Molekularbiologische Charakterisierung und vergleichende Genomik von ausgewählten Vertretern mariner *Roseobacter*-Stämme

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsgrundprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

John Felix Vollmers

aus Bad Soden

Göttingen 2013

Betreuungsausschuss

- **Prof. Dr. Rolf Daniel**, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik
- **Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk**, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent:

Prof. Dr. Rolf Daniel, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Korreferent:

- **Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk**, Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und Genetik
- Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:
- Jun.-Prof. Dr. Kai Heimel, Abteilung für Mikrobielle Zellbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik
- **PD Dr. Michael Hoppert**, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik
- **PD Dr. Wilfried Kramer**, Abteilung für Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik
- **Prof. Dr. Stephanie Pöggeler**, Abteilung für Genetik Eukaryotischer Mikroorganismen, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Ał	obkürz	ungsver	zeichnis	V
1.	Einle	eitung		7
	1.1	Die Vie	elfalt mariner mikrobieller Habitate	7
	1.2	Besond	erheiten der Polarregionen	9
	1.3	Ökolog	ische und wissenschaftliche Bedeutung der <i>Roseobacter</i> -Gruppe	12
	1.4	Physiol	ogische Diversität und Adaptivität der <i>Roseobacter</i> -Gruppe	14
	1.5	Die Ga	ttung Octadecabacter	16
	1.6	Zielsetz	zung	18
2.	Mate	erial & I	Methoden	19
	2.1	Organia	smen und Plasmid-Vektoren	19
	2.2	Kultivi	erung von Bakterien	20
	2.2.	1 Nä	hrmedien	20
	2.2.2	2 Ze	llanzucht	22
	2.2.2	3 Ve	rfolgung des Bakterienwachstums durch photometrische Messungen	23
	2.2.4	4 Ur	tersuchungen zu Schwermetall-Resistenzen	23
	2.2.:	5 M	otilitäts-Tests	23
	2.2.	6 La	gerung von Bakterienkulturen	24
	2.3	Allgem	eine Techniken für die Arbeit mit Nukleinsäuren	25
	2.3.	1 Na Di	tive Agarose-Gelektrophorese zur analytischen Auftrennung von lineare	n 25
	23	2 Ex	traktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren	25
	2	.3.2.1	Extraction von DNA aus Bakterien	26
	2	.3.2.2	Extraktion von RNA aus Octadecabacter-Kulturen	26
	2	.3.2.3	Direkte Aufreinigung von DNA-Fragmenten	27
	2	.3.2.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch präparative Gel- elektrophorese	27
	2.3	3 Ka	przentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
	2.34	4 Fä	llung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren	27
	24	Polyme	rase-Kettenreaktion (PCR)	28
	2.5	Reverse	e Transkription (RT-PCR).	29
	2.6	Klonie	rung von DNA-Fragmenten	30
	2.6.	1 Me	echanische Fragmentierung von DNA für Subklonierungen aus Fosmide	n 30
	2.6.2	2 Er	zeugung von glatten Enden (<i>end repair</i>)	30
	2.6.	3 Er	zeugung von 3'-Adenosinüberhängen	30

2.6.4	Dephosphororylierung von linearen Vektoren und Phosphorylierung v	'on
	Insert-DNA-Fragmenten	
2.6.5	Ligation in pCR TM 4-TOPO® TA-Vektoren	
2.6.6	Ligationen in pET24d- und pBAD/Myc-His A-Vektoren	
2.7 Tra	insformation von DNA in <i>E. coli</i>	32
2.7.1	Transformation durch Elektroporation	32
2.7.2	Transformation durch Hitzeschock-Behandlung	32
2.7.3	Regeneration von rekombinanten Zellen nach der Transformation	32
2.8 Sec	quenzierung von PCR-Produkten und rekombinanten Plasmiden	
2.9 Sec	quenzierung und Annotation der Octadecabacter-Genome	
2.9.1	Rohsequenzierung	
2.9.2	Assemblierung, Lückenschluss und Verbesserung der Sequenzqualität	t 34
2.9.3	Annotation	
2.10 An	alysen von Genom- und Fosmidsequenzen	
2.10.1	Vergleichsgenome	
2.10.2	Gesamtgenom-alignments	
2.10.3	Orthologen-Identifikation	
2.10.4	Identifikation von potentiellen genomischen Inseln	
2.10.5	Vergleiche der Genausstattung (Gene content-Analysen)	
2.10.6	Vergleichende Analysen der Nukleotid-Zusammensetzung	39
2.10.7	Phylogenetische Analysen basierend auf Gen- und Proteinsequenzen.	39
2.11 Sci	eenings von Metagenom-Datenbanken	40
2.12 Fu	nktionelle Analysen von Opsin-Genen	41
2.12.1	Erzeugung von Expressionsstämmen	41
2.12.2	Heterologe Expression von Opsingenen	
2.12.3	Erzeugung und Gewinnung von Membranfragmenten	
2.12.4	Nachweis von Opsinen in Membranfragmenten	
2.12.	4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
2.12.	4.2 Western-Blots	44
2.12.5	Extraktion von Salinixanthin aus Salinibacter ruber	45
2.12.6	Spektralanalysen von Rhodopsingenprodukten	45
2.12.7	Bestimmung der Protonenpumpen-Aktivität von Rhodopsinen	46
3. Ergebnis	SSE	47
3.1 All	gemeine Vergleiche der bislang sequenzierten Roseobacter-Vertreter	
3.1.1	Generelle Genomeigenschaften	
3.1.2	Core- und Pangenom	50
3.1.3	Phylogenie	54
3.1.3	.1 Multilokus Sequenzanalysen (MLSA)	54

3.	.1.3.2	16S + 23S rRNA-Gensequenzvergleiche	56
3.	.1.3.3	Vergleiche auf Basis der Gesamtgenomsequenzen	58
3.2	Speziell	le Betrachtung des Genus Octadecabacter	60
3.2.1	Bio	ogeographie des Genus Octadecabacter	60
3.2.2	2 Ge	nomplastizität der Octadecabacter-Stämme	
3.	.2.2.1	Genomische Inseln und Regionen erhöhter Genomplasitizität	
3.	.2.2.2	Transposable Elemente	
3.	.2.2.3	Pseudogene	67
3.	.2.2.4	Genom-alignments	68
3.2.3	3 Un	terschiede zwischen O. arcticus und O. antarcticus	
3.	.2.3.1	Cyanophycin-Gencluster in O. arcticus	
3.	.2.3.2	Assimilatorische Nitrat-Reduktion in O. antarcticus	75
3.	.2.3.3	Ectoin-Aufnahme und Verwertung	76
3.	.2.3.4	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase(RuBisCO)-ä	hnliches
		Gen	
3.	.2.3.5	Typ IV-Sekretionssystem in O. arcticus	
3.2.4	h Ch	arakteristische Gemeinsamkeiten zwischen O. arcticus und O. ante	arcticus81
3.	.2.4.1	Gene Transfer Agents (GTAs)	
3.	.2.4.2	Flagellen	
3.	.2.4.3	Gasvesikel	
3.	.2.4.4	Quecksilber-Resistenz	
3.	.2.4.5	Kohlenmonoxid-Oxidation	
3.	.2.4.6	Rhamnose Aufnahme- und Verwertungssystem	88
3.	.2.4.7	Cyanat-Hydratase	89
3.	.2.4.8	Weitere Gemeinsamkeiten	
3.2.5	5 Xa	nthorhodopsine	
3.	.2.5.1	Phylogenie der Xanthorhodopsine	
3.	.2.5.2	Biogeographie der Xanthorhodopsine	
3.	.2.5.3	Funktionelle Analysen der Xanthorhodopsine	
	3.2.5.3	S.1 Sequenzbasierte Analysen	96
	3.2.5.3	Experimentelle Analysen	99
3.3	Zusatze	rgebnis: Erste Betrachtung des marinen Myxobakterienclusters (M	MC)
	durch S	equenzanalysen von Fosmid-Klonen	102
4. Disku	ission		104
41	Alloem	eine Genomvergleiche	104
411	Phy	vlogenetische Vergleiche	104
412	$2 Z_{11}$	sammenhänge zwischen Genomeigenschaften und Habitat bzw	
1.1.4	Lel	bensweise	108

	4.1.3	Genomische Flexibilität der Roseobacter-Gruppe	111
	4.1.4	Methodische Aspekte der Roseobacter Genomvergleiche	116
	4.2 Spe	zifische Betrachtung der Octadecabacter-Stämme	118
	4.2.1	Erhöhte Genomplastizität der Octadecabacter Stämme	118
	4.2.2	Rückschlüsse auf die Biogeographie bipolar verbreiteter Organismen	122
	4.2.3	Generelle Adaptionen an Polargebiete bzw. Meereishabitate	124
	4.2.4	Xanthorhodopsine: Ökologie und Funktion	126
	4.2.4	1 Ökologie der Xanthorhodopsine	126
	4.2.4	2 Funktion der Xanthorhodopsine	131
	4.3 Dis	kussion der Zusatzergebnisse: Erste Einblicke in die Genomausstattung	von
	Ver	tretern des marinen Myxobakterienclusters (MMC)	133
5.	Zusamm	enfassung	135
6.	Ausblick		137
7.	Literatu	rverzeichnis	139
8.	Anhang.		155
Ab	bildungsvo	erzeichnis	VII
Ta	bellenverz	eichnis	X

Abbkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromolar
А	Ampere
Acc	<i>Accession</i> -Nummer (Kürzel unter dem Sequenz- und Metainformationen in öffentlichen Datenbanken hinterlegt sind)
AS	Aminosäure
BBH	Bidirektionaler bester hit. Methode der Orthologen-Identifikation
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Programm für Sequenzsuche)
bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
cm	Zentimeter
COG	Cluster of Orthologeous Groups (Protein-Klassifikations Datenbank)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
e-value	<i>Expect value</i> . Parameter zur Bestimmung der statistischen Signifikanz eines BLAST-Treffers
GOLD	Genomes Online Database (Datenbank für Genomprojekte)
GTA	<i>Gene Transfer Agent</i> (Virenartige Partikel welche dem horizontalen Gentransfer dienen)
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser (Millipore, Billerica, USA)
HGT	Horizontaler Gentransfer
His-Tag	Polyhistidinschwanz
ICBM	Institut für die Chemie und Biologie der Meere
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid
IS-Element	Insertionssequenz-Element
kb	Kilobasenpaar(e)
1	Liter
М	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MB	Marine Broth (Mikrobielles Nährmedium)
Mb	Megabasenpaar(e)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar		
n.b.	Nicht bestimmt		
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA		
NCBI-nr	Nicht-redundante Sequenzdatenbank des <i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda, MD, USA		
nm	Nanometer		
Nr.	Nummer		
OD _{600nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
pН	pondus Hydrogenii		
RBH	Reziproker bester <i>hit</i> . Methode der Orthologen-Identifikation. Synonym zu BBH.		
RefSeq	NCBI Reference Sequence Database. Kurierte Sequenzdatenbank von NCBI.		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Revolutions per minute. Umdrehungen pro Minute		
rRNA	Ribosomale RNA		
S	Sekunde		
TE	Transposables Element (transposons und IS-Elemente)		
UV	Ultraviolett		
V	Volt		
z. B.	Zum Beispiel		
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstands)		

1. Einleitung

Die *Roseobacter*-Gruppe, welche im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit steht, repräsentiert einen hohen Anteil der Bakteriengemeinschaften weltweiter mariner Habitate. Diese monophyletische Gruppe der *Alphaproteobacteria* ist phylogenetisch kohärent, aber physiologisch sehr divers (Buchan, Gonzalez & Moran 2005). Dies lässt darauf schließen, dass die Vertreter dieser Gruppe vielfältige ökologische Nischen besetzen. Aufgrund der hohen Diversität und starken Verbreitung der *Roseobacter*-Gruppe in verschiedenen Meeresgebieten ist zu erwarten, dass vergleichende Analysen entsprechender Vertreter entscheidend dazu beitragen können, unser Wissen über biologische Zusammenhänge und Dynamiken in marinen Lebensräumen zu vertiefen. Um ein besseres Verständnis über die Bedeutsamkeit und Komplexität dieses Themas vermitteln zu können, folgt nun zunächst in den Abschnitten 1.1 & 1.2 eine zusammenfassende Darstellung der Vielfalt mariner Habitate. Eine Einführung in die Biologie und Bedeutung der *Roseobacter*-Gruppe wird in den anschließenden Abschnitten 1.3-1.5 gegeben.

1.1 Die Vielfalt mariner mikrobieller Habitate

Meere bedecken ca. 71% der Oberfläche und enthalten mehr als 95% des Wassers unseres Planeten (Kirchman 2008). Mehr als die Hälfte der globalen Primärproduktion wird durch Mikroorganismen in marinen Habitaten geleistet, somit liegt es auf der Hand, dass Meere eine hohe Bedeutung für das Weltklima und unsere Biosphäre haben. Obwohl phototrophe Mikroorganismen wie Cyanobakterien für den Großteil der Primärproduktion in diesen Habitaten verantwortlich sind (im offenen Ozean bis zu 90%), ist der weitaus größere Anteil der marinen Bakterien heterotroph (Kirchman 2008). Diese Organismen sind maßgeblich an der Remineralisierung von Nährstoffen aus organischen Material beteiligt und prägen somit die Stoffkreisläufe in den Ozeanen.

Meere sind im allgemeinen gekennzeichnet durch hohe Salinitäten (durchschnittlich ca. 35 psu) und niedrige Nährstoffkonzentrationen (Giovannoni & Stingl 2005). Darüber hinaus lassen sich im Meer zahlreiche verschiedene Lebensräume unterscheiden. So differenziert man prinzipiell zwischen Benthal (Meeresboden und Sedimente) und Pelagial (Wassersäule). Im Pelagial unterscheidet man wiederum zwischen freilebenden, aggregatgebundenen und wirtsassoziierten Bakteriengemeinschaften. Die Eindringtiefe des Sonnenlichts in die Wasser-

säule ist begrenzt, weshalb sich im oberflächennahen Bereich eine photische Zone, das Epipelagial, von bis zu 200 m Tiefe abgrenzen lässt. Innerhalb dieser Zone ist Photosynthese möglich, allerdings nehmen Lichtintensität und -spektrum in ihrem Tiefenverlauf ab. Der Großteil der Primärproduktion findet in dieser oberflächennahen Schicht statt und wird auch hier wieder in Mineralstoffe umgesetzt. Demgegenüber ist die Tiefsee geprägt durch die Abwesenheit von Licht, vergleichsweise niedrige Zelldichten, hohen Druck und größtenteils niedrige Temperaturen (Horikoshi & Tsujii 1999). Einige Organismen sind spezifisch an diese Bedingungen angepasst und benötigen beispielsweise einen hohen Wasserdruck für optimales Wachstum (Lauro & Bartlett 2008; Fang, Zhang & Bazylinski 2010). Die genannten Umweltfaktoren ändern sich graduell mit zunehmender Tiefe, jedoch sind die genauen Abgrenzungen zwischen den einzelnen Tiefseezonen (Meso-, Bathy-, Abysso- und Hadopelagial) biologisch nicht von Bedeutung. Trotz des Mangels an Licht gibt es auch auf dem Grund der Tiefsee produktive Gemeinschaften in Form von chemoautotrophen Organismen, beispielsweise am Rande von Hydrothermalquellen. Dennoch erfolgt der Eintrag organischer Nährstoffe in die Tiefsee zum überwiegenden Teil durch den Import von "gelöstem" organischem Material (dissolved organic matter, DOM) oder durch Sedimentation von Aggregaten "partikulären" organischen Materials (POM), auch Marine Snow genannt, aus dem Epipelagial (Jiao et al. 2010). Marine Snow-Aggregate stellen, je nach Herkunft und Beschaffenheit, wiederum eigene sehr dynamische mikrobielle Habitate dar (Alldredge & Silver 1988).

Auch geographisch gibt es Unterschiede zwischen marinen Lebensräumen. In Küstengebieten führen Auftrieb von Tiefenwasser sowie Einträge aus Flüssen zu anderen Nährstoffverhältnissen als im offenen Ozean. Ferner gibt es, vor allem entlang der Längengrade, starke Gefälle der Oberflächentemperatur (Abb. 1A) sowie der saisonalen Ausprägung von Tag-Nacht-Zyklen. Einerseits werden hierdurch die jeweiligen Bakteriengemeinschaften direkt indem sich verschiedene Temperaturoptima und Ernährungsstrategien beeinflusst. durchsetzen. Andererseits wird, vor allem in flachen küstennahen Schelfmeeren, die Transpirationsrate und somit die Salinität in den entsprechenden oberflächennahen Wasserschichten beeinflusst. In den Polarmeeren führen dagegen die Bildung und das Abschmelzen von Meereis zu Veränderungen der Salinität. Aus diesen Prozessen resultieren starke regionale Unterschiede in Temperatur, Salinität und Dichte, die das Aufsteigen bzw. Absinken von Wassermassen bedingen. Dieser Prozess treibt globale Meeresströmungen an und bewirkt, dass sich unterschiedliche Wassermassen übereinander schieben. Hierdurch ergeben sich regional verschiedene Schichtungen welche auch biologisch von Bedeutung sein können (Abb. 1B).





A) Die kartographische Darstellung der marinen Oberflächentemperaturen wurde aus Wikimedia Commons (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Weeklysst.gif) entnommen und bearbeitet. Die marinen Oberflächentemperaturen sind durch eine Farbskala dargestellt. Weiße Flächen stellen Meeresgebiete mit Eisbedeckung dar. Auf diese Karte wurde der grobe Verlauf wichtiger Meeresströmungen projiziert. Blaue Pfeile stellen Tiefenströmungen, rote Oberflächenströmungen dar. B) Salinitätsprofil der CTD-Stationen der Polarstern-Expedition ANTXXVII-5 (Erstellt von Florian Remke, ICBM, Oldenburg). Salinitäten sind durch eine Farbskala dargestellt. Verschiedene Wassermassen lassen sich durch distinkte Übergänge des Salzgehaltes unterscheiden. Zu erkennen sind die Wassermassen Antarctic Intermediate Water (AAIW), Antarctic Bottom Water (AABW), North Atlantic Deep Water (NADW) und Mediterranean Outflow Water (MOW). Die jeweilige Strömungsrichtung ist durch Pfeile angezeigt.

1.2 Besonderheiten der Polarregionen

Unter den weltweiten Meeresgebieten nehmen das Südpolarmeer und das Nordpolarmeer eine Sonderstellung ein. Diese Meere sind durch physische Barrieren von den übrigen Ozeanen abgetrennt: das Nordpolarmeer durch umgebende Landmassen und das Südpolarmeer durch eine starke Oberflächenströmung, dem sogenannten Zirkumpolarstrom (*Antarctic* *Circumpolar Current*, ACC). Absinkendes salzreiches und kaltes Wasser aus diesen Regionen bildet Ausgangspunkte für wichtige Tiefenströmungen wie das *North Atlantic Deep Water* (NADW) und das *Antarctic Bottom Water* (AABW) (Morozov *et al.* 2010). Diese Tiefenströmungen sind treibende Kräfte des "globalen Förderbandes", welches das Weltklima maßgeblich beeinflussen (Broecker 1991). Die Umweltbedingungen in diesen Gebieten weisen extreme saisonale Schwankungen auf, vor allem in Bezug auf Temperatur und Licht-intensität. Die durchschnittlichen Wassertemperaturen sind allgemein deutlich niedriger als in allen anderen marinen Habitaten. Entsprechend sind in diesen Regionen spezialisierte, überwiegend psychrotolerante und psychrophile Organismen vorzufinden (Staley & Gosink 1999).

Sowohl das Nord- als auch das Südpolarmeer weisen eine großflächige, saisonal schwankende Eisbedeckung auf. Dieses Meereis stellt einen eigenen, extremen und einzigartigen Lebensraum dar. Meereis ist gekennzeichnet von niedrigen Nährstoff-Diffusionsraten und starken räumlichen sowie zeitlichen Gradienten in Temperatur, Salinität und Lichteinfall. Man unterscheidet zwischen einjährigem Meereis, welches im Verlauf des nächsten Sommers wieder vollständig schmilzt, und mehrjährigem Meereis, welches aufgrund seiner Dicke mindestens eine Sommerperiode übersteht. Meereis entsteht aus gefrierendem Meerwasser und ist somit deutlich von Schelfeis und Eisbergen abzugrenzen, welche glazialen Ursprungs sind. Die Bildung von Meereis beginnt wenn die Wassertemperatur auf ca. -1,9 °C abgesunken ist. Das im Meerwasser enthaltene Salz wird im Laufe des Gefrierprozesses ausgeschieden und sammelt sich teilweise als konzentrierte Salzlake in kleinen Kanälen innerhalb des Eises an. Dadurch variieren die Salinitäten innerhalb des Meereises extrem. Zwischen den Eiskristallen herrschen nahezu Süßwasserbedingungen, während die Salzlake-Kanäle mehr als dreifach höhere Salinitäten als Meerwasser aufweisen können. Je höher die Eisschicht wächst, desto stärker bilden sich vertikale Temperaturgradienten zwischen der oberen Grenzschicht zur Luft und der unteren Grenzschicht zum Meerwasser aus. Während der untere Bereich des Meereises nahezu konstante Temperaturen nahe am Gefrierpunkt des Meerwassers (-1,9 °C) aufweist, schwankt die Temperatur im oberen Bereich mit den polaren Lufttemperaturen, welche -50 °C unterschreiten können (Thomas & Dieckmann 2002).

Während des Eisbildungsprozesses werden auch Organismen des Meerwassers in der wachsenden Eismatrix eingeschlossen. Einige dieser Organismen sind speziell an diesen extremen Lebensraum angepasst und können dort gedeihen, während andere nur überdauern oder absterben. Folglich unterscheiden sich die Bakteriengemeinschaften des Meereises signifikant von denen des darunterliegenden Meerwassers (Bowman *et al.* 2012). Im Gegensatz zu polaren Meerwasserbakterien, welche größtenteils psychrotolerant zu sein scheinen (Delille 1992; Pesciaroli *et al.* 2012), sind Meereisbakterien zum überwiegenden Teil psychrophil (Bowman *et al.* 1997; Junge, Christner & Staley 2011). Sowohl im Meereis als auch im Meerwasser werden mikrobielle Gemeinschaften der Polargebiete häufig dominiert von *Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria* und Vertretern der *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodetes* (CFB)-Gruppe (Brinkmeyer *et al.* 2003; Bowman *et al.* 2012), wobei die genauen Verhältnisse allerdings starken saisonalen Schwankungen unterliegen (Collins, Rocap & Deming 2010; Ghiglione & Murray 2012). Archaeen hingegen, welche üblicherweise mit extremen Standorten assoziiert werden, sind zwar in polarem Meerwasser stark vertreten, aber in Meereis überraschenderweise nur in relativ geringer Zahl nachzuweisen (Collins, Rocap & Deming 2010).

Die stabilsten Lebensbedingungen sind im unteren Bereich des Meereises zu finden. Aufgrund des nahen Kontaktes mit dem darunterliegenden Meerwasser findet hier noch am ehesten eine Diffusion von Nährstoffen aus der Wassersäule statt, und auch Schwankungen der Salinitäten und Temperaturen sind weniger stark ausgeprägt als in höheren Bereichen. Bei geringer oder fehlender Schneedecke sind hier zudem auch die Lichtintensitäten selbst bei bis zu zwei Meter dicken Eisschichten noch ausreichend für photoautotrophe Ernährung. Aus diesen Gründen bildet sich vorwiegend in den unteren 10-20 cm des Meereises häufig eine überaus dichte und hochproduktive mikrobielle Gemeinschaft aus: die sogenannte *Sea Ice Microbial Community* (SIMCO) (Hollibaugh, Lovejoy & Murray 2007). Die primären Produzenten der SIMCO sind Diatomeen. Diese bewirken durch ihre charakteristische Färbung, dass die SIMCO in Querschnitten von Meereis als deutlich erkennbare bräunliche Bande hervortritt (Staley & Gosink 1999).

Trotz vieler Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich Nord- und Südpolarregionen in einigen Punkten deutlich voneinander. Das Nordpolarmeer (Arktis) ist eng von den nördlichen Grenzen der Landmassen Nordamerikas, Asiens und Europas umschlossen und somit starken terrestrischen und anthropogenen Einflüssen ausgesetzt. Eine eigene Landmasse ist jedoch nicht vorhanden, vielmehr handelt es sich um ein reines Meeresgebiet. Die Antarktis dagegen ist ein eigenständiger, zu großen Teilen mit Eis bedeckter, Kontinent umschlossen vom weitläufigen Südpolarmeer. Das Ausmaß terrestrischer Einflüsse, beispielsweise durch den Eintrag von Flüssen, ist im Südpolarmeer vergleichsweise gering. Inwiefern sich diese Unterschiede auf die mikrobiellen Gemeinschaften dieser Habitate auswirken, ist bislang noch nicht ausreichend verstanden. Ebenso wenig ist bekannt, inwiefern sich diese geographisch getrennten Gemeinschaften gegenseitig beeinflussen, denn auf rRNA Gensequenzebene existieren zum Teil bemerkenswerte Parallelen (Staley & Gosink 1999). So weisen einige Taxa eine bipolare Verteilung (Anwesenheit nah verwandter Vertreter in beiden Polarregionen, aber Abwesenheit in temperaten und tropischen Regionen) auf (z. B. Montresor *et al.* 2003; Bano *et al.* 2004; Pearce *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2010). Eine solche Verteilung wurde auch bei eindeutig psychrophilen Organismen beobachtet, welche einen Transport über warme Äquatorregionen, beispielsweise über Oberflächenströmungen oder mittels Verschleppung durch Zugvögel, nicht überleben würden (z. B. Gosink, Herwig & Staley 1997; Comte *et al.* 2007). Detaillierte Genomanalysen, wie die hier vorliegende Arbeit, tragen dazu bei, die genauen Verwandtschaftsbeziehungen sowie potentielle Unterschiede zwischen solchen bipolar verbreiteten Organismen zu beleuchten.

1.3 Ökologische und wissenschaftliche Bedeutung der *Roseobacter*-Gruppe

Die *Roseobacter*-Gruppe ist eine monophyletische Gruppe innerhalb der Familie *Rhodobacteraceae*, welche wiederum der Klasse *Alphaproteobacteria* angehört (Buchan, Gonzalez & Moran 2005). Ihr Name ist von den ersten charakterisierten Isolaten dieser ursprünglich nur in 16S rRNA Genbanken nachgewiesenen Gruppe abgeleitet: *Roseobacter litoralis* und *Roseobacter denitrificans* (Shiba 1991). Diese beiden Arten repräsentieren jedoch nur einen der mittlerweile fast 40 beschriebenen Genera dieser Gruppe (Brinkhoff, Giebel & Simon 2008). Die bislang bekannten Mitglieder der *Roseobacter*-Gruppe sind fast ausschließlich marine oder zumindest halotolerante, aquatische Organismen. Eine Ausnahme stellt die Gattung *Ketogulonicigenium* dar, deren Vertreter aus Bodenproben stammen (Urbance *et al.* 2001). Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe stellen in küstennahen Oberflächenschichten bis zu 25% der marinen Bakterienpopulation (Buchan, Gonzalez & Moran 2005). Sie sind in allen geographischen Breiten (siehe Tab. DA01, digitaler Anhang) und in einer Vielzahl unterschiedlicher ökologischer Nischen (Abb. 2) zu finden. Viele Vertreter scheinen in ihrer Verbreitung auf bestimmte Klimazonen beschränkt zu sein, doch einige sind nahezu ubiquitär (Brinkhoff, Giebel & Simon 2008).

Obwohl die *Roseobacter*-Gruppe eine hohe ökologische Bedeutung besitzt, stellt sie nicht die am stärksten vertretene bakterielle Gruppe in marinen Habitaten dar. Der Großteil der Bakteriengemeinschaften in marinen Habitaten wird durch weniger als 20 phylogenetische Gruppen aus 11 bakteriellen Phyla ausgemacht (Giovannoni & Stingl 2005; Kirchman 2008).



Abb. 2 Herkunft exemplarischer Vertreter der Roseobacter-Gruppe

Dargestellt sind Bezeichnung sowie Herkunft verschiedener mariner *Roseobacter*-Vertreter zur Verdeutlichung der hohen ökologischen Vielfalt der *Roseobacter*-Gruppe.

Die meisten dieser Gruppen sind dem Phylum Bacteriodetes, und den Klassen Gammaproteobacteria und Alphaproteobacteria des Phylums Proteobacteria zugehörig. Vor allem in oberflächennahen Wasserschichten werden Alphaproteobacteria hauptsächlich durch den SAR11-Cluster und die Roseobacter-Gruppe repräsentiert. Der SAR11-Cluster ist mit einem Anteil von 33% an der Bakteriengemeinschaft in der photischen Zone und von 25% der Gemeinschaft im Mesopelagial meist abundanter als die Roseobacter-Gruppe und damit die weltweit in marinen Habitaten am stärksten vertretene Bakteriengruppe (Morris et al. 2002). Da sich Vertreter dieses Clusters jedoch nur mit speziellen Kultivierungsmethoden isolieren und anziehen lassen (Rappé et al. 2002), sind sie als Modellorganismen wenig geeignet. Anders stellt es sich für die Roseobacter-Gruppe dar: Vertreter dieser Gruppe sind durch kultivierungsunabhängige Untersuchungen in hoher Zahl nachweisbar (González & Moran 1997), aber auch häufig und aus diversen marinen Habitaten isoliert worden (Abb. 2) und somit leicht unter Laborbedingungen anzuziehen. Dies eröffnet die Möglichkeit intensiver physiologischer Laborversuche, wodurch Roseobacter-Vertretern eine enorme wissenschaftliche Bedeutung als repräsentative Modellorganismen mariner Habitate zukommt (Nichols 2007).

1.4 Physiologische Diversität und Adaptivität der Roseobacter-Gruppe

Entsprechend ihrer oben beschriebenen ökologischen Vielfalt (Abb. 2), weist die *Roseobacter*-Gruppe eine enorme physiologische Diversität auf (Wagner-Döbler & Biebl 2006). Die Verteilung prägnanter Merkmale auf die verschiedenen Vertreter dieser Gruppe scheint jedoch zu großen Teilen unabhängig von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen zu sein. So werden diverse Eigenschaften von phylogenetisch entfernten Vertretern geteilt, während sie in den jeweils nächstverwandten Organismen nicht vorhanden sind (Moran *et al.* 2007). Dies deutet auf einen ausgedehnten horizontalen Gentransfer (HGT) zwischen *Roseobacter*-Vertretern hin, eine Annahme die durch die hohe Verbreitung von *Gene transfer agents* (GTAs) innerhalb dieser Organismengruppe unterstützt wird (Newton *et al.* 2010). Bei GTAs handelt es sich um Phagen-ähnliche Partikel, welche zufällige Fragmente des Wirtsgenoms verpacken und auf nah verwandte Organismen übertragen können (Biers *et al.* 2008). Wie ausgeprägt HGT innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe stattfindet und in welchem Ausmaß Gentransfers durch GTAs vermittelt werden, ist jedoch bislang nicht vollständig bekannt.

Zu den in verschiedenen Vertretern beschriebenen Merkmalen gehören unter anderem die Befähigung zur Kohlenmonoxid-Oxidation (Moran et al. 2004), fakultativ anaerobes Wachstum (Swingley et al. 2007), assimilatorische und dissimilatorische Nitratreduktion (Shiba 1991) und die Fixierung von Kohlenstoffdioxid (Newton et al. 2010). Wirtschaftliche Bedeutung könnten einige Roseobacter-Isolate durch ihren antagonistischen Effekt auf das Wachstum von Meeresalgen und andere durch die Produktion von antibiotisch wirksamen Substanzen erlangen (Wagner-Döbler & Biebl 2006). Einige Vertreter, wie beispielsweise Roseobacter litoralis und Roseobacter denitrificans, sind in der Lage, sogenannte anaerobe anoxygene Photosynthese (AAnP) zu betreiben. Der Begriff "Photosynthese" ist in diesem Zusammenhang jedoch irreführend, da dieser Prozess nicht zur Fixierung von Kohlenstoff führt und somit keine Photosynthese im klassischen Sinne darstellt. Vielmehr handelt es sich um einen Mechanismus der photoheterotrophen Ernährung. Vor wenigen Jahren wurde in den Genomsequenzen der drei *Roseobacter*-Vertreter *Octadecabacter* arcticus 238, Octadecabacter antarcticus 307 und Rhodobacteraceae sp. HTCC2255 ein weiteres Merkmal identifiziert, welches mit photoheterotropher Energiegewinnung in Zusammenhang steht: mikrobielles Rhodopsin. Aufgrund der hohen Bedeutung die den Rhodopsinen in dieser Doktorarbeit zugeordnet wird, werden bekannte Eigenschaften solcher Proteine im Folgenden detailliert beschrieben.



Abb. 3 Mikrobielle Rhodopsine. Schematischer Aufbau

A) Aufbau eines Rhodopsins. Oben: lineare Darstellung des Opsin-Apoproteins, bestehend aus sieben Transmembranhelices (Helices A-G). Unten: Opsine bilden Taschen innerhalb der Zellmembran. Erst durch die Bindung eines Retinalmoleküls an Helix G im Inneren dieser Tasche entsteht ein funktionales Rhodopsin mit der charakteristischen rötlichen Färbung. Lichtinduzierte Konformitätsveränderungen des Rhodopsins bewirken eine Translokation von Protonen oder Kationen. B) Lichtabhängige Strukturänderung von All-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal.

Rhodopsine, auch als Retilyden-Proteine bezeichnet, sind photoaktive Membranproteine (Spudich *et al.* 2000). Der Apoenzym-Teil des Rhodopsins wird als Opsin bezeichnet, dieser bindet das Vitamin A-Aldehyd Retinal als prosthetische Gruppe und Chromophor. Man unterscheidet Typ II Rhodopsine, welche als Sehpigmente in der Netzhaut von höheren Tieren vorkommen, und Typ I Rhodopsine (auch mikrobielle Rhodopsine genannt), welche in den Membranen von Mikroorganismen wie Archaeen, Bakterien und Pilzen vorkommen (Spudich *et al.* 2000; Spudich & Jung 2005). Typ I Rhodopsine sind phylogenetisch und funktional sehr divers (McCarren & DeLong 2007). Sie teilen jedoch eine hochkonservierte Tertiärstruktur aus sieben Transmembran-Helices, welche eine Tasche innerhalb der Zellmembran bilden (Abb. 3A). Der Chromophor wird in Form von all-*trans*-Retinal kovalent über eine protonierte Schiffsche Base (-NH⁺=) an eine konservierte Lysin-Seitengruppe im Inneren dieser Tasche gebunden.

Wird das Retinal durch Licht angeregt, ändert sich seine isomere Form zu 11-*cis*-Retinal (Abb. 3B). Dies führt zu einer Reihe von Konformationsänderungen des Rhodopsins (Haupts, Tittor & Oesterhelt 1999), welche je nach phylogenetischer Zugehörigkeit für unterschiedliche Prozesse genutzt werden können (McCarren & DeLong 2007):

Energiegewinnung durch Protonentranslokation, Aufrechterhaltung von Salinitätsgradienten durch Ionentranslokation oder Anpassung an veränderte Lichtverhältnisse durch Signaltransduktion. Im Folgenden werden die verschiedenen bekannten Rhodopsingruppen und ihre jeweiligen Eigenschaften vorgestellt.

Bacterio-, Halo- und sensorische Rhodopsine fungieren jeweils als Protonenpumpen, Ionenpumpen oder Signaltransduktoren. Sie sind größtenteils archaeellen Ursprungs, jedoch gibt es auch zahlreiche bakterielle Vertreter. Eng verwandt mit diesen Gruppen sind die fungalen Rhodopsine, deren genaue Funktion jedoch noch nicht geklärt ist (Brown 2004). Die große Gruppe der Proteorhodopsine dagegen ist hauptsächlich bakteriellen Ursprungs und es wird angenommen, dass es sich bei diesen Rhodopsinen größtenteils um Protonenpumpen handelt (Fuhrman, Schwalbach & Stingl 2008). Diese Gruppe ist vor allem unter marinen Bakterien weit verbreitet (de la Torre *et al.* 2003; McCarren & DeLong 2007). Balashov *et al.* beschrieben schließlich 2005 mit den Xanthorhodopsinen eine weitere Gruppe von Rhodopsinen (Balashov *et al.* 2005; Imasheva *et al.* 2009), welche phylogenetisch zwischen den größtenteils archaeellen Bacteriorhodopsinen und den Proteorhodopsinen liegt. Diese neue Gruppe weist die unter mikrobiellen Rhodopsinen einzigartige Eigenschaft auf 4-keto-Carotenoide als Antennenpigmente zu binden.

1.5 Die Gattung Octadecabacter

In polaren marinen Habitaten wird die *Roseobacter*-Gruppe hauptsächlich durch den Genus *Octadecabacter* repräsentiert. Die Typstämme der zwei beschriebenen Arten dieses Genus, *Octadecabacter arcticus* 238 und *Octadecabacter antarcticus* 307, wurden aus den unteren 20 cm von Eiskernen arktischen bzw. antarktischen Packeises isoliert (Gosink, Herwig & Staley 1997). Sie waren Teil einer großen Gruppe von phylogenetisch sehr diversen heterotrophen Bakterien, welche in den Jahren 1989 bis 1993 von Gosink und Staley aus arktischem und antarktischem Meerwasser und -eis isoliert wurden und durch das Vorhandensein von Gasvesikeln auffielen (Gosink & Staley 1995). Dabei handelt es sich um intrazelluläre, gasgefüllte Proteinstrukturen welche der vertikalen Positionierung innerhalb der Wassersäule dienen (Walsby 1994; Pfeifer 2012) und für heterotrophe Bakterien mariner Habitate eher ungewöhnlich sind (Staley & Gosink 1999). Der Name *Octadecabacter* begründet sich durch den erhöhten Anteil einfach ungesättigter Octadecansäure in den Membranen dieser Isolate, durch den sich die Vertreter dieses Genus von den übrigen

heterotrophen Gasvesikel-bildenden Bakterien der Polargebiete abgrenzten (Gosink, Herwig & Staley 1997). Für Vertreter des *Roseobacter*-Clusters ist ein solch hoher Anteil an Octadecansäure jedoch nicht ungewöhnlich.

Die beschriebenen Vertreter der beiden Arten weisen keine Pigmentierung auf und gelten als unbeweglich. Sie sind psychrophil und somit endemisch in den jeweiligen Polarregionen, da die zumeist wärmeren Oberflächentemperaturen anderer Gewässer für sie lebensfeindlich wären. Bakterien dieser Gattung werden in polarem Meerwasser und Meereis häufig nachgewiesen (Brinkmeyer *et al.* 2003; Bowman *et al.* 2012; Grzymski *et al.* 2012). Es handelt sich somit um autochthone Vertreter dieser Habitate.

Stämme der beiden *Octadecabacter*-Arten stimmen in über 99% ihrer 16S rRNA Gensequenz überein. Dies ist in Anbetracht ihres jeweiligen endemischen Vorkommens, das scheinbar keine direkte räumliche Verbindung aufweist, bemerkenswert. Die Ähnlichkeiten auf 16S rRNA Sequenzebene sind so gravierend, dass es nicht möglich ist, die genaue Artzugehörigkeit nur anhand dieses Markers zu bestimmen. Dass trotzdem zwei verschiedene Arten deklariert wurden, liegt an den niedrigen DNA/DNA-Hybridisierungswerten der jeweiligen Typstämme *O. arcticus* 238 und *O. antarcticus* 307. Diese weisen demnach auf Gesamtgenom-Ebene nur eine Übereinstimmung von 42%, weit unterhalb des Grenzwertes für identische Spezies, auf (Wayne *et al.* 1987). Diese Diskrepanz zwischen den Sequenzidentitäten auf Ebene der 16S rRNA und des Gesamtgenoms, verbunden mit der speziellen Biogeographie und dem extremen Habitats der *Octadecabacter*-Arten, macht diese Vertreter besonders interessant für vergleichende Genomanalysen.

1.6 Zielsetzung

Auch in Zeiten intensiver Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierungen ("metaomics") bleiben Genomanalysen einzelner Isolate essentiell. Die teilweise sehr hohe Sequenzvariabilität innerhalb von Populationen sowie potentieller horizontaler Gentransfer zwischen den Spezies erschweren die Assemblierung von meta-omics-Daten zu einem schlüssigen Gesamtbild. Vollständige Genomsequenzen sind hierbei hilfreich, da sie als Referenzen für die Assemblierung von Metagenomdaten dienen können. Zudem erlauben sie die Betrachtung genetischer Informationen in Bezug auf die jeweiligen Organismen und deren spezifischer Gesamtausstattung, was bei Metagenomen nur sehr begrenzt möglich ist. Aus diesen Gründen befasst sich die vorliegende Arbeit mit vergleichenden Genomanalysen repräsentativer Bakterienstämme der Roseobacter-Gruppe. Es sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der genetischen Ausstattung verschiedener Roseobacter-Vertreter identifiziert und mit Habitateigenschaften bzw. individueller Lebensweise der Vergleichsorganismen in Zusammenhang gebracht werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen globale Dynamiken zwischen marinen Bakterienpopulationen sowie spezifische genetische Anpassungen an unterschiedliche marine Lebensräume aufzuzeigen und zu verstehen. Ein besonderer Schwerpunkt soll auf die Genomanalyse von Octadecabacter arcticus 238 und Octadecabacter antarcticus 307, den Typstämmen der beiden Arten des Genus Octadecabacter, gelegt werden. Hierfür sollen die bislang nur als Rohsequenzen verfügbaren Genomsequenzen dieser Organismen vollständig geschlossen, auf Sequenzungenauigkeiten hin überprüft und anschließend intensiv Untersucht werden.

Die Octadecabacter-Typstämme nehmen aufgrund ihres besonderen Meereishabitats sowie ihrer bipolaren geographischen Verteilung innerhalb der Roseobacter-Gruppe eine Sonderstellung ein. Daher sollen die Genomdaten genutzt werden um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen arktischen und antarktischen Octadecabacter-Populationen zu beleuchten und potentielle Habitat-spezifische Anpassungen zu identifizieren. Diese Ergebnisse sollen das Verständnis der Biogeographie, Genomdynamik und Anpassungsfähigkeit mariner Roseobacter-Vertreter weiter vertiefen.

In diesem Zusammenhang soll auch die Bedeutung und Funktion der innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe einzigartigen Xanthorhodopsine in den *Octadecabacter*-Stämmen genauer untersucht werden.

18

2. Material & Methoden

2.1 Organismen und Plasmid-Vektoren

Bakterienstämme und Vektoren, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgelistet.

Organismus	Funktion/Beschreibung/Referenz	Herkunft
Octadecabacter arcticus 238	Typstamm (Gosink, Herwig & Staley 1997)	CRBIP, Paris, Frankreich
Octadecabacter antarcticus 307	Typstamm (Gosink, Herwig & Staley 1997)	CRBIP, Paris, Frankreich
Gloeobacter violaceus PCC7421	Typstamm (Rippka, Waterbury & Cohen-Bazire 1974)	CRBIP, Paris, Frankreich
Salinibacter ruber	Typstamm (Anton et al. 2002)	DSMZ, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> C43(DE3) (Chemisch kompetent)	Expressionsstamm. Angepasst für Überexpression von Membranproteinen (Miroux & Walker 1996)	Lucigen, Middleton, WI, USA
<i>Escherichia coli</i> UT5600 (Chemisch kompetent)	Expressionsstamm. Wurde bereits für heterologe Expression von Rhodopsinen verwendet (Beja <i>et al.</i> 2000)	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>Escherichia coli</i> DH10B TM (Elektrokompetent)	Transformationsstamm	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> DH5α (Elektrokompetent)	Transformationsstamm	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> pBAD_ EBAC31A08	Subklon des Proteorhodopsingens von EBAC31A08 (Beja <i>et al.</i> 2000)	DeLong, E.F., MIT, Cambridge, MA, USA

Tab.	1	Verwendete	Bakterienstämme
ran.		ver wenuete	Dakterichstamme

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pBAD/ <i>Myc</i> -His A	Amp ^r , <i>araC</i> , <i>myc</i> , 6xHis	Invitrogen TM (Fa. Life Technologies, Darmstadt)
pET24d	Kan ^r , <i>lacI</i> , 6xHis	Novagen [®] (Fa. Merck, Darmstadt)
pCR TM 4-TOPO [®] TA	Amp ^r , Kan ^r , <i>lacZα</i>	Invitrogen TM (Fa. Life Technologies, Darmstadt)

2.2 Kultivierung von Bakterien

2.2.1 Nährmedien

E. coli-Kulturen wurden standardmäßig in Luria-Bertani-(LB)-Medium angezogen (1% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 1% [w/v] NaCl). Nach Transformationen (siehe 2.7) wurde SOC-Medium (2% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 1% [w/v] NaCl, 1,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) zur Zellregeneration verwendet.

Salinibacter ruber-Kulturen wurden in einem hypersalinen Medium nach Anton *et al.* (Medium B; 2002) angezogen, während für *Gloeobacter violaceus*-Kulturen das Medium BG-11 verwendet wurde. Marine *Roseobacter* Vertreter, wie die *Octadecabacter*-Stämme, wurden in modifiziertem *Marine Broth* (MB) 2216-Medium oder in modifiziertem *Sea Water Complete* (SWC)-Medium angezogen. Da diese Medien weniger geläufig und zum Teil komplexer sind als die Standard-Medien der *E. coli*-Anzucht, ist die jeweilige Zusammensetzung in den untenstehenden Tabellen gesondert aufgeführt.

S. ruber Medium B	
NaCl	195 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	34,6 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	49,5 g
$CaCl_2 \ge 2 H_2O$	1,25 g
KCl	5 g
NaHCO ₃	0,25 g
NaBr	0,625 g
Hefe-Extrakt	1 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

pH-Wert auf 7.2 eingestellt

NaNO ₃	1,5	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	4	mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75	mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	36	mg
Citronensäure	6	mg
Ammoniumeisen(III)-citrat	6	mg
EDTA (Dinatriumsalz)	1	mg
NaCO ₃	20	mg
Spurenelement-Lsg. A5	1	ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1000	ml

Spurenelement-Lsg. A5		
H ₃ BO ₃	2,86	g
$MnCl_2 \ge 4 H_2O$	1,81	g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,222	g
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,39	g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	79	mg
Co(NO ₃)2 x 6 H ₂ O	49,4	mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1000	ml

pH lag nach dem Autoklavieren bei 7,1

MB-Medium (modifiziert)

MB-Komponente A	500 ml		
MB-Komponente B	500 ml		
Beide Komponenten	wurden		
getrennt angesetzt und	nach dem		
Autoklavieren vereint			

MB-Komponente A (modifiziert)

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
Pepton	10	g
Hefeextrakt	2	g
Eisen(III)citrat	0,2	g
Na2SO ₄	6,48	g
NaCl	38,9	g
KCl	1,1	g
NaHCO ₃	0,32	g
Tris	2.4	g
MB-Spurenelementlsg.	10	ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1	1

pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt

SWC-Medium

NaCl	24	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ 0	7	g
MgCl x 6 H ₂ 0	5,2	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ 0	1,2	g
KCl	0,7	g
KH ₂ PO ₄	10	mg
Eisen-Citrat	1	mg
NH ₄ Cl	0,4	g
Hefeextrakt	0,4	g
Rindfleischextrakt	0,4	g
Trypton	0,4	g
Tris	2,4	g
SWC-Vitamin-Lsg. (1000x)	1	ml
Spurenelement-Lsg. TES	2	ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1	1

pH wurde auf 7,5 eingestellt

MB-Medium Komponente B (modifiziert)

(mouniziert)		
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	25,2	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4,76	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,02	g
Tris	2,4	g
H ₂ O _{bidest}	ad 1	1

pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt

MB-Spurenelementlsg.

KBr	8 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	5,7 g
H_3BO_3	2,2 g
NaF	0,24 g
$H_4N_2O_3$	0,16 g
$Na_2O_7Si_3$	0,5 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1 1

SWC-Vitamin-Lsg. (1000x)		
Biotin	20	mg
Folsäure	20	mg
Pyridoxin-HCL	100	mg
Riboflavin	50	mg
Thiamin-HCL	50	mg
Nicotinamid	50	mg
D-Panthothensäure,		
Calciumsalz	50	mg
Vitamin B12	1	mg
4-Aminobenzoesäure	50	mg
Ethanol (50%)	ad 1	1

.....

Spurenelement-Lsg. TES

$ZnSO_4 x 7 H_20$	100	mg
$MnCl_2 \ge 4 H_20$	30	mg
H ₃ Bo3	300	mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200	mg
$CuCl_2 \ge 2 H_2O$	10	mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20	mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ 0	30	mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1	1

Bei Wachstumsversuchen mit verschiedenen Nährstoffkonzentrationen wurde das MB-Medium zusätzlich modifiziert. Die Menge an zugegebenen Pepton und Hefeextrakt wurde in diesen Fällen auf 10%, 1% oder 0,1% der oben angegebenen Mengen reduziert. Für Wachstumsversuche mit verschiedenen Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen wurde das SWC-Medium modifiziert. In diesen Fällen wurde die Menge an Hefeextrakt auf 0,05 g/L herabgesenkt. Auf Pepton wurde vollständig verzichtet, und stattdessen eine der folgenden Kohlenstoffquellen in Endkonzentrationen von 33,3 mM zugegeben: Ectoin, Hydroxyectoin, Glucose oder Rhamnose. Als Negativkontrolle dienten Medien ohne Zugabe einer Kohlenstoffquelle. Bei Wachstumsversuchen mit verschiedenen Stickstoffquellen wurde darüber hinaus Ammoniumchlorid durch 8 mM Natriumnitrat ersetzt. Als Negativkontrollen dienten Medien, welche weder Ammoniumchlorid noch Natriumnitrat enthielten.

2.2.2 Zellanzucht

Flüssigkulturen wurden größtenteils in Schikanekolben angezogen. Für Wachstumsversuche mittels eines Klett-Summerson-Photometers (siehe 2.2.3) wurden Flüssigkulturen in Reagenzgläsern angezogen. Angeimpft wurde entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte, oder mit 1 µl einer Glycerol-Stammkultur. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte auf einem Rundschüttler bei 225 rpm. Kulturen von *E. coli* und *S. ruber* wurden bei 37 °C angezogen, *Octadecabacter*-Kulturen dagegen bei 4-8 °C. Für Wachstumsversuche von *Octa-decabacter*-Kulturen bei verschiedenen Lichteinflüssen wurde eine selbstgefertigte Lichtbank (Patrick Regin, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen), bestehend aus zwei 18 W Vollspektrum-Leuchtstoffröhren des Typs "Solar Natur 9000K" (Fa. JBL, Neuhofen) in einem Abstand von 30 cm über den Kulturgefäßen angebracht. Kulturen von *G. violaceus* PCC 7421 wurden bei 22 °C in einem Innova 4230 Inkubator (Fa. Eppendorf, Hamburg) bei Beleuchtung durch eine gerätinterne Wachstumslampe angezogen.

Aufgrund der niedrigen Wachstumsraten von *O. arcticus* und *O. antarcticus* (Gosink, Herwig & Staley 1997) dauerte die Anzucht von *Octadecabacter*-Kulturen mehrere Wochen. Sichtbares Wachstum trat bei solchen Kulturen meist erst nach zwei bis drei Wochen auf.

2.2.3 Verfolgung des Bakterienwachstums durch photometrische Messungen

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde als Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600nm}) durch photometrische Messung in einem Lambda25 UV/vis Spectrometer (Fa. Perkin Elmer, Rodgau) bestimmt. Als Blindprobe diente unbeimpftes Medium. Alternativ wurde die zunehmende Trübung von Bakterienkulturen in Klett-Einheiten mittels eines Klett-Summerson-Colorimeters des Modells 900-3 (Klett, New York, USA). bestimmt. Dieses Colorimeter erlaubte die direkte und daher zeitsparende Trübungsmessung von Kulturen in Reagenzgläsern. Diese Methode wurde bei der Verfolgung des Wachstums von *Octadecabacter*-Kulturen bevorzugt verwendet, da durch die Zeitersparnis die Erwärmung der Bakterienkulturen während den Messungen minimiert wurde.

2.2.4 Untersuchungen zu Schwermetall-Resistenzen

Es wurden Agarplatten mit MB-Medium (siehe 2.2.1) und verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Schwermetalle angesetzt (siehe unten). Die eingesetzten Schwermetall-Konzentrationen orientierten sich an den Ergebnissen von Nies (1999), welcher *minimal inhibitory concentrations* (MICs) verschiedener Schwermetalle für *E. coli* bestimmte. *Octadecabacter*-Kulturen wurden mit einer Impföse als Verdünnungsausstrich nach dem 13-Strich-Verfahren aufgetragen. Anschließend wurde das Wachstum der *Octadecabacter*-Kulturen verdünnungsstrichen bei verschiedenen Schwermetall-konzentrationen dokumentiert.

Schwermetall	Konzentrationen	Schwermetall	Konzentrationen
HgCl ₂	1 μM; 5 μM; 10 μM; 50 μM	CoCl ₂	10 µM; 0,1 mM; 1 mM; 2 mM
$CdCl_2$	10 µM; 50 µM; 0,5 mM, 1 mM	NiCl ₂	10 µM; 0,1 mM; 1 mM; 2 mM
CuCl ₂	10 µM; 0,1 mM; 1 mM, 2 mM	$SnCl_2$	10 µM; 0,1 mM; 1 mM; 2 mM
PbCl ₂	$50 \ \mu M; 0,5 \ mM; 1 \ mM, 2 \ mM$	AgNO ₃	1 μM; 10 μM; 20 μM; 0,1 mM

Liste der getesteten Schwermetalle und der jeweils eingesetzten Konzentrationen

2.2.5 Motilitäts-Tests

Zur Überprüfung der Beweglichkeit von *Octadecabacter*-Zellen wurden Weichagarmedien hergestellt. Hierzu wurden MB- und SWC-Medien (siehe 2.2.1) mit 0,3-0,5% (w/v) Agar versetzt, und in sterile Reagenzgefäße gegossen. Alternativ wurden mit diesen Lösungen Weichagarplatten in Petrischalen angesetzt. Die Inokulation von Weichagarmedien in

Reagenzgefäßen erfolgte mit Impfnadeln, wobei tief in den Agar in der Mitte des Gefäßes gestochen wurde (Stichkulturen). Bei diesen Kulturen wurde darauf geachtet, ob Wachstum nur entlang des Einstiches erfolgt (Hinweis auf fehlende Motilität), oder ob Zellen in das Innere des Agars eindringen (Hinweis auf Motilität). Die Inokulation von Weichagarplatten erfolgte durch das Überimpfen von Einzelkolonien mittels einer Impföse. Hier wurde auf schwarmförmige Ausbreitung der Kolonien, bzw. Eindringen in die Agarschicht (Hinweise auf Motilität) geachtet. Ergänzt wurden diese Versuche durch mikroskopische Betrachtung von Proben aus Flüssigkulturen mittels eines BX41 Phasenkontrastmikroskops (Fa. Olympus, Hamburg), wobei auf gerichtete Fortbewegung der Zellen geachtet wurde.

Zudem wurde versucht, potentielle Flagellen der *Octadecabacter*-Vertreter durch Flagellenfärbung (Clark 1976) sichtbar zu machen. Da diese Methode sehr anfällig für hohe Salzkonzentrationen ist, mussten die Kulturen zunächst in mehreren Schritten entsalzt werden. Zunächst wurden 100 μ l Bakterienkultur abzentrifugiert (5 min, 8.000x g, 4 °C), in 1,6% NaCl aufgenommen, erneut zentrifugiert (5 min, 8.000x g, 4 °C) und schließlich in H₂O_{bidest} aufgenommen. Auf Objektträger, welche mit einer Reinigungslösung (3% HCl in 95% Ethanol[reinst]) entfettet und über einer Bunsenbrennerflamme getrocknet wurden, wurde mit Wachs eine rechteckige Begrenzung aufgetragen. Die Bakteriensuspension wurde in diese Begrenzung aufgetragen, luftgetrocknet und mit Färbelösung (0,4% Fuchsin, 0,5% NaCl, 1% Tannin, 32% Ethanol[reinst], pH 5,3; Leifson 1951) überschichtet. Nach Inkubationszeiten von 2-10 min wurde die Färbelösung mit H₂O_{bidest} abgespült, und die gefärbten Zellen wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

2.2.6 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden jeweils 800 µl Flüssigkultur mit 200 µl Glycerol (87%) versetzt und bei -80 °C eingefroren. Diese Ansätze dienten als Stammkulturen für das Animpfen neuer Wachstumskulturen. Bei Verwendung wurden diese Stammkulturen langsam auf Eis aufgetaut und nach Gebrauch so schnell wie möglich wieder eingefroren.

2.3 Allgemeine Techniken für die Arbeit mit Nukleinsäuren

2.3.1 Native Agarose-Gelektrophorese zur analytischen Auftrennung von linearen DNA-Fragmenten

Es wurden stets Elektrophoresekammern der Fa. G&P Kunststofftechnik (Kassel) verwendet. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1mM EDTA, pH 8,5; Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989). Als Trennmittel wurde ein Gel bestehend aus 0,8% Agarose gelöst in 1xTAE-Puffer eingesetzt. DNA-Proben wurden mit 0,4 Vol. Ladepuffer versetzt und in Vertiefungen (Geltaschen) des Agarosegels aufgetragen. 2 µl des "GeneRulerTM DNA Ladder Mix" (Fa. Thermo Scientific, Schwerte) wurden als Größenstandard in jeweils eigene Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-110 V und einer Stromstärke von 400 mA für 45 min bis 2 h. Anschließend wurde das Gel für 10-20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt, 5-10 min in H₂O_{bidest} entfärbt und mittels eines AlphaImager[®] HP UV-Transilluminators (Fa. Innotech, Kasendorf) unter UV-Beleuchtung (λ =302 nm) betrachtet und dokumentiert.



DNA-Ladepuffer	
Bromphenolblau	0,125 g
Xylencyanol	0,125 g
Ficoll 400	7,5 ml
H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 50 ml

GeneRulerTM DNA Ladder Mix

2.3.2 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.3.2.1 Extraktion von DNA aus Bakterien

Bakterielle Gesamt-DNA wurde mit dem MasterPure[™] DNA Purification Kit (Fa. Epicentre, Madison, USA) extrahiert. Dieses Kit beruht auf einer Zellyse durch eine Kombination aus Detergenz-, Proteinase K- und Hitzebehandlung, gefolgt von einer Protein- und einer Nukleinsäurefällung. Es wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen, mit Ausnahme des letzten Schritts: der Aufnahme der aufgereinigten Nukleinsäuren in einer Pufferlösung. Hierfür wurde Tris-Puffer anstelle des in der Anleitung angegebenen Tris-EDTA-Puffers verwendet.

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden) Säulenbasiert aufgereinigt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.3.2.2 Extraktion von RNA aus Octadecabacter-Kulturen

Octadecabacter-Kulturen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 1,6 angezogen, mit 1 Vol. einer auf -80 °C gekühlten Abstopplösung (1% [v/v] β-Mercaptoethanol in Methanol) versetzt und anschließend sofort abzentrifugiert (10 min, 4000x *g*, -10 °C). RNA-Extraktion aus dem Zellpellet erfolgte mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden). Zunächst wurden die Zellen in 700 µl RLT-Puffer und 7 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung mittels eines Sonifier® 250 Ultraschallgeräts (Fa. Branson Ultrasonics, Danbury, USA) aufgeschlossen (Stufe 5, 50% Leistung, 100 Zyklen). Im weiteren Verlauf der Extraktion wurde nach dem Handbuch des RNeasy® Mini Kits vorgegangen. Anschließend erfolgte ein DNAse Verdau mittels der Ambion® TURBOTM DNase (Fa. Life Technologies, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers. Für Arbeiten mit aufgereinigter RNA wurden ausschließlich zweifach autoklavierte Labormaterialien und Ambion[®] Nuklease-freies Wasser (Fa. Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet. RNA-Lösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.2.3 Direkte Aufreinigung von DNA-Fragmenten

War eine Differenzierung zwischen verschiedenen DNA-Fragmenten nicht nötig (z.B. bei spezifischen PCR-Produkten), erfolgte die Aufreinigung säulenbasiert mittels des "QIAquick[®] PCR Purification Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Eluation von DNA aus den Aufreinigungs-Säulen des Kits erfolgte mit sterilem H₂O_{bidest}.

2.3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch präparative Gelelektrophorese

Präperative Gelelektrophoresen fanden Anwendung, wenn eine PCR-Reaktion mehr als ein eindeutiges Produkt hervorrief oder ein spezifisches Fragment eines Restriktionsverdaus benötigt wurde. Hierbei wurde prinzipiell so vorgegangen wie bei analytischen Gelelektrophoresen (siehe 2.3.1). Allerdings wurde ein zusätzliches kleines Aliquot jeder Probe auf einen getrennten Abschnitt des Gels aufgetragen. Nur dieser gesonderte Gelabschnitt, welcher auch den Größenstandard enthielt, wurde gefärbt und unter UV-Licht betrachtet (siehe 2.3.1). Hierdurch sollte verhindert werden, dass mutagene Einflüsse (Ethidiumbromid und UV-Licht) die zu extrahierende DNA beeinflussen. Gelbereiche, welche Banden von interressanten DNA-Fragmenten aufwiesen, wurden mit dem Skapell markiert. Die entsprechenden Bereiche wurden anschließend aus dem ungefärbten Gelabschnitt ausgeschnitten und in sterile Reaktionsgefäße gegeben. Die Extraktion von DNA aus diesen Stücken erfolgte durch eine säulenbasierte Aufreinigung mittels des QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Eluation von DNA aus den Aufreinigungs-Säulen des Kits erfolgte mit sterilem H₂O_{bidest}.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgten mit Hilfe eines NanoDrop[®] 1000 Spektrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen) anhand der Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm. Der Nullabgleich des Gerätes erfolgte mit H₂O_{bidest} oder Tris-Pufferlösung, abhängig davon, in welcher dieser Substanzen die DNA gelöst war. Für DNA-Messungen wurde die Einstellung "DNA-50", für RNA-Messungen die Einstellung "RNA-40" verwendet. Diese Einstellungen unterscheiden sich im Wert des Extinktionskoeffizienten, welcher bei der Berechnung der Nukleinsäure-Konzentraion mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes eingesetzt wird. Bei DNA-Quantifizierungen beträgt dieser Wert 50 ng-cm/µl, bei RNA-Quantifizierungen 40 ng-cm/µl (NanoDrop 1000 Spectrometer V3.7 User's Manual). Mittels der Quotienten der Absorptionswerte bei Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm konnte zudem die Reinheit der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden (Sambrook & Russel 2001).

2.3.4 Fällung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente, welche in H₂O_{bidest} gelöst waren, konnten mithilfe einer Concentrator 5301 Vakuumzentrifuge aufkonzentriert werden. Hierfür wurden die entsprechenden Reaktionsgefäße offen in das Gerät gestellt und 5-20 min bei 30-60 °C unter Vakuum zentrifugiert. DNA-Lösungen in Tris-Puffer oder empfindliche RNA-Lösungen wurden durch Ethanolfällung aufkonzentriert. Hierfür wurden die Nukleinsäure-Lösungen mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (reinst) versetzt und durch Schütteln gemischt. Die Proben wurden bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C für mindestens 30 min inkubiert, und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das nukleinsäurehaltige Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für mindestens 10 min unter der Sterilbank luftgetrocknet und dann im gewünschten Volumen H₂O_{bidest} oder Tris-Puffer aufgenommen.

2.4 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde standardmäßig die BIO-X-ACTTM Short DNA-Polymerase (Fa. Bioline, Luckenwalde) verwendet. Bei problematischer Matrizen-DNA (*template*) oder langen Produkten wurde zum Teil auf das PCR-Extender-System (Fa. 5 Prime, Hamburg) ausgewichen. Die Anlagerungs-Temperatur (*Annealing*-Temperatur) wurde stets wenige (1-4) Grad Celsius unterhalb des Schmelzpunktes der verwendeten Oligonukleotid-Primer gewählt, welcher durch den Hersteller (Fa. Thermo Scientific, Schwerte) jeweils experimentell bestimmt wurde. Die Zusammensetzung typischer PCR-Ansätze sowie der Ablauf typischer PCR-Programme sind im Folgenden aufgelistet. Wies die Matrizen-DNA stabile Sekundärstrukturen auf, welche die Amplifikation behinderten, so wurde Betain oder DMSO (Jensen, Fukushima & Davis 2010) hinzugegeben.

BIO-X-ACT TM Short DNA-Polymerase	PCR-Extender- System	Komponente
1 µl	1 µl	Matrizen-DNA (10-100 ng/µl)
4 µl	4 µl	Oligonukleotid-Primer 1 (5 pmol/µl)
4 µl	4 µl	Oligonukleotid-Primer 2 (5 pmol/µl)
5 µl	5 µl	Polymerase-Puffer (10x)
5 µl	2,5 µl	dNTP's (10 mM)
3 µl	-	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	0,5 µl	Polymerase (4 U/µl)
(2,5 µl)	(2,5 µl)	(Betain (5 M) oder DMSO (99,9%))
ad 50 µl	ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Zusammensetzung eines Stan	dard-P	CR-Ansatzes
----------------------------	--------	--------------------

I CK-I IVgi allilli Iul DIO-A-ACI -Allsatz	PCR-Programm	für	BIO-	X-A(CT TM -	Ansätze
--	--------------	-----	------	------	--------------------	---------

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	20 s	
Annealing	(50-68 °C) ^a	20 s	30
Elongation	68 °C	$(1-12 \text{ min})^{b}$	
Restelongation	72 °C	10 min	1
8 . 1 1	1 / D · b1 ·	111 D 11/1	

^aAbhängig von verwendetem Primer; ^b1 min pro 1 kb Produktlänge

	0		
Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	15 s	
Annealing	(50-68 °C) ^a	30 s	20
Elongation	68 °C	$(1-12 \text{ min})^{b}$	
Denaturierung	96 °C	15 s	
Annealing	(50-68 °C) ^a	30 s	10
Elongation	68 °C	(1-12 min) ^b +20 s /Zyklus ^c	10

PCR-Programm für PCR-Extender-Ansätze

^aAbhängig von verwendetem Primer; ^b1 min pro 1 kb Produktlänge; ^cZeitinkrement ersetzt Restelongation bei PCR-Extender-Ansätzen

2.5 Reverse Transkription (RT-PCR)

Zum spezifischen Nachweis von Transkripten wurde bakterielle Gesamt-RNA (siehe 2.3.2.2) zunächst mittels einer reversen Transkriptase und zufälligen Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Anschließend wurden einzelne Transkripte durch PCR (siehe 2.4) mit genspezifischen Primern nachgewiesen.

2.6 **Klonierung von DNA-Fragmenten**

Mechanische Fragmentierung von DNA für Subklonierungen aus Fosmiden 2.6.1

Für die Erstellung von Plasmid-Genbanken durch Subklonierung aus Fosmiden, musste die Fosmid-DNA zunächst in gleichmässige Fragmente geschert werden. Dies erfolgte auf mechanische Weise unter Anwendung des Hydroshear-Systems (Fa. Genemachines, San Carlos, USA) bei 25 Zyklen und einer Geschwindigkeitseinstellung von 17. Anschließend wurden Fragmente im Größenbereich von 3-5 kb durch präparative Gelelektrophorese (siehe 2.3.2.4) aufgereinigt.

2.6.2 Erzeugung von glatten Enden (end repair)

Vor allem nach mechanischer Scherung können DNA-Fragmente ungleichmäßige Strangüberhänge aufweisen. Um diese Überhänge zu glätten, wurden Fragmente, welche für die Ligation in pCRTM4-TOPO® TA-Vektoren vorgesehen waren, mit einer T4-DNA-Polymerase (fa. Fermentas, St. Leon Rot) behandelt (end repair). Die end repair-Ansätze (siehe unten) wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend direkt aufgereinigt (siehe 2.3.2.2).

End repair-Ansatz	
DNA-Fragmente	x μl
T4 DNA Polymerase Puffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 mM)	5 µl
T4-DNA-Polymerase (5 U/µl)	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

2.6.3 Erzeugung von 3'-Adenosinüberhängen

Für Klonierungen mittels des pCRTM4-TOPO® TA-Vektorsystems mussten 3'-Adenosinüberhänge der Fragmente erzeugt werden. Dies erfolgte mittels einer Taq-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon Rot). Die Reaktionsansätze (siehe unten) wurden 25 min bei 72 °C inkubiert und anschließend direkt aufgereinigt (siehe 2.3.2.2).

Ansatz zur Erzeugung von 3°-Adenosin	überhängen
DNA Fragmente mit glatten Enden	x µl
Taq-(NH_4)SO ₄ -Puffer ohne MgCl ₂ (10x)	7 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
dATP (2 mM)	6 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 70 µl

Ansatz zur	Erzeugung	von 3'-Ac	denosinüb	erhängen
------------	-----------	-----------	-----------	----------

2.6.4 Dephosphororylierung von linearen Vektoren und Phosphorylierung von Insert-DNA-Fragmenten

Linearisierte Vektoren wurden mit der alkalinen Phosphatase FastAPTM (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) dephosphoryliert, um Vektor-Rezirkularisierungen auszuschließen. Hierfür wurden die Dephosphorylierungsansätze (siehe unten) 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch eine Hitzebehandlung für 5 min bei 75 °C inaktiviert.

Die Insert-DNA-Fragmente wurden hingegen mittels einer T4 Polynukleotid Kinase (Fermentas, St. Leon-Rot) phosphoryliert. Die Phosporylierungsansätze wurden 20 min bei 37 °C inkubiert und 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert.

Dephosphorylierungsansatz		Phosphorylierungsansatz	
Linearisierter Vektor	17 µl	Insert-DNA	1 pmol
FastAP TM -Puffer (10x)	2 µl	T4 PNK –Puffer A (10x)	_2 μl
FastAP TM Phosphatase (1 U/ μ l)	1 µl	T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

2.6.5 Ligation in pCRTM4-TOPO® TA-Vektoren

Das Vektorsystem pCRTM4-TOPO® TA wurde für die Klonierung von DNA-Fragmenten zur Erstellung von Plasmid-Genbanken verwendet. Dieser Vektor besitzt 3'-Thyminüberhänge an welche sich 3'-Adenosinüberhänge entsprechender Fragmente (siehe 2.6.3) anlagern können. TOPO® TA-Ligationsansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde direkt mit den Transformationsprotokollen (siehe 2.7) fortgefahren.

TOPO® TA-Ligationsansatz	
DNA-Fragmente	4 µl
1:4 verdünnte "Salt Solution"	1 µl
Vektor	1 µl

2.6.6 Ligationen in pET24d- und pBAD/Myc-His A-Vektoren

Die Vektorsysteme pET24d und pBAD/Myc-His A wurden für die heterologe Expression von Rhodopsingenen verwendet. Sowohl die Vektoren als auch die Insert-DNA-Fragmente besaßen aufgrund eines zweifachen Restriktionsverdaus mit den Enzymen NcoI und XhoI (siehe 2.12.1) jeweils zwei verschiedene, nicht-komplementäre Strangüberhänge. Hierdurch konnte die Orientierung des Inserts während der Ligation festgelegt werden. Die Ligation erfolgte mittels einer T4-DNA-Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) bei einem molaren

Vektor-Insert-Verhältnis von 1 zu 5. Ligationsansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde direkt mit den Transformationsprotokollen (siehe 2.7) fortgefahren.

Ligationsansatz	
Insert-DNA-Fragmente	0,1 pmol
Linearer Vektor	0,02 pmol
Ligase-Puffer (10x)	2 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

2.7 Transformation von DNA in *E. coli*

2.7.1 Transformation durch Elektroporation

Ligationsansätze mussten vor der Elektroporation durch Dialyse mittels einer Nitrocellulosemembran (Fa. Millipore, Billerica, USA) auf H₂O_{bidest} für mind. 20 min entsalzt werden. Für die Elektroporation wurden ein GenePulser II Elektroporationsgerät (Fa. Bio-Rad, München) und elektrokompetente *E. coli* Top10- und DH10B-Zellen (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. 20µl Zellsuspension wurden mit maximal 2 µl entsalzter DNA-Lösung versetzt und für 4-5 ms einer Spannung von 2 kV bei einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt. Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt und es wurde mit dem Protokoll der Zellregeneration fortgefahren (siehe 2.7.3).

2.7.2 Transformation durch Hitzeschock-Behandlung

Für Transformationen durch Hitzeschock-Behandlung wurden 5 μ l Ligationsansatz zu 100 μ l chemisch kompetenten *E. coli* C43(DE3)-Zellen gegeben. Der Transformationsansatz wurde zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann 90 s bei 43 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde mit dem Protokoll der Zellregeneration fortgefahren (siehe 2.7.3).

2.7.3 Regeneration von rekombinanten Zellen nach der Transformation

Die Transformationsansätze wurden mit 1 ml SOC-Medium (siehe 2.2.1) versetzt und 45 min bei 37 °C unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten enthielten je nach verwendetem Vektorsystem (Tab. 2) entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

2.8 Sequenzierung von PCR-Produkten und rekombinanten Plasmiden

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte nach der Sanger-Methode Nicklen & Coulson 1977) mittels eines 3730XL DNA (Sanger, Analyzer-Kapillarsequenzierers und des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Fa. ABI Applied Biosystems, Foster City, USA) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Die Menge an zugegebener Matrizen-DNA richtete sich nach der Größe des zu sequenzierenden Matrizen-DNA-Moleküls. Bei DNA-Fragmenten bis 3 kb wurden pro 100 bp Länge 10 ng Template-DNA in den Sequenzieransatz zugegeben. Bei Matrizen-DNA-Molekülen >3 kb (z.B. Fosmide) wurden 300 ng DNA pro Reaktion eingesetzt. Wies die Matrizen-DNA stabile Sekundärstrukturen auf, welche zu Sequenzabbrüchen führen könnten, wurden Additive (Betain bzw. DMSO; Jensen, Fukushima & Davis 2010) hinzugegeben.

BigDye® Sequenzieransatz

· ·	-
2 µl	BigDye® 5x Sequencing Buffer
1 µl	BigDye [®] Premix
1 µl	Primer [5 pM]
x µl	Matrizen-DNA (10-300 ng)
(0,5µl	Additiv Betain [5 M] oder DMSO)
ad 10 µl	Wasser

Bei hartnäckigen Sekundärstrukturen wurde das Illustra TempliPhi Sequence Resolver Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) eingesetzt. Durch TempliPhi-vermittelte DNA-Amplifikation mit zufälligen Hexamer-Primern entstehen aus einer Matrizen-DNA ungleichmäßige und stark verzweigte Amplifikations-Produkte, welche ein stark vermindertes Potential zur Ausbildung von Sekundärstrukturen aufweisen. Da dieses Kit für zirkuläre Matrizen-DNA ausgelegt ist, mussten lineare DNA-Fragmente zunächst mittels Klonierung in einen zirkulären Vektor integriert werden (siehe 2.6). Anschließend wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.9 Sequenzierung und Annotation der Octadecabacter-Genome

2.9.1 Rohsequenzierung

Die Rohsequenzierung der Genome von *O. arcticus 238* und *O. antarcticus 307* erfolgte im Rahmen des *Gordon and Betty Moore Foundation Marine Genome Sequencing Project* (https://moore.jcvi.org/moore/) durch das J. Craig Venter Institut (JCVI, Rockville, MD, USA) und wurde durch das Niedersächsische VW_Vorab Projekt finanziert. Es wurde nach der Sanger-Methode (Sanger, Nicklen & Coulson 1977) unter Verwendung von sowohl Plasmid- als auch Fosmid-Shotgun-Klonbanken vorgegangen. Sowohl Plasmide als auch Fosmide wurden mit Vektor-spezifischen Primern von beiden Seiten her ansequenziert (*paired-end* Ansatz). Durch diesen Ansatz können pro Shotgun-Klon jeweils zwei Sequenzen (*reads*) einander zugeordnet werden, wobei der Abstand zwischen diesen Sequenzen durch die Art des Vektors definiert ist: 2-3 kb bei Plasmiden und 40-50 kb bei Fosmiden. Rohsequenzen und Klonbanken wurden anschließend durch das JCVI an das Göttinger Genomlabor übergeben.

2.9.2 Assemblierung, Lückenschluss und Verbesserung der Sequenzqualität

Die Assemblierung der Sequenzdaten erfolgte mithilfe des Staden-Packages (Staden 1996), wobei die *paired end*-Informationen der Shotgun-Sequenzierung (siehe 2.9.1) bei der Zusammensetzung und Anordnung der *contigs* (Gruppierungen überlappender Sequenzen) berücksichtigt wurden. Lückenschluss (*finishing*) und Verbesserung der Sequenzqualität (*polishing*) wurden mittels PCR-basierter Techniken auf Fosmiden der Shotgun-Klonbanken und auf genomischer DNA durchgeführt. Hierfür wurden an den *contig*-Enden bzw. an den flankierenden Bereichen der fraglichen Genomabschnitte spezifische Primer abgeleitet. Die Spezifität der Primer wurde durch BLAST-Vergleiche mit dem teilassemblierten Genom überprüft, wobei vor allem Wert auf hohe Spezifität des 3^c-Endes gelegt wurde. Potentielle Primerpaare, deren Sequenzen sich mehr als einem Genomabschnitt zuordnen ließen, wurden abgelehnt. Um möglichst hohe Annealing-Temperaturen zu ermöglichen, was die Ausprägung von Sekundärstrukturen deutlich verminderte, wurden Primersequenzen so gewählt, dass ihre Schmelzpunkte möglichst bei >60 °C lagen. PCRs wurden wie in 2.4 beschrieben durchgeführt. Ergab sich ein eindeutiges PCR-Produkt, wurde dieses direkt aufgereinigt (siehe 2.3.2.2), ansonsten wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese
aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (siehe 2.3.2.4). Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert (siehe 2.8). Aufgrund der hohen Anzahl an repetitiven genetischen Elementen in den *Octadecabacter*-Genomen, mussten zahlreiche PCRs mit insgesamt über 1.000 Primern durchgeführt werden um die korrekte Assemblierung des Genoms zu gewährleisten. Aus diesem Grund wird hier auf eine Auflistung der einzelnen *finishing*- und *polishing*-Primer verzichtet.

2.9.3 Annotation

Offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs) wurden mithilfe der Programme YACOP (Tech & Merkl 2003) und Glimmer (Delcher *et al.* 2007) vorhergesagt. Die resultierenden ORFs wurden mittels Artemis v.11 (Rutherford *et al.* 2000) basierend auf *GC frame plot*-Analysen, der Anwesenheit von Ribosomen-Bindestellen sowie Vergleichen zu bekannten Protein-kodierenden Sequenzen manuell korrigiert.

Funktionelle Annotationen der korrigierten ORFs wurden zunächst mithilfe des ERGO software package (Overbeek *et al.* 2003) automatisiert erstellt und anschließend anhand von BLAST-Vergleichen zu den Swiss-Prot- und Trembl-Datenbanken (http://kr.expasy.org/) und anhand von Domänenanalysen mittels des Programms Interpro-Scan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan; Zdobnov & Apweiler 2001) manuell korrigiert.

Annotationen von BLAST-Treffern wurden nur dann übernommen wenn wichtige sämtliche, für die entsprechende Funktion essentielle, Proteindomänen identifiziert werden konnten, und der Treffer einen *e-value (Expect value*; Parameter zur Bestimmung der statistischen Signifikanz eines BLAST-Treffers) von weniger als 1e-10 aufwies. BLAST-Treffer zu Einträgen der manuell kurierten Swiss-Prot-Datenbank wurden stärker gewichtet als Treffer zu größtenteils auf automatische Annotationen beruhenden Einträgen der Trembl-Datenbank. Ebenso wurden Annotationen von Datenbank-Einträgen welche durch Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt wurden, gegenüber rein Sequenzhomologie-basierten Annotationen bevorzugt.

Anschließend wurden die Genprodukte der annotierten ORFs sämtlicher Roseobacter-Vertreter mithilfe des IMG/ER (Integrated Microbial Genomes/Expert Review) Systems (http://img.jgi.doe.gov/; Markowitz et al. 2012) in funktionelle Kategorien der COG (Cluster of Orthologous Groups)-Datenbank (Tatusov et al. 2003) eingeordnet. Die COG-Datenbank fasst Proteine verschiedener Organismen anhand von Sequenzähnlichkeiten zu orthologen Gruppen zusammen, welche wiederum in 24 funktionelle Kategorien eingeteilt werden (Tab. 3), und erleichtert dadurch den Vergleich funktioneller Charakteristika von Organismen und Organismengemeinschaften.

Α	RNA Prozessierung	Ι	Lipidmetabolismus	Q	Sekundärmetabolismus
B	Chromatin-Struktur	J	Translation	Т	Signaltransduktion
С	Energiestoffwechsel	K	Transkription	R	Funktion unsicher
D	Zellzyklus	\mathbf{L}	Replikation + Rekomb.	S	Funktion unbekannt
E	Aminosäuremetabolismus	Μ	Zellwandsynthese	U	Sekretion
F	Nukleotidmetabolismus	Ν	Motilität	V	Abwehrmechanismen
G	Kohlenhydratmetabolismus	0	Posttransl. Modifikation	W	Extrazelluläre Strukturen
Η	Coenzymmetabolismus	Р	Transp. inorg. Ionen	Ζ	Cytoskelett

2.10 Analysen von Genom- und Fosmidsequenzen

2.10.1 Vergleichsgenome

Tab. 3 COG-Kategorien

Zum Zeitpunkt an dem diese Arbeit verfasst wurde, standen von den 69 in der GOLD-Datenbank (Genomes Online Database, http://www.genomesonline.org) angemeldeten Genomprojekten verschiedener Vertreter der Roseobacter-Gruppe, 49 Genomsequenzen für vergleichende Analysen zur Verfügung (Tab. DA01, digitaler Anhang). Öffentlich verfügbare Referenz-Genomsequenzen (siehe 2.10.1) wurden von der NCBI GenBank Sequenzdatenbank (http:://www.ncbi.nlm.nih.gov) oder vom J. Craig Venter Institut (http://www.jcvi.org) heruntergeladen. Für bidirektionale BLAST-Analysen (siehe 2.10.3) von Sequenzen rekombinanter Fosmide, welche inserts myxobakteriellen Ursprungs trugen, wurden Genomsequenzen folgener Myxobakterien herangezogen: Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C, Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1, Anaeromyxobacter K. sp. Anaeromyxobacter sp. Fw109-5, Myxococcus xantus DK1622, Sorangium cellulosum So ce 56 und Haliangium ochraceum DSM14365.

2.10.2 Gesamtgenom-alignments

Für Genom-*alignments* wurde das Programm Mauve (Darling *et al.* 2004) mit dem ProgressiveMauve-Algorithmus (Darling, Mau & Perna 2010) verwendet. Dieses Programm erkennt konservierte Bereiche zwischen Vergleichsgenomen und stellt diese als lokale kollineare Blöcke (*local collinear blocks*, LCBs) dar. Verschiedene LCBs werden verschiedenfarbig dargestellt, wobei farbige Balkendiagramme den Grad der

Sequenzübereinstimmung anzeigen. Hierdurch lassen sich intragenomische Rekombinationsvorgänge sichtbar machen.

Alternativ wurde das im IMG/ER (*Integrated Microbial Genomes/Expert Review*) System (http://img.jgi.doe.gov/; Markowitz *et al.* 2012) integrierte Programm DotPlot genutzt, welches auf dem NUCmer-Tool der MUMmer suite basiert (Kurtz *et al.* 2004). Dieses Programm stellt Sequenzalignments zwischen zwei Genomen in Form von Dotplots dar, wobei parallele übereinstimmende Bereiche in Blau und antiparallele übereinstimmende Bereiche in Rot angezeigt werden.

2.10.3 Orthologen-Identifikation

Der Begriff Homologe bezeichnet zwei (oder mehr) Gene, welche von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen. Homologe werden grundsätzlich unterschieden in Paraloge, Xenologe und Orthologe. Paraloge entstehen durch Genduplikation innerhalb eines Genoms. Als Xenologe werden verwandte Gene bezeichnet, welche durch horizontalen Gentransfer auf verschiedene Organismen übertragen wurden. Demgegenüber stehen Orthologe für verwandte Gene verschiedener Organismen, welche durch vertikalen Gentransfer übertragen wurden. Häufig wird davon ausgegangen, dass Orthologe bzw. Xenologe in den jeweiligen Vergleichsorganismen ähnliche oder äquivalente Funktionen erfüllen (insbesondere wenn eine hohe Übereinstimmung der Proteinsequenzen vorliegt). Die genaue Unterscheidung zwischen Orthologen und Xenologen ist jedoch problematisch und kann durch keine gängige bioinformatische Methode der Orthologen-Identifikation gewährleistet werden (Kuzniar et al. 2008). Da diese Differenzierung zudem für funktionelle vergleichende Analysen nicht von Belang ist, wird bei vergleichenden Analysen verwandter Gene phylogenetisch diverser Organismen meist zunächst von Orthologen ausgegangen (Newton et al. 2010; z.B. Kalhöfer et al. 2011). Auch in der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde dies im Folgenden so gehandhabt.

Potentielle Orthologe wurden mithilfe des laborinternen *software tools* BiBag (*Wollherr 2010*) auf Basis von Proteinsequenzen ermittelt. Dieses Programm verbindet BLAST-Analysen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) zur Bestimmung bidirektionaler bester *hits* (BBH; häufig auch bezeichnet als reziproke beste *hits*, RBH) (Hulsen *et al.* 2006; Altenhoff & Dessimoz 2009) mit globalen *alignments*, basierend auf dem Needleman-Wunsch Algorithmus (Needleman & Wunsch 1970). Nur BBHs welche *e-values* unterhalb von 1e-10 aufwiesen, wurden berück-

sichtigt. Um falsche, auf kurzen lokalen *alignments* konservierter Proteindomänen basierende Treffer auszuschließen, wurden die Ergebnisse anhand der entsprechenden Sequenzidentitäten auf globaler *alignment*-Ebene gefiltert. Wie bereits in früheren vergleichbaren Studien (Newton *et al.* 2010; Kalhöfer *et al.* 2011; Thole *et al.* 2012), wurde ein unterer Grenzwert von 30% Sequenzidentität festgelegt, um potentielle Orthologe zu definieren. Außerdem wurde, anhand eines Grenzwertes von mindestens 60% Sequenzidentität, der Anteil hochkonservierter Orthologe bestimmt, da bei Proteinen mit Sequenzidentitäten von >50% die Wahrscheinlichkeit für äquivalente Funktion deutlich erhöht ist (Sangar *et al.* 2007). Auf diese Weise kann jedem Gen eines Referenzorganismus maximal ein Ortholog pro Vergleichsorganismus zugeordnet werden. Paraloge werden durch diese Methode nicht berücksichtigt.

2.10.4 Identifikation von potentiellen genomischen Inseln

Für die Identifizierung von potentiellen genomischen Inseln wurde das WEB-basierte Programm IslandViewer eingesetzt (http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer) (Langille & Brinkman 2009). Dieses Programm kombiniert drei verschiedene Ansätze der Fremdgenbestimmung, darunter SIGI-HMM (Waack *et al.* 2006) und IslandPath-DIMOB (Hsiao *et al.* 2003). Diese beiden Methoden, welche auf die *Roseobacter*-Genome angewandt wurden, basieren hauptsächlich auf Veränderungen der Nucleotidzusammensetzung und *codon-usage* innerhalb eines Genoms. Demgegenüber verwendet die dritte Methode des IslandViewer-Programms, IslandPick (Langille, Hsiao & Brinkman 2008), direkte Genomvergleiche zwischen nah verwandten Organismen zur Vorhersage von genomischen Inseln. Da sie jedoch auf einer festen Datenbank mit nur sehr wenigen *Roseobacter*-Genomen beruht, konnte diese dritte Methode nicht auf *Roseobacter*-Vertreter angewandt werden.

2.10.5 Vergleiche der Genausstattung (Gene content-Analysen)

Gene content-Analysen wurden nach dem Vorbild von Newton *et al.* (2010) durchgeführt. Anhand der Ergebnisse der Orthologen-Identifikation (siehe 2.10.3) wurden, mit Ausnahme von *singletons* (einzigartigen Genen), sämtliche in *Roseobacter*-Vertretern vorhandenen Gene aufgelistet. Indem diese Genliste einer Namensliste der Vergleichsorganismen gegenübergestellt wurde, konnte eine Matrix erstellt werden, in der die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Orthologen eines Gens in den verschiedenen Vergleichsorganismen in binärer Schreibweise angegeben ist (Tab. DA02, digitaler Anhang). Diese binäre Matrix wurde unter Verwendung des Programms Clustering Calculator (http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/ cluster.php) (Czechowska *et al.* 2013) in eine Distanzmatrix umgewandelt und Clusteranalysen mittels des Neighbor-Joining Algorithmus unterzogen.

2.10.6 Vergleichende Analysen der Nukleotid-Zusammensetzung

Die Verfügbarkeit von vollständigen Genomsequenzen ermöglicht eine in silico Bestimmung der genetischen Übereinstimmung zwischen Vergleichsorganismen, analog zu den früher üblichen und experimentell aufwendigen DNA-DNA Hybridisierungstechniken (Rosselló-Mora & Amann 2000; Goris *et al.* 2007). Als Messgrößen werden beispielsweise durchschnittliche Nukleotid-Übereinstimmungen (*average nucleotide identities*, ANI) oder Ähnlichkeiten in den Oligonukleotidsignaturen herangezogen (Richter & Rosselló-Móra 2009). Das Programm JSpecies (http://www.imadea.uib.es/jspecies/) wurde verwendet, um BLAST-basierte ANI-Werte (ANIb) sowie Korrelationskoeffizienten der Tetranukleotid-signaturen durch direkte Vergleiche zwischen den verfügbaren *Roseobacter*-Genomen zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden verwendet, um Distanzmatrizen zu erstellen, welche wie in 2.10.5 beschrieben, für Neighbor-Joining Analysen mittels des Programms Clustering Calculator herangezogen wurden.

2.10.7 Phylogenetische Analysen basierend auf Gen- und Proteinsequenzen

Protein- und Gensequenzen wurden von der NCBI-nr Datenbank heruntergeladen oder den Referenzgenomen (siehe 2.10.1) entnommen. Für Proteinalignments wurde das Programm ClustalW (Larkin *et al.* 2007), und für 16S rRNA Gensequenzalignments das Programm SINA (Pruesse, Peplies & Glöckner 2012) verwendet. Für Multilokus-Sequenzanalysen (MLSA) wurden *alignments* von Proteinsequenzen, welche in sämtlichen Vergleichsgenomen ein Ortholog aufwiesen, innerhalb dieser Genome aber einzigartig waren (also keine Paraloge aufwiesen), konkateniert. Um hierbei Paraloge auszuschließen, wurden sämtliche Treffer der Orthologensuche einem anschließenden BLAST-Vergleich gegen die Referenzgenome unterzogen. Gene, welche mehr als einen Treffer bei einem *e-value* Grenzwert von 1e-20

aufwiesen, wurden bei MLSA nicht berücksichtigt. Neighbor-Joining und Maximum-Likelihood Stammbäume wurden mit der Softwareumgebung ARB v5.1 (Ludwig *et al.* 2004) erstellt. Bei MLSA wurde die ARB-interne Filterfunktion angewandt, um lückenhafte *alignment*-Positionen von der Stammbaumberechnung auszuschließen. Um ein möglichst zuverlässiges Grundgerüst der phylogenetischen Stammbäume zu erhalten, wurden für Neighbor-Joining und Maximum-Likelihood Berechnungen ausschließlich 16S Sequenzen mit einer Länge von >1200 bp bzw. vollständige Proteinsequenzen verwendet. Kurze unvollständige Sequenzen wurden nachträglich per Parsimony-Funktion den Grundgerüsten hinzugefügt.

2.11 Screenings von Metagenom-Datenbanken

Verschiedene, öffentlich verfügbare, Metagenom-Datensätze aus Süßwasser, marinen, hypersalinen, termophilen sowie Eis-assoziierten Habitaten wurden von den CAMERA (http:// camera.calit2.net/) und MG-RAST (http://metagenomics.anl.gov/) Datenbanken heruntergeladen (Tab. 4), und mittels BLAST-Analysen nach Octadecabacter 16S rRNA Gensequenzen sowie Rhodopsinen und Cyanophycin-Ligasen durchsucht (gescreent). Bei der Suche nach Rhodopsinen wurden nur Proben aus Oberflächenbereichen bis zu einer Tiefe von 30m berücksichtigt. Allgemein wurden nur Datensätze mit mehr als 100.000 Sequenzen analysiert. Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, wurden mindestens zwei Vertreter jeder Gruppe der entsprechenden phylogenetischen Rhodopsin- und Cyanophycin-Proteindatensätze (siehe 2.10.7) ausgewählt und als query-Sequenz für primäre tBLASTn-Analysen mit einem unstringenten e-value Grenzwert von 1 eingesetzt. Die resultierenden Treffer wurden durch sekundäre BLASTx-Vergleiche mit der NCBI-RefSeq-Datenbank sowie selbst erstellen phylogenetischen Datenbanken (siehe 2.10.7) unter Verwendung stringenter evalue und alignment-Grenzwerte validiert. Bei Analysen von Metagenomen mit einer durchschnittlichen Sequenzlänge von >150 bp wurde ein e-value Grenzwert von 1e-20 festgelegt und bei Datensätzen mit Sequenzlängen von <150 bp ein e-value Grenzwert von 1e-10. Die entsprechenden alignments mussten mind. 60% der Referenz-Sequenz oder 80% der query-Sequenz abdecken. Validierung und Klassifizierung der Ergebnisse erfolgte durch Abgleich mit der NCBI RefSeq-Datenbank und selbst erstellten phylogenetischen Datensätzen (siehe 2.10.7).

Name/Beschreibung	Quelle	MG-RAST/CAMERA accession-Nr.	Sequenzier- methode	Referenz
Antarctica aquatic microbial metagenome	CAMERA	CAM_PROJ_Antarctica Aquatic	454/ Sanger	(Lauro <i>et al.</i> 2011)
Ward Hunt Ice Shelf melt pool metagenome	MG-RAST	WHI	454	(Varin <i>et al.</i> 2010)
Markham Ice Shelf melt pool metagenome	MG-RAST	MIS	454	(Varin <i>et al.</i> 2010)
Botany Bay metagenome	CAMERA	CAM_PROJ_Botany- Bay	454/ Sanger	(Thomas <i>et</i> <i>al.</i> 2010)
Global Ocean Sampling Expedition	CAMERA	CAM_PROJ_GOS	454/ Sanger	(Rusch <i>et al.</i> 2007)
Ice metagenome of the northern Schneeferner	CAMERA	CAM_PROJ_IceMeta- genome	454	(Simon <i>et</i> <i>al.</i> 2009)
Marine bacterioplankton meta- genomes	CAMERA	CAM_PROJ_Bacterio- plankton	454	(Hewson <i>et al.</i> 2009)
Marine metagenome from coastal waters project at Plymouth Marine Laboratory	CAMERA	CAM_PROJ_PML	454	(Gilbert <i>et al.</i> 2009)
Metagenome from Yellowstone Bison Hot Spring	CAMERA	CAM_PROJ_Bison	454	(Havig <i>et al.</i> 2011)
Metagenomic analysis of the North Atlantic spring bloom	CAMERA	CAM_PROJ_BATS	454	-
Microbial community genomics at the HOT/ALOHA station	CAMERA	CAM_PROJ_HOT	Sanger	(Martinez, Tyson & DeLong 2009)
Monterey bay microbial study	CAMERA	CAM_PROJ_Monterey- Bay	454	(Rich <i>et al.</i> 2011)
Viral and microbial metagenomes from salterns of differing salinities	CAMERA	CAM_PROJ_Saltern- Metagenome	454	(Dinsdale <i>et al.</i> 2008)
Yellowstone Lake: Genetic and gene diversity in a freshwater lake	CAMERA	CAM_PROJ_YLAKE	Sanger	(Kan <i>et al.</i> 2011)

Tab. 4 Liste der nach spezifischen Genen durchsuchten Metagenom-Projekte

2.12 Funktionelle Analysen von Opsin-Genen

2.12.1 Erzeugung von Expressionsstämmen

Opsingene verschiedener Donor-Organismen wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert, welche an ihren 5'-Enden Anhänge mit Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Xho*I bzw. *Nco*I trugen (Tab. 5). Bei Primerpaaren mit dem Kürzel "rho2" enthielt der Reverseprimer ein Stopcodon, welcher das Anhängen von Polyhistidinschwänzen (His-Tags) in pET24d-und pBAD/*Myc* His A-Expressionsvektoren verhinderte. Diese Primerpaare waren für Klonierungen zum Zwecke funktioneller Analysen vorgesehen. Primerpaare mit dem Kürzel "rho1" enthielten dagegen kein solches Stopcodon und waren für den Nachweis von heterolog exprimierten Opsingenprodukten durch Westernblots vorgesehen (siehe 2.12.4). Die entsprechenden PCR-Amplifikationen fanden stets bei einer Annealing-Temp. von 60 °C statt.

		Matrizen-
Primer	Primersequenz	DNA
oarrho1_f	<u>GGGGCC</u> ATGGAAACATTATCATTGGGTCAATATG	
oarrho1_r	GGGGGCTCGAGTTCAGCAGGGACTGCTGTCTTTATGGAATCGTTG	O. arcticus
oarrho2_f	<u>GGGGCC</u> ATGGAAACATTATCATTGGGTCAATATG	238
oarrho2_r	<u>GGGGGCTCGAG</u> TTATTCAGCAGGGACTGCTGTCTTTATGGAATCGTTG	
oanrho1_f	<u>GGGGCC</u> ATGGAAACTTTATCACTGGGTCAGTATG	0
oanrho1_r	GGGGGCTCGAGCTCGGCGGGGGGCCCGTCTTGGTGTTTTTGTCC	U.
oanrho2_f	<u>GGGGCC</u> ATGGAAACTTTATCACTGGGTCAGTATG	207
oanrho2_r	<u>GGGGGCTCGAG</u> TTACTCGGCGGGGGACCGTCTTGGTGTTTTTGTCC	307
gviolrho1_f	CINCLATER CONTRACT CATEGACCG CATTICT CTGC	C
gviolrho1_r	GGGGGCTCGAGGGAGATAAGACTGCCTCCCGATTTATTTGC	U.
gviolrho2_f	C <u>GGGGCC</u> ATGGGGGATGTTGATGACCGTATTTTCTTCTGC	PCC7421
gviolrho2_r	<u>GGGGGCTCGAG</u> CTAGGAGATAAGACTGCCTCCCGATTTATTTGC	100/421
protrho1_f	<u>GGGGCCATGGAA</u> ATGAAATTATTACTGATATTAGGTAGTGTTATTGCACTTCCTACATTTG	mDAD
protrho1_r	GGGGGCTCGAGAGCATTAGAAGATTCTTTAACAGCAACATTCCA	EDAC
protrho2_f	$\underline{GGGGCCATGGAA} \\ ATGAAATTATTACTGATATTAGGTAGTGTTATTGCACTTCCTACATTTG$	21A08
protrho2_r	GGGGGGCTCGAGCTAAGCATTAGAAGATTCTTTAACAGCAACATTCCA	31A08

Tab. 5 I HINCI ZUI AINDINKAUON VUN ODMISCHEN	Tab.	5	Primer	zur	Am	plifikation	von	Opsingenen
--	------	---	--------	-----	----	-------------	-----	------------

Anhänge sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt. Stopcodons sind rot markiert.

Sowohl Insert als auch Vektor wurden durch Verdau mittels der Restriktionsenzyme XhoI und NcoI zweifach geschnitten und besaßen dadurch nicht-komplementäre Strangüberhänge. Hierdurch war die Wahrscheinlichkeit für eine Rezirkularisierung des Vektors stark eingeschränkt, während gleichzeitig die korrekte Orientierung des Inserts während der Ligation (siehe 0) gewährleistet wurde. Transformation in *E. coli* erfolgte durch Hitzeschock (siehe 2.7.2). Der Vektor pET24d wurde in Verbindung mit dem Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) verwendet, um eine mögliche Toxizität durch Überexpression von Opsinen vorzubeugen (Wagner *et al.* 2008). Um höhere Expressionsraten zu erzielen, wurde alternativ der Vektor pBAD/*Myc* His A in Verbindung mit dem Expressionsstamm *E. coli* UT5600 verwendet (Tab. 6).

	Donor-	Expres-	Expres-			Donor-	Expres-	Expres-	
Klon-	Organismus/	sions-	sions-	His-	Klon-	Organismus/	sions-	sions-	His-
Kürzel	Vektor	Stamm	Vektor	Tag	Kürzel	Vektor	Stamm	Vektor	Tag
OAN-	0 antarations	C34	nET24d	Т	Prot-	pBAD_	C34	nET24d	т
Rho1	O. uniurciicus	(DE3)	pE124u		Rho1	EBAC31A08	(DE3)	pE124u	
OAN-	0 antanotious	C34	"ET24d		Prot-	pBAD_	C34	"ET 2 44	
Rho2	O. antarcticus	(DE3)	pE124a	-	Rho2	EBAC31A08	(DE3)	pE124a	-
OAN-	O antanotious	1175600	pBAD/		Gviol-	C wielzer	C34	"ET 2 44	
Rho3	O. antarcticus	013000	Myc His A	-	Rho1	G. violaceus	(DE3)	pE124a	+
OAR-	O mustisuus	C34	- ET244		Gviol-	C	C34	- ET244	
Rho1	O. arcticus	(DE3)	pE124d	+	Rho2	G. violaceus	(DE3)	pE124d	-
OAR-	0	C34			Gviol-	$C \rightarrow 1$	LIT5(00	pBAD/	
Rho2	O. arcticus	(DE3)	pE124d	-	Rho3	G. violaceus	015600	Myc His A	-
OAR-	0	1175(00	pBAD/						
Rho3	O. arcticus	013600	<i>Myc</i> His A	-					

Tab. 6 In dieser Arbeit erzeugte rekombinante E. coli-Stämme zur heterologen Expression von Opsingenen

+ His-Tag vorhanden; - Kein His-Tag vorhanden

2.12.2 Heterologe Expression von Opsingenen

Rekombinante *E. coli*-Stämme (Tab. 6) wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (UT5600) bzw. 50 µg/ml Kanamycin (C34[DE3]) bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,5 angezogen. Anschließend erfolgte eine Induktion der Opsin-Produktion mittels 0,2% (w/v) Arabinose (UT5600) bzw. 100 µM IPTG (C34[DE3]) und eine weitere Inkubation für 3-6 h. Waren die Kulturen für Protonenpumpen-Versuche (siehe 2.12.7) vorgesehen, erfolgte an dieser Stelle eine Zugabe von 100 µl Retinal (10 mM).

2.12.3 Erzeugung und Gewinnung von Membranfragmenten

Expressionskulturen wurden abzentrifugiert (10 min, 4.000x g, 4 °C), in 1-10 ml Membranpuffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 8) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung mittels eines Sonifier[®] 250 Ultraschallgeräts (Fa. Branson Ultrasonics, Danbury, USA) aufgeschlossen (Stufe 5, 50% Leistung, 300 Zyklen). Grobe Zelltrümmer wurden duch Zentrifugation bei 10.000x g (5 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde anschließend einer Ultrazentrifugation (1-2 h, 160.000x g, 4 °C) ausgesetzt, um Membranfragmente zu pelletieren. Die Pellets wurden in Membranpuffer resuspendiert.

2.12.4 Nachweis von Opsinen in Membranfragmenten

Um heterolog exprimierte Opsine in den Membranfraktionen rekombinater Zellen nachzuweisen, wurde eine SDS-PAGE, gefolgt von einem Western-Blot, durchgeführt. Hierfür wurden Klone verwendet, deren Opsin-Inserts einen His-Tag aufwiesen ("Rho1"-Klone, Tab. 6).

2.12.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde eine Mini-PROTEAN 2-D Elektrophoresekammer (Fa. BioRad, München) verwendet. Hierbei wurde das Standardprotokoll nach Laemmli (1970) modifiziert, indem ein veränderter Ladepuffer mit erhöhter SDS-Konzentration und Zugabe von Urea verwendet wurde. Mit Ladepuffer versetzte Membranfragment-Suspensionen wurden 15 min bei 65 °C denaturiert, um die bei Membranproteinen häufig auftretende Aggregatbildung zu

verhindern (Hennessey & Scarborough 1989). Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele sowie des Ladepuffers sind unten angegeben. Der Laufpuffer wurde als 10x Stammlösung (125 mM Tris, 959 mM Glycin, 35,7 mM SDS, pH 8,4) angesetzt und vor Gebrauch 1:10 verdünnt. Als Größenstandard wurde der Prestained Molecular Weight Marker (Fa. Fermentas, St. Leon Rot) aufgetragen. Die Elektophorese wurde 45 min bei einer Stromstärke von 20 mA durchgeführt.

Sammelgel		Trenngel		4x Ladepuffer		
Acrylamid (30%)	400 µl	Acrylamid (30%)	2 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	3 ml	
0,5 M Tris, pH 6,8	250 µl	1,5 M Tris, pH 8,8	1ml	DTT	1,86 g	
SDS (10%)	25 µl	SDS (10%)	50 µl	EDTA (0,5 M)	3 ml	
TEMED	3 µl	TEMED	4 µl	Bromphenol-Blau	24 mg	
APS (10%)	10 µl	APS (10%)	30 µl	Urea	14 g	
H ₂ O _{bidest}	1,8 ml	H ₂ O _{bidest}	1,94 ml	SDS	2,4 g	
				Glycerol	12 ml	
				H ₂ O _{bidest}	9 ml	

2.12.4.2 Western-Blots

SDS-PAGE Gele wurden mit jeweils einer Lage Hybond ECL Nitrocellulosemembran (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) und sechs Lagen Whatman 3 MM Filterpapier (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% [v/v] Methanol, pH8,1) getränkt. Drei Lagen des Filterpapiers, gefolgt von der Nitrocellulosemembran, dem SDS-Gel und weiteren drei Lagen des Filterpapiers wurden luftblasenfrei auf der Anodenseite einer Perfect BlueTM Mini-Blot-Apperatur (Fa. Peqlab, Erlangen) gestapelt. Anschließend erfolgte für 60 min eine Elektrophorese bei 300 mA und 10 V. Die nun proteinhaltige Nitrocellulosemembran wurde über Nacht bei 5 °C in Blocklösung (5% Magermilchpulver [w/v] in TBS-T-Puffer) inkubiert. Nach drei Waschschritten in TBS-T-Puffer wurde die Membran 2 h in einer His-Tag spezifischen Antikörperlösung inkubiert und anschließend wieder 3x in TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion spezifisch gebundener Anti-His-Tag Antikörper erfolgte mittels des BCIP/NBT Color Development Substrats (Fa. Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

TBS-T-Puffer	Antikörperlösung
10 mM Tris-HCl	14 ml TBS-T-Puffer
140 mM NaCl	7 µl Anti-His-Tag Antikörper
0,01 % (w/v) Tween20	200 µl Blocklösung

2.12.5 Extraktion von Salinixanthin aus Salinibacter ruber

Aus *S. ruber* Kulturen wurde Salinixanthin nach den Methoden von Imasheva *et al.* (2009) und Lutnaes *et al.* (2002) extrahiert. Es wurden 2-3 Liter Kulturen von *S. ruber* angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 10.000x g, 4 °C), in 20 mL H₂O_{bidest} aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Sonifier[®] 250, Fa. Branson Ultrasonics, Danbury, USA). Zur Extraktion von Carotenoiden wurde das Lysat mit mindestens 200 ml einer Aceton/Methanol (7:3)-Lösung versetzt und zentrifugiert (10 min, 4.000x g, 4 °C), woraufhin der Überstand abgenommen und lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Der Extraktionsschritt wurde mit dem Pellet mehrfach wiederholt, bis keine rötliche Färbung des Pellets mehr zu erkennen war. Die Überstände wurden jeweils vereint und durch lichtgeschützte Inkubation unter einem Laborabzug bei Raumtemperatur fast vollständig eingetrocknet. Der resultierende Feststoff wurde mit eiskaltem Aceton (-20 °C) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert um Proteine auszufällen. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 4.000x g, 4 °C) wurde der Salinixanthin-haltige Überstand abgenommen und lichtgeschützt unter einem Laborabzug eingetrocknet. Das eingetrocknete Salinixanthin wurde anschließend in Ethanol (reinst) aufgenommen.

Die Salinixanthin-Konzentration wurde nach Imasheva *et al.* (2009) anhand der auf dem Lambert-Beerschen Gesetz beruhenden Formel $c = \frac{A}{\varepsilon}d$ berechnet. *c* entspricht in dieser Formel der Salinixanthin-Konzentration, *A* enspricht der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 480 nm, *d* ist die Schichtdicke und ε ist der Extinktionskoeffizient, welcher von Imasheva *et al.* für Salinixanthin auf 140.000 M⁻¹ cm⁻¹ geschätzt wurde.

2.12.6 Spektralanalysen von Rhodopsingenprodukten

Die Absorbtionsspektren verschiedener Membranfragment-Suspensionen (siehe 2.12.3) wurden mittels eines Lambda25 UV/vis Spektrophotometers (Fa. Perkin Elmer, Rodgau) im Wellenlängenbereich von 300-800 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Zugabe der Chromophore Retinal (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) bzw. Salinixanthin (siehe 2.12.5). Retinal wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M und Salinixanthin in einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Als Blindwert diente jeweils Membranpuffer mit bzw. ohne Zugabe von Retinal oder Salinixanthin. Durch Abzug der Messwerte vor Zugabe von Chromophoren von den

entsprechenden Messwerten nach Zugabe von Chromophoren wurden Differenzspektren gebildet.

2.12.7 Bestimmung der Protonenpumpen-Aktivität von Rhodopsinen

Die Protonenpumpen-Funktion von heterolog exprimierten Rhodopsinen wurde nach Vorbild von Beja et al. (2000) direkt in Suspensionen rekombinanter E. coli-Zellen gemessen. Die Zellen wurden mind. 2x durch Zentrifugation (10 min, 5.000x g, 8 °C) und anschließende Resuspension in ungepufferter Protonenpumpenlösung (10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 100 µM CaCl₂) gewaschen, um Nährstoffe des Wachstumsmediums zu entfernen. Die nährstoffreien Zellsuspensionen wurden vor den Messungen mind. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis lichtabhängiger Protonentranslokation (Protonendurch vorübergehender pumpenaktivität) erfolgte Messung Veränderungen der Ansäuerungsrate der Zellsuspensionen unter Verwendung eines WTW pH33i pH-meters und einer Sentix81 pH-Elektrode (WTW, Weilheim). Eine 500 W Tungsten Halogen-Lampe (Fa. Osram, Augsburg) diente als Lichtquelle. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Um den Einfluss der Wärmestrahlung der Lampe zu minimieren, wurde das Licht durch eine 15cm Schicht eiskalten Wassers gefiltert. Die Temperatur der Zellsuspensionen wurde mittels eines in der pH-Elektrode integrierten Temperatursensors während des gesamten Experiments beobachtet. Bei Bedarf wurden die Zellsuspensionen mit Hilfe eines flachen Wasserbads gekühlt.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Vergleiche der bislang sequenzierten Roseobacter-Vertreter

3.1.1 Generelle Genomeigenschaften



Abb. 4 Graphische Übersicht der Octadecabacter Genome.

Die Größenverhältnisse sind maßstabsgetreu dargestellt. Blaue Striche zeigen Protein-kodierende Gene auf den Chromosomen an. Rote Graphen zeigen Schwankungen des GC-Gehalts an. Grüne Graphen stellen den jeweiligen GC-*skew* dar.

Die Octadecabacter Genome von arcticus 238 und Octadecabacter antarcticus 307 wurden vollständig sequenziert, assembliert und auf Sequenzierfehler hin überprüft (siehe 2.9). Das Genom von O. arcticus 238 besteht aus einem 5,2 Megabasen (Mb) großen Chromosom und zwei Plasmiden mit jeweils Größen von 118 kb und 160 kb (Abb. 4). Im Vergleich dazu ist das Genom von O. antarcticus 307, bestehend aus einem 4,8 Mb Chromosom und einem 65 kb Plasmid etwas kleiner. Beide Genomgrößen liegen im Vergleich zu den übrigen Vertretern der Roseobacter-Gruppe (durchschnittlich ca. 4,29 Mb) im oberen Bereich (Tab. 7).

Entsprechend ist auch die Zahl der in den Genomen von *O. arcticus* und *O. antarcticus* enthaltenen Gene überdurchschnittlich

hoch. Jedoch liegt die Zahl der t-RNA- und rRNA-Gene in beiden Stämmen (49 und 48) deutlich unter dem Durchschnitt der *Roseobacter*-Gruppe (ca. 60). Auch der GC-Gehalt der *Octadecabacter*-Genome (55%) liegt im Vergleich zu den Genomen anderer *Roseobacter*-Vertreter im unteren Bereich (Durchschnitt 60%).

Besonders auffällig ist hingegen die hohe Zahl an Pseudogenen in den *Octadecabacter*-Genomen, welche 322 in *O. antarcticus* und 406 in *O. arcticus* beträgt. Diese Werte sind nicht nur einzigartig innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe sondern auch allgemein ungewöhnlich für bakterielle Genome. Auf diese Pseudogene und ihre möglichen Ursachen wird im Abschnitt 3.2.2.2 gesondert eingegangen.

Tab. 7 Genomeigenschaften der Untersuchten Roseobacter-Vertreter

Organismus Lebens- weise Habitat/ Wirt GC - Gehalt Organismus grösse (Mb) Protein- Rodierend Pseudo- gene RNA- Gene ⁸ Citreicella aestuarii 357 mar./ass. Sediment 64% 4,60 4528 0 45 31 Citreicella sp. SE45 mar./ass. Schlickgras 67% 5,52 5425 2 72 18 Dinoroseobacter shibae DFL-12* mar./ass. Dinoflagellat 66% 4,42 4186 33 52 22 Jannaschia sp. CCS1* mar./pel. Freiwasser 62% 3,28 3054 0 71 6 Ketogulonicigenium vulgare WSH-001 terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. SE62 mar./pel. Freiwasser 65% 3,06 3068 0 43 8 Acktanella talica R11 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 30655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Fre
Weise With Genant [Mb] kodierend gene Gene ^a Citreicella aestuarii 357 mar./ass. Sediment 64% 4,60 4528 0 45 31 Citreicella sp. SE45 mar./ass. Schlickgras 67% 5,52 5425 2 72 18 Dinoroseobacter shibae DFL-12* mar./ass. Dinoflagellat 66% 4,42 4186 33 52 22 Jannaschia sp. CCS1* mar./pel. Freiwasser 62% 3,28 3054 0 74 5 Ketogulonicigenium vulgare WSH-001 terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 8 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153
Citreicella aestuarii 357 mar./ass. Sediment 64% 4,60 4528 0 45 31 Citreicella sp. SE45 mar./ass. Schlickgras 67% 5,52 5425 2 72 18 Dinoroseobacter shibae DFL-12* mar./ass. Dinoflagellat 66% 4,42 4186 33 52 22 Jannaschia sp. CCS1* mar./pel. Freiwasser 62% 4,40 4283 0 56 6 Ketogulonicigenium vulgare Y25* terr. Boden 62% 3,29 3213 0 74 5 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanicola batsensis HTCC2577 mar./pel. Tiefsee
Citreicella sp. SE45 mar./ass. Schlindgras 67% 5,52 5425 2 72 18 Dinoroseobacter shibae DFL-12* mar./ass. Dinoflagellat 66% 4,42 4186 33 52 22 Jannaschia sp. CCS1* mar./ass. Dinoflagellat 66% 4,40 4283 0 56 6 Ketogulonicigenium vulgare Y25* terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 65% 4,53 4712 0 48 9 Nautella italica R11 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Oceanicola batsensis HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacte
Dinoroseobacter shibae DFL-12* mar./ass. Dinofigellat 66% 4,42 4186 33 52 22 Jannaschia sp. CCS1* mar./ass. Dinofigellat 66% 4,40 4283 0 56 6 Ketogulonicigenium vulgare Y25* terr. Boden 62% 3,29 3213 0 74 5 Ketogulonicigenium vulgare WSH-001 terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 <
Jannaschia sp. CCS1*mar./pel.Freiwasser62%4,4042830566Ketogulonicigenium vulgare Y25*terr.Boden62%3,2932130745Ketogulonicigenium vulgare WSH-001terr.Boden62%3,2830540716Loktanella sp. CCS2mar./pel.Freiwasser55%3,5036600433Loktanella sp. SE62mar./ass.Schlickgras62%4,5845960438Loktanella vestfoldensis SKA53mar./pel.Freiwasser60%3,0630680499Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654mar./pel.Freiwasser64%4,5347120489Nautella italica R11mar./ass.Algen60%3,8236551693Oceanibulbus indolifex HEL-45mar./pel.Freiwasser60%4,11415305516Oceanicola batsensis HTCC2597mar./pel.Tiefsee66%4,44421204912Oceanicola granulosus HTCC2516mar./ass.Meereis55%5,20468341349175Pelagibaca bermudensis HTCC2601mar./pel.Freiwasser66%5,43545206223Phaeobacter aeruleus 13mar./ass.Sediment59%5,0547261028110Phaeobacter gallaeciensis DSM 23566mar./ass.Sediment64%
Katogulonicigenium vulgare Y25* terr. Boden 62% 3,29 3213 0 74 5 Ketogulonicigenium vulgare WSH-001 terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella sp. SE62 mar./ass. Schlickgras 62% 4,58 4596 0 43 8 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter articus 238* mar./pel. Freiwasser 55% 5,20 4683 413 49 175
Ketogulonicigenium vulgare WSH-001 terr. Boden 62% 3,28 3054 0 71 6 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 8 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,41 4212 0 49 12 Oceanicola batsensis HTCC2516 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175
Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 3 Loktanella sp. CCS2 mar./pel. Freiwasser 55% 3,50 3660 0 43 8 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 64% 4,53 4712 0 48 9 Nautella italica R11 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Freiwasser 60% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23
Loktanella sp. SE62 mar./ass. Schlickgras 62% 4,58 4596 0 43 8 Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Nautella italica R11 mar./pel. Freiwasser 64% 4,53 4712 0 48 9 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23
Loktanella vestfoldensis SKA53 mar./pel. Freiwasser 60% 3,06 3068 0 49 9 Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 64% 4,53 4712 0 48 9 Nautella italica R11 mar./ss. Algen 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola batsensis HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10
Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654 mar./pel. Freiwasser 64% 4,53 4712 0 48 9 Nautella italica R11 mar./pel. Freiwasser 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola batsensis HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 4,88 4492 361 48 74 Octadecabacter arcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10
Nautella italica R11 mar./ass. Algen 60% 3,82 3655 1 69 3 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13
Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanibulbus indolifex HEL-45 mar./pel. Freiwasser 60% 4,11 4153 0 55 16 Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 4,88 4492 361 48 74 Octadecabacter arcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 </td
Oceanicola batsensis HTCC2597 mar./pel. Tiefsee 66% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 4,88 4492 361 48 74 Octadecabacter arcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Oceanicola baserisis HTCC2597 Inal./pel. Heisee 00% 4,44 4212 0 49 12 Oceanicola granulosus HTCC2516 mar./pel. Freiwasser 70% 4,04 3792 0 63 6 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 4,88 4492 361 48 74 Octadecabacter arcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4
Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 4,88 4492 361 48 74 Octadecabacter antarcticus 307* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter gallaeciensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Octadecabacter antarcticus 357 Inal./ass. Meeters 55% 4,66 4492 361 46 74 Octadecabacter arcticus 238* mar./ass. Meereis 55% 5,20 4683 413 49 175 Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Pelagibaca bermudensis HTCC2601 mar./pel. Freiwasser 66% 5,43 5452 0 62 23 Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter arcticus DSM 23566 mar./ass. Sediment 59% 5,05 4726 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Sediment 59% 5,05 47/26 102 81 10 Phaeobacter caeruleus 13 mar./ass. Biofilm 63% 5,35 5146 81 108 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Biolinin 63% 5,35 5146 61 106 13 Phaeobacter daeponensis DSM 23529 mar./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter gallaeciensis DSM 23529 Inal./ass. Sediment 64% 4,64 4284 69 78 9 Phaeobacter gallaeciensis 2.10* mar./ass. Algen 60% 4,16 3875 16 69 4 Phaeobacter gallaeciensis DSM17395* mar./pel. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter gallaeciensis 2.10*mar./ass.Algen60%4,16387516694Phaeobacter gallaeciensis DSM17395*mar./pel.Fischkultur60%4,233875166910
Phaeobacter galiaeciensis DSM17395° mar.pei. Fischkultur 60% 4,23 3875 16 69 10
Phaeobacter Innibens 15 mar./pei. Freiwasser 60% 4,13 3884 39 63 /
Priaeobacter sp. Y41 mar./pei. Freiwasser 64% 4,34 4132 1 69 13
, Ca. Planktomarina temperata RCA23° mar./pei. Freiwasser 54% 3,29 3053 1 47 20
Rhodobacteraceae sp. AzwK-3b mar./pel. Freiwasser 62% 4,18 4145 0 52 37
Rhodobacteraceae sp. H1CC2283 mar./pel. Freiwasser 53% 4,02 41/7 2 4/ 32
Rhodobacteraceae sp. H1CC2150 mar./pel. Freiwasser 49% 3,58 3667 0 46 4
Rhodobacteraceae sp. HTCC2255° mar./pel. Freiwasser 39%° 4,81° 4507° 0 86° 18
Rhodobacteraceae sp. MED193 mar./pel. Freiwasser 57% 4,65 4535 0 70 15
Rhodobacteraceae sp. R2A57 mar./pel. Freiwasser 51% 4,14 4386 0 43 16
Rhodobacteraceae sp. SK209-2-6 mar./pel. Freiwasser 57% 4,56 4537 0 73 20
Roseobacter denitrificans OCh 114* mar./ass. Algen 59% 4,33 4129 17 55 8
Roseobacter litoralis Och 149* mar./ass. Algen 57% 4,75 4537 0 40 14
Roseovarius nubinhibens ISM mar./pel. Freiwasser 64% 3,67 3547 0 58 2
<i>Roseovarius</i> sp. 217 mar./pel. Freiwasser 61% 4,76 4772 0 51 23
Roseovarius sp. TM1035 mar./ass. Dinoflagellat 61% 4,21 4102 0 56 9
Ruegeria lacuscaerulensis ITI-1157 mar./pel. Freiwasser 63% 3,52 3608 3 63 14
Ruegeria pomeroyi DSS-3* mar./pel. Freiwasser 64% 4,60 4252 31 72 5
<i>Ruegeria</i> sp. KLH11 mar./ass. Schwamm 58% 4,49 4269 5 64 24
Ruegeria sp. TM1040 mar./pel. Freiwasser 60% 4,15 3864 6 94 7
Ruegeria sp. TrichCH4Bmar./pel.Freiwasser59%4,69473417920
Ruegeria conchae TW15 mar./ass. Muscheln 56% 4,49 4380 0 45 8
Sagittula stellata E-37 mar./pel. Freiwasser 65% 5,26 5067 0 54 17
Sulfitobacter sp. EE-36 mar./pel. Freiwasser 60% 3,55 3474 0 68 11
Sulfitobacter sp. GAI101 mar./pel. Freiwasser 59% 4,53 4202 1 55 15
Sulfitobacter sp. NAS-14.1 mar./pel. Freiwasser 60% 4,00 3962 0 64 23
Thalassiobium sp. R2A62 mar./pel. Freiwasser 55% 3,49 3696 0 48 34
Wenxinia marina DSM 24838 mar./ass. Sediment 71% 4,18 4045 0 59 10

Mb = Megabase; TEs = transposable Elemente; mar. = marin; terr. = terrestrisch; pel. = pelagisch; ass. = assoziiert mit Partikeln/Eukaryoten ^a tRNA- und rRNA-Gene; ^b Genomsequenz weist Kontaminationen durch *E.coli* auf; * Genomsequenz

vollständig geschlossen und überprüft (finished+polished)

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Genomeigenschaften und Habitat aufzuzeigen, wurden die Genome anhand der prinzipiellen Lebensweise der entsprechenden Organismen gruppiert und verglichen (Abb. 5). Hierbei wurde unterschieden zwischen marinen Organismen welche mit Partikeln bzw. Eukaryoten assoziiert sind, marinen Organismen mit pelagischer Lebensweise (Organismen des Freiwassers) und terrestrischen Organismen.



Abb. 5 Genomeigenschaften von Roseobacter-Vertretern mit unterschiedlicher Lebensweise

Die Verteilung der Werte für GC-Gehalt (A), Genomgröße (B), Anzahl kodierender Gene (C), Anzahl Pseudogene (D), Anzahl an RNA Genen (E) und Dichte an TEs (F) innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe ist jeweils als Boxplot dargestellt. Die Vergleichsorganismen wurden gruppiert nach prinzipieller Lebensweise (marin assoziiert, marin pelagisch und terrestrisch). Zusätzlich ist für jeden Vergleichswert eine Übersicht der gesamten *Roseobacter*-Gruppe angegeben. Abgesehen von den terrestrischen Vertretern sind die Verteilungen der Vergleichswerte als Boxplots dargestellt. Da nur zwei terrestrische Vertreter zur Verfügung standen, sind die entsprechenden Werte durch Punkte dargestellt. Dunkle Punkte repräsentieren *K. vulgare* Y25, helle Punkte *K. vulgare* WSH-100.

Tendentiell scheinen marine *Roseobacter*-Vertreter mit eukaryoten- bzw. partikelassoziierter Lebensweise im Vergleich zu pelagischen Vertretern einen etwas erhöhten Anteil an Pseudogenen zu besitzen. (Abb. 5D). Deutlichere Unterschiede treten jedoch in Bezug auf Genomgröße und Gen-Gehalt auf (Abb. 5B+C). Diese Werte liegen bei marinen *Roseobacter*-Vertretern mit assoziierter Lebensweise im Durchschnitt höher als bei pelagischen Vertretern.

3.1.2 Core- und Pangenom

Die Gesamtheit aller Gene aller Mitglieder einer Organismen-Gruppe wird als das Pangenom dieser Gruppe bezeichnet (Tettelin et al. 2008). Das Pangenom lässt sich wiederum differenzieren in das Core-Genom, welches aus Genen besteht, die ausnahmslos in allen Vertretern der Gruppe zu finden sind, und in das flexible Genom (auch als "entbehrliches" Genom bezeichnet; Medini et al. 2005), welches alle übrigen Merkmale beinhaltet (Hacker & Carniel 2001). Das Octadecabacter-Pangenom, bestehend aus der Summe aller Gene der beiden sequenzierten Octadecabacter-Stämme (siehe 2.9) umfasst 9175 Proteinkodierende Gene. Für ungefähr 76% dieser Gene konnten durch reziproke BLAST-Analysen (siehe 2.10.3) Orthologe in mindestens einem Roseobacter-Vertreter außerhalb des Genus Octadecabacter nachgewiesen werden. In der überwiegenden Zahl (85%) dieser Fälle besaßen die Orthologe zudem hohe Sequenzidentitäten von über 60%, was auf nahe Verwandtschaft und erhöhte Wahrscheinlichkeiten für identische Funktion schließen lässt. In den übrigen Fällen könnten orthologe Genprodukte in den Vergleichsstämmen durch Mutation und genetische Drift abweichende Funktionen erlangt haben. Zusammensetzung und Anzahl der entsprechenden Orthologe variierten sehr stark zwischen den verschiedenen Roseobacter-Vertretern. In direkten Vergleichen teilen die einzelnen Vergleichsstämme nur 32-50% des Octadecabacter-Pangenoms. Die geringste Zahl an Orthologen wiesen die Vertreter der terrestrischen Art Ketogulonicigenium vulgare auf, während die höchste im Genom von Roseobacter litoralis zu finden war

Das *Roseobacter*-Core-Genom, nimmt nur einen kleinen Teil (ca. 16%) des *Octadecabacter*-Pangenoms ein. Im Gegensatz dazu macht das *Octadecabacter* Core-Genom ungefähr 59% der proteinkodierenden Gene beider Stämme aus. Jedoch ist nur ein Bruchteil (ca. 2%) dieser Gene ausschließlich spezifisch für den Genus *Octadecabacter*.

Für 1091 proteinkodierende Gene in *O. arcticus* und 892 in *O. antarcticus* konnten keine reziproken besten Blasthits ermittelt werden. Solche vermeintlich einzigartigen Gene werden

als *singletons* bezeichnet. Diese beinhalten jedoch auch viele Paraloge von TE-assoziierten Genen, denen zwar keine bidirektionalen besten Treffer zugeordnet werden konnten, welche aber dennoch prinzipiell auch in anderen *Roseobacter*-Stämmen nah verwandte Homologe aufweisen (siehe 3.2.2.2). Zieht man TE-assoziierte Gene von den durch reziproke BLAST-Analysen ermittelten *singletons* ab, so bleiben nur noch 83 dieser Gene in *O. arcticus* und 689



Abb. 6 Neighbor-Joining Baum basierend auf der Gen-Ausstattung (gene content) von Roseobacter-Vertretern mit Darstellung der entsprechenden COG-Kategorien

Dargestellt ist ein Neighbor-Joining-Baum basierend auf unterschiedlicher Orthologenzusammensetzung (siehe 2.10.5). Nur *Bootstrap*-Werte unter 90% sind angegeben. Für jeden Vergleichsorganismus sind die absoluten Anteile an Genen verschiedener COG-Kategorien (siehe Tab. 3, 2.9.3) als Balkendiagramm angegeben. die entsprechenden COG-Kategorien sind der Farblegende in der Abbildung zu entnehmen. Zusätzlich ist die grundsätzliche Lebensweise (marin/pelagisch, marin/assoziiert, terrestrisch) für jeden Organismus angegeben.

in *O. antarcticus* übrig. Das entspricht jeweils einem Anteil von 8% des Genoms von *O. arcticus* und 15% von *O. antarcticus*. Hierbei handelt es sich größtenteils um hypothetische Gene unbekannter Funktion. Sämtliche der oben genannten Werte beziehen sich auf reziproke BLAST Analysen die von den *Octadecabacter*-Genomen als Referenzen ausgingen. Entsprechende Analysen wurden zusätzlich von jedem Vergleichsorganismus ausgehend wiederholt (Tab. DA03-DA53, digitaler Anhang). Anhand dieser Ergebnisse wurde eine Distanzmatrix der Vergleichsorganismen erstellt (siehe 2.10.5), um Clusteranalysen bezüglich der jeweiligen genomischen Ausstattung durchführen zu können (Abb. 6).Vergleiche der Zusammensetzung an Genen unterschiedlicher *Cluster of Orthologeous Groups* (COG)-Kategorien sind ebenfalls in Abb. 6 dargestellt.

Gene content Analysen erlauben einen über phylogenetischen Beziehungen hinausgehenden Rückschluss auf ähnliche oder unterschiedliche Lebensweisen von Vergleichsorganismen (Newton et al. 2010). Demnach weisen die beiden Meereis-Organismen O. arcticus 238 und O. antarcticus 307 untereinander eine höhere Übereinstimmung in ihrer genomischen Ausstattung auf, als zu anderen Roseobacter-Vertretern. Darüber hinaus bilden die Octadecabacter-Vertreter in Bezug auf ihre Genausstattung eine zusammenhängende Gruppe mit den Organismen Thalassiobium sp. R2A62, Rhodobacteraceae sp. HTCC283 und Rhodobacteraceae sp. HTCC2150. Beide Octadecabacter-Vertreter weisen einen überdurchschnittlich hohen Anteil an Genen der COG-Kategorie L (Replikation, Rekombination und Reparatur) auf. Dies liegt vor allem an der hohen Zahl an transposablen Elementen in diesen Organismen. Allerdings sind auch zahlreiche Gene UV-induzierter DNA-Reperaturmechanismen vorhanden, welche ebenfalls in diese Kategorie fallen. Da Gene der COG-Kategorie L vor allem im Genom von O. arcticus überrepräsentiert sind, scheinen die prozentualen Anteile der meisten anderen COG-Kategorien in diesem Organismus im Vergleich zu O. antarcticus deutlich erniedrigt zu sein (Abb. 7). Die absoluten Anteile der meisten COG-Kategorien sind jedoch in beiden Octadecabacter-Vertretern sehr ähnlich (Abb. 6).

Der Anteil an Genen der COG-Kategorie G (Kohlenhydrat-Stoffwechsel) ist in beiden *Octadecabacter*-Stämmen im Vergleich zu den meisten anderen *Roseobacter*-Vertretern etwas erhöht. Die prozentualen Anteile an Genen der COG-Kategorien C (Energiestoffwechsel), H (Coenzym-Stoffwechsel), M (Zellwandsynthese) und T (Signaltransduktion) liegen dagegen in beiden *Octadecabacter*-Vertretern unterhalb des *Roseobacter*-Durchschnitts. Innerhalb der marinen *Roseobacter*-Vertreter zweigen "Ca. *planktomarina temperata*" RCA23 und *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2255 am weitesten ab. Wie zu erwarten, zweigen die beiden terrestrischen *Roseobacter*-Vertreter *K. vulgare* Y25 und *K. vulgare* WSH-001 in Bezug auf ihre Genomausstattung tief von den übrigen (marinen) Vertretern ab (Abb. 6). Beispiele für diese Unterschiede sind geringere prozentuale Anteile an Genen der COG-Kategorien Energie-, Coenzym- und Lipidstoffwechsel sowie erhöhte Anteile an Genen der Kategorien Ionentransport sowie Aminosäure- und Nukleotidstoffwechsel (Abb. 7).

Deutliche Unterschiede zwischen pelagischen und partikel- bzw. wirtsgebundenen (assoziierten) Vertretern ergaben sich vor allem in Bezug auf die COG-Kategorien G und T, welche in pelagischen *Roseobacter*-Vertretern weniger stark repräsentiert sind als in assoziierten, und in Bezug auf die Kategorien I und J, welche in assoziiert lebenden *Roseobacter*-Vertretern weniger stark repräsentiert sind als in pelagischen.



Abb. 7 Anteile an Genen verschiedener COG-Kategorien in *Roseobacter*-Vertretern unterschiedlicher Lebensweise

Die Schwankungsbereiche der Anteile an Genen (in %) verschiedener COG-Kategorien (siehe 2.9.3) in den Genomen pelagisch (1) und assoziiert lebender (2) mariner *Roseobacter*-Vertreter sowie der gesamten *Roseobacter*-Gruppe (3) sind jeweils als Boxplots dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden Werte der *Octadecabacter*-Vertreter als Rauten, und die der terrestrischen *Ketogulonicigenium* Vertreter als Kreise dargestellt.

3.1.3 Phylogenie

3.1.3.1 Multilokus Sequenzanalysen (MLSA)

Multilokus Sequenzanalyse (MLSA) ist eine Methode zur phylogenetischen Differenzierung nah verwandter Organismen, basierend auf multiplen phylogenetischen Markern (Martens *et al.* 2008). Typischerweise werden hierfür Sequenzen mehrerer meist proteinkodierender Gene, welche in allen Vergleichsorganismen jeweils genau ein Ortholog aufweisen, konkateniert. Proteinkodierende Gene sind in der Regel weniger stark konserviert als rRNA-Gene (Palys, Nakamura & Cohan 1997; Palys *et al.* 2000). Daher wird durch diesen Ansatz eine höhere phylogenetische Auflösung erreicht als durch die Verwendung von 16S rRNA-Gensequenzen (Thompson *et al.* 2005). Durch Verwendung vieler unterschiedlicher Marker wird zudem die hohe Variabilität von proteinkodierenden Sequenzen ausgeglichen und die Zuverlässigkeit der resultierenden Stammbäume erhöht. Die Kenntnis des Core-genoms der *Roseobacter* Gruppe (siehe 3.1.1) ermöglichte es, die maximale Zahl geeigneter Marker für phylogenetische Untersuchungen basierend auf MLSA heranzuziehen, wobei *Escherichia coli* K-12 MG1655 sowie *Parvarcula bermudensis* HTCC2503 als Referenzen dienten (siehe 2.10.7).

Es wurde ein Satz von 166 Genen pro Organismus ermittelt, welche in jedem der Vergleichsorganismen einzigartige Orthologe aufwiesen. Die konkatenierten Aminosäure-alignments der entsprechenden Genprodukte resultierten in einem soliden Neighbor-Joining Stammbaum, dessen Verzweigungen hohe Bootstrap-Werte aufwiesen und größtenteils durch Maximum-Likelihood-Berechnungen reproduzierbar waren (Abb. 8). Der Stammbaum bestätigt und erweitert die Ergebnisse von Newton et al. (2010), welche auf einer kleineren Gruppe aus 32 Roseobacter-Genomen und nur 69 ausgewählten Proteinsequenzen basierten. Demnach lassen sich die sequenzierten Roseobacter-Vertreter prinzipiell in fünf Untergruppen einteilen, wobei die Octadecabacter-Stämme in Untergruppe 4 fallen. Im Vergleich zu Newton et al., welche dieser Gruppe neben den Octadecabacter-Stämmen auch Loktanella vestfoldensis SKA53, Loktanella sp. CCS2 sowie Oceanicola granulosus zurechneten, konnten fünf weitere Vertreter dieser Gruppe zugewiesen werden: Loktanella sp. SE62, Thalassiobium sp. R2A62, Wenxinia marina DSM24838 und interessanterweise die beiden terrestrischen Ketogulonicigenium vulgare Stämme WSH-001 und Y25. Die beiden K. vulgare Stämme zweigen innerhalb der Untergruppe 4 tief ab, bilden aber dennoch ein stabiles Cluster gemeinsam mit W. marina DSM 24838 und O. granulosus HTCC2516.

Insgesamt konnten den durch Newton *et al.* beschriebenen Untergruppen vierzehn neue Vertreter zugewiesen werden, wodurch sich neue Sequenzcluster abzeichnen, ohne die Integrität der Untergruppen grundsätzlich zu verändern (Abb. 8). Es gibt lediglich eine Abweichung in Bezug auf *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2083, welcher anhand der neuen



Abb. 8 MLSA-basierte Phylogenie der Roseobacter-Gruppe

Dargestellt ist ein Neighbor-Joining Baum aus konkatenierten Aminosäure-Sequenzen von 166 Genprodukten, welche in allen *Roseobacter*-Genomen sowie den Referenzen *E. coli* K12 MG1655 und *P. bermudensis* HTCC2503 Orthologe, aber keine Paraloge aufwiesen. Für sämtliche Verzweigungen sind *Bootstrap*-Werte angegeben. Verzweigungen, welche sich durch Maximum-Likelihood Berechnungen reproduzieren ließen, sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Die ursprünglich durch Newton *et al.* (2010) definierten *Roseobacter*-Untergruppen sind farblich hinterlegt und beschriftet. Darüber hinaus wurden in Untergruppen 1 und 3 stabile Subcluster identifiziert und ebenfalls beschriftet. Organismen welche frühere Analysen von Newton *et al.* ergänzen oder deutlich von ihnen abweichen sind fett beschriftet. Typenstämme sind durch (T) markiert. Als *outgroup* diente *E. coli* K12 MG1655.

Daten, im Gegensatz zu Newton *et al.*, nicht zweifelsfrei der Untergruppe 2 zugeordnet werden kann. Die entsprechende Verzweigung des Stammbaums weist einen vergleichsweise niedrigen *Bootstrap*-Wert von 57% auf und ist nicht durch Maximum-Likelihood-Berechnungen reproduziert worden. Untergruppen 1 und 3 lassen sich jeweils in zwei eindeutige Sequenzcluster (1a + 1b bzw. 3a + 3b) unterteilen. Cluster 1a besteht hauptsächlich aus Vertretern des Genus Phaeobacter, beinhaltet jedoch auch Nautelle italica R11 sowie die Bakterienstämme TM1040 und TrichCH4B, welche bislang dem Genus *Ruegeria* zugeordnet wurden. Die Typstämme der beiden *Ruegeria*-Arten *R. lacuscaerulensis* und *R. pomeroyi* fallen jedoch in das deutlich abzugrenzende Cluster 1b. Im Gegensatz zu den übrigen Untergruppen weist Untergruppe 3 einen relativ niedrigen *Bootstrap*-Wert von 62 % auf. Die Integrität dieser Untergruppe wird jedoch durch Maximum-Likelihood-Berechnungen unterstützt. Die Zugehörigkeit von *Oceanicola batsensis* zu Cluster 3a ist jedoch aufgrund des sehr niedrigen *Bootstrap*-Wertes von 47% unsicher.

Die Organismen *Rhodobacteraceae* sp. R2A57, *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2083 und *Maritimibacter alkaliphilus* HTCC2654 bilden zwischen den Untergruppen 1-4 eigene Abzweigungen. Sie sind demnach mit diesen Untergruppen relativ nah verwandt, auch wenn sie keiner von ihnen eindeutig zugewiesen werden können. Im Gegensatz hierzu fällt *"Candidatus* Planktomarina temperata" RCA23, ebenso wie die noch unklassifizierten *Rhodobacteraceae*-Stämme HTCC2150 und HTCC2255, nicht in die Nähe der übrigen *Roseobacter*-Vertreter. Somit weichen diese Organismen auf Proteinsequenz-Ebene erheblich von den übrigen *Roseobacter*-Vertretern ab.

3.1.3.2 16S + 23S rRNA-Gensequenzvergleiche

Um die durch Multilokus Sequenzanalysen ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse (siehe 3.1.3.1) mit Ergebnissen traditioneller rRNA-basierter Phylogenie in Relation setzen zu können, wurden die verfügbaren 16S und 23S rRNA-Gensequenzen der Vergleichsstämme für weitere Stammbaumberechnungen herangezogen. Basierend auf ribosomalen RNA-Gensequenzen berechnete phylogenetische Stammbäume (Abb. 9) wurden zu großen Teilen ähnliche Verwandtschaftsverhältnisse ermittelt wie durch Multilokus Sequenzanalysen (siehe 3.1.3.1), allerdings mit geringeren *Bootstrap*-Werten.

Untergruppen 1 und 2, sowie die Cluster 1a und 1b sind auf rRNA-Gensequenzebene rekonstruierbar. Die übrigen Untergruppen zeigen auf rRNA Sequenzebene allerdings eine



Abb. 9 Phylogenetische Stammbäume basierend auf rRNA-Gensequenzen Die dargestellten Bäume wurden mittels des Neighbor-Joining Algorithmus berechnet. *Bootstrap*-Werte über 50% sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. A) Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen. B) Stammbaum basierend auf 23S rRNA-Gensequenzen. Als *outgroup* diente jeweils *E. coli* K12 MG1655. Zugehörigkeit zu MLSA-basierten *Roseobacter*-Untergruppen (siehe 3.1.3.1) ist durch entsprechende

Farbmarkierung gekennzeichnet.

deutlich erhöhte Heterogenität. Dies gilt in besonderem Maße für die Mitglieder von Untergruppe 3, welche in den auf 16S und 23S rRNA-Gensequenzen basierenden Stammbäumen mit niedrigen *Bootstrap*-Werten stellenweise weit verteilt sind. Die Beziehungen innerhalb der Untergruppe 4 waren insoweit rekonstruierbar, dass die *Octadecabacter*-Stämme in rRNA-Gensequenzbasierten Stammbäumen (Abb. 9a+b), ebenso wie im MLSA-Stammbaum (Abb. 8), eine nahe Verwandtschaft zu *Thalassobium* sp. R2A62 und eine etwas entferntere Verwandtschaft zu *Loktanella*-Vertretern aufweisen. Nicht rekonstruierbar war jedoch die Zusammengehörigkeit dieser Vertreter mit *K. vulgare, W. marina* und *O. granulosus*. Untergruppe 5, bestehend aus *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 und *Jannaschia* sp. CCS1, konnte auf Basis von 23S rRNA-Gensequenzen zuverlässig rekonstruiert werden (*Bootstrap* >70%, Abb. 9a), nicht jedoch auf Basis von 16S rRNA-Gensequenzen (Abb. 9b).

"*Ca.* Planktomarina temperata" RCA23 sowie *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2150 und HTCC2255 zeigen auf rRNA-Sequenzebene eine deutlich geringere Divergenz zu den übrigen *Roseobacter*-Vertretern als auf MLSA-Ebene. Insbesondere "*Ca.* P. temperata,, RCA23 zeigt auf rRNA-Ebene relativ nahe Verwandtschaften zu *Octadecabacter*, *Loktanella* und *Thalassiobium*.

3.1.3.3 Vergleiche auf Basis der Gesamtgenomsequenzen

Als Vergleichswerte zur Bestimmung der Sequenzähnlichkeiten von Vergleichsorganismen auf Gesamtgenomebene wurden BLAST-basierte durchschnittliche Nukleotididentitäten (*Average nucleotide identity based on BLAST*, ANIb) sowie Korrelationskoeffizienten der Tetramerzusammensetzungen der Vergleichsstämme herangezogen (siehe 2.10.6). Diese Werte können analog zu den bislang üblichen DNA/DNA-Hybridisierungswerten (Wayne *et al.* 1987) genutzt werden, um Art-Zugehörigkeiten zu ermitteln (Richter & Rosselló-Móra 2009). Die Vergleichswerte wurden, wie in Math&Meth beschrieben, Clusteranalysen unterzogen (Abb. 10). ANIb-Werte von über 96% bzw. Tetramer-Korrelationskoeffizienten von über 0,999 deuten darauf hin, dass es sich bei den Vergleichs-Organismen um dieselbe Spezies handelt (Richter & Rosselló-Móra 2009). Solche Fälle sind in Abb. 10 durch rote Umrandung markiert und im Folgenden aufgelistet. Sämtliche Ähnlichkeitswerte sind in Tab. DA54 und Tab. DA55 (digitaler Anhang) aufgeführt.

Wie zu erwarten, erfüllten die beiden *K. vulgare* Stämme WSH-001 und Y25 die Kriterien für gemeinsame Artzugehörigkeit. Des Weiteren sind *Sulfitobacter* sp EE-36 und *Sulfitobacter* sp. NAS-141 einer gemeinsamen Art zuzuordnen. *Phaeobacter* sp. Y4I ist aufgrund der hohen Ähnlichkeiten zu *P. daeponensis* DSM23529 der Art *P. daeponensis* zuzuordnen. Zwar erfüllt auch *Phaeobacter caerulensis* 13 auf Ebene der Tetranukleotid-Häufigkeiten das Kriterium für Artgleichheit mit *Phaeobacter* sp. Y4I (Abb. 10B), jedoch wird dies durch die Ergebnisse anderer phylogenetische Ansätze (Abb. 8, Abb. 9,Abb. 10A) nicht unterstützt. Überraschenderweise sind auch *P. gallaeciensis* DSM17395, *P. gallaeciensis* 2.10 und *Phaeobacter inhibens* T5 potentiell zu gemeinsamen Arten zusammenzufassen. Dies ist deshalb überraschend, weil es sich bei *P. gallaeciensis* DSM17395 und *P. inhibens* T5 um Typstämme zweier bereits beschriebener Arten handelt. Die beobachtet Artgleichheit wird jedoch auch durch entsprechend niedrige phylogenetische Distanzen auf MLSA- und rRNA-Gensequenzebene unterstützt (Abb. 8+Abb. 9).

Der ANIb-basierte Stammbaum (Abb. 10A) spiegelt zu großen Teilen die durch MLSA ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse (siehe 3.1.3.1) wider. Untergruppen 1 und 2 werden durch diesen Stammbaum vollständig rekonstruiert. Untergruppe 3 ist jedoch aufgespalten in die Cluster 3a und 3b sowie *O. batsensis* HTCC2597. Die größten Heterogenitäten weisen die Vertreter der Untergruppen 4 und 5 auf. Die auf Tetramer-Korrelationskoeffizienten basierende Clusterung (Abb. 10B) zeigt jedoch nur geringe Übereinstimmungen mit MLSA-oder rRNA-Gensequenz-basierten Verwandtschaftsverhältnissen.



Abb. 10 Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Roseobacter-Vertretern basierend auf Gesamtgenomvergleichen.

Abgebildet sind Neighbor-Joining Stammbäume basierend auf Distanzmatrizen, welche anhand der Ergebnisse von Analysen der Jspecies Software (www.imedea.uib.es/jspecies/) erstellt wurden (siehe 2.10.6). Organismen, welche Ähnlichkeitskriterien für Artgleichheit erfüllen (Richter & Rosselló-Móra 2009), sind durch rote gestrichelte Linien umrandet. A) Stammbaum beruhend auf BLAST-basierten durchschnittlichen Nukleotid-identitäten (ANIb). B) Stammbaum beruhend auf den Korrelationskoeffizienten der Tetranukleotid-häufigkeiten in den verschiedenen Vergleichsgenomen.

3.2 Spezielle Betrachtung des Genus Octadecabacter

3.2.1 Biogeographie des Genus Octadecabacter

In arktischen sowie antarktischen Habitaten wurden Vertreter des Genus *Octadecabacter* bereits häufig in unabhängigen Studien nachgewiesen (Tab. 8), was darauf hindeutet, dass es sich um allochthone Vertreter der Polargebiete handelt. Die phylogenetischen Daten dieser Studien wurden genutzt, um den ungefähren Anteil an *Octadecabacter*-Vertretern in verschiedenen Standorten zu berechnen (Tab. 8). Dabei zeigte sich, dass die entsprechenden Schätzungen je nach Studie, Probenort und Untersuchungsmethode stark schwanken können.

Polar- Region	Habitat	Methode	Anteil an Gesamt- population	Anteil an Proteobacteria	Anteil an <i>Alpha-</i> proteobacteria	Referenz
Arktis	Packeis	16S-Genbank	20%	75%	100%	(Brown & Bowman 2001)
Arktis	Packeis	16S-Genbank	5-8%	5-10%	36-86%	(Brinkmeyer <i>et al.</i> 2003)
Arktis	Packeis	16S-Genbank	n.b.	3%	6%	(Collins, Rocap & Deming 2010)
Arktis	Packeis	16S-Amplikon- Sequenzierung (454)	2,2%	3,3%	57%	(Bowman <i>et al.</i> 2012)
Arktis	Packeis	Isolate	9%	15%	100%	(Junge <i>et al.</i> 2002)
Arktis	Packeis	Isolate	25%	30%	42%	(Brinkmeyer <i>et al.</i> 2003)
Sub-Arktis	Oberflächen- wasser	16S-Genbank	0,5%	1,5%	2%	(Zeng <i>et al.</i> 2012)
Sub-Arktis	Oberflächen- wasser	GTA Capsid-Genbank	n.b.	n.b.	ca. 11%	(Fu <i>et al.</i> 2010)
Antarktis	Packeis	16S-Genbank	0%	0%	0%	(Brown & Bowman 2001)
Antarktis	Packeis	16S-Genbank	0-1%	0-1%	0-14%	(Brinkmeyer <i>et al.</i> 2003)
Antarktis	Packeis	16S-Genbank	n.b.	n.b.	14%	(Ghiglione <i>et al.</i> 2012)
Antarktis	Packeis	Isolate	9%	10%	38%	(Brinkmeyer et al. 2003)
Antarktis	Oberflächen- wasser	16S libraries	1,7%	2,3%	5,2%	(Grzymski <i>et al.</i> 2012)
Antarktis	Oberflächen- wasser	Isolate+16S-libaries	4%	15%	20%	(Murray & Grzymski 2007)
Antarktis	Oberflächen- wasser	MEGAN/Metagenom- Fosmid-Enden	n.b.	n.b.	12%	(Grzymski <i>et al.</i> 2012)

Tab. 8 Anteile von Octadecabacter-Vertretern in polaren Habitaten

n.b. = Nicht bestimmt; GTA = Gene Transfer Agent

Ermittelt anhand öffentlich zugänglicher Daten verschiedener Studien.

So wird dieser Anteil durch kultivierungsabhängige Untersuchungen höher eingeschätzt (9-25%) als durch kultivierungsunabhängige (0-20%). Dies reflektiert die generell hohe Kultivierbarkeit der *Roseobacter*-Gruppe (Kirchman 2008) und deutet an, dass sich *Octadecabacter*-Vertreter gut an die relativ hohen Nährstoffkonzentrationen gängiger Isolierungsmedien anpassen können. Für eine zuverlässige Bestimmung der tatsächlichen Populationsverhältnisse nativer Bakteriengemeinschaften sind kultivierungsunabhängige Ansätze jedoch weitaus besser geeignet (Hugenholtz, Goebel & Pace 1998; Schmidt 2006).



Abb. 11 Phylogenetische Beziehungen zwischen Octadecabacter-Vertretern unterschiedlicher geographischer Standorte

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem Neighbor-Joining Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen repräsentativer Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe sowie aller verfügbaren *Octadecabacer*-Vertreter. Der gesamte Stammbaum ist in Abb. A1 (Anhang) wiedergegeben. NCBI *Accession*-Nummern sind in Klammern hinter den jeweiligen Stamm- bzw. Klonbezeichnungen angegeben. Klone sind durch einen Asterisk (*) gekennzeichnet. Typenstämme einer Spezies sind durch ein "T" gekennzeichnet. *Bootstrap*-Werte über 50% sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. 16S rRNA-Gensequenzen von *Methylococcus capsulatus* und *Thiothrix nivea* (NCBI-ACC-Nr: AJ563935 + L40993) dienten als *Outgroup*.

Doch auch zwischen verschiedenen kultivierungsunabhängigen Untersuchungen schwanken die geschätzten *Octadecabacter*-Anteile sehr stark, was auf einen großen Einfluss regionaler und saisonaler Unterschiede schließen lässt (Tab. 8). In arktischem Packeis stellen *Octadecabacter* schätzungsweise 2-20% der Bakteriengemeinschaft und machen meist den Großteil der vorhandenen *Alphaproteobacteria* aus, während sie in Meerwasser derselben Polarregion nur schwach vertreten waren (0,5% der Bakteriengemeinschaft). In antarktischem Packeis ist dagegen der *Octadecabacter*-Anteil mit 0-1% der Bakteriengemeinschaft und 0-14% der *Alphaproteobacteria* deutlich geringer als in der Arktis, während er in antarktischem Meerwasser mit 2-4% der Bakteriengemeinschaft und 5-20% der *Alphaproteobacteria* etwas erhöht ist (Tab. 8).

Das Vorkommen von Vertretern des Genus Octadecabacter beschränkt sich größtenteils auf die Polarregionen. Dennoch lassen sich mittlerweile auch außerhalb der Polarregionen eine Reihe von Sequenzen, sowohl von Klonen aus 16S rRNA-Genbanken als auch von einer wachsenden Zahl an Isolaten, diesem Genus zuordnen (Abb. 11). Dennoch bilden 16S rRNA-Gensequenzen von Octadecabacter-Stämmen der Arktis und der Antarktis ein gemeinsames phylogenetisches Cluster, welches sich mit hohen Bootstrap-Werten eindeutig von den meisten aus nicht-polaren Habitaten stammenden Octadecabacter-Sequenzen abgrenzt. Das bedeutet, dass die Octadecabacter-Vertreter der beiden räumlich getrennten Polargebiete auf 16S rRNA-Sequenz-Ebene untereinander einen höheren Grad an Verwandtschaft aufweisen, als zu potentiellen Vertretern in den wärmeren Regionen zwischen den Polen. Lediglich drei nicht-polare Klon-Sequenzen sind in diesem Cluster enthalten, welche allesamt aus kalten Umgebungen stammen: Zwei Sequenzen, welche im Winter von Ciliaten aus dem Atlantischen Ozean gewonnen wurden (NCBI-Acc: FN999980 + FN999956) und eine, welche aus Tiefsee-Sediment stammt (NCBI-Acc: AB094833). Die übrigen nicht-polaren Sequenzen bilden mindestens zwei eigenständige phylogenetische Cluster mit ebenfalls hohen Bootstrap-Werten von 76% bzw. 99%. Eines dieser Cluster, bestehend aus acht Sequenzen, scheint ausschließlich aus Vertretern aus der Nordsee zu bestehen.

3.2.2 Genomplastizität der Octadecabacter-Stämme

3.2.2.1 Genomische Inseln und Regionen erhöhter Genomplasitizität

Der Begriff Genomplastizität bezeichnet die Wandlungs- bzw. Anpassungsfähigkeit eines Genoms und wird meist in Bezug auf horizontalen Gentransfer verwendet. Ein Indikator für

horizontalen Gentransfer sind sogenannte genomische Inseln. Hierbei handelt es sich um klar abgegrenzte Bereiche eines Genoms, welche sowohl in Basen als auch in Gen-Zusammensetzung vom Großteil des übrigen Genoms sowie der Genome nah verwandter Stämme abweichen. Solche Genomabschnitte können durch Insertion von Fremd-DNA resultieren und sind beispielsweise aufgrund abweichender Basen-Zusammensetzung (z.b über Tetranucleotid-Häufigkeiten oder GC-Gehalt) oder abweichendem genetischen Dialekt (Codon-Usage) zu identifizieren. Mithilfe der Software-Tools SIGI-HMM und IslandPath-DIMOB der Islandviewer-Plattform (http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer) wurden auf den Chromosomen beider Organismen mehrere potentielle genomische Inseln identifiziert: 35 mit einer Gesamtgröße von 469.100 bp in Octadecabacter arcticus 238 und 28 mit einer Gesamtgröße von 544.622 bp in Octadecabacter antarcticus 307. Auch die Plasmide der Octadecabacter-Stämme wurden mittels IslandViewer analysiert. Auf pOAR160 wurden drei und auf pOAR118 ein von der Norm abweichender Abschnitt ermittelt. Diese sind möglicherweise auf Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Replikons zurückzuführen. Allerdings ist anzumerken, dass die geringe Größe dieser Replikons eine zuverlässige Bestimmung abweichender Sequenzabschnitte stark beeinträchtigt.

Visualisierungen der Orthologen-Verteilung beider *Octadecabacter*-Genome lassen große zusammenhängende Bereiche erkennen, welche in Vergleichsorganismen nur wenige Orthologe mit zudem relativ geringen Sequenzidentitäten aufweisen (Abb. 12). In solchen Regionen konzentrieren sich somit Art bzw. Stamm-spezifische Gene, was ebenfalls als Hinweis auf genomische Inseln gedeutet werden kann. Im Sinne eines systematischen Vorgehens wurden Regionen erhöhter Genomplastizität (RGPs) (Abb. 12) definiert, für die gleichzeitig mehrere Kriterien gelten mussten: Das Vorhandensein einer oder mehrerer Bereiche mit positiver IslandViewer-Vorhersage, starke Schwankungen des GC-Gehaltes und eine geringe Dichte an Orthologen in den Vergleichsstämmen. Plasmide wurden generell als RGPs definiert. In *O. arcticus* treten 19 (Oar-RGP 1-19), und in *O. antarcticus* 17 (Oan-RGP 1-17) solcher Regionen auf. Viele der charakteristischen Eigenschaften beider *Octadecabacter*-Stämme (siehe 3.2.3-3.2.4) befinden sich in diesen Regionen.

Eine detaillierte Auflistung und Beschreibung sämtlicher Regionen ist in Tab. DA56 (digitaler Anhang) zu finden.

63



Abb. 12 Detailierte zirkuläre Darstellung der Octadecabacter Genome

Regionen erhöhter Genomplastizität (RGPs) sind auf den jeweiligen Chromosomen durch gepunktete Linien markiert und durchnummeriert. Ebenfalls dargestellt sind protein-kodierende Gene, IslandViewer Vorhersagen potentieller *Islands*, rRNA-Gene, transposable Elemente (TEs), Orthologe zu Genen anderer *Roseobacter*-Stämme sowie Schwankungen im GC-Gehalt (siehe 2.10). Die Vergleichsstämme wurden zu Untergruppen 1-5 (siehe 3.1.3) zusammengefasst. Die Positionen verschiedener Merkmale, welche auf horizontalen Gentransfer oder intragenomsiche Rekombinationsereignisse hindeuten, sind entsprechend beschriftet. Merkmale, welchen beiden *Octadecabacter*-Stämmen gemein sind, sind durch fette Beschriftung markiert.

3.2.2.2 Transposable Elemente

Von den 4683 Protein-kodierenden Genen im Genom von *O. arcticus*, sind 912 konservierte Bestandteile von transposablen Elementen (TEs), während es in *O. antarcticus* 361 von insgesamt 4492 Protein-kodierenden Genen sind. Die hohe Dichte an TE-assoziierten Genen in diesen Organismen ist nicht nur einzigartig innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe (Tab. 7, 3.1.1), sondern auch allgemein für bakterielle Organismen sehr ungewöhnlich. Ein großer Teil der TE-assozierten Gene und Pseudogene konnte durch BLAST-Vergleiche mit der ISFinder-Datenbank (Siguier *et al.* 2006) charakterisierten Familien und Untergruppen zugeordnet

		OAR			OAN		Häufigkeit in
Familie/Typ	CDS	Pseudo	Gesamt	CDS	Pseudo	Gesamt	<i>Roseobacter</i> -Gruppe ^c
IS3 ^a	177	30	207	137	49	186	26
IS4	0	0	0	1	1	2	2
IS5 ^a	44	19	63	34	8	42	14
IS6	25	4	29	12	3	15	7
IS10	7	8	15	0	0	0	0
IS21	11	0	11	13	4	17	8
IS30	45	17	62	8	0	8	11
IS66	66	15	81	2	1	3	14
IS91	22	5	27	12	0	12	6
IS110	17	4	21	33	39	72	9
IS200/IS605	38	2	40	14	0	14	31
IS204/IS1001/IS1096/IS1165	0	2	2	0	0	0	0
IS256	72	21	93	9	3	12	3
IS481	33	3	36	1	16	17	9
IS630	73	10	83	2	3	5	4
IS116/IS110/IS902	1	0	1	0	0	0	0
IS1182	0	0	0	1	14	15	5
IS1380	1	0	1	2	0	2	0
IS1595	33	1	34	20	3	23	12
ISAs1	28	2	30	0	0	0	0
ISL3	29	10	39	0	0	0	0
P4-Integrase	1	0	1	0	0	0	11
ISNCY	1	2	3	0	0	0	8
Oar-RGP4/Oan-RGP8-Integrase ^b	6	1	7	5	1	6	
Unbekannt ^b	182	107	289	55	120	175	

Tab. 9 Klassifikation der Transposablen Elemente von O. arcticus und O. antarcticus anhand der ISFinder-Datenbank

Familien, welche auf einen der beiden *Octadecabacter* Stämme beschränkt sind, wurden fett hervorgehoben CDS = *Coding Sequence* (funktionales Gen); Pseudo = Pseudogen (nicht funktionales Gen)

^amehrere verschiedene Untergruppen dieser Familie sind repräsentiert

^bkeine Verwandten Elemente in ISfinder-Datenbank vorhanden

^cAnzahl der Vergleichstämme ausserhalb des Genus Octadecabacter, welche nah verwandte TEs aufweisen

werden. Es zeigte sich, dass die TEs in den Genomen der *Octadecabacter*-Stämme nicht nur zahlreich, sondern auch hochdivers sind (Tab. 9). Die TEs von *O. arcticus* 238 lassen sich 21 verschiedenen Familien zuordnen, während die Elemente von *O. antarcticus* 16 verschiedenen Familien zugehörig sind. Diese hohe Diversität an TEs in den Genomen der *Octadecabacter*-Stämme ist bemerkenswert, da sie auf unterschiedliche Herkünfte der verschiedenen Elemente und somit häufigen horizontalen Gentransfer hindeuten könnte.

Ein hoher Anteil der TE-assoziierten Gene und Pseudogene (296 in *O. arcticus* bzw. 181 in *O. antarcticus*) ließen sich keiner bereits charakterisierten Familie zuordnen und repräsentieren somit neue Gruppen von transposablen Elementen. Hierzu gehört auch eine Gruppe von Integrasen welche mit nahezu identischer Sequenz in Region Oar-RGP 4 von *O. arcticus* und Oan-RGP 8 von *O. antarcticus* vorkommen (Oar-RGP4/Oan-RGP8-Integrase, siehe 3.2.2.1). Manche Familien, darunter IS3 und IS5, deren Vertreter in beiden *Octadecabacter*-Genomen vorkommen, sind in der ISFinder-Datenbank zusätzlich in Untergruppen eingeteilt. Jeweils vier dieser Untergruppen sind in den *Octadecabacter*-Stämmen repräsentiert: Untergruppen IS150, IS407, IS51 und IS3 der Familie IS3 sowie Untergruppen IS903, IS247, IS1031 und IS5 der Familie IS5. Insgesamt acht Familien von TEs waren auf jeweils einen der beiden *Octadecabacter*-Stämme beschränkt (Tab. 9).

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen mutmaßlichen Rekombinations-Ereignissen und verschiedenen Gruppen an TEs besteht, wurde die Verteilung der einzelnen Gruppen an TEs über die *Octadecabacter*-Genome untersucht. Die meisten der in Tab. 9 aufgelisteten Elemente sind relativ gleichmäßig über die Genome der beiden *Octadecabacter* Stämme verteilt. Fünf Gruppen an Elementen wiesen jedoch in mindestens einem der Stämme regionale Anhäufungen auf: Untergruppe IS3 der Familie IS3, Untergruppe IS903 der Familie IS5, Familien IS6 und IS256 sowie die Oar-RGP4/Oan-RGP8-Integrasen (Abb. 13).

Transposable Elemente der Untergruppe IS3 (Familie IS3) sind in *O. arcticus* relativ gleichmäßig über das Genom verteilt, während sie in *O. antarcticus* ausschließlich auf einen Genomabschnitt beschränkt sind, der sich auf weniger als die Hälfte des Chromosoms erstreckt. Umgekehrt sind Elemente der Untergruppe IS903 (Familie IS5), in *O. antarcticus* gleichmäßig über das Genom verteilt, in *O. arcticus* jedoch hauptsächlich in den Regionen Oar-RGP 13-17 sowie auf dem Plasmid pOAR160 zu finden. Elemente der Familie IS6 sind in beiden *Octadecabacter*-Stämmen auf einen Bereich im letzten Achtel des Chromosoms (relativ zum Replikationsursprung) konzentriert. In *O. arcticus* 238 erstreckt sich dieser Bereich über Oar-RGP 14 bis Oar-RGP 17, während er in *O. antarcticus*, abgesehen von



Abb. 13 Regionale Anhäufung einiger Gruppen von transposablen Elementen (TEs) in den Genomen von *O. arcticus* 238 und *O. antarcticus* 307

Oan-RGP 16, nur konservierte Genomabschnitte umfasst. In beiden Fällen ist jedoch eine Region enthalten, welche ein Xanthorhodopsin-Gencluster aufweist (siehe 3.2.2.1+3.2.5). In *O. arcticus* sind IS6-Elemente auch auf Plasmid pOAR160 stark vertreten. Die Tatsache, dass IS6- und IS903 (Familie IS5)-ähnliche Elemente in *O. arcticus* sowohl im selben Abschnitt des Chromosoms, als auch auf Plasmid pOAR160 gehäuft vorkommen, deutet auf vergangene Rekombinations-Ereignisse zwischen diesen Genom-Bereichen hin. Transposable Elemente der Familie IS256 konzentrieren sich in *O. antarcticus* deutlich in Region Oan-RGP 9, welche in diesem Organismus Gasvesikel- und Flagellen-Gencluster enthält (siehe 3.2.2.1, 3.2.4.2+3.2.4.3), während sie in *O. arcticus* gleichmäßig über das Genom verteilt sind. Auch in *O. arcticus* ist ein einzelnes Element dieser Familie in der Umgebung des Gasvesikel-Genclusters vorhanden, welches sich in diesem Organismus jedoch auf dem Plasmid pOAR160 befindet.

3.2.2.3 Pseudogene

Beide *Octadecabacter*-Stämme enthalten, verglichen mit anderen Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe, eine ungewöhnliche hohe Zahl an Pseudogenen (Tab. 7, 3.1.1). Um zu untersuchen, ob dies ausschließlich auf die Aktivität von transposablen Elementen (TEs) zurückzuführen

Abgebildet sind zirkuläre, nicht maßstabsgetreue, Repräsentationen der *Octadecabacter*-Genome. GC-Plots sind als ringförmige Graphen im Inneren der kreisförmigen Genomdarstellungen angezeigt. Die Positionen und Nummern von RGPs (siehe 3.2.2.1) sind ausserhalb der Kreise markiert. Das Vorkommen von Genen verschiedener Gruppen von TEs ist durch verschiedene Farben dargestellt. Es sind deutliche regionale Anhäufungen einiger TE-Gruppen zu erkennen.

ist, wurden sämtliche Pseudogene sowie deren Genumgebung im Einzelnen überprüft (Tab. 10).

Der überwiegende Teil an Pseudogenen in beiden *Octadecabacter*-Stämmen (262 von 411 in *O. arcticus* bzw. 273 von 361 in *O. antarcticus*) ist Bestandteil eines transposablen Elements. Dies war zu erwarten, da solche Elemente aufgrund ihrer hohen Kopienzahl in den *Octadecabacter*-Genomen, sowie der Fähigkeit vieler TEs *in trans* aktiviert zu werden (Mahillon, Léonard & Chandler 1999), einem niedrigeren evolutionärem Druck ausgesetzt sein sollten als andere Gene. Von den übrigen Pseudogenen ist ein hoher Anteil in *O. arcticus* (77 von 411) und ein niedriger Anteil in *O. antarcticus* (9 von 361) durch die Insertion eines transposablen Elements fragmentiert worden. Dies deutet darauf hin, dass einige der TEs in den *Octadecabacter*-Stämmen noch aktiv sind und, vor allem in *O. arcticus*, auch Stoffwechsel-relevante Gene beeinträchtigen können. Die restlichen Pseudogene sind nicht direkt auf den Einfluss transposabler Elemente zurückzuführen. Die Zahl dieser Pseudogene ist mit 72 in *O. arcticus* und 81 in *O. antarcticus* noch immer höher als die Gesamtzahl an Pseudogene) und *Phaeobacter caeruleus* 13 (81 Pseudogene).

	О.	arcticus 238	O. ant	arcticus 307
	Anzahl	Anteil an Genom ^a	Anzahl	Anteil an Genom ^a
Pseudogene gesamt:	411	8,0%	361	7,37%
davon Bestandteil eines TE	262	5,1%	273	5,57%
durch Insertion eines TE fragmentiert	77	1,5%	9	0,18%
restliche Pseudogene	72	1,4%	81	1,65%

Tab. 10 Pseudogene in O. arcticus und O. antarcticus

TE = Transposables Element

^aProtein-kodierende + Pseudo- + rRNA- + tRNA-Gene

3.2.2.4 Genom-alignments

Es wurden paarweise Genom-*alignments* (siehe 2.10.2) von *Octadecabacter antarcticus* 307 gegen *Octadecabacter antarcticus* 238 erstellt und mit entsprechenden Genom-*alignments* von *Roseobacter denitrificans* Och114 gegen *Roseobacter litoralis* Och149 und *Nautella italica* R11 gegen *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395 verglichen (Abb. 14). Diese Organismenpaare wurden für Vergleichs-*alignments* ausgewählt, weil sie auf Multilokus Sequenzanalyse-Ebene (MLSA) sowie auf Ebene der durchschnittlichen Nukleotididentitäten



Abb. 14 Genomalignments der Octadecabacter-Stämme sowie verschiedener Vergleichsorganismen

A) MUMmer-Plots basierend auf Nukleotid-Sequenzen. Lineare Bereiche repräsentieren zusammenhängende übereinstimmende Genomabschnitte. Rote Färbung deutet auf identische Orientierung der Abschnitte in beiden Vergleichsgenomen hin, während blaue Färbung Inversionen anzeigt. Die entsprechenden phylogenetischen Distanzen auf MLSA- sowie ANIb-Ebene (siehe 3.1.3) sind für jedes Organismenpaar angegeben. Zusätzliche Vergleiche zwischen weiteren *Roseobacter*-Vertretern sind in Abb. A2 (Anhang) dargestellt. B) Graphische Darstellung der Mauve-*alignments*. Farbige Boxen repräsentieren zusammenhängende Genomabschnitte. Die Füllung der Boxen stellt den jeweiligen Grad an Übereinstimmung dar. Die Position der Boxen oberhalb bzw. unterhalb der Grenzlinien, zeigt die relative Orientierung der Abschnitte in den jeweiligen Vergleichsorganismen an. Es zeigt sich das die Genome der *Octadecabacter*-Stämme eine deutlich geringere Syntenie aufweisen als vergleichbare Organismen mit ähnlichen phylogenetischen Verhältnissen.

(ANIb) ähnliche phylogenetische Distanzen (Abb. 8 + Abb. 10) zeigten wie die beiden *Octadecabacter*-Stämme (siehe 3.1.3), und die entsprechenden Genomsequenzen zudem nur sehr wenige bzw. keine Lücken aufwiesen. Ausserdem wurden *P. gallaeciensis* DSM17395 und *N. italica* R11, ähnlich wie die beiden *Octadecabacter*-Stämme, an nahezu entgegengesetzten Standorten des Erdglobus isoliert (Tab. DA01, digitaler Anhang). Die *Octadecabacter*-Genome zeigten im Vergleich zu den anderen verwandten *Roseobacter*-Stämmen eine extrem hohe Divergenz (Abb. 14). Dies äußerte sich besonders deutlich in NUCmer-Plots (Abb. 14a) welche bei den *Octadecabacter-alignments* nur sehr kurze übereinstimmende (linear dargestellte) Bereiche mit einer sehr diffusen Verteilung aufwiesen (Abb. 14a). Sowohl R. litoralis und R. denitrificans als auch P. gallaeciensis und N. italica wiesen weitaus höhere Syntenien und zudem eine gleichmässigere Verteilung und Übereinstimmender Genomabschnitte auf (Abb. Orientierung 14). Mauve-Plots verdeutlichten, dass dennoch teilweise sehr hohe Sequenz-Übereinstimmung zwischen Teilabschnitten beider Octadecabacter-Genome vorhanden sind (Abb. 14b). Diese sind jedoch in Form kleiner Regionen weit über die entsprechenden Genome verteilt. Zudem weisen diese Regionen zwischen den Octadecabacter-Genomen weitaus mehr Inversionen auf, als das bei alignments von R. denitrificans gegen R. litoralis bzw. N. italica gegen P. gallaeciensis der Fall ist.

3.2.3 Unterschiede zwischen O. arcticus und O. antarcticus

3.2.3.1 Cyanophycin-Gencluster in O. arcticus

O. arcticus 238 besitzt ein innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe kaum verbreitetes Gencluster, welches die Synthese sowie den Abbau von Cyanophycin kodiert (Abb. 15). Cyanophycin ist ein nicht-ribosomal synthetisiertes, verzweigtes und wasserunlösliches Polymer des Isodipeptids β -Aspartat-Arginin (β -Asp-Arg) (Berg *et al.* 2000; Berg 2003). Das Enzym Cyanophycin-Ligase katalysiert sowohl die Synthese des β -Asp-Arg-Monomers als auch dessen Polymerisierung. In Cyanobakterien liegt dieses Enzym als Homodimer, bestehend aus zwei identischen CphA-Untereinheiten, vor (Ziegler *et al.* 1998). In anderen Organismen kann es jedoch auch als Heterodimer vorkommen, bestehend aus einer CphA-Untereinheit und einer CphA-ähnlichen Untereinheit (CphA^c) (Füser & Steinbüchel 2007). Die



Abb. 15 Cyanophycin-Gencluster mit Typ VI Cyanophycin-Ligase

Identische Farben kennzeichnen Orthologe zwischen den Vergleichsstämmen. Cyanophycin-Ligase-Gene sind jeweils mit dem entsprechenden *locus tag* beschriftet. In *O. arcticus* ist die assoziierte Iso-Aspartyl Peptidase vom IaaA-Typ, während sie bei *Rhodobacteraceae* sp. R2A57 und *C. psycherythraea* 34H dem IadA-Typ angehört.




Neighbor-Joining Baum basierend auf Proteinsequenzen. Gruppen die aus mehr als drei Sequenzen bestehen und *Bootstrap*-Werte von über 70% aufweisen, sind als geschlossene Gruppen dargestellt. Gruppen die prinzipiell bereits durch Füser *et al.* (2007) beschrieben wurden, sind mit einem Asterisk (*) markiert und entsprechend mit römischen Zahlen durchnummeriert. Neu entdeckte Gruppen sind mit den Kleinbuchstaben a-i beschriftet. Die Anzahl an Sequenzen pro Gruppe ist jeweils in Klammern angegeben. Die relativen Anteile unterschiedlicher Bakterien-Taxa, die in den verschiedenen Gruppen vertreten sind, wurden durch verschiedene Farbmarkierungen dargestellt. Verzweigungen mit *Bootstrap*-Werten über 50% sind mit schwarzen Punkten markiert. Gruppen VI und VII, welche Cyanophycin-Ligase-gene von *O. arcticus* 238 beinhalten, sind Fett hervorgehoben. Eine genaue Auflistung aller im Stammbaum enthaltenen Sequenzen befindet sich in Tab. DA57 (digitaler Anhang).

Organisation des entsprechenden Genclusters von *O. arcticus* 238 (Abb. 15) legt nahe, dass es sich bei der Cyanophycin-Ligase dieses Organismus um ein Heterodimer handelt. Ähnliche Gencluster sind auch in *Phaeobacter daeponensis* DSM23529 und *Rhodobacteraceae* sp. R2A57 vorzufinden. Cyanophycin ist nicht anfällig für die Aktivität der meisten Proteinasen und Peptidasen. Der Abbau dieses Polymers geschieht durch Cyanophycinasen (CphB) und Iso-Aspartyl Peptidasen (IadA bzw. IaaA) (Füser & Steinbüchel 2007). Solche Abbau-Enzyme sind ebenfalls im Cyanophycin-Gencluster von *O. arcticus* 238 vertreten (Abb. 15).

Das Produkt des *cphA*-Gens von *O. arcticus* wies hohe Sequenzähnlichkeiten (>70%) zu Cyanophycin-Ligasen von *Mycobacterium marinum* M, *Acinetobacter* sp. ADP1, *Colwellia psycherythraea* 34H sowie *Francisella tularensis* Schu 4 auf. Diese bilden Gruppe-VI der von Füser und Steinbüchel etablierten zehn Gruppen von Cyanophycin-Ligasen (I-X) (Füser & Steinbüchel 2007). Da jedoch in der Zwischenzeit die Zahl öffentlich verfügbarer Sequenzen stark gestiegen ist, und um eine korrekte phylogenetische Einteilung der *Octadecabacter*-Cyanophycin-Ligase sicherzustellen, wurde die NCBI-nr Datenbank per BLAST-Analysen nach weiteren Cyanophycin-Ligase-ähnlichen Proteinsequenzen durchsucht. Die so ermittelten Proteinsequenzen wurden in einem phylogenetischen Stammbaum integriert (Abb. 16).

	5	
Organismus	NCBI-Acc	Herkunft
Acinetobacter sp. ADP1	CAG68152	Strand der Iriomote-jima Insel, Japan
Mycobacterium marinum M	YP_001850711	San Francisco, Kalifornien, USA
Colwellia psychrerythraea 34H	YP_268601	Arktisches Sediment
Francisella tularensis SCHU 4	YP_170103	Ohio, USA
Octadecabacter arcticus 238	ZP_05067667	Arktisches Meereis
Rhodobacteraceae sp. R2A57	-	Meerwasser, Aquina Bucht, Oregon, USA
Phaeobacter daeponensis DSM23529	-	Strand von Daeopo, Südkorea
<i>Francisella novicida</i> FTE	ZP_03057450	Mauspassage von Stamm U112
Francisella novicida U112	YP_898752	Patient, Ogden Bucht, Utah, USA
Francisella novicida GA99-3548	ZP_04990001	Loisiana, USA
Francisella tularensis WY96-3418	YP_001122090	Wyoming, USA
Francisella novicida FTG	ZP_03247111	genaue Herkunft nicht ermittelbar
Francisella tularensis MA00-2987	ZP_03665784	Martha's Vineyard, Massachusetts, USA
Francisella tularensis FSC 198	YP_667235	Slovakei
Francisella tularensis FSC033	ZP_04986699	Georgia, USA
Francisella tularensis FSC147	YP_001891929	Alma-Ata-Region, Kazakhstan
Francisella tularensis MA00-2987	ZP_05247730	Martha's Vineyard, Massachusetts, USA
Francisella novicida GA99-3549	ZP_04988557	Kalifornien, USA
Francisella tularensis URFT1	ZP_06558955	Frankreich
Francisella tularensis FTNF002-00	YP_001428312	Frankreich
Francisella tularensis OSU18	YP_763387	Red Rock, Oklahoma, USA
Francisella tularensis 257	ZP_04983545	Moskau, Russland
Francisella tularensis LVS	YP_513553	Europa
Francisella tularensis FSC200	ZP_02274705	genaue Herkunft nicht ermittelbar
Francisella tularensis FSC022	ZP_04985201	Japan
Francisella philomiragia ATCC 25015	ZP_04755870	Brigham City, Utah, USA
Francisella philomiragia ATCC 25017	YP_001678220	Bear River Refuge, Utah, USA
Francisella philomiragia ATCC 25015	ZP_05249534	Brigham City, Utah, USA
Congregibacter litoralis KT71	ZP_01104810	Bei Helgoland, Deutschland
gamma proteobacterium NOR5-3	ZP_05125957	Sylt, Deutschland
Plesiocystis pacifica SIR-1	ZP_01912973	Japan
Acinetobacter sp. ADP1	YP_045974	Strand der Iriomote-jima Insel, Japan
Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779	YP_001543393	Minnesota, USA

Tab. 11 Liste der Gruppe-VI Cyanophycin Ligasen und der zugehörigen Organismen.

Zwar bleiben die durch Füser und Steinbüchel etablierten Gruppen mit hohen *Bootstrap*-Werten bestehen, jedoch existieren noch einige weitere Gruppen und es zeigte sich, dass Cyanophycin-Ligasen in weitaus vielfältigeren Organismen verbreitet sind als bisher angenommen. Entsprechende Gencluster sind in Bakterien neun verschiedener Phyla zu finden. Am häufigsten wurden solche Gencluster in Genomen von Vertretern des Phylums Firmucutes, insbesondere der Klasse *Clostridia*, nachgewiesen. Die Cyanophycin-Ligase-Sequenzen mehrerer Gruppen (insbesondere Gruppen VI und VII sowie Gruppe f) stammen trotz hoher Sequenz-Übereinstimmungen von Vertretern sehr unterschiedlicher bakterieller Taxa (Abb. 16), was auf eine Übertragung dieser Eigenschaft durch horizontalen Gentransfer hindeutet.

Die Vertreter der Gruppe-IV beinhalten neben *O. arcticus* auch Ligasen aus Organismen der Phyla *Actinobacteria*, *Chloroflexi* und *Deltaproteobacteria*, hauptsächlich aber aus Vertretern der *Gammaproteobacteria* (Tab. 11). Dazu gehört auch *Colwellia Psycherythraea*, eine weitere psychrophile arktisch-marine Bakterienart, deren Vertreter auch häufig in Meereis vorzufinden sind. Die übrigen Organismen, welche eine Gruppe-VI Cyanophycin-Ligase besitzen, stammen allesamt aus der nördlichen Hemisphäre. Die meisten der Isolate, in denen diese Ligase nachgewiesen wurde, gehören den nah verwandten bakteriellen Krankheitserregern *Francisella tularensis, Francisella novicida* und *Francisella philomiragia* an, welche fast ausschließlich in der nördlichen Hemisphäre auftreten (Keim, Johansson & Wagner 2007). Aufgrund hoher Sequenzübereinstimmungen wird *F. novicida* als Unterart von *F. tularensis* betrachtet, doch die Zusammenführung dieser Taxa ist bislang noch umstritten (Huber *et al.* 2010; Johansson *et al.* 2010).

Obwohl die Herkunft entsprechender Isolate für ein endemisches Vorkommen von Gruppe-VI Cyanophycin-Ligasen auf der nördlichen Erdhalbkugel hindeuten (Tab. 11), zeigten Screenings von marinen Metagenombanken der GOS und AntarcticAquatic Metagenomprojekte (siehe 2.11), dass diese Gruppe an Cyanophycin-Ligasen durchaus auch in der südlichen Hemisphäre vorzufinden ist (Abb. 17). In marinen Habitaten waren diese Cyanophycin-Ligasen allerdings hauptsächlich auf Polargebiete beschränkt. Marine Habitate in temperaten bis tropischen Regionen wiesen nur selten Cyanophycin-Ligasen dieses Typs auf.



Abb. 17 Biogeographie von Gruppe-VI Cyanopycin-Ligasen in marinen und Eis-assoziierten Standorten Die Abbildungen wurden mit Ocean Data View (ODV) Version 3.3.2 (AWI, Bremerhaven) erstellt. Es wurden nur marine und Eis-assoziierte Standorte berücksichtigt. Probenorte von Metagenomen, welche Sequenzen von Cyanophycin-Ligasen aufwiesen, sind durch farbige Kreise repräsentiert. Durch unterschiedliche Färbung dieser Kreise ist der jeweilige Anteil an Typ VI Cyanophycin-Ligasen an den gesamten Cyanophycin-Ligasen des jeweiligen Metagenoms gekennzeichnet. Weiße Kreise kennzeichnen Probenorte von Metagenomen, welche keine Sequenzen von Cyanophycin-Ligasen aufwiesen. Metagenome aus Tiefseeproben sind mit weißen Dreiecken markiert. Kreuze markieren Isolierungsorte von marinen Organismen welche Typ VI Cyanophycin-Ligase Gene besitzen. Die Farbe der Kreuze zeigt an, ob es sich bei dem Isolat um einen Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe oder einen Vertreter einer anderen bakteriellen Gruppe handelt.

3.2.3.2 Assimilatorische Nitrat-Reduktion in O. antarcticus

O. antarcticus besitzt, im Gegensatz zu *O. arcticus* (siehe 3.2.3.1), keine Gene für die Synthese von Stickstoff-Speicherpolymeren. Stattdessen konnte jedoch ein Gencluster der assimilatorischen Nitrat-Reduktion identifiziert werden. Dieses Gencluster beinhaltet die Bestandteile eines Nitrat ABC-Transporters, bestehend aus einem extrazellulärem Substrat-Bindeprotein, einer Permease und einer ATPase, sowie einer Nitrit-Reduktase, bestehend aus zwei Untereinheiten und einer Nitrat-Reduktase.



Abb. 18 Gencluster der assimilatorischen Nitrat-Redukion in *R. litoralis* und *O. antarcticus* Orthologe zwischen *O. antarcticus* und *R. litoralis* sind durch identische Färbung der jeweiligen Gensymbole gekennzeichnet. Das jeweils erste und letzte Gen der dargestellten Gencluster sind mit den entsprechenden *locus tags* beschriftet. Die Funktion der einzelnen Genprodukte ist jeweils für *R. litoralis* angegeben. Die Basenfolge in der unmittelbaren Umgebung der Punkmutation, welche in *O. antarcticus* zu einer Unterbrechung der ATPase Untereinheit des Nitrat-Transporters führte, ist für beide Vergleichsorganismen angegeben. A) Gencluster der assimilatorischen Nitrat-Reduktion in *R. litoralis*. B) Gencluster der assimilatorischen Nitrat-Reduktion in *O. antarcticus*.

Diese Eigenschaft ist innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe weit verbreitet. 21 der 48 bislang sequenzierten *Roseobacter*-Genome, darunter Vertreter aller 5 Untergruppen (siehe 3.1.3), weisen das entsprechende Gencluster auf. Der Aufbau des Genclusters ist dabei stark konserviert und entspricht grundsätzlich der in Abb. 18A dargestellten Organisation. In *O. antarcticus* ist jedoch, anders als bei allen anderen Roseobactern, das Gen der ATPase Untereinheit des Nitrat-Transporters unterbrochen. Der Grund hierfür ist eine Punktmutation in Base 1262 dieses Gens, wodurch das Triplet TCG, welches für Serin kodieren würde, in das Stop-Codon TAG umgewandelt wurde. Dennoch ist der Nitrat-Transporter hierdurch nicht zwangsläufig inaktiviert. Die Punktmutation unterbricht das Gen in einem Bereich, der einer Shine-Dalgarno-Sequenz gleicht, und nur wenige Basen stromaufwärts eines potentiellen Start-Codons. Somit können sowohl das vordere als auch das hintere Fragment dieses Gens



Abb. 19 Wachstum von O. antarcticus mit verschiedenen Stickstoffquellen

Als Basis-Medium diente gepuffertes MB2216-Medium (pH 7.5) mit geringer Zugabe von Hefeextrakt, aber ohne Zugabe von Pepton (siehe 2.2.1). Als Kohlenstoffquelle diente Glucose. Es wurden verschiedene Ansätze durchgeführt mit Ammoniumchlorid (Positivkontrolle) oder Natriumnitrat als Stickstoffquelle (N-Quelle) bzw. ohne Stickstoffquelle (Negativkontrolle). Alle Ansätze wurden in zwei Parallelen durchgeführt (A und B). Wachstum wurde durch Trübungsmessung mittels eines Klett-Summerson Photometers verfolgt. Für jede Kultur ist die Optische Dichte (OD in Klett-Einheiten) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen.

translatiert werden. Um die Befähigung zur Nitrat-aufnahme zu überprüfen, wurden Wachstumsversuche mit *O. antarcticus* in Medien mit oder ohne Zugabe einer Stickstoffquelle (Ammoniumchlorid oder Natriumnitrat) durchgeführt (Abb. 19). Als Basismedium diente modifiziertes SWC-Medium in dem Pepton als vorwiegende Kohlenstoff-Quelle durch Glucose ersetzt und die Menge an zugegebenen Hefeextrakt als Vitaminquelle stark reduziert wurde (siehe 2.2.1).

O. antarcticus zeigte in Medien, welche Nitrat als hauptsächliche Stickstoff-Quelle enthielten, ein deutlich stärkeres Wachstum als in Medien ohne zugesetzte Stickstoffquelle. Das Wachstum war gegenüber solchen Kulturen, welche mit Ammonium als hauptsächlicher Stickstoff-Quelle wuchsen, nur geringfügig eingeschränkt. Dies deutet darauf hin, dass *O. antarcticus* in der Lage ist Nitrat aufzunehmen und als Stickstoffquelle zu nutzen.

3.2.3.3 Ectoin-Aufnahme und Verwertung

Im Gegensatz zu *O. antarcticus* besitzt *O. arcticus* ein Gencluster für die Aufnahme und den Abbau von Ectoin, einem kompatiblen Solut, das als Osmo- und Cryoprotektant dienen kann. Ähnliche Gencluster sind auch in einigen anderen *Roseobacter*-Vertretern zu finden. Insgesamt zwölf der 49 untersuchten *Roseobacter*-Stämme tragen Gene für die Aufnahme von Ectoin, während nur sieben Vertreter das Potential zur Ectoin-Verwertung besitzen. Die entsprechenden Organismen unterscheiden sich jedoch größtenteils im Typ des assoziierten Ectoin-Transporters. In *O. arcticus* ist dies ein ABC-Transporter des *ehu*-Typs. Die Expression dieses Typs an Ectoin- Transportern wird in *Sinorhizobium meliloti* durch die Verfügbarkeit von exogenem Ectoin aktiviert (Jebbar *et al.* 2005) und kommt nur in insgesamt 4 *Roseobacter*-Stämmen vor, von denen zudem nur zwei zur Verwertung von Ectoin befähigt sind. Die meisten (neun von zwölf) der zur Aufnahme von Ectoin befähigten *Roseobacter*-Stämme besitzen dagegen TRAP-Transporter des *tea*-Typs. Hierbei handelt es sich um eine Art von Ectoin-Transporter, welcher ebenfalls in *Halomonas elongata* zu finden ist und dort durch Schwankungen der Osmolarität aktiviert wird (Grammann, Volke & Kunte 2002). In Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass *O. arcticus* in der Lage ist, Ectoin als hauptsächliche Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Abb. 20).

Im Gegensatz zu *O. antarcticus*, dem entsprechende Gencluster fehlen, wies *O. arcticus* bei Zugabe von Ectoin als hauptsächlicher Kohlenstoff- und Energiequelle ein deutlich stärkeres Wachstum auf als in Ansätzen ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle. Allerdings war das Wachstum deutlich weniger stark ausgeprägt als bei Ansätzen mit Pepton oder Glucose als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle.



Abb. 20 Wachstum von Octadecabacter-Kulturen mit Ectoin als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle Als Basis-Medium diente gepuffertes SWC-Medium (pH 7.5) mit geringer Zugabe von Hefeextrakt aber ohne Zugabe von Pepton (siehe 2.2.1). Es wurden verschiedene Ansätze durchgeführt mit Pepton (Positivkontolle) oder Ectoin als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) bzw. ohne Kohlenstoffquelle (Negativkontrolle). Ansätze mit Ectoin sowie Negativkontrollen wurden in drei Parallelen durchgeführt (A, B und C). Wachstum wurde durch Trübungsmessung mittels eines Klett-Summerson Photometers verfolgt. Für jede Kultur ist die Optische Dichte (OD in Klett-Einheiten) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen.

3.2.3.4 Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase(RuBisCO)-ähnliches Gen

O. antarcticus weist ein Gen auf, welches ein Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO)-ähnliches Protein kodiert (OAN307_c00690). Orthologe dieses Gens sind nur in sechs anderen *Roseobacter*-Genomen zu finden: *Citreicella* sp. SE45, *Jannaschia* sp. CCS1, *O. granulosus* HTCC2516, *P. bermudensis* HTCC2601 *Rhodobacteraceae* sp. MED193 und "*Ca.* P. marina" RCA23. Die höchste Ähnlichkeit, sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Organisation der näheren Genumgebung, wies das entsprechende Ortholog von "*Ca.* P. marina" RCA23 auf (Abb. 21). In *O. arcticus* ist kein Ortholog dieses Gens vorhanden.

BLAST-Analysen zeigten eine nahe Verwandtschaft zu dem Swissprot-Eintrag Q8KBL4, einem Protein aus *Chlorobium tepidum* DSM12025. Funktionelle Analysen dieses Proteins hatten ergeben, dass es nicht an einer Fixierung von Kohlenstoff beteiligt ist, aber dafür wahrscheinlich eine Rolle im Sulfat-Metabolismus und der osmotischen Stress-Antwort spielt (Hanson & Tabita 2001). Diese Art von RuBisCO-ähnlichen Proteinen wird als Typ IV RuBisCo oder *RuBisCO-Like Protein* (RLP) bezeichnet (Tabita *et al.* 2007).



Abb. 21 Gencluster RuBisCO-ähnlicher Gene in Roseobacter-Vertretern

Gene, welche keine Orthologe zu den entsprechenden Genclustern der Vergleichsstämme aufwiesen, sind in Weiß dargestellt Andere Farben kennzeichnen Orthologe zwischen den Vergleichsstämmen. RuBisCO-ähnliche Gene sind in Rot dargestellt und mit dem jeweils entsprechenden *locus tag* beschriftet.

3.2.3.5 Typ IV-Sekretionssystem in O. arcticus

O. arcticus besitzt 3 Gencluster, welche einem Typ IV Sekretionssystem zuzuordnen sind (Abb. 22). Vertreter dieses vielseitigen Sekretionssystems sind in verschiedenen bakteriellen Organismen als Mechanismen der Konjugation, der natürlichen Transformation oder der Übertragung von Effektoren nachgewiesen worden (Cascales & Christie 2003; Fronzes, Christie & Waksman 2009; Wallden, Rivera-Calzada & Waksman 2010). Typ IV Sekretionssysteme können somit entweder Instrumente des horizontalen Gentransfers oder Merkmale der Pathogenität sein. Entsprechende Gencluster sind in 18 der 49 *Roseobacter*-Vergleichsstämme zu finden, fehlen jedoch in *O. antarcticus* 307 und "*Ca.* P. temperata" RCA23.

Im Gegensatz zu den anderen *Roseobacter*-Stämmen, welche Typ IV Sekretionssysteme aufweisen, sind in *O. arcticus* die entsprechenden Gencluster auf verschiedene Genomregionen verteilt. Da die Gencluster in *O. arcticus* zudem von transposablen Elementen flankiert werden, ist dies vermutlich auf intragenomische Rekombinationsereignisse zurückzuführen. Das erste Gencluster, bestehend aus den Genen von VirB2-VirB5, VirB8, zwei putativen lytischen Transglycosilasen sowie zwei konservierten hypothetischen Proteinen, befindet sich im Bereich von Oar-RGP 3. Dieses Gencluster ist aufgrund von zwei Punktmutationen in *virB4* und einer Insertion eines transposablen Elements in *virB8* defekt. Die



Abb. 22 Gencluster der Typ IV Sekretionssysteme in *O. arcticus* 238 und ausgewählten Vergleichsorganismen

Graue und schwarze Färbung kennzeichnet jeweils Transposasen und Rekombinasen. Weiße Färbung kennzeichnet Gene, welche keine Orthologe in den entsprechenden Genclustern der Vergleichsstämme aufwiesen. Alle anderen Farben markieren Orthologe zwischen Vergleichsstämmen. Die Typ IV Sekretionssystemgene *virB2-B11* und *virD2-D4* sind jeweils für *O. arcticus* mit *B2-B11* bzw *D2-D4* beschriftet. Beschriftungen in Klammern weisen auf Pseudogene in *O. arcticus* hin. Die jeweils ersten und letzten Gene zusammengehöriger Gencluster sind mit den entsprechenden *locus tags* beschriftet.



Abb. 23 Phylogenie von Typ IV-Sekretionssystemen in Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe Dargestellt ist ein ungewurzelter Neighbor-Joining Stammbaum, basierend auf den Aminosäuresequenzen der Genprodukte VirB9-11. Einige Vergleichsorganismen besitzen mehrere Paraloge dieser Gene. In diesen Fällen sind die jeweiligen Paraloge in eckigen Klammern mit A-C gekennzeichnet. Zugehörigkeit zu einer der MLSAbasierten *Roseobacter*-Untergruppen ist durch farbige Hinterlegung gekennzeichnet.

anderen beiden Gencluster befinden sich in einigem Abstand zueinander im Bereich von Oar-RGP 11. Ein Gencluster kodiert die Proteine VirB6 und VirB9-VirB10, während das andere Gencluster VirD2, VirD4 sowie ein MobC-ähnliches Protein kodiert. Phylogenetische Analysen dieser Sekretionssysteme, basierend auf Aminosäuresequenzen der Genprodukte VirB9-11, ergaben keinen direkten Zusammenhang mit der MLSA-basierten Phylogenie der *Roseobacter*-Gruppe (Abb. 23).

3.2.4 Charakteristische Gemeinsamkeiten zwischen O. arcticus und O. antarcticus

3.2.4.1 Gene Transfer Agents (GTAs)

Gene Transfer Agents (GTAs) sind keine spezifische Eigenschaft der Octadecabacter-Stämme, sondern ein Merkmal, das der Großteil der Roseobacter-Gruppe teilt (Newton et al. 2010), und dementsprechend nicht in einer Region erhöhter Genomplastizität (RGP) lokalisiert (Abb. 12). Es handelt sich dabei um Phagen-ähnliche Partikel, welche zufällige Fragmente des Wirtsgenoms verpacken und in nah verwandte Bakterien einschleusen können (Lang, Zhaxybayeva & Beatty 2012). Entsprechende Gencluster sind in 43 der 49 sequenzierten Roseobacter-Vertretern vorhanden und stark konserviert (Abb. 24). Organismen, welche kein entsprechendes Gencluster aufweisen, sind Rhodobacteraceae sp. R2A57, HTCC2255, KLH11 sowie Thalassobium sp. R2A62. Rhodobacteraceae sp. HTCC2083 und "Cand. P. temperata" RCA23 besitzen ebenfalls keine vollständigen GTA Gencluster. Diese beiden Organismen weisen jedoch Genfragmente auf, welche darauf hindeuten, das GTAs in den Vorfahren dieser Stämme noch vorhanden waren (Abb. 24).



Abb. 24 Gene Transfer Agent (GTA)-Gencluster und Umgebung in verschiedenen Roseobacter-Vertretern GTA-Gencluster befinden sich häufig in der Umgebung eines konservierten Serin-O-Acetyl Transferase(SAcT)-Gens (blau). Das erste Gen des GTA-Clusters (X) kodiert ein großes hypothetisches Protein unbekannter Funktion und ist grün dargestellt. Dieses Gen ist in *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2083 und *Cand*. P. temperata RCA23 fragmentiert. In *O. arcticus* ist ein transposables Element in dieses Gen inseriert (grau). Die charakterisierten Bestandteile des Genclusters, Schwanzfaser Protein (TF), primäres Schwanzprotein (MT), Kopf-Schwanz-Adaptor (A), primäres Capsid (C), Kopf-Protease (PP), Portal-Protein (P) und Terminase (T), sind in braun dargestellt. Pseudogene sind dadurch markiert, dass die Beschriftungen in Klammern gesetzt wurden. Konservierte Wirts-Gene (mit Ausnahme von *sacT*) sind in Gelb dargestellt. Das erste und das letzte Gen der einzelnen Gencluster sind jeweils mit dem entsprechenden *Locus tag* beschriftet.



Abb. 25 Neighbor-Joining-Baum von GTA-Genprodukten in Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe *Bootstrap*-Werte über 50% sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Farbmarkierungen und Nummerierungen weisen auf die Untergruppenzugehörigkeit der entsprechenden Organismen hin (siehe 3.1.3.1)

Die Aminosäure-Sequenzen konservierter GTA-Genprodukte wurden konkateniert und für phylogenetische Analysen verwendet (siehe 2.10.7). Es zeigte sich, dass die Verwandtschaftsverhältnisse der GTA-Gencluster in den verschiedenen Roseobacter-Vertretern weitestgehend die durch Multilokus Sequenzanalysen (MLSA) des Core-Genoms (siehe 3.1.3.1) ermittelte Phylogenie *Roseobacter*-Gruppe der widerspiegelt (Abb. 25). Abweichungen gab es lediglich in Bezug auf die beiden terrestrischen K. vulgare-Stämme, welche laut GTA-Phylogenie deutlich von den übrigen Vertretern der Untergruppe 4 abzugrenzen sind, sowie in Bezug auf Jannaschia sp. CCS1 und D. shibae DFL-12, welche in GTA-Sequenzvergleichen, Gegensatz Core-Genomim zu Vergleichen, keine gemeinsame Gruppe bilden.

3.2.4.2 Flagellen

Obwohl *O. arcticus* 238 und *O. antarcticus* 307 als unbeweglich beschrieben wurden (Gosink, Herwig & Staley 1997), sind in beiden Genomen drei zusammengehörige Gencluster zu finden, welche für Flagellen-Synthese kodieren. In *O. arcticus* befinden sich die Gencluster auf dem Plasmid pOAR118 (Oar-RGP 18) während sie in *O. antarcticus* auf dem Chromosom in Region Oan-RGP 9 zu finden sind. Die Reihenfolge der Gencluster unterscheidet sich in den beiden *Octadecabacter*-Stämmen etwas, die einzelnen Cluster sind jedoch in beiden Organismen nahezu identisch aufgebaut (Abb. 26).



Abb. 26 Flagellen-Gencluster in O. arcticus 238 und O. antarcticus 307.

Die obere Abbildung stellt die relative Orientierung der drei Flagellengencluster beider *Octadecabacter*-Vertreter dar. Die Organisation der einzelnen Flagellengencluster ist darunter abgebildet. Hypothetische Gene sind weiß dargestellt. Alle anderen Farben deuten auf Orthologe in den *Octadecabacter*-Vertretern hin. Dargestellt ist der Genombereich zwischen den *locus tags* OA238_118p0200-118p0780 (*O. arcticus* 238) und OAN307_c29440-c30060 (*O. antarcticus* 307).

BLAST-Vergleiche (siehe 2.9.3) zeigten, dass die Produkte der Flagellen-Synthesegene beider Octadecabacter-Stämme in ihren Aminosäure-Sequenzen stark von denen der meisten motilen Roseobacter-Vertretern abweichen. Für eine genauere Analyse wurden 15 Flagellengene (flgA, flgB, flgC, flgD, flgF, flgG, flgH, flgI, flhA, flhB, fliE, fliI, fliL, fliQ, und fliR) identifiziert, welche in allen Flagellen-Gencluster besitzenden Roseobactern vorhanden waren. Die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Genprodukte wurden konkateniert und phylogenetischen Analysen unterzogen (siehe 2.10.7). Die resultierenden Stammbäume bestätigten, dass die Flagellen-Gencluster der Octadecabacter-Stämme von der Norm der bisher sequenzierten Roseobacter-Stämme abweichen (Abb. 27). So zeichnen sich zwei eindeutig umgrenzte Typen an Flagellen-Genclustern ab. Der Großteil (85%) der Flagellen-Cluster der Roseobacter-Gruppe fällt in Typ I. Dieser Typ lässt sich desweiteren in zwei deutliche Unterkategorien einteilen. Typ Ia, welcher innerhalb der Roseobacter-Gruppe am stärksten verbreitet ist, und Typ Ib, welcher Gencluster von Sulfitobacter sp. NAS141 + EE-36, Oceanibulbus indolifex HEL45, Oceanicola batsensis HTCC2597 sowie Oceanicola granulosus HTCC2516 beinhaltet. Das Genom von O. granulosus HTCC2516 beinhaltet sowohl Gencluster des Typs Ia als auch des Typs Ib. Die Gencluster der Octadecabacter-Stämme fallen hingegen in Typ II, welcher zudem Gencluster der Roseobacter-Vertreter sp. TM1035, Loktanella vestfoldensis SKA53, Rhodobacteraceae Roseovarius sp. HTCC2083, und Cand. Planktomarina temperata RCA23 enthält. Sowohl Roseovarius sp. TM1035 als auch Rhodobacteraceae sp. HTCC2083 besitzen zusätzlich ein zweites Gencluster vom Typ I. Weitere Vertreter des Typs II sind diverse *Rhodobacter sphaeroides* Stämme, sowie mehrere Vertreter des SAR11-Clusters. Interessanterweise weist Typ II der Flagellen-Gencluster eine nähere Verwandtschaft zu Genclustern der *Gammaproteobacteria* als zu solchen des Typs I auf.



Abb. 27 Phylogenie der Flagellen-Gencluster in Vertretern der Roseobacter-Gruppe und verwandten Organismen.

Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe sind in roter Schrift dargestellt. Vertreter anderer *Alphaproteobacteria*-Gruppen sind in schwarzer Schrift dargestellt. Repräsentanten der *Gammaproteobacteria* wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit kollabiert. Für ausgewählte Verzweigungen wurden *Bootstrap*-Werte angegeben (durch Kreise markiert). Drei verschiedene Flagellentypen (Typ Ia, Typ Ib und Typ II) sind anhand der phylogenetischen Beziehungen ersichtlich. Diese Flagellentypen sind blau umkreist und entsprechend beschriftet.



Abb. 28 RT-PCR mit Flagellin-spezifischen Primern

Transcripte der Flagellengene *motA* und *flgA* wurden durch spezifische PCRs nachgewiesen (siehe 0). MatrizencDNA wurde aus RNA-Extrakten von *O. arcticus* 238-Kulturen, welche mit Licht (Hell) bzw. bei Dunkelheit (Dunkel) angezogen wurden erzeugt. Es wurden jeweils zwei Negativkontrollen durchgeführt: Eine Kontrolle wurde mit einem RNA-Aliquot durchgeführt, welches wie ein Ansatz der cDNA-Synthese behandelt wurde, jedoch ohne Zugabe von reverser Transkriptase (Neg. Kontr. 1). Bei der anderen Kontrolle wurde unverdünntes RNA-Extrakt ohne weitere Behandlung als Matrize eingesetzt (Neg. Kontr. 2). Als Positivkontrolle diente Chromosomale DNA von *O. arcticus* 238 (nicht abgebildet).

Durch RT-PCRs konnten Transkripte der Flagellengene *motA* und *flgA* in *O. arcticus* nachgewiesen werden (Abb. 28). Versuche, diese Flagellen durch Anfärbung unter dem Lichtmikroskop sichtbar zu machen (siehe 2.2.5) waren jedoch nicht erfolgreich. Verschiedene Motilitäts-Nachweise (siehe 2.2.5) fielen ebenfalls negativ aus (Tab. 12).

In Bezug auf "*Ca.* Planktomarina temperata" RCA23 sind ursprünglich ähnliche Beobachtungen gemacht worden. Die Zellen dieses Bakteriums wiesen, wie auch die der *Octadecabacter*-Stämme, unter dem Phasenkontrast-Mikroskop deutliche Zuckungen auf, jedoch keine gerichtete Fortbewegung (Giebel, H.-A., persönliches Gespräch). Zunächst war unklar ob die beobachteten Zuckungen auf eine generelle Beweglichkeit des Organismus zurückzuführen waren, in späteren Tests konnte jedoch schließlich die Motilität dieses Organismus nachgewiesen werden (Voget, Vollmers *et al.* 2013).

Tab. 12 Ergebnisse verschiedener Motilitäts-Tests mit O. arcticus 238 und O. antarcticus 30

Ansatz	Beobachtung
Weich-Agar Stichkulturen in Kultur-Röhrchen	Wachstum nur innerhalb des Einstichs. Kein
	Eindringen von Zellen in das umgebende Medium
Punktförmige Inokulation von Weich-Agar-	Kompakte, kreisförmige Kolonien ohne
Platten	schwarmförmige Ausbreitung
Beobachtungen mittels Phasen-Kontrast-	Deutliches Zucken der Zellen zu sehen, jedoch keine
Mikroskopie	gerichtete Fortbewegung

3.2.4.3 Gasvesikel

In beiden *Octadecabacter*-Genomen konnten Gencluster der Gasvesikel-Synthese identifiziert werden (Abb. 29a). In *O. antarcticus* befindet sich das Gencluster auf dem Chromosom in Region Oan-RGP 9, während es in *O. antarcticus* auf dem Plasmid pOAR160 enthalten ist. Gasvesikel-Bildung ist eine charakteristische Eigenschaft des Genus *Octadecabacter* (Gosink, Herwig & Staley 1997). Heterotrophe Organismen mit der Befähigung zur Gasvesikel-Bildung sind für die meisten marinen Habitate sehr ungewöhnlich, in Meereis jedoch häufiger vorzufinden. Entsprechend weist der überwiegende Teil der bislang sequenzierten *Roseobacter*-Vertreter keine Homologe zu Genen dieses Clusters auf. Einzige Ausnahmen stellen die zwei *Loktanella*-Stämme CCS2 und SE-62 dar (Abb. 29b). *Loktanella* CCS2 weist ein einzelnes *gvpK* aber keine weiteren Gasvesikel-Gene auf. *Loktanella* SE-62 besitzt hingegen auch weitere Gasvesikel-Gene in einem zusammenhängenden Cluster. BLAST-Vergleiche zeigten jedoch, dass diese Gene nur sehr geringe Sequenzähnlichkeiten zu den entsprechenden Genen in *O. arcticus* und *O. antarcticus* aufweisen. Stattdessen ähneln sie stark entsprechenden Gasvesikel-Genen in *Rhodobacter capsulatus* BS1003. In *Loktanella* sp.



Abb. 29 Gasvesikel-Gencluster in beiden Octadecabacter-Stämmen

a) Gasvesikel-Gencluster der *Octadecabacter*-Stämme. b) Gasvesikel-Gencluster in *Loktanella*-Stämmen und *Rhodobacter capsulatus* SB1003. Gene mit homologer Funktion sind durch identische Färbung gekennzeichnet. Hypothetische Proteine sind in Weiß dargestellt. Trotz funktioneller Übereinstimmung weisen die Gasvesikel-Genprodukte von *R. capsulatus* und *Loktanella* nur sehr geringe Sequenz-Übereinstimmungen mit den entsprechenden Produkten der *Octadecabacter*-Stämme auf. Das jeweils erste und letzte Gen jedes der dargestellten Gencluster ist mit dem entsprechenden *locus tag* beschriftet.

SE-62 ist zudem, ebenso wie in *R. capsulatus* SB1003, ein *pyp* (*yellow photoactive protein*)-Gen (Kyndt *et al.* 2004) eng mit diesem Cluster assoziiert (Abb. 29b). Die Gencluster von *O. arcticus* und *O. antarcticus* sind nahezu identisch aufgebaut, unterscheiden sich aber eindeutig von den Genclustern der *Loktanella*-Stämme und *R. capsulatus*. Die *Octadecabacter*-Gencluster beinhalten Homologe zu sämtlichen 8 Genen (*gvpAJS*, *gvpLF*, *gvpG*, *gvpO* und *gvpK*), welche in *Halobacterium salinarum* PHH1 als essentiell für Gasvesikel-Bildung identifiziert wurden. Darüber hinaus sind Gene des Chaperons GvpN, eines HSP20-Hitzeschock-Proteins und eines weiteren konservierten hypothetischen Proteins enthalten.

3.2.4.4 Quecksilber-Resistenz

Auf den Chromosomen beider *Octadecabacter*-Stämme sind nahezu identische Quecksilber-Resistenz-Gencluster vorhanden (Abb. 30). Diese Cluster beinhalten Gene des Regulators MerR, des Quecksilber-Transporters MerTPF und der Quecksilber-Reduktase MerA. Während im Genom von *O.arcticus* nur eine Version des Clusters in Oar-RGP 14 vorhanden ist, besitzt *O. antarcticus* eine intakte Kopie in Oan-RGP 8 und eine defekte in Oan-RGP 10, welche eine Rasterschubmutation im Transporter-Gen *merT* aufweist. Ähnliche Quecksilber-Resistenz-Gencluster konnten in 10 der 49 übrigen *Roseobacter*-Vertretern gefunden werden.



Abb. 30 Schwermetall-Resistenz-Gencluster in den *Octadecabacter*-Stämmen Homologe Gene sind durch identische Färbung gekennzeichnet. Hypothetische Proteine sind in Weiß dargestellt. Für das jeweils erste und letzte Gen des Clusters ist der entsprechende *locus tag* angegeben.

Bei vorläufigen Wachstumsversuchen mit verschiedenen Schwermetallkonzentrationen (siehe 2.2.4) wiesen die *Octadecabacter*-Stämme bei Quecksilber Konzentrationen bis 5 μ M nahezu uneingeschränktes Wachstum auf. Mit verzögertem Wachstum waren beide Stämme in der Lage, bis hin zu Quecksilber Konzentrationen von 10 μ M eingeschränkt zu wachsen. In Tab. DA58 (digitaler Anhang) sind die Ergebnisse der Schwermetall-Wachstumsversuche im Einzelnen aufgelistet.

3.2.4.5 Kohlenmonoxid-Oxidation

Beide *Octadecabacter*-Stämme weisen jeweils zwei *cox*-ähnliche Gencluster auf (*Locus tags* OA238_c17740-c17760 + OA238_c20690-c20670 in *O. arcticus* bzw. OAN307_c32790-c32810 + OAN307_c07520-c07540 in *O. antarcticus*). Solche Gencluster werden in nah verwandten Organismen mit Kohlenmonoxid-Oxidation in Verbindung gebracht (Cunliffe 2010). Jeweils eines der Cluster (*Locus tags* OA238_c20690-c20670 in *O. arcticus* 238 bzw. OAN307_c32790-c32810 in *O. antarcticus* 307) ist dem BMS-typ zuzuordnen, dessen Genprodukte nur eine niedrige Affinität zu Kohlenmonoxid aufweisen und das im überwiegenden Teil der *Roseobacter*-Vertreter vorhanden ist (Cunliffe 2010; Newton *et al.* 2010; Voget, Vollmers *et al.* 2013). Dieses Cluster ist in beiden *Octadecabacter*-Stämmen in regulären Genomabschnitten (ausserhalb von RGPs) lokalisiert. Das zweite Cluster, welches dem hochaffinen OMP-Typ zuzuordnen ist (Cunliffe 2010) ist hingegen nur in wenigen *Roseobacter*-Vertretern vorhanden, und in *O. arcticus* in Region Oan-RGP4 und in *O. antarcticus* in Region Oan-RGP 3 lokalisiert.

3.2.4.6 Rhamnose Aufnahme- und Verwertungssystem

Sowohl in *O. arcticus* als auch *O. antarcticus* wurde das Gencluster *rhaKMQPTSRDI* identifiziert, welches die Aufnahme und Verwertung des Zuckers Rhamnose kodiert. Dieses Cluster ist in zehn weiteren *Roseobacter*-Vertretern, darunter mehrere Organismen der



Abb. 31 Rhamnose-Import- und Verwertungs-Gencluster in *O. arcticus* 238 und *O. antarcticus* 307 Oben das Gencluster in *O. antarcticus* 307, unten das Gencluster von *O. arcticus* 238. Gene von transposablen Elementen sind in Grau dargestellt. Die übrigen Farben kennzeichnen Orthologe zwischen den beiden *Octadecabacter*-Stämmen. Für das jeweils erste und letzte Gen des Clusters sind die entsprechenden *locus tags* angegeben.

Untergruppen 2, 4 und 5 (siehe 3.1.3.1), vorhanden (Tab. DA03 und Tab. DA04, digitaler Anhang). Dieses Gencluster ist in seinem prinzipiellen Aufbau in beiden *Octadecabacter*-Stämmen identisch (Abb. 31). Jedoch ist in *O. arcticus* das Gen *rhaT* durch die Insertion von 3 verschiedenen transposablen Elementen unterbrochen. Dieses Gen kodiert das ATP-Bindungsprotein des Rhamnose-ABC-Transporters RhaTPQMK.

Um zu überprüfen, ob hierdurch die Fähigkeit von *O. arcticus* 238 Rhamnose als Kohlenstoffund Energiequelle aufzunehmen, beeinträchtigt ist, wurden Wachstumskurven beider *Octadecabacter*-Stämme in verschiedenen Nährmedien aufgenommen (siehe 2.2.3): einerseits mit Pepton und andererseits mit Rhamnose als hauptsächlicher Kohlenstoff-Quelle. *O. antarcticus* 307 wuchs in Rhamnose-haltigem Medium, während *O. arcticus* 238 in Rhamnose-haltigem Medium so gut wie kein Wachstum aufwies (Abb. 32). Daher ist die Unfähigkeit von *O. arcticus* 238 Rhamnose effektiv zu verwerten wahrscheinlich auf den defekten Rhamnose-Transporter dieses Organismus zurückzuführen.





Als Basis-Medium diente gepuffertes SWC-Medium (pH 7.5) mit geringer Zugabe von Hefeextrakt aber ohne Zugabe von Pepton (siehe 2.2.1). Es wurden verschiedene Ansätze durchgeführt mit Pepton (Positivkontrolle) oder Rhamnose als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) bzw. ohne Kohlenstoffquelle (Negativkontrolle). Ansätze mit Rhamnose sowie Negativkontrollen wurden in drei Parallelen durchgeführt (A, B und C). Wachstum wurde durch Trübungsmessung mittels eines Klett-Summerson Photometers verfolgt. Für jede Kultur ist die Optische Dichte (OD in Klett-Einheiten) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen.

3.2.4.7 Cyanat-Hydratase

Cyansäure (CHNO) ist ein Abfallprodukt einiger Industriezweige, kann aber auch als Nebenprodukt verschiedener Stoffwechselvorgänge gebildet werden (Dubey & Holmes 1995; Scanlan et al. 2009). Diese Substanz ist für die meisten Organismen toxisch (Stark 1965; Qian et al. 2011), kann aber durch das Enzym Cyanat-Hydratase (CynS) in einer Bicarbonatabhängigen Reaktion in Kohlenstoffdioxid und Ammonium umgewandelt werden (Johnson & Anderson 1987). Diverse marine Organismen sind in der Lage exogene Cyansäure aufzunehmen und mit Hilfe von CynS als Stickstoff-Quelle zu nutzen (Kamennaya & Post 2011). In beiden Octadecabacter-Genomen konnten Gencluster des Cyansäure-Abbaus (Locus tags: OA238 c17620-OA238 c17670 bzw. OAN307 c10320-OAN307 c10370), welche eine Cyanat-Hydratase CynS, ein konserviertes hypothethisches Protein, einen Bicarbonat-Transporter und einen Transkriptions-Regulator kodieren, identifiziert werden. Es konnten jedoch keine Aufnahme-Systeme für exogene Cyansäure in den Octadecabacter-Genomen identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass dieses Gencluster in den Octadecabacter-Stämmen ausschließlich zur Detoxifizierung endogener Cyansäure dient. Da dieser Stickstoffhaltige Stoff auf diese Weise jedoch wieder dem eigenen Stoffwechsel zugeführt werden kann, anstatt ihn zu Entgiftungszwecken auszuscheiden, ist davon auszugehen, dass die Cyanat-Hydratasen auch den Stickstoff-Metabolismus der Octadecabacter-Stämme beeinflussen.

3.2.4.8 Weitere Gemeinsamkeiten

Zu den noch nicht aufgezählten Eigenschaften beider Octadecabacter-Stämme zählt die Veranlagung zur Synthese und Nutzung der Speicherstoffe Polyhydroxybutyrat (PHB) und Polyphosphat. Transporter für die Aufnahme der potentiellen Stickstoffquellen Ammonium, Harnstoff, Spermidin, Putrescin sowie einer Vielzahl an Aminosäuren und kleiner Peptide sind diesen Organismen ebenfalls gemein. Auch wurden betABCI-Gencluster, welche die Synthese des kompatiblen Soluts Betain aus Cholin kodieren (Pocard et al. 1997; Cánovas et al. 2000), sowie eine Vielzahl an putativen Betain/Cholin-Transportern gefunden. Beide Organismen besitzen Gene für Sialinsäure-Synthasen sowie diverse Exopolysaccharid-Biosynthese-Proteine und Polysaccharid-Exporter, was auf die Befähigung beider Organismen hindeutet, Exopolymere zu bilden. Diverse Fettsäure- und Sterol-Desaturasen, welche eine Anpassung der Membranfluidität ermöglichen, sind ebenfalls in den Octadecabacter-Genomen kodiert. Alle eben genannten Eigenschaften sind in Genomanalysen psychrophiler Bakterien als wichtige Anpassungen an kalte Habitate identifiziert worden (Medigue et al. 2005; Methé et al. 2005). Jedoch ist keine dieser Eigenschaften spezifisch für den Genus *Octadecabacter*, sondern im Gegenteil in den meisten Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe vorzufinden (Tab. DA03+Tab. DA04, digitaler Anhang). Zusätzlich zu den eben erwähnten Eigenschaften besitzen beide *Octadecabacter*-Stämme jedoch eine relativ hohe Anzahl an UV-induzierten DNA-Reparatursystemen (fünf in *O. arcticus*, sieben in *O. antarcticus*; Tab. DA03+Tab. DA04, digitaler Anhang).

Nicht im *Octadecabacter* Pan-Genom enthalten sind Homologe der Eis-bildenden Proteine von *Colwellia* sp. SLW5 (Raymond, Fritsen & Shen 2007), oder der Polyketid-artigen Fettsäure-synthasen von *Colwellia psychrerythraea* 34H (Methé *et al.* 2005), welche als spezielle Anpassungen an Meereishabitate beschrieben wurden.

3.2.5 Xanthorhodopsine

3.2.5.1 Phylogenie der Xanthorhodopsine

Sowohl die Genome beider Octadecabacter-Stämme, als auch das eines weiteren Roseobacter-Vertreters, HTCC2255 weisen Gencluster auf, welche für die Synthese von Rhodopsinen kodieren. Diese Eigenschaft war bislang noch nicht in Vertretern der Roseobacter-Gruppe beobachtet worden. BLAST-Vergleiche deuten darauf hin, dass HTCC2255 das Opsin von den Proteorhodopsinen zuzuordnen ist, während die Octadecabacter-Opsine der Xanthorhodopsin-Gruppe angehörig sind. Diese Gruppenzugehörigkeiten konnten durch detailierte phylogenetische Analysen bestätigt werden (Abb. 33).

Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Xanthorhodopsin-Gruppe sich in zwei große Untergruppen, im Folgenden als



Abb. 33 Phylogenie mikrobieller Rhodopsine Der dargestellte Neighbor-Joining Stammbaum gibt grob die phylogenetischen Verhältnisse zwischen mikrobiellen Rhodopsinen wieder. Die verschiedenen Rhodopsintypen sind markiert und beschriftet. Die Position der *Octadecabacter*-Xanthorhodopsine und des HTCC2255 Proteorhodopsins sind zusätzlich angegeben. Eine Liste der im Stammbaum enthaltenen Sequenzen ist Tab. DA59 (digitaler Anhang) zu entnehmen

Untergruppen I und II bezeichnet, einteilen lässt. Diese Einteilung wird durch hohe Bootstrap-Werte von 95% (Untergruppe I) und 92% (Untergruppe II) unterstützt. Ferner konnten die beiden Untergruppen anhand robuster Hidden-Markov-Modelle voneinander abgegrenzt werden. Untergruppe I umfasst die beiden bislang einzigen funktionell charakterisierten Xanthorhodopsine: Die Rhodopsine von *Salinibacter ruber* M31 und *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Dieser Untergruppe sind bislang 9 bekannte Rhodopsinsequenzen zuzuordnen. Hierzu gehört auch das nennenswerte und distinkte Cluster der Actinorhodopsine(Sharma *et al.* 2009), dessen Vertreter ausschließlich in *Actinobacteria* aus Süßwasser-Habitaten auftreten. Die Rhodopsine der beiden *Octadecabacter* Stämme dagegen gehören in Untergruppe II und sind somit von den bisher charakterisierten Xanthorhodopsinen abzugrenzen. Der Untergruppe II sind mehr als 16 bekannte Sequenzen zuzuordnen, darunter ein Cluster, welches in Dinoflagellaten , also marinen Eukaryoten, vorzufinden ist (Slamovits *et al.* 2011). Bislang ist jedoch noch kein Vertreter dieser Untergruppe funktionell charakterisiert worden.

Betrachtet man die Hintergrundinformationen, der in der NCBI-nr Datenbank hinterlegten Xanthorhodopsin-Sequenzen, so zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Xanthorhodopsin-Untergruppe und der Herkunft des entsprechenden Organismus oder Klons ab (Abb. 34). So stammen mit Ausnahme von *Thioalkalimicrobium cyclicum* ALM1 alle Vertreter der Untergruppe II von marinen Mikroorganismen. Sechs Vertreter stammen von psychrophilen oder psychrotoleranten Organismen aus den Polargebieten: *Polarella glacialis*



Abb. 34 Habitat-Bevorzugung und detaillierte Phylogenie der Xanthorhodopsin Untergruppen

Detaillierte, gewurzelte Darstellung des Xanthorhodopsin-Zweigs des Rhodopsinstammbaums von Abb. 33. Die *Octadecabacter*-Xanthorhodopsine sind fett beschriftet. Als *outgroup* diente die Gruppe der fungalen Rhodopsine. Die Xanthorhodopsin Untergruppen I und II sowie Subcluster aus Actinobakterien bzw. Dinoflagellaten sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Lebensweise der entsprechenden Organismen ist durch verschiedene Symbole dargestellt. Für jedes Rhodopsin ist die entsprechende NCBI-Acc in runden Klammern angegeben.

CCMP 2088, Octadecabacter antarcticus 307, Octadecabacter arcticus 238, Oxalobacteraceae bacterium IMCC9480 und Marinobacter sp, ELB17. Die restlichen Vertreter dieser Untergruppe stammen von mesophilen Organismen.

Im Gegensatz dazu stammt kein einziger Vertreter der Xanthorhodopsin Untergruppe I aus einer marinen Umgebung. Die entsprechenden Organismen sind meso- bis thermophil und mit Ausnahme von *Salinibacter ruber* (Anton *et al.* 2002) stammen alle aus Habitaten mit niedrigen Salinitäten. (Rippka, Waterbury & Cohen-Bazire 1974; Madigan *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2009). *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 wurde zwar aus einem terrestrischen Habitat isoliert (Rippka, Waterbury & Cohen-Bazire 1974), da jedoch die entsprechenden Isolierungs- und Kultivierungsmedien Salzkonzentrationen des Süßwassers aufwiesen, kann von einer niedrigen Salztoleranz ausgegangen werden.

3.2.5.2 Biogeographie der Xanthorhodopsine

Zahlreiche Metagenome verschiedener aquatischer Umgebungen wurden auf den Anteil und die Diversität von Rhodopsinen hin überprüft (Abb. 35, Abb. 36). Hierbei wurde vor allem den relativen Anteilen der beiden Xanthorhodopsin-Untergruppen Aufmerksamkeit gewidmet. Allgemein zeigte sich, dass Typ I Rhodopsine in aquatischen Habitaten weit verbreitet sind. Die am stärksten vertretenen Gruppen waren meist Proteo- und Xanthorhodopsine. Metagenome welche auf 454-Pyrosequenzierung beruhten (Abb. 36), wiesen allgemein einen niedrigeren Anteil an Gesamt-Rhodopsinen auf als solche, die auf Sanger-Sequenzierung beruhten (Abb. 35). Dies lässt sich durch den *cloning-bias*, die ungleichmäßige Repräsentation verschiedener Bakteriengruppen in Klon-Bibliotheken, welcher bei der Sanger-Methode auftreten kann, erklären. Dennoch waren die relativen Anteile der verschiedenen Rhodopsin-Gruppen an den Gesamt-Rhodopsin-Sequenzen bei beiden Sequenzierungsmethoden ähnlich.

In marinen Habitaten stellten Proteorhodopsine den deutlich stärksten Anteil (durchschnittlich 98%) an den detektierten Rhodopsin-Sequenzen. Xanthorhodopsine machten hier durchschnittlich weniger als 2 % aus und waren in vielen Proben nicht vertreten. Allerdings gab es vereinzelt starke Schwankungen im Xanthorhodopsin-Anteil (von 0 bis 7% im offenen Ozean und von 0-14% in Küstengebieten). Dies betraf Vertreter beider Untergruppen.

In Süßwasserseen, heißen Quellen, hypersalinen Habitaten und sogar in Gletscher- und Schelf-Eis waren Xanthorhodopsine beider Untergruppen generell zahlreicher vertreten als im



Abb. 35 Anteil von Rhodopsin-Gensequenzen in Sanger-Sequenzierungs-basierten Metagenomen Die Anteile von Proteorhodopsinen und Xanthorhodopsinen der Untergruppen I und II an den Gesamtsequenzen der jeweiligen Metagenome sind durch Farbmarkierungen dargestellt. Der relative Anteil von Xanthorhodopsinen der Untergruppe II an den Rhodopsinen verschiedener Standorte ist (sofern vorhanden) durch entsprechende Beschriftung angezeigt.

Meer. Häufig stellten sie in diesen nicht-marinen Habitaten die am stärksten vertretene Gruppe, noch vor den Proteorhodopsinen.

In Seen, Flüssen und heißen Quellen dominierten Xanthorhodopsine der Untergruppe II mit Anteilen an den Gesamt-Rhodopsinen von meist über 50%. Untergruppe II war mit Anteilen von 0-14% in Seen und Flüssen sowie 0-25% in heißen Quellen vertreten.

In warmen hypersalinen Habitaten waren Xanthorhodopsine in stark variierenden, aber zum Teil bedeutenden, Anteilen von 7-88% enthalten. In drei von vier hypersalinen Metagenomen dominierte Untergruppe I die Xanthorhodopsin-Fraktion. Mit zunehmender Salinität nahm jedoch der Anteil an Xanthorhodopsinen zugunsten von Bakterio- und Halorhodopsinen ab.

Organic Lake, ein flacher hypersaliner See auf dem antarktischen Kontinent mit extrem niedrigen durchschnittlichen Wassertemperaturen (Franzmann *et al.* 1987; Yau *et al.* 2011), waren Xanthorhodopsine der Untergruppe II auffällig stark vertreten (19-86%). Dieser See



Abb. 36 Anteil von Rhodopsin-Gensequenzen in 454-Sequenzierungs-basierten Metagenomen

Die Anteile von Proteorhodopsinen und Xanthorhodopsinen der Untergruppen I und II an den Gesamtsequenzen der jeweiligen Metagenome sind durch Farbmarkierungen dargestellt. Der relative Anteil von Xanthorhodopsinen der Untergruppe II an den Rhodopsinen verschiedener Standorte ist (sofern vorhanden) durch entsprechende Beschriftung angezeigt. * Ein Loch wurde durch 3 m dickes marines Packeis gebohrt und anschließend wurde das Wasser auf Höhe der Eisschicht ("In dem Eis") und unterhalb der Eisschicht ("Unter dem Eis") beprobt (Jeff Hoffman, persönliches Gespräch).

wurde mehrmals zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlicher Eisbedeckung beprobt. Es zeichnete sich ab, dass der Anteil von Untergruppe II mit zunehmender Eisbedeckung zunimmt. In Ace Lake, ebenfalls ein Antarktischer See allerdings mit niedrigeren Salzkonzentrationen und höheren Durchschnittstemperaturen als Organic Lake, waren Rhodopsine hauptsächlich in den oberen Wasserschichten (5-12 m) zu finden. Hier überwiegte wieder der Anteil der Proteorhodopsine. Xanthorodopsine waren nur zu 28-33% vertreten, wobei der Anteil von Untergruppe I überwiegte. In tieferen anoxischen Schichten dieses Sees (>12m Tiefe) waren Rhodopsine kaum noch nachzuweisen.

In Gletscher- und Schelfeis waren Xanthorhodopsine die bedeutendste Rhodopsin-Gruppe. In arktischem Schelfeis war Untergruppe II stärker vertreten als Untergruppe I, während es im Eis eines alpinen Gletschers des Schneeferners (Deutschland) (Simon *et al.* 2009) umgekehrt war.

3.2.5.3 Funktionelle Analysen der Xanthorhodopsine

3.2.5.3.1 Sequenzbasierte Analysen

Genomgebung

Xanthorhodopsine der Untergruppen I und II unterscheiden sich grundsätzlich in der Organisation der entsprechenden Genumgebungen (Abb. 37). Die Vertreter der Untergruppe II sind stets eng mit einem konservierten Gencluster bestehend aus *crtE*, *crtI*. *crtB*, *crtY* und *blh* assoziiert. Diese Gene stellen einen Stoffwechselweg zur Gewinnung von Retinal aus Geranylgeranyl-diphosphat (Armstrong 1997; Sabehi *et al.* 2005) dar und sind auch in einem großen Teil der Proteorhodopsin-kodierenden Genome als konserviertes Gencluster zu finden(McCarren & DeLong 2007).

Protonenpumpen-Aktivität und Energiekonservierung

Die *Octadecabacter*-Rhodopsine besitzen Äquivalente sämtlicher konservierter Aminosäuren, welche in Bacterio-, Proteo- und in *Salinibacter*-Xanthorhodopsin als funktionelle Bestandteile der Protonentranslokation identifiziert wurden (Balashov 2000; Beja *et al.* 2000; Balashov *et al.* 2005) (Abb. A3, Anhang). Dies deutet darauf hin, dass es sich um lichtgetriebene Protonenpumpen handelt.

Keto-Carotenoid-Bindung

Die *Octadecabacter*-Rhodopsine wurden auch auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Ketocarotenoide zu binden. Imasheva *et al.* gelang es in dem Xanthorhodopsin von *S. ruber*



Abb. 37 Vergleich der Genumgebungen von Xanthorhodopsinen der Untergruppen I und II

Nicht dargestellt sind die Vertreter des Actinorhodopsin-Clusters (Untergruppe I) und des Eukaryotenassoziierten Rhodopsin-Clusters (Untergruppe II), da hierfür keine Genominformationen verfügbar waren. A) Gen-Umgebungen von Xanthorhodopsinen der Untergruppe I. Es sind keine gemeinsamen Gencluster zu erkennen. B) Gen-Umgebungen von Xanthorhodopsinen der Untergruppe II. Gene, welche Enzyme der Retinal-Synthese und Gene die Opsine kodieren, sind in allen Vergleichsorganismen in konservierten Genclustern organisiert. In *Nisaea* sp. BAL199 ist *crtB* vorhanden, jedoch nicht annotiert. Dies ist durch die gestrichelte Darstellung des Gensymbols markiert. Die stattdessen fälschlicherweise annotierten ORFs sind durch transparente Symbole dargestellt.

die funktionellen Bestandteile der Keto-Carotenoid-Bindestelle zu bestimmen (Imasheva *et al.* 2009). Diese besteht aus 16 Aminosäuren welche über die Transmembranhelices E und F verteilt sind. Als unentbehrlich für Keto-Carotenoid-Bindung gilt ein Glycin-Rest an Sequenzposition 156 (Gly₁₅₆) des *Salinibacter*-Xanthorhodopsins (Balashov *et al.* 2010). Wird dieses durch ein Tryptophan ersetzt, verliert das Protein die Befähigung, Ketocarotenoide zu binden (Imasheva *et al.* 2009). Die übrigen Aminosäure-Reste dieser Bindestelle sind jedoch offenbar nicht alle essentiell, da das ebenfalls Keto-Carotenoid-bindende Xanthorhodopsin von *G. violaceus* nur 11 hiervon an den entsprechenden *alignment*-Positionen teilt (Abb. 38). Experimentelle Daten existieren hierfür jedoch leider

noch nicht. Generell ist diese Bindestelle unter Vertretern der Untergruppe I hochkonserviert. Diese besitzen durchschnittlich 12 äquivalente oder 10 identische Aminosäuren an den entsprechenden *alignment*-Positionen. Alle Untergruppe I-Xanthorhodopsine besitzen einen



Abb. 38 Potentielle Keto-Carotenoid-Bindestellen in verschiedenen Xanthorhodopsinen

Die entsprechende Aminosäureposition ist für *S. ruber*-Xanthorhodopsin oberhalb der *alignments* angegeben. *Alignment*-Positionen, welche laut Imasheva *et al.* (2009) in *S. ruber*-Xanthorhodopsin an der Bindung von Keto-Carotenoiden beteiligt sein könnten, sind durch die Buchstaben c, g, k und r markiert, welche direkten Kontakt zu unterschiedlichen Bestandteilen des Keto-Carotenoids repräsentieren (c, Polyen-Seitenkette [*chain*]; g, Glucosid; k, Keto-Gruppe; r, Ring). Äquivalente Aminosäuren an solchen Positionen sind umrandet und durch farbige Schrift gekennzeichnet. Aminosäureidentitäten sind zusätzlich gelb hervorgehoben. Aminosäuren, welche dem Gly₁₅₆ des *Salinibacter* Xanthorhodopsins entsprechen, sind in roter Schrift dargestellt. Die Summe der Aminosäureäquivalente bzw. –identitäten in den einzelnen Organismen bzw. deren Mittelwerte in den einzelnen Xanthorhodopsin-Untergruppen sind rechts angegeben.

zu Gly156 homologen Glycin-Rest. In Vertretern der Untergruppe-II waren dagegen nur an 5 Positionen der Keto-Carotenoid-Bindestelle gleichartige und nur an 7 Positionen ähnliche Aminosäuren zu *Salinibacter*-Xanthorhodopsin zu finden. Die meisten Rhodopsine der Untergruppe-II tragen zudem ein Tryptophan anstelle von Gly₁₅₆, was effektiv die Befähigung zur Keto-Carotenoid-Bindung ausschließt. Ausgenommen hiervon sind die Rhodopsine von *O. arcticus*, *O. antarcticus*, *T. cyclicum* und *Nisaea* sp. BAL199 (Abb. 38). Diese unterscheiden sich jedoch von dem Großteil der Untergruppe-I Vertretern an den entsprechenden *alignment*-positionen von Thr160, Leu194, Leu197, Ala198, Gly201 und Ile205 des *Salinibacter*-Xanthorhodopsins. Diese Aminosäuren, welche in Vertretern der Untergruppe I größtenteils konserviert sind, sind in *S. ruber* daran beteiligt, die sperrige Polyen-Seitenkette solcher Keto-Carotenoide wie Salinixanthin zu beherbergen.

3.2.5.3.2 Experimentelle Analysen

Heterologe Expression und Spektraleigenschaften

Die *Octadecabacter* Opsingene wurden zum Zweck der heterologen Expression in *E. coli*-Zellen eingebracht. Die resultierenden rekombinanten *E. coli*-Stämme wiesen nach Zugabe von Retinal eine charakteristische rötliche Färbung auf. Da diese Färbung bei den Kontrollstämmen nicht auftrat, deutet diese Färbung auf die Anwesenheit von funktionalem Rhodopsin in den Zellmembranen hin. Zudem konnten durch Western-Blot-Analysen Opsine



Abb. 39 Western-Blots und Spektralanalysen heterolog exprimierter Rhodopsine

A) Western-Blots heterolog exprimierter Rhodopsine. Als Größenstandard diente "PageRulerTM Prestained Protein Ladder" von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Die den Banden entsprechenden Molekulargewichte stimmen mit den erwarteten Sequenzlängen der Rhodopsine überein. B) Differenz-Spektren rhodopsinhaltiger Membranfragmente nach Zugabe von 10 μ M Retinal. Spektren verschiedener Rhodopsintypen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Für jeden Rhodopsintyp ist das jeweilige Absorptionsmaximum angegeben.

in den Membranfraktionen von Lysaten der entsprechenden Zellsuspensionen nachgewiesen werden (Abb. 39A). Spektralanalysen der Membranfragment-Suspensionen erbrachten Absorptionsmaxima von 533 (\pm 1) nm für das *O. arcticus*-Rhodopsin, und 535 (\pm 1) nm für das *O.antarcticus*-Rhodopsin (Abb. 39B). Diese Werte liegen über dem des Referenz-Proteorhodopsins von EBAC31A08 (512 \pm 1 nm) aber unter denen der Untergruppe I Xanthorodopsine von *Gloeobacter violaceus* (540 \pm 1nm) und *S. ruber* (560 nm) (Lanyi & Balashov 2008).

Protonenpumpenaktivität und Energiekonservierung

Rhodopsin-vermittelte Protonenpumpenaktivität wurde anhand sensitiver Messungen geringfügiger pH-Wert-Änderungen in nährstofffreien Suspensionen rekombinanter, Rhodopsin-exprimierender *E. coli*-Zellen nachgewiesen (siehe 2.12.7). Rhodopsine befördern unter Lichteinfluss Protonen aus den Zellen in das umliegende Medium, was eine Erhöhung des Membranpotentials und eine vorübergehende sehr geringfügige pH-Wert-Absenkung des umliegenden Mediums bewirkt. Endet die Beleuchtung, so fließen die Protonen entsprechend des Membranpotentials zurück in die Zellen, wodurch der pH-Wert des umliegenden Mediums wieder geringfügig ansteigt. Suspensionen rekombinanter *E. coli*-Stämme, welche



Abb. 40 Protonenpumpenaktivitäten heterolog exprimierter Rhodopsine

Lichtabhängige pH-Wert-Änderungen rekombinanter *E. coli-*Zellsuspensionen. Links: Kurvendiagramme, welche Änderungen des pH-Wertes im Laufe der Versuchszeit darstellen. Beleuchtungsintervalle sind durch einen hellen Hintergrund, Dunkelintervalle durch einen grauen Hintergrund dargestellt. Eine andauernde Ansäurerung des Mediums war in allen Suspensionen, inklusive der Negativkontrolle, zu beobachten. Zellsuspensionen, welche Rhodopsine exprimierten, zeigten jedoch lichtabhängige Veränderungen der Ansäuerungsrate, welche in den Negativkontrollen nicht zu beobachten waren. Rechts: Durchschnittliche Ansäuerungsrate der verschiedenen rekombinanten Zellsuspensionen während Beleuchtungs- bzw. Dunkelintervallen. Die Ansäuerungsrate ist als Veränderung des pH-Wertes pro Sekunde angegeben. Fehlerindikatoren zeigen den jeweiligen Standardfehlerbereich an.

Octadecabacter-Xanthorhodopsine exprimierten, zeigten lichtabhängige Veränderungen in der Ansäuerungs-Rate (Abnahme des pH-Wertes pro Sekunde, Δ pH) (Abb. 40). Bei Wechsel von Dunkelheit zu Beleuchtung war die Ansäuerungsrate erhöht, während sie umgekehrt bei Wechsel von Beleuchtung zu Dunkelheit erniedrigt war. Da solche Fluktuationen bei den Negativkontrollen nicht auftraten, sind die Änderungen der Ansäuerungsrate auf die Aktivität von Rhodopsinen zurückzuführen, welche in den Membranen der Expressions-Zellen im Überschuss vorhanden sind. Unabhängig vom Beleuchtungszustand war aber in allen Suspensionen, inklusive der Negativkontrolle, eine geringe aber stetige Ansäuerung des Mediums zu beobachten (Abb. 33). Dies ist vermutlich auf Lösung atmosphärischen Kohlendioxids und somit Bildung von Kohlensäure im ungepufferten Suspensionsmedium zurückzuführen.

Native Octadecabacter-Kulturen wiesen bei Wachstumsversuchen mit Nährstoffkonzentrationen von 10-1% keinen deutlichen lichtabhängigen Wachstumsvorteil auf (Abb.A4, Anhang). Bei Nährstoffkonzentrationen <1% wurde weder bei Licht noch bei Dunkelheit Wachstum festgestellt. Somit konnte Rhodopsin-vermittelte Energiekonservierung in den Octadecabacter-Kulturen nicht beobachtet werden. Dennoch waren Transkripte der Opsingene mittels RT-PCR in RNA-Extrakten klar nachweisbar (Abb. 41).



Abb. 41 Nachweis der Expression von Xanthorhodopsinen in nativen Octadecabacter-Kulturen Transcripte von Opsingenenwurden durch spezifische PCRs nachgewiesen (siehe 0). Matrizen-cDNA wurde aus RNA-Extrakten von O. arcticus 238-Kulturen welche mit Licht (Hell) bzw. bei Dunkelheit (Dunkel) angezogen wurden. Es wurden jeweils zwei Negativkontrollen durchgeführt: Eine Kontrolle wurde mit einem RNA-Aliquot durchgeführt, welches wie ein Ansatz der cDNA-Synthese behandelt wurde, jedoch ohne Zugabe von reverser Transkriptase (Neg. Kontr. 1). Bei der anderen Kontrolle wurde unverdünntes RNA-Extrakt ohne weitere Behandlung als Matrize eingesetzt (Neg. Kontr. 2). Als Positivkontrolle diente Chromosomale DNA von O. arcticus 238 (nicht abgebildet).

Keto-Carotenoid-Bindung

Spektralanalysen nach Zugabe von Salinixanthin zu heterolog exprimierten Rhodopsin-Suspensionen zeigten, dass die Xanthorhodopsine der *Octadecabacter*-Stämme nicht dazu befähigt sind, das Keto-carotenoid Salinixanthin zu binden. (Abb. 42). Die für Salinixanthinbindung charakteristischen Peaks bei 456 nm, 480 nm und 512 nm (Imasheva *et al.* 2009; Balashov *et al.* 2010) traten nur bei der Positivkontrolle *Gloeobacter*-Xanthorhodopsin auf, nicht aber bei *Octadecabacter*-Xanthorhodopsin.



Abb. 42 Versuche zur Keto-Carotenoid Bindefähigkeit von Untergruppe I- und Untergruppe II-Xanthorhodopsinen

Dargestellt sind Differenz-Spektren, welche Veränderungen der Absorpionsmaxima verschiedener Rhodopsinhaltiger Membranfragment-Suspensionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 μ M Salinixanthin aufzeigen. Das Differenzspektrum von *G. violaceus* Xanthorhodopsin weist eine Zunahme der Absorption bei 456 nm, 480 nm und 521 nm auf, was auf die Bindung von Salinixanthin hindeutet (Imasheva *et al.* 2009)

3.3 Zusatzergebnis: Erste Betrachtung des marinen Myxobakterienclusters (MMC) durch Sequenzanalysen von Fosmid-Klonen

Vertreter der Ordnung *Myxococcales* (auch als Myxobakterien bekannt) galten lange Zeit ausschließlich als terrestrische Organismen. Der gelegentliche Nachweis von Myxobakterien in limnischen oder marinen Habitaten wurde meist dadurch erklärt, dass terrestrische Vertreter in diese Habitate ausgespült wurden. Schließlich wies Stevens *et al.* (2005) durch DGGE-Analysen einen der Ordnung *Myxococcales* zuzuordnenden Phylotyp in diversen marinen Oberflächensedimenten nach. Nah verwandte Sequenzen dieses Phylotyps waren weltweit in zahlreichen Klonbanken mariner Sedimente nachweisbar, jedoch nie in terrestrischen oder limnischen Habitaten (Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012). Diese Sequenzen bildeten eine gemeinsame phylogenetische Gruppe welche als MMC (marines Myxobakteriencluster) bezeichnet wurde. Die Biogeographischen Analysen von Brinkhoff *et al.* legen nahe, dass es sich bei dieser Gruppe um Organismen marinen Ursprungs handelt, welche zudem in marinen Sedimenten von hoher ökologischer Bedeutung sein können. Ein Isolat, dass dieser Gruppe zugeordnet werden konnte, existiert jedoch bislang noch nicht. Durch PCR-basierte Screenings einer aus Sedimenten des deutschen Wattenmeeres erstellten Fosmidbank konnten zwei Klone (MMCf1 und MMCf2) identifiziert werden, welche 16S Sequenzen von Vertretern des MMC beinhalteten (Vollmers 2007; Brinkhoff, Vollmers et al. 2012). Um einen ersten Einblick in die genetische Ausstattung dieser Gruppe zu erhalten, wurden die entsprechenden Fosmide subkloniert (siehe 2.6), sequenziert (siehe 2.8) und analysiert (Brinkhoff, Vollmers et al. 2012). MMCf1 trug ein 37,1 kb insert mit 24 proteinkodierenden ORFs und MMCf2 ein 40,7 kb insert mit 31 proteinkodierenden ORFs. Die entsprechenden Annotationen sowie die nächsten Homologe dieser ORFs in öffentlichen Proteindatenbanken sind in Tab. A60 (digitaler Anhang) aufgeführt. Direkte Sequenzvergleiche zwischen beiden Fosmiden ergaben einen ca 32 kb langen überlappenden Bereich, der jeweils 20 Gene mit einer Sequenzübereinstimmung von bis zu 94 % umfasste. Durch bidirektionale BLAST-Analysen (siehe 2.10.3) konnten zahlreiche Orthologe zu Sorangium cellulosum So ce 56 und Haliangium ochraceum DSM14365 nachgewiesen werden (Abb. A5, Anhang). Diese Orthologe machten 14 von 23 Genen (61%) in MMCf1 und 15 von 30 Genen (50%; Vergleichsorganismus S. cellulosum) bzw. 14 von 30 Genen (47%; Vergleichsorganismus H. ochraceum) in MMCf2 aus. Ungefähr die hälfte dieser Gene wies jedoch bei BLAST-Vergleichen mit der Trembl-Datenbank höhere Sequenzübereinstimmungen mit Homologen in marinen Organismen als mit entsprechenden Genen in terrestrischen Myxobakterien auf (Tab. A60, digitaler Anhang). Beide Fosmide wiesen jeweils ein einzelnes 16S rRNA-Gen auf, welches nicht mit einem vollständigen rRNA- Operon verbunden war und keine benachbarten tRNA- oder rRNA-Gene aufwies.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Genomvergleiche

4.1.1 Phylogenetische Vergleiche

Die in dieser Arbeit untersuchten Genomsequenzen ermöglichten eine polyphasische Herangehensweise der phylogenetischen Einordnung der teilweise sehr nah verwandten *Roseobacter*-Vertreter Hierdurch (siehe 3.1.3). konnten die Komplexität der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb *Roseobacter*-Gruppe der aufgezeigt, sowie verschiedene sequenzierte Roseobacter-Vertreter einander verwandtschaftlich auf Art-Ebene zugeordnet werden. Die beobachtete Artgleichheit der beiden Phaeobacter gallaeciensis Stämme mit Phaeobacter inhibens T5 (siehe 3.1.3.3) erscheint zwar sehr überraschend, deckt sich jedoch mit Ergebnissen unabhängiger Untersuchungen durch Mitarbeiter der AG Simon (ICBM, Carl-von-Ossietzky-Universität, Oldenburg) in Kooperation mit der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Demnach scheint in mehreren internationalen Stammsammlungen ein falscher Organismus als Typstamm der Art P. gallaeciensis hinterlegt zu sein, was in einer bald erscheinenden Publikation aufgearbeitet werden soll (Thorsten Brinkhoff, persönliches Gespräch).

Obwohl sich phylogenetische Vergleiche basierend auf Tetramer-Korrelationskoeffizienten als Kriterium zur Unterscheidung sehr nah verwandter Bakterienarten bewährt haben (Richter & Rosselló-Móra 2009), scheint diese Methode bei höheren phylogenetischen Distanzen wenig zuverlässig zu sein (siehe 3.1.3.3, Abb. 10B). Die ANIb-Analysen zeigen dagegen mehr Übereinstimmungen zu den durchgeführten Marker-basierten phylogenetischen Analysen (siehe 3.1.3.3, Abb. 10A), allerdings fehlen bootstrap-Werte, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse einschätzen zu können. Die durchgeführten MLSAentsprechenden Berechnungen, basierend auf 166 einzigartigen Genen des Roseobacter-Coregenoms (siehe 3.1.2 + 3.1.3.1), ermöglichen eine besonders genaue phylogenetische Einteilung und sind als zuverlässiger einzustufen als entsprechende rRNA-Gensequenzanalysen (siehe 3.1.3.2) (Palys et al. 2000; Rajendhran & Gunasekaran 2011). Durch die große Menge an Sequenzinformation verschiedener unabhängiger phylogenetischer Marker wird der Einfluss einzelner Artefakte (z. B. horizontal übertragener Gene oder schlecht alignbarer Sequenzbereiche) minimiert, was sich in hohen Bootstrap-Werten äußert. Prinzipiell konnten die bereits durch Newton et al. (2010) auf der Grundlage von nur 69 konservierten Proteinsequenzen beschriebenen Untergruppen 1-5 bestätigt werden. Vergleichende Analysen basierend auf rRNA-Genen und allgemeiner Nukleotid-Zusammensetzung (siehe 3.1.3.2+3) sowie genereller Genomeigenschaften (Abb. 43), zeigen jedoch, dass diese Untergruppen unterschiedliche Maße an Heterogenität aufweisen.



Abb. 43 Vergleich allgemeiner Genomeigenschaften zwischen MLSA-basierten *Roseobacter* Gruppen Die Abbildungen basieren auf den Daten in Tab. 7 (3.1.1). Die Verteilung der Werte für GC-Gehalt (A), Genomgröße (B), Anzahl kodierender Gene (C), Anzahl Pseudogene (D), Anzahl an RNA Genen (E) und Dichte an TEs (F) innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe ist jeweils für die gesamte Gruppe sowie für jede einzelne Untergruppe (UG) als Boxplot dargestellt. Untergruppe 5 ist nicht dargestellt, da die Anzahl der entsprechenden Vergleichsgenome für statistische Analysen nicht ausreichte.

Untergruppe 1, welche hauptsächlich aus Vertretern der Gattungen *Phaeobacter* und *Ruegeria* besteht, wird bislang durch die meisten Genomsequenzen repräsentiert. Diese Untergruppe ist sehr homogen und lässt sich auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen, wie rRNA Gensequenz-Analysen oder durchschnittlicher BLAST-basierter Nukleotididentitäten (ANIb), zuverlässig rekonstruieren (siehe Abb. 9 + Abb. 10A, 3.1.3). Auch in Bezug auf ihren GC-Gehalt (Abb. 43C) weichen Vertreter der Untergruppe 1 vergleichsweise wenig voneinander ab. Trotz der allgemeinen Homogenität dieser Untergruppe sind ihre Vertreter phylogenetisch

tief verzweigt und vielfältig (Abb. 8, 3.1.3.1). Zudem weisen die entsprechenden Organismen eine recht hohe Diversität mariner Habitate auf. Sie sind weltweit sowohl im Freiwasser, als auch Sediment-, Algen- oder Biofilm-assoziiert vorzufinden (Tabelle DA01, digitaler Anhang). Auffällig ist die Unterteilung in zwei deutlich getrennte phylogenetische Cluster. Cluster 1a beinhaltet hauptsächlich Phaeobacter-Stämme, enthält jedoch auch die beiden Bakterien-Stämme TM1040 und TrichCH4b, welche bislang der Gattung Ruegeria wurden. Die Typenstämme zweier dieser zugeschrieben Arten Gattung. R. lacuscaerulensis ITI-1157 und R. pomeroyi DSS-3, fallen jedoch in Cluster 1b. Daher ist es fragwürdig ob TM1040 und TrichCH4b tatsächlich der Gattung Ruegeria zuzuordnen sind. Die scheinbar irrtümliche Zuordnung mag mit der allgemein problematischen Taxonomie dieser Gattung zusammenhängen. So sind verschiedene Vertreter bereits mehrfach umbenannt worden und die Zusammenlegung der Taxa Ruegeria und Silicibacter zu einem gemeinsamen Genus ist bis heute umstritten (Martens et al. 2006; Muramatsu et al. 2007; Yi, Lim & Chun 2007). Diese Unsicherheiten basieren zu großen Teilen auf dem niedrigen Auflösungsvermögen 16S rRNA Gensequenz-basierter phylogenetischer Ansätze, einem Problem das durch die MLSA-Methodik umgangen werden kann.

Auch Untergruppe 2 ist größtenteils auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen rekonstruierbar. In Bezug auf GC-Gehalt und Größe ihrer Genome weisen Vertreter dieser Gruppe ebenfalls nur geringe Schwankungen auf (Abb. 43A+C).

Rhodobacteraceae sp. HTCC2083 scheint jedoch, anders als durch Newton *et al.* (2010) angenommen, nicht direkt dieser Untergruppe zuzuordnen zu sein. Hierauf deuten der niedrige Bootstrap-Wert auf MLSA-Ebene, sowie die unsichere Zuordnung auf rRNA-Genund ANIb-Ebene, hin (Abb. 9 + Abb. 10A, 3.1.3). Da dieser Organismus zudem auf MLSA-Ebene sehr tief abzweigt (Abb. 8, 3.1.3.1) ist anzunehmen, dass er eine weitere bislang nicht beschriebene Untergruppe repräsentiert.

Untergruppe 3 ist heterogener als die zuvor genannten Untergruppen. Auf der Ebene von 16S rRNA Gensequenzvergleichen (Abb. 9A, 3.1.3.2) lässt sich diese Gruppe in Bezug auf zwei ihrer Vertreter, *Oceanicola batsensis* HTCC2597 und *Sagittula stellata* E-37, nicht vollständig rekonstruieren. Da die phylogenetischen Verzweigungen von *O. batsensis* HTCC2597 innerhalb von Untergruppe 3 auf MLSA-Ebene relativ niedrige *bootstrap*-Werte aufweisen (47% bzw. 62%; Abb. 8, 3.1.3.1) und zudem auf ANIb- und 16S rRNA-Gensequenz-Ebene ebenfalls nicht rekonstruierbar sind (Abb. 9A+Abb. 10A, 3.1.3), ist die Zugehörigkeit dieser
Art zu Untergruppe 3 sehr unsicher. Die Zugehörigkeit von *S. stellata* E-37 ist dagegen auf MLSA-Ebene eindeutig und wird zudem durch ANIb-Vergleiche und 23S rRNA-Gensequenzanalysen bestätigt (Abb. 8 + Abb. 9B, 3.1.3).

Untergruppe 4 weist eine besonders große Heterogenität auf. Zwar wird die Zusammengehörigkeit dieser Untergruppe auf MLSA-Ebene durch hohe *bootstrap*-Werte unterstützt, auf den Ebenen von rRNA-Gensequenzanalysen sowie ANIb-Vergleichen (siehe 3.1.3), bildeten ihrer Vertreter jedoch kein zusammenhängendes Cluster. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die entsprechenden rRNA-Gensequenzbasierten Stammbäume bereits bei frühen Verzweigungen niedrige *bootstrap*-Werte von <50% aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die phylogenetische Auflösung einzelner rRNA-Gensequenzen nicht ausreicht, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Vertretern dieser Untergruppe zuverlässig darzustellen. Die Zuverlässigkeit der auf ANIb-Vergleichen basierenden Clusteranalysen lässt sich mangels *bootstrap*-Werten nicht beurteilen. Allgemein zeigen die Differenzen zwischen den verschiedenen phylogenetischen Vergleichsmethoden jedoch, dass die Verwandschaftsbeziehungen zwischen Vertretern der Untergruppe 4 komplexer sind, als zwischen Vertretern anderer *Roseobacter*-Untergruppen.

Auch in Bezug auf prinzipielle Genomeigenschaften wie GC-Gehalt, Genomgröße und Anzahl an RNA-Genen (Abb. 43) weisen die Vertreter dieser Untergruppe eine hohe Variabilität auf. Ebenso divers sind ihre Habitate, welche nicht nur Salzwiesen, Meerwasser und Meeressedimente unterschiedlicher klimatischer Regionen, sondern auch den extremen Lebensraum Meereis und sogar terrestrische Habitate umfassen. Dies spricht für eine hohe Adaptivität dieser Untergruppe, welche möglicherweise in einer allgemein erhöhten Genomdynamik begründet sein könnte. Da die Genomsequenzen dieser Untergruppe jedoch fast ausschließlich in Form von *draft*-Genomen mit hoher *contig*-Zahl vorliegen, lässt sich diese Hypothese nicht durch direkte Genom-*alignments* überprüfen.

Untergruppe 5 besteht aus nur zwei Organismen, welche auf MLSA-Ebene sehr weit voneinander abzweigen und auch auf anderen phylogenetischen Ebenen kaum Ähnlichkeiten aufweisen (siehe 3.1.3). Daher sind, obwohl diese Organismen vermutlich von einem gemeinsamen entfernten Vorfahren abstammen, die phylogenetische Zusammengehörigkeit und das Verwandtschaftsverhältnis innerhalb dieser Untergruppe nicht annähernd so eng wie zwischen Vertretern der anderen *Roseobacter*-Untergruppen. Das deutet darauf hin, dass diese beiden Vertreter jeweils eigene, voneinander abzugrenzende, Untergruppen repräsentieren.

Durch Analysen weiterer Genomsequenzen nah verwandter Organismen könnten Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen diesen hypothetischen neuen Untergruppen deutlicher hervortreten. Somit zeigen diese Organismen eine Lücke in der genomischen Abdeckung der *Roseobacter*-Gruppe auf, welche durch zukünftige Sequenzierprojekte geschlossen werden sollte.

Die *Rhodobacteraceae* Stämme R2A57, HTCC2083, HTCC2510 und HTCC2255 sowie die Organismen *Maritimibacter alkaliphilus* HTCC2654 und "*Ca.* Planktomarina temperata" RCA23 sind auf MLSA-Ebene keiner zusammenhängenden Gruppe sequenzierter *Roseobacter*-Vertreter eindeutig zuzuordnen. Sie repräsentieren somit jeweils potentiell eigene Untergruppen, welche jedoch bislang nicht ausreichend durch entsprechende Genomsequenzen abgedeckt sind, um ihre jeweilige Diversität und Heterogenität abschätzen zu können. Zwei dieser Organismen repräsentieren bedeutende, bislang fast ausschließlich aus 16s rRNA Gensequenz-Ebene nachgewiesene, *Roseobacter*-Cluster. "*Ca.* P. temperata" RCA23 repräsentiert den sog. *Roseobacter Clade Affiliated* (RCA)-Cluster (Voget, Vollmers *et al.* 2013), während HTCC2255 eine nahe Verwandtschaft zu dem sog. NAC11-7-Cluster aufweist (Newton *et al.* 2010). Diese beiden Cluster sind weltweit in marinen Habitaten hoch abundant (Selje, Simon & Brinkhoff 2004; Buchan, Gonzalez & Moran 2005), und daher für eine umfassende Beschreibung mariner *Roseobacter*-Populationen unerlässlich.

4.1.2 Zusammenhänge zwischen Genomeigenschaften und Habitat bzw. Lebensweise

Die hier präsentierten Genomanalysen deuten auf erniedrigte Genomgrößen in marinen Organismen mit pelagischer Lebensweise im Vergleich zu partikel- bzw. eukaryotenassoziierter Lebensweise hin. Dementsprechend sind auch marine Vertreter der *Myxococcales*, welche die größten der bekannten prokaryotischen Genome aufweisen (Reichenbach 1999; Schneiker *et al.* 2007), fast ausschließlich auf Partikeln und in Sedimenten vorzufinden (Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012). Somit scheint auf freilebende marine Organismen ein Selektionsdruck zu herrschen, der kleine Genome begünstigt. Genomreduktion (bzw. *genomic streamlining*) wurde für diverse ubiquitäre aber schwer zu kultivierende marine Organismen, darunter Vertreter des SAR11-Clusters, als mögliche nährstoff- und energiekonservierende Anpassung beschrieben (Giovannoni *et al.* 2005; Woyke *et al.* 2009). Daher könnten die relativ geringen Genomgrößen von *Roseobacter*-Vertretern des Freiwassers auf eine geringere Verfügbarkeit von Nährstoffen bei pelagischer Lebensweise hindeuten. Auch der niedrigere Anteil an Genen der COG-Kategorie G (Kohlenhydratmetabolismus) in pelagischen Vertretern (Abb. 7, 3.1.2) könnte mit einer solchen Nährstofflimitierung zusammenhängen. Dies lässt sich beispielsweise durch die im Freiwasser im Vergleich zu Sedimenten, Meereis und Biofilmen erhöhten Diffusionsraten erklären, welche den Abbau von Makromolekülen durch Exoenzyme stark erschweren. Zudem können Organismen-assoziierte *Roseobacter*-Vertreter, im Gegensatz zu freilebenden, eventuell direkt von Stoffwechsel-Ausscheidungen ihrer Wirte profitieren. Zugleich könnte der Genomgehalt auch die Komplexität und Wechselhaftigkeit des entsprechenden Lebensraumes widerspiegeln und somit darauf hindeuten, dass das marine Freiwasser einen stabileren und weniger komplexen Lebensraum darstellt, als Biofilme, Sedimente oder Wirtsorganismen. Dies wird durch den durchschnittlich höheren Anteil an Genen der COG-Kategorie T (Signaltransduktion) in assoziiert lebenden Roseobacter Vertretern unterstützt, welcher für eine komplexe Interaktion innerhalb der Bakteriengemeinschaften partikel- oder wirtsassoziierter Habitate spricht.

Die Kopienzahlen von rRNA und tRNA Genen sind in Vertretern der *Roseobacter*-Untergruppe 1 im Durchschnitt höher als bei anderen *Roseobacter*-Vertretern (Abb. 43D). Verschiedene Studien brachten Kopienzahlen von rRNA-Genen mit der ökologischen Strategie von Bakterien in Verbindung: Organismen mit einer hohen Zahl an rRNA Operons wiesen höhere Wachstumsraten bei optimalen Nährstoffkonzentrationen und eine schnellere Adaption an wechselnde Umweltbedingungen auf, als solche mit einer geringen Anzahl an Operons (Klappenbach, Dunbar & Schmidt 2000; Stevenson & Schmidt 2004). Dies könnte auf einen opportunistischen Lebensstil von Vertretern der *Roseobacter*-Untergruppe 1 hindeuten.

Die auf gene content-Analysen basierende Clusterung der Roseobacter-Vergleichsstämme (siehe 3.1.2) zeichnet die phylogenetischen Verhältnisse zwischen diesen Organismen teilweise nach (Abb. 44). Dies ist besonders deutlich bei Untergruppe 1 der Fall. Die spezifische genetische Ausstattung von Vertretern dieser Untergruppe scheint somit, trotz der sehr diversen Habitate der entsprechenden Isolate, deutlich stärker durch phylogenetische Abstammung als durch äußere Einflüsse geprägt zu sein. Bei den Vertretern anderer Roseobacter-Untergruppen sind zwar ebenfalls Zusammenhänge, aber auch mehrere deutliche Abweichungen, zwischen Phylogenie und genetischer Ausstattung ersichtlich. Diese Abweichungen scheinen mit Unterschieden in Lebensweise und Habitat und daher mit individuellen Nischenadaptionen in Zusammenhang zu stehen.



Abb. 44 Zusammenhang zwischen MLSA-basierter Phylogenie, gene content Analysen und Lebensweise verschiedener Roseobacter-Vertreter

Dargestellt ist ein *gene content*-Baum der *Roseobacter*-Gruppe (siehe 3.1.2). Zugehörigkeiten zu MLSAbasierten phylogenetischen Untergruppen (siehe 3.1.3.1) sind durch unterschiedliche Farbhinterlegung und entsprechende Nummerierung markiert. Spezifische Eigenschaften von Lebensweise und Habitat der Vergleichsorganismen sind durch verschiedene Symbole gekennzeichnet. Symbole in Klammern deuten auf Eigenschaften hin, welche in Genomdatenbanken (www.genomesonline.org) angegeben wurden, aber nicht in entsprechenden Publikationen nachvollziehbar sind. So sind marine und terrestrische *Roseobacter*-Vertreter in *gene content*-Analysen deutlich voneinander abzugrenzen, obwohl dies auf phylogenetischer Ebene nicht der Fall ist.

Untergruppen 2, 3, 4 und 5 zeigen ebenfalls auf gene content-Ebene eine höhere Diversität als auf phylogenetischer Ebene. Roseobacter denitrificans Och114 und Roseobacter litoralis Och149, welche phylogenetisch der Roseobacter-Untergruppe 2 zugehörig sind, lassen sich in ihrer genomischen Ausstattung deutlich von den übrigen Vertretern dieser Untergruppe unterscheiden, und weisen stattdessen große Ähnlichkeiten zu dem phylogenetisch nur sehr entfernt verwandten Organismus Dinoroseobacter shibae DFL12 (Untergruppe 5) auf (Abb. 44). Auch hier ist ein deutlicher Zusammenhang mit ökologischer Nischenadaption zu sind *R. denitrificans* Och114 und *R. litoralis* Och149 erkennen. So ebenso wie D. shibae DFL12 Eukaryoten-assoziierte Lebensformen, welche der phototrophen Ernährung fähig sind. Die übrigen Vertreter von Untergruppe 2 sind jedoch freilebend und obligat chemotroph. Interessanterweise unterscheiden sich die Vertreter "Ca. P. temperata" RCA23 und Rhodobacteraceae sp. HTCC2255, welche mit den hoch abundanten Roseobacter-Clustern RCA bzw NAC11-7 assoziiert sind (siehe 4.1.1), in ihrer Genomausstattung deutlich von allen anderen marinen Roseobacter-Vertretern (Abb. 44). Im Fall des Isolats HTCC2255 lässt sich dies zwar möglicherweise zum Teil auf E. coli Kontaminationen der Sequenzdaten zurückführen (Ottesen et al. 2011). Im Fall von "Ca. P. temperata" RCA23 sind solche Kontaminationen jedoch ausgeschlossen. Somit weist zumindest dieser Organismus im Vergleich zu den übrigen bislang sequenzierten Roseobacter-Vertretern tatsächlich einzigartige genetische Adaptionen auf. Dies ist vor allem deshalb bedeutend, weil sowohl der RCA- als auch der NAC11-7-Cluster häufig die Mehrheit natürlicher Roseobacter-Populationen stellen. Somit ist das genetische Potential natürlicher Roseobacter-Populationen durch die bisherigen Genomsequenzen wahrscheinlich nicht repräsentativ erfasst. Um diese Wissenslücke zu schließen, müssen weitere Vertreter der RCA- und NAC11-7-Cluster sequenziert werden.

4.1.3 Genomische Flexibilität der Roseobacter-Gruppe

Die Genomvergleiche der *Roseobacter*-Gruppe (siehe 3.1.1) unterstreichen die Bedeutung von horizontalem Gentransfer (HGT) für diese Gruppe. Das Coregenom der 49 untersuchten *Roseobacter*-Vertreter nimmt nur einen geringen Teil (14-25%) der jeweiligen Genome ein (siehe Tab. A5, Anhang), was viel Freiraum für individuelle Adaptionen lässt. Entsprechend

reichhaltig und divers ist das flexible Genom der *Roseobacter*-Gruppe. Hierdurch wird die physiologische Vielfalt widergespiegelt, welche es Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe ermöglicht, unterschiedlichste marine Lebensräume zu besiedeln (Moran *et al.* 2007; Newton *et al.* 2010).

Die natürliche Umgebung der *Octadecabacter*-Stämme stellt ein unter den Vergleichsorganismen einzigartiges Habitat dar, zudem zweigen beide Vertreter in phylogenetischen Stammbäumen der Roseobacter-Gruppe tief ab. Aus diesem Grund war zu erwarten, dass sich die Octadecabacter-Vertreter in zahlreichen spezifischen genetischen Merkmalen von den übrigen Roseobacter-Vertretern abgrenzen würden. Der Großteil des Octadecabacter-Pangenoms wird jedoch auch von phylogenetisch weit entfernten Roseobacter-Vertretern geteilt. Jedes der Vergleichsgenome teilt allerdings einen völlig anderen Satz an Genen mit dem Octadecabacter-Pangenom (Tab. DA03 + Tab DA04, digitaler Anhang). Der Anteil an Genen, welcher ausschließlich von den beiden Octadecabacter-Vertretern geteilt wird, ist dagegen mit nur 2% der jeweiligen Genome verschwindend gering. All dies deutet darauf hin, dass sich die Gattung Octadecabacter innerhalb der Roseobacter-Gruppe weniger durch einzigartige, Octadecabacter-spezifische Merkmale, sondern mehr durch eine einzigartige Zusammenstellung von Merkmalen eines allgemeinen Roseobacter-Genpools abgrenzt.

Dies scheint, in unterschiedlichem Maße, auch für andere *Roseobacter*-Vertreter zu gelten. Viele Eigenschaften des flexiblen Genoms dieser Gruppe sind in mehreren verschiedenen *Roseobacter*-Vertretern konserviert, ohne dass in der Verteilung dieser Eigenschaften ein direkter phylogenetischer Zusammenhang erkennbar wäre (Abb. 45). Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen der physiologischen und genetischen Vielfalt dieser Gruppe (Buchan, Gonzalez & Moran 2005; Newton *et al.* 2010). Beispiele für solche Eigenschaften sind verschiedene Mechanismen der phototrophen Ernährung, der assimilatorischen Nitrat-Reduktion, der Kohlenmonoxid-Oxidation sowie Cyanat-Hydratasen. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen Vertreter dieser Gruppe per HGT vernetzt sind. Prinzipiell können also auch phylogenetisch entfernte Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe auf einen gemeinsamen Pool aus akzessorischen Genen zurückgreifen.

Es ist anzunehmen, dass ein solcher Austausch von Genmaterial die Adaptivität von Bakterienpopulationen erhöht und sie somit befähigt, sich schneller in neuen oder veränderten Lebensräumen zu behaupten.





Links dargestellt ist der MLSA-Stammbaum basierend auf dem Roseobacter Coregenom. Die verschiedenen Roseobacter-Untergruppen (siehe 3.1.3.1) sind eweils farbig markiert. Kleine farbige Kästchen in der nebenstehenden Tabelle weisen auf die Anwesenheit verschiedener Merkmale in den Vergleichsstämmen hin. Die Verteilung vieler Eigenschaften scheint unabhängig von phylogenetischen Verhältnissen zwischen den Vergleichsstämmen zu sein. Ein wirkungsvolles Instrument des horizontalen Gentransfers stellen *Gene Transfer Agents* (GTAs, siehe 3.2.4.1) (Solioz & Marrs 1977; Lang & Beatty 2000) dar, Phagen-ähnliche Partikel welche in den Genomen fast aller *Roseobacter*-Vertreter kodiert werden (Abb. 45).

Die hohe Verbreitung der GTA-Gencluster lässt auf eine wichtige Bedeutung dieser Eigenschaft für die Roseobacter-Gruppe schließen. Am Beispiel von Silicibacter pomeroyi DSS-3 wurde die Funktion von GTAs als Mechanismen der Übertragung von genetischem Material zwischen nah verwandten Bakterienstämmen bereits experimentell bestätigt (Biers et al. 2008). Bislang wurden jedoch noch keine Untersuchungen über die Übertragungsweite von GTAs zwischen verschiedenen Vertretern der Roseobacter-Gruppe veröffentlicht. Somit ist es unklar, ob GTA-vermittelte Transduktion nur zwischen Bakterienstämmen derselben Spezies, oder auch zwischen Vertretern zweier nah verwandter Genera möglich ist. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass die Zugabe von GTAs zu komplexen Bakteriengemeinschaften die Übertragungsfrequenz bestimmter Eigenschaften auch zwischen Vertretern verschiedener Phyla deutlich erhöht (McDaniel et al. 2010), doch es ist nicht sicher, ob dies ausschließlich auf die Aktivität der jeweils zugegebenen GTAs zurückzuführen ist. Auf Ebene der Aminosäuresequenz spiegelt die Phylogenie der Roseobacter-GTAs fast vollständig die MLSA-basierten Verwandtschaftsverhältnisse der Roseobacter-Gruppe wieder (Abb. 25, 3.2.4.1 und Abb. 8, 3.1.3.1). Sollten GTAs eine Übertragung genetischer Merkmale über Artbzw. Gattungsgrenzen hinweg ermöglichen, so wäre nicht anzunehmen, dass die entsprechenden Proteinsequenzen in solch hohem Maße art- und gattungsspezifisch konserviert wären. In diesem Fall könnten GTA-Gencluster teilweise oder vollständig durch horizontal übertragene Homologe aus anderen Vertretern ersetzt werden.

Eine hohe Wirtsspezifität dieser Phagen-ähnlichen Partikel würde die enge Bindung zwischen MLSA- und GTA-Phylogenie erklären. Eine GTA-vermittelte Genübertragung auf weit entfernt verwandte Organismen wäre dadurch stark eingeschränkt und würde, über einen Selektionsdruck auf funktionaler Ebene, letztlich zu einer art- bzw. gattungsspezifischen Konservierung der GTA-Gene führen. Aus diesem Grund ist es naheliegend anzunehmen, dass GTA-vermittelter Gentransfer nur zwischen sehr nah verwandten *Roseobacter*-Stämmen möglich ist (bzw. GTAs nur eine geringe phylogenetische Übertragungsweite aufweisen).

Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass *gene content*-Stammbäume der *Roseobacter* Gruppe (siehe 3.1.2), trotz der teilweise erheblichen Unterschiede in Lebensweise und Habitat zwischen verwandten Organismen, zu großen Teilen ebenfalls mit der MLSA-basierten Phylogenie übereinstimmen (Abb. 44). Sollte ein vollkommen uneingeschränkter Gentransfer zwischen sämtlichen Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe möglich sein, so wäre zu erwarten,

dass die individuelle Genausstattung einzelner Vertreter weniger von phylogenetischer Abstammung und mehr mit Habitat und Lebensweise zusammenhängt. Demnach scheinen für verschiedene Untergruppen distinkte Genpools zu existieren, und HGT scheint in erster Linie zwischen Vertretern derselben Untergruppe, Gattung oder Art stattzufinden.

Die oben erwähnte flickenartigen Verteilung mehrerer konservierter Gencluster über phylogenetisch relativ weit entfernte Taxa (Abb. 45) zeigt jedoch, dass es durchaus auch Überlappungen zwischen den Genpools der einzelnen Untergruppen gibt. Hierfür könnten zusätzliche Mechanismen des HGT verantwortlich sein, welche eine höhere phylogenetische Übertragungsweite erlauben, aber innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe weniger stark verbreitet sind als GTAs. Typ-IV Sekretionssysteme können unter anderem dem Gentransfer zwischen Organismen dienen (siehe 3.2.3.5) (Wallden, Rivera-Calzada & Waksman 2010). Gencluster, welche Typ-IV Sekretionssysteme kodieren, sind in 20 der 49 Roseobacter-Vertreter konserviert (Abb. 45). Anders als bei GTAs ist jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Phylogenie dieser Sekretionssysteme und der MLSA-basierten Phylogenie der Roseobacter-Gruppe zu erkennen (Abb. 23, 3.2.3.5). Somit scheint auf diesen Merkmalen, im Gegensatz zu GTAs, kein Selektionsdruck bezüglich Taxon-spezifischer Konservierung zu lasten. Die Annahme, dass diese Sekretionssysteme auch über relativ weite phylogenetische Distanzen hinweg einen Gentransfer ermöglichen, wird durch bislang unveröffentlichte experimentelle Ergebnisse unterstützt. So berichtete PD Dr. Jörn Petersen (DSMZ, Braunschweig) von dem Nachweis eines durch Typ-IV Sekretionssysteme vermittelten Gentransfers zwischen den weit entfernt verwandten Roseobacter-Vertretern D. shibae DFL-12 und P. gallaeciensis DSM17395 (Tagungsbeitrag, Klausurtagung des TRR 51 Januar 2013, Wolfenbüttel). Es ist anzunehmen, dass sich gattungs- und artfremde Merkmale, einmal in das Genom eines Roseobacter-Vertreters aufgenommen, anschließend mithilfe von GTAs zügig innerhalb nah verwandter Roseobacter-Populationen verbreiten können. Die Tatsache, dass Typ-IV Sekretionssysteme in Roseobacter-Vertretern weitaus seltener vorzufinden sind als GTAs, deckt sich zudem mit der oben erwähnten Beobachtung, dass HGT zwischen phylogenetisch entfernten Taxa seltener aufzutreten scheint als zwischen nah verwandten Taxa.

In *O. arcticus* 238 sind zwar prinzipiell alle entsprechenden Gene eines Typ-IV Sekretionssystems vorhanden, jedoch ist dieses Gencluster durch intragenomische Rekombination stark fragmentiert (siehe 3.2.3.5). Daher ist davon auszugehen, dass dieses Merkmal im besagten Stamm nicht funktional ist. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Fragmentierung dieses Genclusters entwicklungsgeschichtlich lange zurück liegt, da aufgrund natürlicher Selektion funktionslose Gene mit der Zeit deletiert würden. Daher ist davon auszugehen, dass nah verwandte *Octadecabacter*-Stämme derselben Population noch entsprechende unfragmentierte Gencluster aufweisen. Inwiefern GTAs und Typ-IV Sekretionssysteme in den Pangenomen der entsprechenden Populationen konserviert sind, wird sich jedoch erst mit größerer Sicherheit sagen lassen, wenn weitere Genome nah verwandter Isolate sequenziert wurden.

4.1.4 Methodische Aspekte der Roseobacter Genomvergleiche

Bei der Interpretation der in dieser Arbeit dargelegten Genomvergleiche sind einige wichtige methodische Aspekte sowie einige Besonderheiten in den untersuchten Vergleichsgenomen zu berücksichtigen. Je nach Referenzorganismus ergaben reziproken BLAST-Analysen teilweise etwas unterschiedliche Orthologenzahlen. Vergleicht man also die Roseobacter-Gruppe ausgehend von den Octadecabacter-Vertretern, ergibt sich ein etwas anderes Bild als wenn ähnliche Vergleiche beispielsweise ausgehend von Dinoroseobacter shibae DFL-12 durchgeführt werden. Zu einem Teil ist dies durch evalue- und Identitäts-cutoffs bedingt. So gibt es immer wieder Grenzfälle, in denen die entsprechenden Vertrauenswerte eines BLAST-Treffers von unterschiedlichen Organismen ausgehend, jeweils über oder unter den gewählten cutoff-Werten liegen. Der hauptsächliche Grund für die Diskrepanzen in den Orthologenzahlen liegt jedoch in der Methodik des reziproken BLASTs selbst. Durch diese Methode werden nur solche Gene als potentielle Orthologe identifiziert, welche in bidirektionalen BLAST-Analysen den jeweils besten Treffer darstellen, während Paraloge nicht berücksichtigt werden (siehe 2.10.3). Folglich wird die Gesamtzahl an potentiellen Orthologen zwischen verschiedenen Vergleichsgenomen durch diese Methode eher unterschätzt, wodurch die resultierenden Vergleichswerte etwas variieren können. Die Unterschiede sind in der Regel jedoch nicht schwerwiegend. Beispielsweise ergeben sich in Bezug auf das Coregenom der 49 untersuchten Roseobacter-Vertreter bei unterschiedlichen Referenzorganismen lediglich Abweichungen von bis zu 15 Genen (bei einer durchschnittlichen Coregenomgröße von 750 Genen, Tab. A5, Anhang). Gene content-Analysen (siehe 3.1.2) werden hierdurch nicht beeinträchtigt, da singletons nicht in die entsprechenden Charaktermatrizen mit aufgenommen wurden (siehe 2.10.5). Die Bestimmung art- und gattungsspezifischer Gene in den Octadecabacter-Vertretern wird durch diesen Umstand jedoch gravierend beeinflusst. Diese beiden Organismen weisen zahlreiche transposable Elemente (TEs) auf, welche in der überwiegenden Zahl der Fälle auch in anderen *Roseobacter*-Vertretern zu finden sind (Tab. 9, 3.2.2.2). In den *Octadecabacter*-Stämmen ist die Kopienzahl solcher Elemente allerdings um ein vielfaches höher als in anderen *Roseobacter*-Vertretern. Die entsprechenden Paraloge werden somit zumeist fälschlicherweise als art- bzw. gattungsspezifische Merkmale bestimmt, was zu hohen Anteilen (20-23%) von vermeintlich einzigartigen Genen in den *Octadecabacter*-Genomen führt. Zwar ist die extreme Anzahl der TEs in diesen Organismen tatsächlich einzigartig innerhalb der *Roseobacter*-Gruppe, die entsprechenden TE-assoziierten Gene sind es jedoch nicht. Somit sind TE-assoziierte Gene von dem Anteil vermeintlich art-bzw. gattungsspezifischer Gene in den *Octadecabacter*-Genomen abzuziehen. Die entsprechend korrigierten Anteile liegen mit 9-15% deutlich niedriger als die nicht korrigierten, und geben ein wahrscheinlich realitätsgetreueres Abbild der physiologischen Eigenheiten der *Octadecabacter*-Vertreter wieder (Tab. DA03 + Tab. DA04, digitaler Anhang).

Auch die Qualität der Genomsequenzen beeinflusst vergleichende Analysen zwischen den Roseobacter-Vertretern. Aus Kosten- und Zeitgründen wird immer häufiger auf finishing und polishing (siehe 2.9) von Genomsequenzen verzichtet. Stattdessen werden bakterielle Genome in Form von Rohsequenzen (draft-Genome) veröffentlicht, welche noch zahlreiche Lücken aufweisen. Lücken in assemblies entstehen meist in sogenannten repeat-Regionen (Schatz, Delcher & Salzberg 2010), also Bereichen, welche mit sehr ähnlicher Sequenz mehrfach über das Genom verteilt, vorkommen. Solche Bereiche werden häufig durch TEs oder rRNA-Gencluster gebildet und somit lässt sich ohne Lückenschluss nicht mit absoluter Sicherheit sagen, wie viele Kopien dieser Elemente in den jeweiligen Genomen enthalten sind. So ist es durchaus möglich, dass einige Roseobacter-Vertreter eine höhere Zahl an TEs oder rRNA Genclustern beinhalten als angenommen. Zudem können draft-Genome noch zahlreiche Sequenzierfehler beinhalten, welche dazu führen können, dass prinzipiell funktionale Gene fälschlicherweise als Pseudogene klassifiziert werden. Aber auch vermeintlich vollständige Genomsequenzen, welche ausschließlich auf 454-Pyrosequenzierung beruhen, wie die von Ketogulonicigenium vulgare WSH-001, weisen in sog. homopolymer-stretches (drei oder mehr aufeinanderfolgende identische Nukleotide) häufig Sequenzierfehler auf (Margulies et al. 2005).

Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass das *draft*-Genom von *Rhodobacteraceae* sp. HTCC2255 einige *Contigs* aufweist, welche womöglich auf einer Kontamination des Sequenzieransatzes durch *E. coli* beruhen (Ottesen *et al.* 2011). Die Identifikation von Elementen des *Roseobacter*-Coregenoms in diesem Organismus sollte dadurch nicht

wesentlich beeinträchtigt worden sein, da die zusätzlichen fremden Genomabschnitte im Falle einer Kontamination bei BLAST-Analysen konservierter *Roseobacter housekeeping*-Gene keinen bidirektionalen besten Treffer ergeben sollten. Bei Vergleichen der allgemeinen Genomausstattung (z.B. *gene content*-Bäume) könnten die Unterschiede und Eigenheiten dieses Organismus durch eine solche Kontamination jedoch schwerwiegender erscheinen als sie es tatsächlich sind.

4.2 Spezifische Betrachtung der Octadecabacter-Stämme

4.2.1 Erhöhte Genomplastizität der Octadecabacter Stämme

Beide untersuchten *Octadecabacter*-Stämme weisen eine außerordentliche Genomplastizität auf. Vor allem in Genomorganisation und –struktur sind enorme Unterschiede zu sehen (siehe 3.2.2). Dies deckt sich mit früheren DNA/DNA-Hybridisierungsversuchen von Gosink *et al.* (1997), scheint aber nicht mit den Ähnlichkeiten dieser Organismen auf verschiedenen Sequenzebenen (siehe 3.1.3) vereinbar zu sein.

Es ist in hohem Maße unwahrscheinlich, dass zwei getrennte Bakterienpopulationen über einen längeren Zeitraum hinweg unabhängig voneinander, ähnliche oder identische Sequenzmutationen anhäufen. Sollte also die Divergenz in Aufbau und Struktur der *Octadecabacter*-Genome auf die räumliche Trennung dieser Organismen und somit auf eine unabhängige evolutionäre Entwicklung zurückzuführen sein, so müsste sich dies auch auf anderen phylogenetischen Ebenen widerspiegeln. Durch vergleichbare Genom-*alignments* repräsentativer *Roseobacter*-Stämme konnte jedoch gezeigt werden, dass die strukturellen Unterschiede zwischen den *Octadecabacter*-Genomen deutlich höher sind, als die entsprechenden Distanzen auf Sequenzebene vermuten lassen (3.2.2.4). In diesen *alignments* wiesen die Genome der Vergleichsorganismen selbst bei höheren Sequenzunterschieden weitaus mehr strukturelle Syntenien auf als die *Octadecabacter*-Vertreter, unabhängig davon, ob die entsprechenden Stämme aus nahe gelegenen oder global entgegengesetzten Standorten stammen (Abb. 14, 3.2.2.4 + Abb. A2, Anhang).

Daher ist vielmehr davon auszugehen, dass *O. arcticus* und *O. antarcticus* anfälliger sind für intragenomische Rekombinationsereignisse als andere *Roseobacter*-Vertreter. In Anbetracht der außergewöhnlichen Dichte an transposablen Elementen (TEs) in diesen Organismen (siehe 3.2.2.2), sind Häufungen solcher Rekombinationsereignisse nicht verwunderlich. Viele TEs weisen in den *Octadecabacter*-Genomen zahlreiche Kopien auf, welche weit über die

jeweiligen Replikons verteilt sind (Tab. 9, 3.2.2.2). Diese Elemente stellen somit repetitive Bereiche mit nahezu vollständiger Sequenzidentität dar, welche als Ausgangspunkte für homologe Rekombination dienen können. In diversen Organismen konnten verschiedentliche Inversionen, Deletionen, Duplikationen und Translokationen größerer Genomabschnitte auf solch Homologie-basierte Rekombinationsereignisse zwischen identischen TEs zurückgeführt werden (Gray 2000; Mieczkowski, Lemoine & Petes 2006; Petrosino et al. 2006; Braumann, van den Berg & Kempken 2008). Während die durchschnittliche Dichte an TEs in Genomen der Roseobacter-Gruppe bei ca. 18 TEs/Megabase liegt (Tab. 7, Abb. 5, 3.1.1), ist dieser Wert bei beiden Octadecabacter-Vertretern um das vier- bis achtfache erhöht. Entsprechend ist zu erwarten, dass TE-basierte homologe Rekombinationsereignisse in beiden Octadecabacter-Stämmen mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit auftreten als in anderen Roseobacter-Vertretern. Zudem wird intragenomische Rekombination auch unabhängig von Sequenzhomologien durch sogenannte "alternative Transposition" (Gray 2000) ermöglicht. Dieser Begriff bezeichnet die gleichzeitige Beteiligung zweier in unterschiedlichen Genomabschnitten lokalisierter TEs an derselben Transpositionsreaktion, was zu einem Austausch der jeweils benachbarten Regionen führen kann (Zhang & Peterson 1999; Zhang & Peterson 2004). Die hohe Kopienzahl mehrerer TEs in beiden Octadecabacter Genomen (Tab. 9, 3.2.2.2) deutet darauf hin, dass diese TEs funktional sind und häufige Transpositions-Aktivität aufweisen. Somit kann es in beiden Octadecabacter-Genomen auch zu alternativen Transpositions-Ereignissen kommen.

Es ist anzunehmen, dass beide erwähnten TE-basierten Rekombinationsmechanismen auch das Potential für HGT in *Octadecabacter*-Populationen drastisch erhöhen. Dies könnte im Meereis von besonderer Bedeutung sein, da Meereis als potentieller *hot spot* für HGT gilt, der reich an extrazellulärer DNA ist (Collins & Deming 2011a; Collins & Deming 2011b). DNA-Fragmente, welche z. B. mittels Transduktion oder Transformation aus fremden Quellen aufgenommen wurden, müssen jedoch meist in ein natives Replikon integrieren, um stabil repliziert werden zu können und dem Abbau durch Nukleasen zu entgehen. Die Wahrscheinlichkeit für die Integration heterologer DNA-Abschnitte allein mittels illegitimer (nicht-homologer) Rekombination (Ehrlich 1989) ist extrem niedrig (de Vries & Wackernagel 2002). Bereits kurze Sequenzbereiche (ab 183 bp) mit hoher Sequenzübereinstimmung können jedoch als "rekombinatorische Anker" bzw. Ausgangspunkt für homologe Rekombinationsereignisse dienen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Integration flankierender heterologer Genomabschnitte mittels anschließender illegitimer Rekombination um bis das 10⁵-fache erhöht wird (de Vries & Wackernagel 2002; Prudhomme, Libante &

Claverys 2002). Die meisten der in den *Octadecabacter*-Genomen identifizierten TEs weisen nah verwandte Orthologe in beiden Isolaten auf (Tab. 9, 3.2.2.2), und sind zudem in hoher Dichte über beide Genome verteilt. Somit ist die Anwesenheit geeigneter rekombinatorischer Anker auf den meisten DNA Fragmenten, welche zwischen den *Octadecabacter*-Stämmen transferiert werden könnten, gegeben. Die extrem hohe Diversität an TEs in den *Octadecabacter*-Genomen spricht zudem dafür, dass häufig genetisches Material auch aus vielfältigen anderen Quellen aufgenommen wurde. Aufgrund ihrer Befähigung zur Transposition besitzen TEs eine höhere Wahrscheinlichkeit in ein neues Wirtsgenom zu integrieren als andere genetische Elemente. Solche neu aufgenommenen TEs könnten anschließend als rekombinatorische Anker für die Integration weiterer fremder DNA-Fragmente fungieren und somit auch das Potential für art- bzw. gattungsübergreifenden Gentransfer erhöhen. Diese Hypothese würde auch die regionale Anhäufung von Elementen einiger TE-Familien in begrenzten Genomabschnitten (Abb. 13, 3.2.2.2) erklären.

Die auf Basis mehrerer Faktoren systematisch definierten "Regionen erhöhter Genomplastizität" (RGPs, 3.2.2.1) sind als rekombinatorische hot spots anzusehen. In diesen Regionen ist die Dichte an TEs und somit die Wahrscheinlichkeit für Homologie-basierte oder TE-vermittelte Rekombinationsereignisse meist deutlich erhöht. Anhand spezifischer Gencluster lassen sich in den Octadecabacter-Genomen verschiedene Rekombinationsereignisse zwischen RGPs nachvollziehen, sowohl innerhalb des Chromosoms (z. B. Fragmentierung des Typ-IV Sekretionssystems in O. arcticus, siehe 3.2.3.5 bzw. Duplikation des Quecksilber-Resistenzclusters in O. antarcticus, siehe 3.2.4.4), als auch zwischen verschiedenen Replikons (z. B. Duplikationen einzelner Gene der Flagellen- und Gasvesikel-Gencluster in O. arcticus, Abb. 12, 3.2.2.1). In O. arcticus sind zudem im Bereich der RGPs 13-17, sowie auf dem Plasmid pOAR160 weitere konkrete Hinweise für den Austausch von genetischem Material zwischen chromosomalen und Plasmid-lokalisierten Genomabschnitten zu finden. Ein deutlicher Hinweis ist die regionale Anhäufung von IS6- und IS903-ähnlichen TEs in den genannten chromosomalen Genomabschnitten sowie auf pOAR160 (Abb. 13, 3.2.2.2). Desweiteren sind im Bereich der RGPs 13-17 mehrere Toxin/Antitoxin Plasmid-Stabilisierungssysteme enthalten, von denen eines fast vollständige Sequenzidentität zu einem entsprechenden System auf Plasmid pOAR160 aufweist (Tab. DA56, digitaler Anhang).

Die zahlreichen als potentielle genomische Inseln identifizierten Bereiche in den Chromosomen beider *Octadecabacter*-Stämme (Abb. 12, 3.2.2.1) weisen ebenfalls auf ein hohes Potential für horizontalen Gentransfer (HGT) hin. Wie im Folgenden erläutert, ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Anzahl genomischer Inseln durch die verwendeten bioinformatische Vorhersage-Methoden (siehe 2.10.4) stark unterschätzt wird. Diese Vorhersagen basieren auf signifikanten Abweichungen verschiedener Messgrößen (beispielsweise der *codon usage* oder des GC-Gehalts) von genomischen Mittelwerten (Langille, Hsiao & Brinkman 2008). Durch die hohe Zahl der transposablen Elemente (TEs) in diesen Organismen werden jedoch sowohl die Durchschnittswerte als auch die Varianz der jeweiligen Messgrößen beeinflusst. Dies kann dazu führen, dass einige Bereiche nicht mehr als signifikant abweichend gewertet werden. So sind auch abseits der durch bioinformatische Analysen identifizierten genomischen Inseln diverse Gencluster zu finden, welche wahrscheinlich durch HGT übertragen wurden. Beispiele hierfür sind das Cyanophycin Gencluster von *O. arcticus* 238 und die Gene der assimilatorischen Nitrat-Reduktion in *O. antarcticus* 307 (siehe 3.2.3.1+2 und Abb. 12, 3.2.2.1).

Durch die oben genannten Faktoren lassen sich die extremen Unterschiede in Struktur sowie Zusammensetzung der Genome der beiden phylogenetisch nah verwandten Octadecabacter-Stämmen erklären. Doch auch die vergleichsweise hohe Divergenz zwischen den phylogenetischen Distanzen auf MLSA- und rRNA-Gensequenz-Ebene (siehe Abb. 8+9, 3.1.3) ist wahrscheinlich als Ausdruck erhöhter Genomplastizität zu sehen. Obwohl die geringe Auflösung 16S rRNA-Gensequenz-basierter Phylogenie in Bezug auf sehr nah verwandte Spezies bereits häufig berichtet wurde (Palys, Nakamura & Cohan 1997; Gevers et al. 2005; Thompson et al. 2005), sind 16S rRNA-basierte Stammbäume prinzipiell verlässlich und größtenteils vergleichbar mit MLSA-basierten Methoden (Adekambi & Drancourt 2004; Soria-Carrasco et al. 2007). Allerdings weisen 16S rRNA-Gene signifikant niedrigere evolutionäre Substitutionsraten auf, als proteinkodierende Gene (Palys, Nakamura & Cohan 1997; Palys et al. 2000). Entsprechend sollten sich erhöhte Mutationsraten in proteinkodierenden Genen weitaus früher und stärker ausprägen als in rRNA-Genen. Demnach deuten die unterschiedlichen phylogenetischen Distanzen zwischen den Octadecabacter-Stämmen auf rRNA-Ebene und MLSA-Ebene darauf hin, dass sich die beiden Octadecabacter-Stämme, möglicherweise aufgrund erhöhter Mutationsraten, innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes auseinander entwickelten. Der ungewöhnlich hohe Anteil an Pseudogenen in beiden Octadecabacter-Stämmen deutet auf eine solche erhöhte Mutationsrate hin (siehe 3.2.2.3). Somit scheinen die beiden Octadecabacter-Stämme entweder anfälliger für Sequenzmutationen oder in ihrem natürlichen Habitat stärker mutagenen Einflüssen ausgesetzt zu sein als andere Roseobacter-Vertreter. Saisonal erhöhte UV-Strahlungen (McKenzie et al. 2007) und Schwermetall-Konzentrationen (Ebinghaus et al. 2002; Ariya et al. 2004) in den Polarregionen könnten solche mutagenen Einflüsse darstellen.

4.2.2 Rückschlüsse auf die Biogeographie bipolar verbreiteter Organismen

Arktis und Antarktis unterscheiden sich in mehreren Faktoren wie dem Ausmaß terrestrischer, limnischer und anthropogener Einflüsse sowie den verschiedenen durchschnittlichen Jahrestemperaturen grundsätzlich voneinander (Ghiglione *et al.* 2012) (Siehe 1.2). Auch die beiden *Octadecabacter*-Stämme lassen sich in mehreren prägnanten Merkmalen voneinander unterscheiden (siehe 3.2.3). Es liegt daher nahe, die genetischen Unterschiede zwischen arktischen und antarktischen *Octadecabacter*-Vertretern mit unterschiedlichen Umwelt-einflüssen ihres jeweiligen Habitats in Verbindung zu setzen. Auf der ausschließlichen Grundlage der wenigen sequenzierten polaren *Roseobacter*-Vertreter sind jedoch noch keine verlässlichen Rückschlüsse auf unterschiedliche Lebensbedingungen in den nördlichen und südlichen Polargebieten möglich.

16S rRNA-Gensequenzanalysen zeigten, dass psychrophile Octadecabacter-Stämme beider Pole eine deutlich nähere Verwandtschaft zueinander aufweisen, als zu mesophilen Octadecabacter-Vertretern in temperaten und warmen Habitaten (siehe 3.2.1). Dies spricht gegen eine unabhängige Entwicklung und deutet vielmehr auf eine direkte Verbindung zwischen den Bakteriengemeinschaften beider Polargebiete hin. Zudem weisen die beiden Octadecabacter-Stämme, abgesehen von offenkundigen Unterschieden in Genomstruktur und -organisation (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.4), erstaunlich viele Gemeinsamkeiten auf. So sind beispielsweise Gasvesikel, Rhodopsin und Flagellengencluster der Octadecabacter-Vertreter beider Polarregionen fast identisch, aber dennoch prinzipiell verschieden von entsprechenden Genclustern der meisten anderen Roseobacter-Vertreter. Dies deutet auf einen gemeinsamen arktischer und antarktischer Octadecabacter-Populationen hin. Genpool Sämtliche Unterschiede in der Genom-Ausstattung beider Octadecabacter-Stämme lassen sich hingegen durch deren extrem hohe Genomplastizität erklären (siehe 4.2.1), einer Eigenschaft, welche gleichzeitig auch die auffälligste Gemeinsamkeit dieser Organismen darstellt (siehe 4.2.3). Keines der prägnanten genetischen Merkmale, in denen sich O. arcticus 238 und O. antarcticus 307 unterscheiden, ist ausschließlich auf Organismen des nördlichen bzw. des südlichen Polargebiets beschränkt. So sind Homologe sowohl der Gene der assimilatorischen Nitrat-Reduktion von O. antarcticus (siehe 3.2.3.2) als auch der Cyanophycin-Ligase und des Typ IV Sekretionssystems von O. arcticus (siehe 3.2.3.1 bzw. 3.2.3.5) prinzipiell in Organismen beider Polargebiete nachweisbar. Das genomische Potential der Bakteriengemeinschaften beider Polarregionen scheint somit grundsätzliche Ähnlichkeiten aufzuweisen

Es wurde bereits über mögliche Übertragungswege von Bakterien zwischen den Polen spekuliert (Staley & Gosink 1999). Am naheliegendsten erscheint ein Transport polarer Organismen über die Wassermassen kalter Tiefenströmungen wie dem North Atlantic Deep Water oder dem Antarctic Bottom Water (NADW bzw. AABW; Brix & Gerdes 2003). Diese Tiefenströmungen entstehen in den Polargebieten und erstrecken sich über den Äquator hinaus in die Gewässer der jeweils anderen Erdhalbkugel. Das NADW bildet sogar eine direkte Verbindung zwischen den Wassermassen beider Polargebiete (Brix and Gerdes 2003). Ein Kritikpunkt solcher Hypothesen ist die extrem lange Transferzeit von mehreren hundert Jahren, die vergeht, bis Wasser von einem Pol zum anderen gelangt (Staley & Gosink 1999). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass heterotrophe polare Organismen während solcher Transferzeiten in den Wassermassen von Tiefenströmungen überleben und sogar wachsen können. Der durch die charakteristischen Gasvesikel bedingte erhöhte Auftrieb von Octadecabacter-Vertretern (siehe 3.2.4.1) scheint zwar auf den ersten Blick gegen einen Transport über Tiefsee-Wassermassen zu sprechen. Allerdings sind Gasvesikel allgemein sehr empfindlich gegenüber Druckveränderungen und kollabieren irreversibel sobald der Wasserdruck zu sehr ansteigt (Pfeifer 2012). Wenn also Octadecabacter-Vertreter durch absinkende Tiefenströmungen ausreichend weit mitgerissen würden, wäre aufgrund der veränderten Druckverhältnisse die Ausbildung von Gasvesikeln nicht mehr möglich. Somit besäßen die entsprechenden Bakterienzellen keinen erhöhten Auftrieb mehr, der ein Aufsteigen in höhere und wärmere Wassermassen bewirken könnte.

Die Annahme einer direkten Verbindung zwischen den Populationen beider Polarregionen wird durch kürzlich von Ghiglione et al. (2012) veröffentlichte, auf 16S rRNA-Amplikonsequenzierung basierende Strukturanalysen globaler Bakteriengemeinschaften unterstützt. Zwar ließen sich durch die genannten Analysen arktische und antarktische Bakteriengemeinschaften in ihrer Zusammensetzung prinzipiell voneinander abgrenzen, jedoch wiesen die Populationen der beiden Polargebiete untereinander stets höhere Ähnlichkeiten auf, als zu angrenzenden Meeresregionen. Zudem sind die durch Ghiglione et al. dargestellten Unterschiede zwischen arktischen und antarktischen Bakteriengemeinschaften allgemein geringer ausgeprägt als zwischen den Sommer- und Wintergemeinschaften der jeweiligen Polarregion. Das bedeutet, dass saisonale Schwankungen einen stärkeren Einfluss auf die Artenzusammensetzung dieser Gebiete haben als geographische Unterschiede.

Die Tatsache, dass arktische und antarktische Bakteriengemeinschaften sich dennoch prinzipiell unterscheiden lassen, deutet allerdings auch auf grundsätzliche Unterschiede in den

Lebensbedingungen beider Polarregionen hin. Die wenigen bislang verfügbaren Genomsequenzen polarer Organismen (www.genomesonline.org) reichen jedoch nicht aus und sind zudem zu divers, um entsprechende unterschiedliche Adaptionen durch *gene content*-Analysen aufzuzeigen. Zudem ist nicht auszuschließen, dass genetische Unterschiede zwischen den entsprechenden nördlichen und südlichen Bakteriengemeinschaften nicht in der Exklusivität, sondern vor allem in der Häufigkeit und Expressionsstärke verschiedener Merkmale zu suchen sind. Daher sind Metagenom- und Metatranskriptomanalysen geeignetere Mittel, um spezifische genetische Anpassungen an arktische bzw. antarktische Habitate aufzuzeigen, als Genomanalysen einzelner Organismen.

4.2.3 Generelle Adaptionen an Polargebiete bzw. Meereishabitate

Mehrere Merkmale beider Octadecabacter-Stämme lassen sich als generelle Anpassungen an polare bzw. Meereishabitate interpretieren. Das auffälligste Merkmal dieser Organismen ist die hohe Zahl und Diversität der TEs. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, sind hierdurch die Genomplastizität und somit auch das Potential für HGT in beiden Octadecabacter-Stämmen stark erhöht. Da Meereishabitate als potentielle hot spots für HGT gelten (Kiko 2010; Collins & Deming 2011a; Collins & Deming 2011b), ist anzunehmen, dass genomische Rekombination für die Meereis-bewohnenden Octadecabacter-Stämme von höherer Bedeutung ist als für andere Roseobacter-Vertreter. Die damit zusammenhängende genomische Flexibilität und erhöhte ökologische Adaptivität könnte in den sich jahreszeitlich drastisch verändernden polaren Lebensräumen (Takahashi et al. 2010; Ghiglione et al. 2012; Ghiglione & Murray 2012) einen entscheidenden Selektionsvorteil bieten und erklären, wie sich die hohe Dichte an TEs trotz ersichtlicher negativer Auswirkungen (beispielsweise die Inaktivierung des Rhamnose-Verwertungs-Genclusters in O. arcticus, siehe 3.2.4.6) in beiden räumlich getrennten Octadecabacter-Populationen erhalten konnte. Somit könnten Octadecabacter-Vertreter aus Meereishabitaten eine starke Triebkraft der genomischen Diversität der gesamten Roseobacter-Gruppe darstellen.

Die Belastung mit UV-Licht ist in polaren Habitaten im Vergleich zu anderen Erdregionen erhöht (Karsten *et al.* 1998). Dies äußert sich bei den *Octadecabacter*-Stämmen in der relativ hohen Zahl an UV-Reparatursystemen (siehe 3.2.4.8) und könnte zudem eine Erklärung für die erhöhte Mutationsrate (siehe 3.2.2.3 und 4.2.1) in beiden *Octadecabacter*-Vertretern darstellen.

Quecksilber-Emissionen belasten weltweit verschiedene Ökosysteme (Hylander & Goodsite 2006). Entsprechend sind Resistenzmechanismen, wie die Befähigung zur Quecksilber-Reduktion, in vielfältigen Organismen unterschiedlicher Lebensräume zu finden (Osborn *et al.* 1997; Mindlin *et al.* 2005; Møller *et al.* 2012). Da jedoch sowohl die Arktis als auch die Antarktis als Senken für atmosphärisches Quecksilber gelten, was in diesen Gebieten zu saisonal erhöhten Quecksilber-Konzentrationen führt (Ebinghaus *et al.* 2002; Ariya *et al.* 2004; Poulain *et al.* 2007), könnten entsprechende Resistenzmechanismen in polaren Habitaten von besonderer Bedeutung sein. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass Quecksilberresistenz Gencluster in allen drei polaren *Roseobacter*-Vertretern *Phaeobacter arcticus* DSM23566, *O. arcticus* 238 sowie *O. antarcticus* 307 konserviert sind, aber nur wenige andere Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe entsprechende Orthologe aufweisen.

Es ist davon auszugehen, dass Speicherstoffe im Meereis allgemein eine sehr wichtige Rolle einnehmen. Sowohl niedrige Diffusionsraten im Meereis und kältebedingte erniedrigte Substratbindeaffinitäten bakterieller Enzyme als auch die extremen Übergänge zwischen verschiedenen Lebensbedingungen (vor allem bei der Bildung oder Schmelze des Meereises) und die damit verbundenen notwendigen Umstellungen des Metabolismus, können die Verfügbarkeit von Nährstoffen für Meereisorganismen vorrübergehend stark einschränken (Thomas & Dieckmann 2002). Die Kohlenstoff-Speichersubstanz Polyhydroxybuttersäure (PHB) und der Phosphat-Speicherstoff Polyphosphat sind beiden Octadecabacter-Stämmen gemein, aber auch in vielen anderen Roseobacter-Vertretern zu finden (Tab. DA03+Tab. DA04, digitaler Anhang). Daher sind diese Speicherstoffe, auch wenn sie zweifelsohne in Meereishabitaten von großer Bedeutung sind, nicht spezifisch für Bewohner polarer Habitate. Anders verhält sich dies beim Cyanophycin-Gencluster von O. arcticus 238 (siehe 3.2.3.1). Metagenomanalysen deuten darauf hin, dass die Befähigung zur Cyanophycin-Synthese für marine Organismen eher untypisch ist. In Polarregionen ist die Häufigkeit entsprechender Gene, insbesondere von Cyanopycin-Ligasen des Typs VI, jedoch deutlich erhöht. Dies könnte vor allem mit saisonalen Nährstoff-Schwankungen in den Polarregionen zusammenhängen, da Stickstoff ein signifikanter limitierender Faktor für die heterotrophe Biomasse-Produktion polarer mariner Bakteriengemeinschaften im Sommer sein kann (Ortega-Retuerta, Jeffrey & Joux 2012). Anstelle eines Stickstoff-Speicherpolymers, besitzt O. antarcticus 307 die Befähigung zur assimilatorischen Nitrat-Reduktion und ist daher in der Lage zusätzliche anorganische Stickstoffquellen zu nutzen (siehe 3.2.3.2). Desweiteren besitzen beide Octadecabacter-Stämme Cyanat-Hydratasen kodierende Gene (siehe 3.2.3.1), welche im weiteren Sinne ebenfalls am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind. Dies deutet auf eine besonders Wachstums-limitierende Rolle von Stickstoff in polaren Lebensräumen hin.

Die Befähigung von O. arcticus, Ectoin aufzunehmen und zu verwerten, ist vor allem in Bezug auf das Meereishabitat dieses Organismus vorteilhaft. Aufgrund der sich während der Formation und des Schmelzens von Meereis drastisch ändernden Salinitäten ist anzunehmen, dass kompatible Solute für Organismen dieses Lebensraumes von großer Bedeutung sind. Interessanterweise scheint die Aufnahme von Ectoin in O. arcticus jedoch nicht primär der Osmoregulation, sondern vielmehr der Energie- und Kohlenstoffversorgung zu dienen. Hierfür spricht die Art des Ectoin-Transporters, welcher in O. arcticus dem ehu-Typ angehört. Da die Aktivität dieser Art von Transportern durch die Verfügbarkeit des Substrats reguliert wird, ist die Aufnahme von Ectoin nicht zwangsläufig von osmotischen Bedingungen abhängig. Es ist anzunehmen, dass dieses kompatible Solut in der natürlichen Umgebung von O.arcticus vor allem dann in großen Mengen zur Verfügung steht, wenn es durch Ectoinbildende Organismen aktiv ausgeschieden wird. Dies ist jedoch vor allem dann zu erwarten, wenn die Osmolarität drastisch abnimmt und eine hohe intrazelluläre Ectoin-Konzentration somit die Überlebensfähigkeit einschränken würde. Zwar ist es denkbar, dass die Expression des ehu-Typ Transporters in O. arcticus in Abhängigkeit von der Osmolarität reguliert wird, jedoch würde dies keine schnelle Reaktion auf plötzliche Veränderungen erlauben. Zum Zwecke der Osmoregulation erscheinen Ectoin-Transporter des tea-Typs, wie sie in den meisten zur Ectoin-Aufnahme befähigten Roseobacter-Vertretern vorliegen, weitaus besser geeignet. Ein Vorteil ergibt sich in O. arcticus somit vielmehr dadurch, dass dieser Organismus ein zusätzliches und in seinem natürlichen Habitat erwartungsgemäß häufig vorkommendes Substrat nutzen kann.

Die Xanthorhodopsine der *Octadecabacter*-Stämme (siehe 3.2.5) stellen nachweislich spezifische Anpassungen an die Eis-assoziierten Habitate dieser Organismen dar. Da diese im Fokus besonders intensiver Untersuchungen standen, werden die entsprechenden Befunde im nachfolgenden Abschnitt gesondert diskutiert.

4.2.4 Xanthorhodopsine: Ökologie und Funktion

4.2.4.1 Ökologie der Xanthorhodopsine

Phylogenetische Analysen der in der NCBI-nr Datenbank hinterlegten Rhodopsin-Sequenzen zeigen eindeutig eine Unterteilung der Xanthorhodopsin-Gruppe in zwei Untergruppen

(Abb. 34, 3.2.5.1) (Vollmers et al. 2013). Eine solche Unterteilung ist bislang noch nicht beschrieben worden, jedoch lassen die hohen Bootstrap-Werte dieser Untergruppen, sowohl in Neighbor-Joining- als auch in Maximum-Likelihood-Analysen, an diesem Befund keine Zweifel aufkommen. Die Xanthorhodopsin-Untergruppe I beinhaltet unter anderem die beiden ursprünglich beschriebenen Xanthorhodopsine von G. violaceus und S. ruber und ist somit bereits funktional charakterisiert worden (Balashov & Lanyi 2007; Balashov et al. 2010). Allerdings ist, trotz der größeren Zahl an entsprechenden Isolaten, noch kein Vertreter der Xanthorhodopsin Untergruppe II detailliert untersucht worden. Die Analysen der Octadecabacter-Rhodopsine stellen somit stellvertretend auch eine Charakterisierung der gesamten Xanthorhodopsin-Untergruppe II dar. Eine einfache phylogenetische Differenzierung solcher Merkmale wäre wohl wenig bemerkenswert, wenn sie nicht mit Unterschieden in Funktion und Ökologie einhergehen würde. Einer der Gründe dafür, dass die Existenz von Xanthorhodopsin-Untergruppen vormals noch nicht beschrieben wurde, könnte sein, dass solche funktionalen und ökologischen Unterschiede bislang nicht festgestellt wurden. Bei genauer Betrachtung der entsprechenden Isolate und Klone zeichnen sich jedoch deutliche Trends bezüglich der Habitate, in denen die jeweiligen Untergruppen typischerweise vorzukommen scheinen, ab (Abb. 46 und Abb. 34, 3.2.5.1).

Die Herkunftsverteilung dieser Klone und Isolate impliziert, dass Untergruppe I bevorzugt in meso- bis thermophilen Organismen diverser, vorwiegend limnischer, Habitate vorkommt,

während es sich bei Untergruppe II primär um eine Eigenschaft meso- bis psychro-philer, mariner Organismen handelt. Bemerkenswert ist die Häufung von Vertretern der Untergruppe II in den Polargebieten. Da Isolate jedoch nicht notwendigerweise charakteristisch für ihre entsprechenden Habitate sein müssen, ist notwendig, die tatsächlichen es Abundanzen durch kultivierungsunabhängige Methoden zu überprüfen. Metagenomsequenzierung ist hierfür ein besonders geeignetes Mittel. Durch diese Methode wird die Beeinflussung der



Abb. 46 Vergleich der Lebensbedingungen von Organismen mit Xanthorhodopsinen der Untergruppe I oder II

Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Vertreter aus verschiedenen Habitaten mit unterschiedlichen Lebensbedingungen. a) Habitate b) Habitate eingeteilt nach Salinität. c) Habitate eingeteilt nach Temperatur-Optima der jeweils dominanten Organismen. relativen Verhältnisse innerhalb einer Umweltprobe minimiert. Entsprechend konnten Metagenomanalysen die oben genannten Vermutungen teilweise bestätigen (Abb. 46 und Abb. 35+36, 3.2.5.2). Xanthorhodopsin-Sequenzen der Untergruppe I traten besonders zahlreich in heißen Quellen und in Süßwasser-Habitaten wie Flüssen und Seen auf. Allerdings waren dort auch Sequenzen der Untergruppe II vorzufinden, wenn auch in relativ geringem Maße. Demnach scheinen hohe Temperaturen und niedrige Salinitäten das Auftreten von Vertretern der Untergruppe II nicht prinzipiell auszuschließen. Auch in Metagenomen aus hypersalinen Habitaten war Untergruppe I stark vertreten, jedoch wiesen diese Metagenome bezüglich der relativen Rhodopsin-Anteile sehr hohe Schwankungen auf. Es handelte sich bei den betreffenden Habitaten um eine hypersaline Lagune und drei verschiedene Becken einer Salzgewinnungsanlage mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Diese vier Habitate sind allesamt ursprünglich durch Meerwasser geprägt worden. In den flachen Becken der Lagune jedoch und der Salzgewinnungsanlage erwärmt sich Meerwasser das unter Sonneneinstrahlung schnell, was zu erhöhten Verdunstungsraten und somit steigenden Salinitäten führt. So entwickeln sich extreme Lebensbedingungen, welche im zunehmenden Maße halo- und thermophile Organismen, vornehmlich Archaeen, begünstigen. Dieser Umstand spiegelt sich in den ermittelten Rhodopsin-Verhältnissen wider: Der Proteorhodopsin-Anteil nimmt mit steigender Salinität ab, während archaeelle Bacterio- und Halorhodopsine immer dominanter werden (Abb. 36, 3.2.5.2). Das bedeutet, dass solche Habitate ohne Kenntnis der genauen Wassertemperatur und des Salzgehaltes schwer zu vergleichen sind. Jedoch sind solche Parameter für die Metagenome der Salzgewinnungsbecken nicht dokumentiert.

Interessanterweise scheinen jedoch Vertreter der Untergruppe II, anders als durch die Verhältnisse der Xanthorhodopsin-tragenden Klone und Isolate angedeutet (Abb. 46), nicht bevorzugt in marinen Organismen aufzutreten (Abb. 47). Tatsächlich sind beide Xanthorhodopsin-Untergruppen in limnischen Umgebungen weitaus zahlreicher vorzufinden als in marinen. Dennoch sind beide Untergruppen in geringen und regional schwankenden Anteilen in Meerwassern vorzufinden, wobei es keinen Unterschied machte, ob küstennahe Regionen untersucht wurden, oder der offene Ozean (Abb. 47). Xanthorhodopsine der Untergruppe II erreichten die höchsten Anteile in Eis-assoziierten Habitaten und auch in Meerwasser-Proben war ihr Anteil in der direkten Umgebung von Meereis deutlich erhöht (Abb. 36A, 3.2.5.2). In *Organic Lake* stieg der Anteil dieser Untergruppe mit zunehmender



Abb. 47 Zusammenfassung der relativen Rhodopsin-Anteile in verschiedenen Habitaten Es sind die durchschnittlichen Anteile verschiedener mikrobieller Rhodopsine an den Gesamt-Rhodopsinen unterschiedlicher Habitate dargestellt. Schwarze senkrechte Balken geben den jeweiligen Standardfehlerbereich wieder. Die Rhodopsin-Verhältnisse in *Ace Lake* werden nur durch eine Probe repräsentiert, da es sich hierbei um die einzige oberflächennahe Probe dieses Standortes handelt. Sämtliche andere Proben von *Ace Lake* stammen aus dem tiefergelegenen anoxischen Bereich dieses Sees und waren daher nicht direkt vergleichbar.

Eisbedeckung (Abb. 36F, 3.2.5.2). Dies deutet darauf hin, dass der Anteil an Xanthorhodopsinen der Untergruppe II direkt mit dem Vorhandensein von Eis zusammenhängt. Dennoch waren in mehreren Proben des ganzjährig mit Eis bedeckten Antarktischen Sees Ace Lake (Burch 1988), kaum Xanthorhodopsine nachweisbar. Allerdings handelt es sich bei Ace Lake um einen stark stratifizierten, meromiktischen See mit einer deutlich höheren Wassertiefe als Organic Lake. Nur in die oberen Meter dieses Sees dringt genügend Licht um Photosynthese bzw. photoheterotrophe Ernährung zu ermöglichen, weshalb sich ab ca. 12 m Wassertiefe eine deutliche anoxische Schicht ausbildet (Lauro et al. 2011). Die meisten Proben des Ace Lake Metagenoms stammen jedoch aus Wassertiefen ≥12 m, daher sind in diesen Proben keine hohen Anteile an Rhodopsinen zu erwarten. In der obersten beprobten Wasserschicht dieses Sees (5 m) konnte immerhin ein deutlich höherer relativer Anteil an Untergruppe II-Xanthorhodopsinen identifiziert werden als in sämtlichen nicht Eisassoziierten Metagenomen (Abb. 47). Sowohl Ace Lake als auch Organic Lake sind durch marine Bedingungen geprägt worden. Organic Lake entstand vor etwa 6000 Jahren in Folge sinkender Meeresspiegel aus abfließendem Meerwasser (Franzmann et al. 1987), während Ace Lake ursprünglich aus einem Süßwassersee hervorging, der zwischenzeitlich durch Meerwasser überspült wurde (Rankin *et al.* 1996). Demgegenüber sind die Probenstandorte des arktischen Schelfeis- (Varin *et al.* 2010) und insbesondere des alpinen Gletschereismetagenoms (Simon *et al.* 2009) nicht direkt durch marine Habitate beeinflusst worden. Auch diese Metagenome weisen deutlich erhöhte Anteile an Untergruppe II Xanthorhodopsinen auf (Abb. 47), was deutlich belegt, dass es sich hierbei um Eis-, nicht um Meerwasser-assoziierte Merkmale handelt. Daher lassen die hier vorgelegten Metagenomanalysen insgesamt darauf schließen, dass Xanthorhodopsine der Untergruppe II vor allem Eis-assoziierten Organismen einen Selektionsvorteil bieten.

Auffällig ist, dass Xanthorhodopsine im Allgemeinen an beiden Enden sowohl des Salinitätsspektrums, als auch des Temperaturspektrums mikrobieller Gemeinschaften vorzufinden sind. Sie stellen sowohl in eiskalten als auch in sehr heißen Umgebungen die dominante Rhodopsin-Gruppe, und sind sowohl in Süßwasser als auch in hypersalinen Habitaten zahlreich vertreten. Die Tatsache, dass eines der Xanthorhodopsin-tragenden Isolate aus einem Natronsee stammt, lässt zudem auch ein breites pH-Spektrum vermuten. Das könnte darauf hindeuten, dass Xanthorhodopsine, im Gegensatz zu Proteorhodopsinen, welche hauptsächlich unter stabilen marinen Umweltbedingungen Selektionsvorteile zu bringen scheinen, an stark schwankende Umweltbedingungen angepasst sind. Dieser Aspekt ist vor allem für das Meereis-Habitat der Octadecabacter-Vertreter, mit seinen extremen zeitlichen und räumlichen Salinitäts- und Temperatur-Gradienten, von großer Bedeutung. Leider war es nicht möglich, den Einfluss solcher Umweltbedingungen auf die Aktivität verschiedener Rhodopsine direkt in Zellkulturen zu messen, da sowohl die pH-Messung, als auch die Integrität der Bakterienzellen durch eben diese Faktoren entscheidend beeinträchtigt werden. Durch Flash-Photolyse-Techniken (Sasaki & Spudich 1998) ließen sich Aktivitätsspektren von Rhodopsinen auch in Membranfragmentsuspensionen bestimmen, jedoch stand diese Methode im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht zur Verfügung.

Obwohl Xanthorhodopsine auf Sequenzebene enge Verwandtschaftsbeziehungen aufweisen, sind die zugehörigen Organismen sehr divers. Diese Organismen sind acht verschiedenen bakteriellen Klassen aus sechs bakteriellen Phyla zuzuordnen und beinhalten zudem auch noch eine Gruppe von eukaryotischen Organismen. Das lässt darauf schließen, dass dieses Merkmal häufig durch horizontalen Gentransfer auch zwischen phylogenetisch sehr unterschiedlichen Organismen übertragen wird. Die konservierte Genumgebung von Xanthorhodopsinen der Untergruppe II, welche das Opsin-Gen und mehrere Gene der Retinalsynthese in einem kompakten Cluster vereint (Abb. 37, 3.2.5.3) begünstigt die Übertragung funktionaler Rhodopsine. Ohne kovalent gebundenes Retinal sind Opsine nicht photoaktiv

und somit nicht funktional (Spudich & Jung 2005). Durch die Zusammenfassung von Opsinund Retinalsynthese zu einem gemeinsamen Gencluster würde ein einziges Gentransfer-Ereignis ausreichen, um ein funktionales Rhodopsin zu übertragen. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ereignisses liegt höher als die Wahrscheinlichkeit der Übertragung funktional zusammengehöriger aber räumlich getrennter Gen-Loci durch multiple unabhängige Gentransfers (Lawrence & Roth 1996; Sharma, Spudich & Doolittle 2006). Der hohe Grad an Konservierung der Untergruppe II-Xanthorhodopsin-Gencluster deutet zudem darauf hin, dass dieses Merkmal vor nicht sehr langer Zeit durch die entsprechenden Organismen aufgenommen wurde. Denn ist ein solches Gencluster einmal in das Genom integriert, kann es sich im Laufe der Zeit durch Rekombinationsereignisse verändern und auch auf verschiedene Genomregionen verteilen.

Untergruppe I-Xanthorhodopsine besitzen hingegen keine entsprechende konservierte Genumgebung. Allerdings bilden sämtliche Isolate, welche Xanthorhodopsine der Untergruppe I beherbergen, auch unabhängig von diesem Merkmal Carotenoide aus. Salinibacter ruber bildet das Carotenoid Salinixanthin vermutlich primär zur Stabilisierung der Membran und zum Schutz vor starker Sonneneinstrahlung (Lutnaes, Oren & Liaaen-Jensen 2002). Auch Vertreter der Actinobacteria und des Genus Thermus sind für die Bildung von Carotenoiden bekannt (Brock & Freeze 1969; Yokoyama et al. 1996; Klassen 2010; Romero et al. 2012). Gloeobacter violaceus PCC 7411 und Roseiflexus sp. RS-1 bilden Chlorophyll bzw. Bacteriochlorophyll (Nakamura et al. 2003; van der Meer et al. 2010). Vermutlich sind in den entsprechenden Organismen die Retinal-Synthesegene des ursprünglichen Xanthorhodopsin-Genclusters in bereits vorhandene Carotenoid-Synthese-Gencluster integriert, bzw. teilweise durch diese funktional ersetzt worden. In Folge dessen könnte sich schließlich auch die Befähigung der Untergruppe I-Xanthrorhodopsine ausgebildet haben, zusätzliche Carotenoide als Antennenpigmente zu binden. Dies lässt darauf schließen, dass die weitere horizontale Übertragung von Untergruppe I-Xanthorhodopsin-Genen größtenteils auf Organismen beschränkt sein wird, welche ebenfalls bereits Carotenoid-Synthesewege besitzen.

4.2.4.2 Funktion der Xanthorhodopsine

Die Untergruppe II-Xanthorhodopsine der beiden Octadecabacter-Stämme fungieren als lichtgetriebene Protonenpumpen. Hierauf deuten bereits vergleichenden Analysen der entsprechenden Aminosäure-Sequenzen hin (siehe 3.2.5.3). So sind an den entsprechenden *alignment*-Positionen Äquivalente aller Aminosäuren vorhanden, welche in Bacterio- und Proteorhodopsinen als funktionelle Bestandteile des Protonentransports beschrieben wurden (Balashov 2000; Beja *et al.* 2000; Balashov *et al.* 2005). Anhand heterologer Expressions-kulturen konnte lichtabhängige Protonentranslokation für die Xanthorhodopsine von *O. arcticus* und *O. antarcticus* auch experimentell nachgewiesen werden (Abb. 40, 3.2.5.3). Für die nah verwandten Xanthorhodopsine der Untergruppe I ist eine solche Funktion ebenfalls bekannt (Balashov *et al.* 2005; Kawanabe *et al.* 2009), daher ist anzunehmen, dass diese Funktion allen Xanthorodopsinen gemein ist. Der so erzeugte Protonengradient kann zur Energiekonservierung genutzt werden, wodurch vorhandene Nährstoffe vermehrt anabolischen Stoffwechselwegen zugeführt werden können.

Transkriptionsanalysen zeigten, dass die Opsin-Gene in beiden *Octadecabacter*-Stämmen sowohl bei Licht als auch bei Dunkelheit exprimiert werden (Abb. 41, 3.2.5.3). Das Fehlen einer sichtbaren Pigmentierung könnte auf eine geringe Expressionsrate zurückzuführen sein. Auch *Vibrio* sp. AND4 weist keine sichtbare Pigmentierung auf und besitzt dennoch bei Nährstoffmangel einen Überlebensvorteil aufgrund des von diesem Organismus gebildeten Proteorhodopsins (DeLong & Beja 2010; Gomez-Consarnau *et al.* 2010).

Dass die Octadecabacter-Stämme unter den getesteten Bedingungen dennoch keinen deutlichen lichtabhängigen Wachstumsvorteil aufwiesen, ist nicht ungewöhnlich. Für diverse Proteorhodopsin-bildende Organismen konnte ein solcher Wachstumsvorteil bislang noch nicht nachgewiesen werden (DeLong & Beja 2010; Irene Wagner-Döbler, persönliches Gespräch). Bei einigen Organismen vermittelte Proteorhodopsin lediglich während extremer Hungerperioden einen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil (Gomez-Consarnau et al. 2007; Gomez-Consarnau et al. 2010). In mehreren Fällen wurde beobachtet, dass die Aktivität von Rhodopsinen direkt mit der Aktivität der Atmungskette zusammenhängt und sogar durch diese gehemmt wird (Walter et al. 2007). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dem Xanthorhodopsin der Octadecabacter-Vertreter nicht um einen allgemein wachstumsfördernden Mechanismus, sondern vielmehr um einen Überlebensmechanismus handelt, welcher nur unter widrigen Lebensbedingungen an Bedeutung gewinnt. Dies könnte unter anderem in den Adaptionsphasen während der Bildung oder des Schmelzens von Meereis (Thomas & Dieckmann 2002) der Fall sein. Eine ähnliche Rolle könnten Xanthorhodopsine auch in anderen Organismen einnehmen. Die Untergruppe I-Xanthorhodopsin-bildenden Bakterien G. violaceus und Roseiflexus RS-1 besitzen zusätzlich zu dem Xanthorhodopsinvermittelten Protonentransport noch weitere effiziente Mechanismen der photoheterotrophen Ernährung: Photosynthese mittels Chlorophyll bzw. anoxygene Photosynthese mittels Bacteriochlorophyll (Nakamura *et al.* 2003; van der Meer *et al.* 2010). Daher ist auch für diese Organismen nicht anzunehmen, dass Xanthorhodopsin primär zur Energiegewinnung während der Wachstumsphase benötigt wird. Da *G. violaceus* als Fels-assoziierter Organismus (Rippka, Waterbury & Cohen-Bazire 1974) voraussichtlich des Öfteren mit Austrocknung und *Roseiflexus* RS-1 (Madigan *et al.* 2005) in heißen Quellen mit starken Temperaturgradienten konfrontiert ist, könnte Xanthorhodopsin als Überlebensmechanismus auch für diese Organismen von Bedeutung sein.

4.3 Diskussion der Zusatzergebnisse: Erste Einblicke in die Genomausstattung von Vertretern des marinen Myxobakterienclusters (MMC)

Die in dieser Doktorarbeit präsentierten Sequenzanalysen zweier Fosmide einer marinen Metagenombank (siehe 3.3), ermöglichen einen ersten Einblick in die Eigenschaften einer weiteren beudeutsamen und global verbreiteten marinen Bakteriengruppe: Dem marinen Myxobakteriencluster (MMC; Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012)

Die auf den Fosmiden MMCf1 und MMCf2 enthaltende Sequenzeninformation ist tatsächlich auf marine Myxobakterien zurückzuführen. Hierauf deuten nicht nur 16S rRNA-Gensequenzanalysen (Vollmers 2007; Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012) hin, sondern auch die Tatsache, dass beide Fosmide über 50% der jeweils enthaltenen Gene als Orthologe mit sequenzierten Myxobakterien teilen (Abb. A5, Anhang). Eine evolutionäre Anpassung an marine Habitate wird dadurch ersichtlich, dass ungefähr die Hälfte der eben genannten Orthologe in den MMC-Fosmiden eine höhere Sequenzübereinstimmung zu entsprechenden Homologen in marinen Organismen als zu anderen, ausschließlich terrestrischen Myxobakterien (Tab. DA60, digitaler Anhang; Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012) aufweisen. Da sich die Orthologe zwischen beiden MMC-Fosmiden zwar sehr ähneln, aber auch geringfügige Sequenzunterschiede aufweisen, ist davon auszugehen, dass die entsprechenden Fosmid-*inserts* von zwei verschiedenen Stämmen derselben Bakterien-Art stammen.

Die Tatsache, dass die 16S rRNA-Gene der *inserts* von MMCf1 und MMCf2 nicht mit vollständigen oder partiellen rRNA-Operons verbunden sind, ist bemerkenswert und grenzt die Vertreter des MMC von den bislang sequenzierten Myxobakterien ab. Alleinstehende 16S Gene wurden bereits in verschiedenen Bakterien und Archaeen beobachtet, stellen aber eher Ausnahmen als den Normalfall dar (Boyer, Flechtner & Johansen 2001).

Die auf den Fosmiden enthaltene Sequenzinformation reicht zwar nicht aus, um tiefgehende Rückschlüsse auf die Lebensweise mariner Myxobakterien zu erlauben, insbesondere da Vertreter der *Myxococcales* allgemein sehr komplex sind und die größten bekannten bakteriellen Genome aufweisen (Reichenbach 1999; Schneiker *et al.* 2007). Dennoch ermöglichen sie einen interessanten ersten Einblick in die Genomeigenschaften dieser Organismen.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit präsentierten Genomanalysen erweitern das Wissen um das genomische Potential der *Roseobacter*-Gruppe und zeigen mögliche Adaptionen an ökologische Nischen innerhalb mariner Lebensräume auf. In den polaren Meereisorganismen *Octadecabacter arcticus* 238 und *O. antarcticus* 307 konnten neue Eigenschaften identifiziert werden, welche bislang nicht in Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe beschrieben wurden und wahrscheinlich Anpassungen an polare bzw. Meereis-assoziierte Lebensräume darstellen.

Ein besonderes Highlight dieser Analysen ist die Charakterisierung einer neuen Untergruppe von Xanthorhodopsinen in den *Octadecabacter*-Vertretern. Diese neue Xanthorhodopsin-Untergruppe unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Xanthorhodopsinen in ihrer mangelnden Befähigung zur Keto-Carotenoid-Bindung und ihrer vorwiegenden Verbreitung in Organismen Eis-assoziierter Habitate. Die Analysen weisen zudem darauf hin, dass diese lichtgetriebenen Protonenpumpen nicht primär zur Energiegewinnung während der Wachstumsphase benötigt werden. Vielmehr scheint es sich um einen Überlebensmechanismus für extreme Umweltbedingungen, wie sie auch im Meereis herrschen, zu handeln (Vollmers *et al.* 2013).

Für beide polare *Octadecabacter*-Vertreter wurde eine ungewöhnlich hohe Genomplastizität festgestellt. Hierbei scheint es sich um eine Anpassung an das einzigartige Meereishabitat dieser Organismen zu handeln, welches als *hot spot* für horizontalen Gentransfer (HGT) gilt. Zudem bietet diese Genomplastizität eine Erklärung für die zahlreichen genomischen Unterschiede zwischen den *Octadecabacter*-Stämmen, welche in direktem Widerspruch zu der nahen Verwandtschaft dieser Organismen auf 16S rRNA-Gensequenzebene stehen.

Trotz dieser Unterschiede weist die genetische Ausstattung von *O. arcticus* und *O. antarcticus* auffällige Übereinstimmungen auf, welche auf einen gemeinsamen exklusiven Genpool von *Octadecabacter*-Vertretern beider Polargebiete hindeuten. Dies wird durch 16S rRNA-basierte phylogenetische Analysen von *Octadecabacter*-Vertretern verschiedener Habitate unterstützt. Somit scheint zwischen Bakteriengemeinschaften beider Polarregionen eine direkte Verbindung zu existieren. Von den Polargebieten ausgehende Tiefenströmungen, welche sich über beide Hemisphären erstrecken, könnten diese Verbindung darstellen (Vollmers *et al.* 2013).

Anhand der bislang verfügbaren Genomsequenzen wurden Verwandtschaftsbeziehungen sowie allgemeine Unterschiede zwischen Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe auf vielfältigen Ebenen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen geben wertvolle Einblicke in unterschiedliche Nischenadaptionen zwischen nah verwandten *Roseobacter*-Vertretern und in die Bedeutung von horizontalem Gentransfer für diese Gruppe (Voget, Vollmers *et al.* 2013; Vollmers *et al.* 2013). Zudem bieten sie eine Grundlage für die vereinfachte Einteilung und Analyse zukünftiger *Roseobacter*-assoziierter Genom– und Metagenomsequenzen. So trugen die in dieser Arbeit präsentierten phylogenetischen Analysen des Genus *Octadecabacter* bereits dazu bei, ein kürzlich gewonnenes Nordsee-Isolat (AG Simon, ICBM, Oldenburg; noch nicht veröffentlicht) als nicht-polaren *Octadecabacter*-Stamm zu identifizieren.

Als zusätzliches Ergebnis konnten erste Einblicke in die Genomausstattung von Vertretern des weltweit verbreiteten aber bislang unkultivierten marinen Myxobakterienclusters (MMC) gewonnen werden (Brinkhoff, Vollmers *et al.* 2012).

6. Ausblick

1) Die Beziehungen zwischen bipolar verbreiteten Organismen beider Polarregionen sollten weiter untersucht werden. Hierfür böten sich unter anderem Genomsequenzierungen weiterer arktischer und antarktischer *Octadecabacter*-Isolate an. Dadurch ließe sich feststellen, ob Struktur und Zusammensetzung der Genome von *Octadecabacter*-Vertretern derselben Polarregion aufgrund der hohen Genomplastizität dieser Organismen ähnlich hohe Unterschiede aufweisen wie die Genome der hier untersuchten *Octadecabacter*-Vertreter der Arktis und der Antarktis.

Die in dieser Arbeit präsentierten Analysen von Xanthorhodopsin- und Cyanophycin-Ligase-Genen zeigten, dass meta-omics Ansätze für detaillierte Habitatvergleiche und biogeographische Analysen unerlässlich sind. Insbesondere vergleichende Metatranskriptom-Analysen würden dazu beitragen, signifikante Unterschiede in der genetischen Ausstattung arktischer und antarktischer Bakteriengemeinschaften sichtbar zu machen. Hierfür müsste jedoch eine hohe Vergleichbarkeit der jeweiligen Datensätze bezüglich allgemeiner Umweltfaktoren (z.B. Jahreszeit, Wassertiefe und Eisbedeckung) sowie methodischer Aspekte gewährleistet werden.

2) Mögliche direkte Verbindungen zwischen endemischen Populationen beider Polarregionen sollten intensiv überprüft werden. Würden psychrophile Vertreter polarer Bakteriengemeinschaften durch kalte Tiefenströmungen unter den warmen Oberflächengewässern des Äquators hindurch übertragen, so sollten solche Vertreter in den entsprechenden Tiefsee-Wassermassen nachweisbar sein. Dies könnte durch spezifischen PCR-Nachweis ausgewählter Taxa (beispielsweise dem Genus *Octadecabacter*) erfolgen. Komplementiert werden könnten solche Untersuchungen durch vergleichende Analysen polarer sowie tropischer Oberflächen- und Tiefengewässer mittels 16S Amplikonsequenzierung oder denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE). Die nötige Grundlage hierfür bietet die hohe Zahl an Oberflächen- und Tiefenwasserproben, welche (unter anderem im Rahmen dieser Doktorarbeit) während der Polarsternexpeditionen AntXXVIII/2,4+5 im Südpolarmeer und Atlantik genommen wurden (Bumke 2012; Kattner 2012; Lucassen 2012). 3) Die Bedeutung von horizontalem Gentransfer (HGT) in Meereishabitaten sollte weiter untersucht werden. Durch vergleichende Metagenomanalysen von Meereis- und Meerwasserproben ließe sich feststellen, ob die Anzahl HGT- und TE-assoziierter Gene in Meereishabitaten signifikant erhöht ist.

4) Die genaue Bedeutung verschiedener Mechanismen des HGT ist in Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe bislang kaum untersucht. Daher sollten sowohl Häufigkeit als auch phylogenetische Übertragungsweiten von HGT durch Konjugations-, Transformations- und Transduktionsversuche zwischen Bakterienstämmen verschiedener *Roseobacter*-Taxa unterschiedlicher Verwandtschaftsgrade gemessen werden. Als Marker böten sich beispielsweise Antibiotikaresistenzen an. Die hierfür benötigten gentechnischen Methoden wurden bereits durch Piekarski *et al.* (2009) für Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe etabliert.

5) Die geplante Genomanalyse eines kürzlich gewonnenen *Octadecabacter*-Isolats aus der deutschen Nordsee (AG Simon, ICBM, Oldenburg; noch nicht veröffentlicht) wird für die Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse polarer und nichtpolarer *Octadecabacter*-Vertreter von sehr hoher Bedeutung sein. Hierdurch wird sich unter anderem die Hypothese eines exklusiven gemeinsamen Genpools arktischer und antarktischer *Octadecabacter*-Vertreter (siehe 4.2.2) effektiv überprüfen lassen.

6) Das Wissen über die Funktion und ökologische Bedeutung der Xanthorhodopsin-Untergruppen kann durch weitere funktionelle Analysen noch erheblich vertieft werden. Beispielsweise sollte die Befähigung zur Keto-Carotenoid-Bindung in weiteren Vertretern beider Untergruppen untersucht werden. Durch Mutationsversuche ließe sich zudem die funktionelle Bedeutung einzelner Bestandteile der Keto-Carotenoid-Bindestellen gezielt überprüfen. Desweiteren sollte der Photozyklus zahlreicher Vertreter der Xanthorhodopsin-Untergruppen I und II bei unterschiedlichen Temperaturen, pH-Werten und Salzkonzentrationen untersucht und verglichen werden. Der Photozyklus eines Rhodopsins gibt Aufschluss über dessen Aktivität bei definierten Umweltbedingungen und wird üblicherweise mittels Flash-Photolyse gemessen (Dioumaev *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003), einer Methode die im Zuge dieser Doktorarbeit nicht zur Verfügung stand.

7. Literaturverzeichnis

- Adekambi, T. & Drancourt, M. (2004) Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 2095-2105.
- Alldredge, A.L. & Silver, M.W. (1988) Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog Oceanogr*, **20**, 41-82.
- Altenhoff, A.M. & Dessimoz, C. (2009) Phylogenetic and Functional Assessment of Orthologs Inference Projects and Methods. *PLoS Comp Biol*, **5**, e1000262
- Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. & Rossello-Mora, R. (2002) Salinibacter ruber gen. nov., sp nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. Int J Syst Evol Microbiol, 52, 485-491.
- Ariya, P.A., Dastoor, A.P., Amyot, M., Schroeder, W.H., Barrie, L., Anlauf, K., Raofie, F., Ryzkhov, A., Davignon, D., Lalonde, J. & Steffen, A. (2004) The Arctic: a sink for mercury. *Tellus B*, 56, 397-403.
- Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 629-659.
- Balashov, S.P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1460**, 75-94.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Boichenko, V.A., Anton, J., Wang, J.M. & Lanyi, J.K. (2005) Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science*, 309, 2061-2064.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Choi, A.R., Jung, K.H., Liaaen-Jensen, S. & Lanyi, J.K. (2010) Reconstitution of *Gloeobacter* rhodopsin with echinenone: Role of the 4-Keto group. *Biochemistry*, 49, 9792-9799.
- Balashov, S.P. & Lanyi, J.K. (2007) Xanthorhodopsin: Proton pump with a carotenoid antenna. J Cell Mol Life Sci, 64, 2323-2328.
- Bano, N., Ruffin, S., Ransom, B. & Hollibaugh, J.T. (2004) Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 781-789.
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N. & DeLong, E.F. (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 289, 1902-1906.
- Berg, H. (2003) Untersuchungen zu Funktion und Struktur der Cyanophycin-Synthetase von *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W. & Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin) - Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. *Eur J Biochem*, 267, 5561-5570.

- Biers, E.J., Wang, K., Pennington, C., Belas, R., Chen, F. & Moran, M.A. (2008) Occurrence and expression of gene transfer agent genes in marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2933-2939.
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, M.V., Nichols, D.S. & McMeekin, T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3068-3078.
- Bowman, J.S., Rasmussen, S., Blom, N., Deming, J.W., Rysgaard, S. & Sicheritz-Ponten, T. (2012) Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *ISME J*, 6, 11-20.
- Boyer, S.L., Flechtner, V.R. & Johansen, J.R. (2001) Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in *Cyanobacteria*. *Mol Biol Evol*, **18**, 1057-1069.
- Braumann, I., van den Berg, M. & Kempken, F. (2008) Strain-specific retrotransposonmediated recombination in commercially used *Aspergillus niger* strain. *Mol Genet Genomics*, **280**, 319-325.
- Brinkhoff, T., Fischer, D., Vollmers, J., Voget, S., Beardsley, C., Thole, S., Mussmann, M., Kunze, B., Wagner-Dobler, I., Daniel, R. & Simon, M. (2012) Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine *Myxobacteria*. *ISME J*, 6, 1260-1272.
- Brinkhoff, T., Giebel, H.A. & Simon, M. (2008) Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol*, **189**, 531-539.
- Brinkmeyer, R., Knittel, K., Jurgens, J., Weyland, H., Amann, R. & Helmke, E. (2003) Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus antarctic pack ice. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6610-6619.
- Brix, H. & Gerdes, R. (2003) North Atlantic Deep Water and Antarctic Bottom Water: Their interaction and influence on the variability of the global ocean circulation. J Geophys Res-Oceans, 108, 3022.
- Brock, T. & Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol*, **98**, 289-297.
- Broecker, W.S. (1991) The great ocean conveyor. Oceanography, 4, 79-89.
- Brown, L. (2004) Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photoch Photobio Sci*, **3**, 555-565.
- Brown, M. & Bowman, J. (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol*, **35**, 267-275.
- Buchan, A., Gonzalez, J.M. & Moran, M.A. (2005) Overview of the marine Roseobacter lineage. Appl Environ Microbiol, 71, 5665-5677.
- Bumke, K. (2012) The expedition of the research vessel "Polarstern" to the Antarctic in 2012 (ANT-XXVIII/5). *Rep. Polar Mar. Res.*, 1-77.
- Burch, M.D. (1988) Annual cycle of phytoplankton in Ace Lake, an ice covered, saline meromictic lake. *Biology of the Vestfold Hills, Antarctica* (eds J.M. Ferris, H.R. Burton, G.W. Johnstone & I.A.E. Bayly), pp. 59-75. Springer, Netherlands.
- Cascales, E. & Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, **1**, 137-149.

- Clark, W.A. (1976) A simplified Leifson flagella stain. J Clin Microbiol, 3, 632-634.
- Collins, R.E. & Deming, J.W. (2011a) Abundant dissolved genetic material in Arctic sea ice Part I: Extracellular DNA. *Polar Biol*, **34**, 1819-1830.
- Collins, R.E. & Deming, J.W. (2011b) Abundant dissolved genetic material in Arctic sea ice Part II: Viral dynamics during autumn freeze-up. *Polar Biol*, **34**, 1831-1841.
- Collins, R.E., Rocap, G. & Deming, J.W. (2010) Persistence of bacterial and archaeal communities in sea ice through an Arctic winter. *Environ Microbiol*, **12**, 1828-1841.
- Comte, K., Sabacka, M., Carre-Mlouka, A., Elster, J. & Komarek, J. (2007) Relationships between the Arctic and the Antarctic *Cyanobacteria*; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiol Ecol*, **59**, 366-376.
- Cunliffe, M. (2010) Correlating carbon monoxide oxidation with cox genes in the abundant Marine *Roseobacter* Clade. *ISME J*, **5**, 685-691.
- Czechowska, K., Sentchilo, V., Beggah, S., Rey, S., Seyfried, M. & van der Meer, J.R. (2013) Examining chemical compound biodegradation at low concentrations through bacterial cell proliferation. *Environ Sci Technol*, **47**, 1913-1921.
- Cánovas, D., Vargas, C., Kneip, S., Morón, M.J., Ventosa, A., Bremer, E. & Nieto, J.J. (2000) Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043, USA. *Microbiology+*, **146** (Pt 2), 455-463.
- Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R. & Perna, N.T. (2004) Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*, **14**, 1394-1403.
- Darling, A.E., Mau, B. & Perna, N.T. (2010) progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*, **5**, e11147.
- de la Torre, J., Christianson, L., Beja, O., Suzuki, M., Karl, D., Heidelberg, J. & DeLong, E. (2003) Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12830-12835.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2094-2099.
- Delcher, A.L., Bratke, K.A., Powers, E.C. & Salzberg, S.L. (2007) Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, **23**, 673-679.
- Delille, D. (1992) Marine bacterioplankton at the Weddell Sea ice edge, distribution of psychrophilic and psychrotophic populations. *Polar Biol*, **12**, 205-210.
- DeLong, E.F. & Beja, O. (2010) The Light-Driven Proton Pump Proteorhodopsin Enhances Bacterial Survival during Tough Times. *PLoS Biol*, **8**, e1000359.
- Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Hall, D., Angly, D., Breitbart, M., Brulc, J.M., Furlan, M., Desnues, C., Haynes, M., Li, L., McDaniel, L., Moran, M.A., Nelson, K.E., Nilsson, C., Olson, R., Paul, J., Brito, B.R., Ruan, Y., Swan, B.K., Stevens, R., Valentine, D.L., Thurber, R.V., Wegley, L., White, B.A. & Rohwer, F. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, **452**, 629-632.
- Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. & Lanyi, J.K. (2002) Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biochemistry*, **41**, 5348-5358.

- Dubey, S.K. & Holmes, D.S. (1995) Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, **11**, 257-265.
- Ebinghaus, R., Kock, H.H., Temme, C., Einax, J.W., Löwe, A.G., Richter, A., Burrows, J.P. & Schroeder, W.H. (2002) Antarctic springtime depletion of atmospheric mercury. *Environ Sci Technol*, **36**, 1238-1244.
- Ehrlich, S. (1989) Illegitimate recombination in bacteria. *Mobile DNA* (eds D. Berg & M. Howe), pp. 799-824. Am Soc Microbiol, Washington, DC, USA.
- Fang, J.S., Zhang, L. & Bazylinski, D.A. (2010) Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends Microbiol*, **18**, 413-422.
- Franzmann, P.D., Deprez, P.P., Burton, H.R. & van den Hoff, J. (1987) Limnology of Organic Lake, Antarctica, a meromictic lake that contains high concentrations of dimethyl sulfide. *Austral J Mar Fresh Res*, **38**, 409-417.
- Fronzes, R., Christie, P.J. & Waksman, G. (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 703-714.
- Fu, Y., MacLeod, D., Rivkin, R., Chen, F., Buchan, A. & Lang, A. (2010) High diversity of Rhodobacterales in the subarctic North Atlantic Ocean and gene transfer agent protein expression in isolated strains. *Aquat Microb Ecol*, **59**, 283-293.
- Fuhrman, J.A., Schwalbach, M.S. & Stingl, U. (2008) Opinion Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol*, **6**, 488-494.
- Füser, G. & Steinbüchel, A. (2007) Analysis of genome sequences for genes of cyanophycin metabolism: Identifying putative cyanophycin metabolizing prokaryotes. *Macromol Biosci*, 7, 278-296.
- Gevers, D., Cohan, F., Lawrence, J., Spratt, B., Coenye, T., Feil, E., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. & Swings, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*, 3, 733-739.
- Ghiglione, J.-F., Galand, P.E., Pommier, T., Pedrós-Alió, C., Maas, E.W., Bakker, K., Bertilson, S., Kirchman, D.L., Lovejoy, C., Yager, P.L. & Murray, A.E. (2012) Pole-topole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 17633-17638.
- Ghiglione, J.F. & Murray, A.E. (2012) Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton. *Environ Microbiol*, 14, 617-629.
- Gilbert, J.A., Thomas, S., Cooley, N.A., Kulakova, A., Field, D., Booth, T., McGrath, J.W., Quinn, J.P. & Joint, I. (2009) Potential for phosphonoacetate utilization by marine bacteria in temperate coastal waters. *Environ Microbiol*, **11**, 111-125.
- Giovannoni, S.J. & Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, **437**, 343-348.
- Giovannoni, S.J., Tripp, H.J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K.L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T.H., Noordewier, M., Rappe, M.S., Short, J.M., Carrington, J.C. & Mathur, E.J. (2005) Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, 309, 1242-1245.
- Gomez-Consarnau, L., Akram, N., Lindell, K., Pedersen, A., Neutze, R., Milton, D.L., Gonzalez, J.M. & Pinhassi, J. (2010) Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. *PLoS Biol*, 8, e1000358.
- Gomez-Consarnau, L., Gonzalez, J.M., Coll-Llado, M., Gourdon, P., Pascher, T., Neutze, R., Pedros-Alio, C. & Pinhassi, J. (2007) Light stimulates growth of proteorhodopsincontaining marine *Flavobacteria*. *Nature*, 445, 210-213.
- González, J.M. & Moran, M.A. (1997) Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 4237-4242.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J.M. (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 81-91.
- Gosink, J.J., Herwig, R.P. & Staley, J.T. (1997) *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus*, sp. nov., nonpigmented, psychrophilic gas vacuolate bacteria from polar sea ice and water. *Syst Appl Microbiol*, **20**, 356-365.
- Gosink, J.J. & Staley, J.T. (1995) Biodiversity of Gas Vacuolate Bacteria from Antarctic Sea Ice and Water. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 3486-3489.
- Grammann, K., Volke, A. & Kunte, H.J. (2002) New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T. J Bacteriol, 184, 3078-3085.
- Gray, H. (2000) It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet*, **16**, 461-468.
- Grzymski, J.J., Riesenfeld, C.S., Williams, T.J., Dussaq, A.M., Ducklow, H., Erickson, M., Cavicchioli, R. & Murray, A.E. (2012) A metagenomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctica Peninsula coastal surface waters. *ISME J*, 6, 1901-1915
- Hacker, J. & Carniel, E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*, **2**, 376-381.
- Hanson, T.E. & Tabita, F.R. (2001) A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **98**, 4397-4402.
- Haupts, U., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struc*, **28**, 367-399.
- Havig, J.R., Raymond, J., Meyer-Dombard, D.R., Zolotova, N. & Shock, E.L. (2011) Merging isotopes and community genomics in a siliceous sinter-depositing hot spring. *J Geophys Res*, **116**, G01005.
- Hennessey, J.P. & Scarborough, G.A. (1989) An optimized procedure for sodium dodecylsulfate polyacrylamide-gel electrophoresis analysis of hydrophobic peptides from an integral membrane-protein. *Anal Biochem*, **176**, 284-289.
- Hewson, I., Paerl, R.W., Tripp, H.J., Zehr, J.P. & Karl, D.M. (2009) Metagenomic potential of microbial assemblages in the surface waters of the central Pacific Ocean tracks variability in oceanic habitat. *Limnol Oceanograph*, 54, 1981-1994.
- Hollibaugh, J.T., Lovejoy, C. & Murray, A.E. (2007) Microbiology in Polar Oceans. Oceanography, 20, 140-145.

- Horikoshi, K. & Tsujii, K. (1999) Extremophiles in deep-sea environments. pp. 316. Springer, Tokyo.
- Hsiao, W., Wan, I., Jones, S.J. & Brinkman, F.S.L. (2003) IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics*, **19**, 418-420.
- Huber, B., Escudero, R., Busse, H.J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kampfer, P. & Splettstoesser, W.D. (2010) Description of *Francisella hispaniensis* sp nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson *et al.* 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. novicida comb. Nov. and emended description of the genus *Francisella. Int J Syst Evol Microbiol*, **60**, 1887-1896.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, **180**, 4765-4774.
- Hulsen, T., Huynen, M.A., de Vlieg, J. & Groenen, P.M.A. (2006) Benchmarking ortholog identification methods using functional genomics data. *Genome Biol*, **7**, R31.
- Hylander, L.D. & Goodsite, M.E. (2006) Environmental costs of mercury pollution. *Sci Total Environ*, **368**, 352–370.
- Imasheva, E.S., Balashov, S.P., Choi, A.R., Jung, K.H. & Lanyi, J.K. (2009) Reconstitution of *Gloeobacter violaceus* Rhodopsin with a Light-Harvesting Carotenoid Antenna. *Biochemistry*, 48, 10948-10955.
- Jebbar, M., Sohn-Bosser, L., Bremer, E., Bernard, T. & Blanco, C. (2005) Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*, **187**, 1293-1304.
- Jensen, M.A., Fukushima, M. & Davis, R.W. (2010) DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in *de novo* synthesis. *PLoS One*, **5**, e11024.
- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D.A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W., Kirchman, D.L., Weinbauer, M.G., Luo, T.W., Chen, F. & Azam, F. (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Microbiol*, 8, 593-599.
- Johansson, A., Celli, J., Conlan, W., Elkins, K.L., Forsman, M., Keim, P.S., Larsson, P., Manoil, C., Nano, F.E., Petersen, J.M. & Sjostedt, A. (2010) Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1717-1718.
- Johnson, W.V. & Anderson, P.M. (1987) Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *Fed Proc*, **46**, 2226.
- Junge, K., Christner, B. & Staley, J.T. (2011) Diversity of psychrophilic bacteria from sea iceand glacial ice communities. *Extremophiles Handbook* (ed. K. Horikoshi), pp. 794-815. Springer, Tokyo.
- Junge, K., Imhoff, F., Staley, T. & Deming, J. (2002) Phylogenetic diversity of numerically important arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature. *Microb Ecol*, **43**, 315-328.
- Kalhöfer, D., Thole, S., Voget, S., Lehmann, R., Liesegang, H., Wollher, A., Daniel, R., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2011) Comparative genome analysis and genome-guided physiological analysis of *Roseobacter litoralis*. *BMC Genomics*, **12**, 324.
- Kamennaya, N. & Post, A. (2011) Characterization of Cyanate Metabolism in Marine Synechococcus and Prochlorococcus spp. Appl Environ Microb, 77, 291-301.

- Kan, J., Clingenpeel, S., Macur, R., Inskeep, W., Lovalvo, D., Varley, J., Gorby, Y., McDermott, T. & Nealson, K. (2011) Archaea in Yellowstone Lake. *ISME J*, 5, 1784-1795.
- Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F.L., Flores-Moya, A. & Wiencke, C. (1998) An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot Mar*, **41**, 443-453.
- Kattner, G. (2012) The expedition of the research vessel "Polarstern" to the Antarctic in 2011/12 (ANT-XXVIII/2). *Rep. Polar Mar. Res.*, 1-94.
- Kawanabe, A., Furutani, Y., Jung, K.H. & Kandori, H. (2009) Engineering an inward proton transport from a bacterial sensor rhodopsin. *J Am Chem Soc*, **131**, 16439-16444.
- Keim, P., Johansson, A. & Wagner, D. (2007) Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of *Francisella*. Ann N Y Acad Sci, **1105**, 30-66.
- Kiko, R. (2010) Acquisition of freeze protection in a sea-ice crustacean through horizontal gene transfer? *Polar Biol*, **33**, 543-556.
- Kirchman, D.E. (2008) *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. edn. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M. & Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Env Microbiol*, **66**, 1328-1333.
- Klassen, J.L. (2010) Phylogenetic and evolutionary patterns in microbial carotenoid biosynthesis are revealed by comparative genomics. *PLoS One*, **5**, e11257.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S.L. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol*, 5, R12.
- Kuzniar, A., van Ham, R.C., Pongor, S. & Leunissen, J.A. (2008) The quest for orthologs: finding the corresponding gene across genomes. *Trends Genet*, **24**, 539-551.
- Kyndt, J.A., Hurley, J.K., Devreese, B., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Tollin, G. & Van Beeumen, J.J. (2004) *Rhodobacter capsulatus* photoactive yellow protein: genetic context, spectral and kinetics characterization, and mutagenesis. *Biochemistry*, 43, 1809-1820.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage-T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lang, A.S. & Beatty, J.T. (2000) Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 859-864.
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J.T. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol*, **10**, 472-482.
- Langille, M.G.I. & Brinkman, F.S.L. (2009) IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics*, 25, 664-665.
- Langille, M.G.I., Hsiao, W.W.L. & Brinkman, F.S.L. (2008) Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics*, **9**, 329.
- Lanyi, J.K. & Balashov, S.P. (2008) Xanthorhodopsin: A bacteriorhodopsin-like proton pump with a carotenoid antenna. *BBA-Bioenergetics*, **1777**, 684-688.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Lauro, F.M. & Bartlett, D.H. (2008) Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. *Extremophiles*, **12**, 15-25.
- Lauro, F.M., DeMaere, M.Z., Yau, S., Brown, M.V., Ng, C., Wilkins, D., Raftery, M.J., Gibson, J.A.E., Andrews-Pfannkoch, C., Lewis, M., Hoffman, J.M., Thomas, T. & Cavicchioli, R. (2011) An integrative study of a meromictic lake ecosystem in Antarctica. *ISME J*, 5, 879-895.
- Lawrence, J.G. & Roth, J.R. (1996) Selfish operons: Horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143, 1843-1860.
- Leifson, E. (1951) Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. *J Bacteriol*, **62**, 377-389.
- Lucassen, M. (2012) The expedition of the research vessel "Polarstern" to the Antarctic in 2012 (ANT-XXVIII/4). *Rep. Polar Mar. Res.*, 1-89.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, R., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1363-1371.
- Lutnaes, B.F., Oren, A. & Liaaen-Jensen, S. (2002) New C-40-carotenoid acyl glycoside as principal carotenoid in *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic eubacterium. *J Nat Prod*, **65**, 1340-1343.
- Madigan, M.T., Jung, D.O., Karr, E.A., Sattley, W.M., Achenbach, L.A. & Van Der Meer, M.T.J. (2005) Diversity of Anoxygenic Phototrophs in Contrasting Extreme Environments. *Diversity of anoxygenic phototrophs in contrasting extreme environments* (eds W.P. Inskeep & T.R. McDermott), pp. 203-220. Montana State University Publications, USA.
- Mahillon, J., Léonard, C. & Chandler, M. (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res Microbiol*, **150**, 675–687.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z.T., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P.G., Begley, R.F. & Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.
- Markowitz, V.M., Chen, I.M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K.,

Ivanova, N.N. & Kyrpides, N.C. (2012) IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res*, **40**, D115-122.

- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 200-214.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B.J. & Brinkhoff, T. (2006) Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter, Ruegeria* and *Leisingera. Int J Syst Evol Microbiol*, **56**, 1293-1304.
- Martinez, A., Tyson, G.W. & DeLong, E.F. (2009) Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environ Microbiol*, **12**, 222-238.
- McCarren, J. & DeLong, E.F. (2007) Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit coevolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environ Microbiol*, 9, 846-858.
- McDaniel, L., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. & Paul, J. (2010) High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science*, **330**, 50-50.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Bjorn, L.O. & Ilyas, M. (2007) Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci*, **6**, 218-231.
- Medigue, C., Krin, E., Pascal, G., Barbe, V., Bernsel, A., Bertin, P.N., Cheung, F., Cruveiller, S., D'Amico, S., Duilio, A., Fang, G., Feller, G., Ho, C., Mangenot, S., Marino, G., Nilsson, J., Parrilli, E., Rocha, E.P.C., Rouy, Z., Sekowska, A., Tutino, M.L., Vallenet, D., von Heijne, G. & Danchin, A. (2005) Coping with cold: The genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res*, 15, 1325-1335.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Masignani, V. & Rappuoli, R. (2005) The microbial pangenome. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 589-594.
- Methé, B.A., Nelson, K.E., Deming, J.W., Momen, B., Melamud, E., Zhang, X., Moult, J., Madupu, R., Nelson, W.C., Dodson, R.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., DeBoy, R.T., Kolonay, J.F., Sullivan, S.A., Zhou, L., Davidsen, T.M., Wu, M., Huston, A.L., Lewis, M., Weaver, B., Weidman, J.F., Khouri, H., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V. & Fraser, C.M. (2005) The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10913-10918.
- Mieczkowski, P., Lemoine, F. & Petes, T. (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Rep*, **5**, 1010-1020.
- Mindlin, S., Minakhin, L., Petrova, M., Kholodii, G., Minakhina, S., Gorlenko, Z. & Nikiforov, V. (2005) Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Res Microbiol*, 156, 994–1004.

- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **260**, 289-298.
- Montresor, M., Lovejoy, C., Procaccini, G. & Roy, S. (2003) Bipolar distribution of the cystforming dinoflagellate *Polarella glacialis*. *Polar Biol*, 26, 186-194.
- Moran, M.A., Belas, R., Schell, M.A., Gonzdlez, J.M., Sun, F., Sun, S., Binder, B.J., Edmonds, J., Ye, W., Orcutt, B., Howard, E.C., Meile, C., Palefsky, W., Goesmann, A., Ren, Q., Paulsen, I., Ulrich, L.E., Thompson, L.S., Saunders, E. & Buchanlo, A. (2007) Ecological genomics of marine *Roseobacters*. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 4559-4569.
- Moran, M.A., Buchan, A., Gonzalez, J.M., Heidelberg, J.F., Whitman, W.B., Kiene, R.P., Henriksen, J.R., King, G.M., Belas, R., Fuqua, C., Brinkac, L., Lewis, M., Johri, S., Weaver, B., Pai, G., Eisen, J.A., E., R. & al., e. (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature*, 432, 910-913.
- Morozov, E.G., Demidov, A.N., Tarakanov, R.Y. & Zenk, W. (2010) Deep Water Masses of the South and North Atlantic. *Abyssal Channels in the Atlantic Ocean* (ed. G. Weatherly), pp. 25-50. Springer, Netherlands.
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A. & Giovannoni, S.J. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 420, 806-810.
- Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K.-I. & Nakagawa, Y. (2007) *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the *Alphaproteobacteria* isolated in Japan and Palau. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**, 1304-1309.
- Murray, A. & Grzymski, J. (2007) Diversity and genomics of Antarctic marine microorganisms. *Philos T R Soc B*, **362**, 2259-2271.
- Møller, A., Barkay, T., Al-Soud, W., Sørensen, S., Skov, H. & Kroer, N. (2012) Diversity and characterization of mercury-resistant bacteria in snow, freshwater and sea-ice brine from the High Arctic. *FEMS Microbiol Ecol*, **75**, 390-401.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res*, **10**, 137-145.
- Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) A General Method Applicable to Search for Similarities in Amino Acid Sequence of 2 Proteins. *J Mol Biol*, **48**, 443-453.
- Newton, R.J., Griffin, L.E., Bowles, K.M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C.E., Howard, E.C., King, E., Oakley, C.A., Reisch, C.R., Rinta-Kanto, J.M., Sharma, S., Sun, S.L., Varaljay, V., Vila-Costa, M., Westrich, J.R. & Moran, M.A. (2010) Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J*, 4, 784-798.
- Nichols, D. (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol*, **60**, 351-357.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol, 51, 730-750.
- Ortega-Retuerta, E., Jeffrey, W.H. & Joux, F. (2012) Evidence of heterotrophic prokaryotic activity limitation by nitrogen in the Western Arctic Ocean during summer. *Polar Biol*, **35**, 785-794.

- Osborn, A., Bruce, K., Strike, P. & Ritchie, D. (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiol Rev*, **19**, 239-262.
- Ottesen, E.A., Marin, R., Preston, C.M., Young, C.R., Ryan, J.P., Scholin, C.A. & DeLong, E.F. (2011) Metatranscriptomic analysis of autonomously collected and preserved marine bacterioplankton. *ISME J*, **5**, 1881-1895.
- Overbeek, R., Larsen, N., Walunas, T., D'Souza, M., Pusch, G., Selkov, E., Liolios, K., Joukov, V., Kaznadzey, D., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Burd, H., Gardner, W., Hanke, P., Kapatral, V., Mikhailova, N., Vasieva, O., Osterman, A., Vonstein, V., Fonstein, M., Ivanova, N. & Kyrpides, N. (2003) The ERGO genome analysis and discovery system. *Nucleic Acids Res*, **31**, 164-171.
- Palys, T., Berger, E., Mitrica, I., Nakamura, L.K. & Cohan, F.M. (2000) Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50**, 1021-1028.
- Palys, T., Nakamura, L.K. & Cohan, F.M. (1997) Discovery and Classification of Ecological Diversity in the Bacterial World: The Role of DNA Sequence Data. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 1145-1156.
- Pearce, D.A., Cockell, C.S., Lindstrom, E.S. & Tranvik, L.J. (2007) First evidence for a bipolar distribution of dominant freshwater lake bacterioplankton. *Antarctic Sci*, **19**, 245-252.
- Pesciaroli, C., Cupini, F., Selbmann, L., Barghini, P. & Fenice, M. (2012) Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar Biol*, 35, 435-445.
- Petrosino, J., Xiang, Q., Karpathy, S., Jiang, H., Yerrapragada, S., Liu, Y., Gioia, J., Hemphill, L., Gonzalez, A., Raghavan, T., Uzman, A., Fox, G., Highlander, S., Reichard, M., Morton, R., Clinkenbeard, K. & Weinstock, G. (2006) Chromosome Rearrangement and Diversification of *Francisella tularensis* Revealed by the Type B (OSU18) Genome Sequence. *J Bacteriol*, **188**, 6977-6985.
- Pfeifer, F. (2012) Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nat Rev Microbiol*, **10**, 705-715.
- Piekarski, T., Buchholz, I., Drepper, T., Schobert, M., Wagner-Doebler, I., Tielen, P. & Jahn, D. (2009) Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria. *BMC Microbiol*, 9, 265.
- Pocard, J.-A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L., Poggi, M.-C. & Le Rudulier, D. (1997) Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology+*, 143, 1369-1379.
- Poulain, A., Ní Chadhain, S., Ariya, P., Amyot, M., Garcia, E., Campbell, P., Zylstra, G. & Barkay, T. (2007) Potential for mercury reduction by microbes in the high arctic. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 2230-2238.
- Prudhomme, M., Libante, V. & Claverys, J.-P. (2002) Homologous recombination at the border: Insertion-deletions and the trapping of foreign DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2100-2105.
- Pruesse, E., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, **28**, 1823-1829.

- Qian, D., Jiang, L., Lu, L., Wei, C. & Li, Y. (2011) Biochemical and Structural Properties of Cyanases from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS One*, **6**, e18300.
- Rajendhran, J. & Gunasekaran, P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*, **166**, 99–110.
- Rankin, L., Gibson, J., Franzmann, P. & Burton, H. (1996) The chemical stratification and microbial communities of Ace Lake, Antarctica: A review of the characteristics of a marine-derived meromictic lake. *Polarforschung*, 66, 33-52.
- Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L. & Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, **418**, 630-633.
- Raymond, J., Fritsen, C. & Shen, K. (2007) An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiol Ecol*, **61**, 214-221.
- Reichenbach, H. (1999) The ecology of the Myxobacteria. Environ Microbiol, 1, 15-21.
- Rich, V.I., Pham, V.D., Eppley, J., Shi, Y. & DeLong, E.F. (2011) Time-series analyses of Monterey Bay coastal microbial picoplankton using a 'genome proxy' microarray. *Environ Microbiol*, 13, 116-134.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19126-19131.
- Rippka, R., Waterbury, J. & Cohen-Bazire, G. (1974) A Cyanobacterium Which Lacks Thylakoids. Arch Microbiol, 100, 419-436.
- Romero, F., Fernández-Chimeno, R., de la Fuente, J. & Barredo, J. (2012) Selection and taxonomic identification of carotenoid-producing marine actinomycetes. *Methods Mol Biol*, 892, 13-20.
- Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2000) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 39-67.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D.Y., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.H., Falcon, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M. & Venter, J.C. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol*, 5, 398-431.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. & Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, **16**, 944-945.
- Sabehi, G., Loy, A., Jung, K.H., Partha, R., Spudich, J.L., Isaacson, T., Hirschberg, J., Wagner, M. & Beja, O. (2005) New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins. *PLoS Biol*, **3**, e273.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Habor Laboratory Press, New York, USA.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual,* 3. edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

- Sangar, V., Blankenberg, D., Altman, N. & Lesk, A. (2007) Quantitative sequence-function relationships in proteins based on gene ontology. *BMC Bioinformatics*, **8**, 294.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki, J. & Spudich, J.L. (1998) The transducer protein HtrII modulates the lifetimes of sensory rhodopsin II photointermediates. *Biophys J*, **75**, 2435-2440.
- Scanlan, D., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W., Post, A., Hagemann, M., Paulsen, I. & Partensky, F. (2009) Ecological Genomics of Marine *Picocyanobacteria*. *Microbiol Mol Biol R*, 73, 249.
- Schatz, M.C., Delcher, A.L. & Salzberg, S.L. (2010) Assembly of large genomes using second-generation sequencing. *Genome Res*, **20**, 1165-1173.
- Schmidt, T.M. (2006) The maturing of microbial ecology. Int Microbiol, 9, 217-223.
- Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, O., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M.O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., Bode, H.B., Bolten, C.J., Choudhuri, J.V., Doss, S., Elnakady, Y.A., Frank, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Groeger, C., Gross, F., Jelsbak, L., Jelsbak, L., Kalinowski, J., Kegler, C., Knauber, T., Konietzny, S., Kopp, M., Krause, L., Krug, D., Linke, B., Mahmud, T., Martinez-Arias, R., McHardy, A.C., Merai, M., Meyer, F., Mormann, S., Munoz-Dorado, J., Perez, J., Pradella, S., Rachid, S., Raddatz, G., Rosenau, F., Rückert, C., Sasse, F., Scharfe, M., Schuster, S.C., Suen, G., Treuner-Lange, A., Velicer, G.J., Vorhölter, F.-J., Weissman, K.J., Welch, R.D., Wenzel, S.C., Whitworth, D.E., Wilhelm, S., Wittmann, C., Blöcker, H., Pühler, A. & Müller, R. (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nature Biotechnol*, 25, 1281-1289.
- Selje, N., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2004) A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature*, **427**, 445-447.
- Sharma, A.K., Sommerfeld, K., Bullerjahn, G.S., Matteson, A.R., Wilhelm, S.W., Jezbera, J., Brandt, U., Doolittle, W.F. & Hahn, M.W. (2009) Actinorhodopsin genes discovered in diverse freshwater habitats and among cultivated freshwater *Actinobacteria*. *ISME J*, 3, 726-737.
- Sharma, A.K., Spudich, J.L. & Doolittle, W.F. (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol*, **14**, 463-469.
- Shiba, T. (1991) *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll-a. *Syst Appl Microbiol*, **14**, 140-145.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. & Chandler, M. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*, **34**, D32-D36.
- Simon, C., Wiezer, A., Strittmatter, A.W. & Daniel, R. (2009) Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential Revealed in a Glacier Ice Metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 75, 7519-7526.
- Slamovits, C., Okamoto, N., Burri, L., James, E. & Keeling, P. (2011) A bacterial proteorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. *Nature Commun*, **2**, 183.
- Solioz, M. & Marrs, B. (1977) The gene transfer agent of *Rhodopseudomonas capsulata*. Purification and characterization of its nucleic acid. *Arch Biochem Biophys*, **181**, 300-307.

- Soria-Carrasco, V., Valens-Vadell, M., Pena, A., Anton, J., Amann, R., Castresana, J. & Rossello-Mora, R. (2007) Phylogenetic position of *Salinibacter ruber* based on concatenated protein alignments. *Syst Appl Microbiol*, **30**, 171-179.
- Spudich, J., Yang, C., Jung, K. & Spudich, E. (2000) Retinylidene proteins: Structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 365-392.
- Spudich, J.L. & Jung, K.-H. (2005) Microbial Rhodopsins: Phylogenetic and Functional Diversity. *Handbook of Photosensory Receptors* (ed. W.R. Briggs & J.L. Spudich). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Staden, R. (1996) The Staden sequence analysis package. Mol Biotechnol, 5, 233-241.
- Staley, J.T. & Gosink, J.J. (1999) Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **53**, 189-215.
- Stark, G.R. (1965) Reactions of cyanate with functional groups of proteins .III. reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, **4**, 1030-1036.
- Stevens, H., Brinkhoff, T. & Simon, M. (2005) Composition and seasonal dynamics of freeliving, aggregate- and sediment surface-associated bacterial communities in the German Wadden Sea. *Aquat Microb Ecol*, **38**, 15-30.
- Stevenson, B.S. & Schmidt, T.M. (2004) Life history implications of rRNA gene copy number in *Escherichia coli*. *Appl Env Microbiol*, **70**, 6670-6677.
- Swingley, W.D., Sadekar, S., Mastrian, S.D., Matthies, H.J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C.R., Conrad, A.L., Taylor, H.L., Dejesa, L.C., Shah, M.K., O'huallachain, M.E., Lince, M.T., Blankenship, R.E., Beatty, J.T. & Touchman, J.W. (2007) The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol*, **189**, 683-690.
- Tabita, F.R., Hanson, T.E., Li, H.Y., Satagopan, S., Singh, J. & Chan, S. (2007) Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 576-599.
- Takahashi, T., Olafsson, J., Goddard, J.G., Chipman, D.W. & Sutherland, S.C. (2010) Seasonal variation of CO2 and nutrients in the high-latitude surface oceans: A comparative study. *Global Biochem Cy*, 7, 843-878.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Krylov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J. & Natale, D.A. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4, 41.
- Tech, M. & Merkl, R. (2003) YACOP: Enhanced gene prediction obtained by a combination of existing methods. *In Silico Biol*, **3**, 441-451.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C. & Medini, D. (2008) Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol*, **11**, 472-477.
- Thole, S., Kalhöfer, D., Voget, S., Berger, M., Engelhardt, T., Liesegang, H., Wollherr, A., Kjelleberg, S., Daniel, R., Simon, M., Thomas, T. & Brinkhoff, T. (2012) *Phaeobacter* gallaeciensis genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. *ISME J*, 6, 2229-2244.
- Thomas, D.N. & Dieckmann, G.S. (2002) Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. *Science*, **295**, 641-644.

- Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M.Z., Yung, P.Y., Lewis, M., Halpern, A., Heidelberg, K.B., Egan, S., Steinberg, P.D. & Kjelleberg, S. (2010) Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *ISME J*, 4, 1557-1567.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B.
 & Swings, J. (2005) Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 5107-5115.
- Urbance, J.W., Bratina, B.J., Stoddard, S.F. & Schmidt, T.M. (2001) Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. Int J Sys Evol Microbiol, 51, 1059-70.
- van der Meer, M.T.J., Klatt, C.G., Wood, J., Bryant, D.A., Bateson, M.M., Lammerts, L., Schouten, S., Damsté, J.S.S., Madigan, M.T. & Ward, D.M. (2010) Cultivation and genomic, nutritional, and lipid biomarker characterization of *Roseiflexus* strains closely related to predominant *in situ* populations inhabiting Yellowstone hot spring microbial mats. *J Bacteriol*, **195**, 3033-3042.
- Varin, T., Lovejoy, C., Jungblut, A.D., Vincent, W.F. & Corbeil, J. (2010) Metagenomic profiling of Arctic microbial mat communities as nutrient scavenging and recycling systems. *Limnol Oceanogr*, 55, 1901-1911.
- Voget, S., Wemheuer, B., Brinkhoff, T., Vollmers, J., Dietrich, S., Giebel, H.-A., Beardsley, C., Bakenhus, I., Billerbeck, S., Daniel, R. & Simon, M. (2013) Genome-based analysis and active role of a photoheterotrophic and CO oxidizing *Roseobacter* RCA population in the ocean. *ISME J*, (Submitted).
- Vollmers, J. (2007) Strukturanalyse mariner Myxobakterienpopulationen. Diplomarbeit, Carlvon-Ossietzky Universität Oldenburg.
- Vollmers, J., Voget, V., Dietrich, S., Gollnow, K., Smits, M., Meyer, K., Brinkhoff, T., Simon, M. & Daniel, R. (2013) Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecabacter* strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. *PLoS One*, 8, e63422.
- Waack, S., Keller, O., Asper, R., Brodag, T., Damm, C., Fricke, W.F., Surovcik, K., Meinicke, P. & Merkl, R. (2006) Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics*, 7, 142.
- Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K.J., Slotboom, D.J., Persson, J.O. & de Gier, J.W. (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 14371-14376.
- Wagner-Döbler, I. & Biebl, H. (2006) Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu Rev Microbiol*, **60**, 255-280.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A. & Waksman, G. (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*, **12**, 1203-1212.
- Walsby, A.E. (1994) Gas vesicles. Microbiol Rev, 58, 94-144.
- Walter, J.M., Greenfield, D., Bustamante, C. & Liphardt, J. (2007) Light-powering Escherichia coli with proteorhodopsin. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **104**, 2408-2412.
- Wang, W.W., Sineshchekov, O.A., Spudich, E.N. & Spudich, J.L. (2003) Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin. J Biol Chem, 278, 33985-33991.

- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. & Truper, H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, **37**, 463-464.
- Wollherr, A. (2010) Komparative Genomanalyse zur Stammoptimierung produktionsnaher *Bacillus*-Stämme. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Woyke, T., Xie, G., Copeland, A., Gonzalez, J.M., Han, C., Kiss, H., Saw, J.H., Senin, P., Yang, C., Chatterji, S., Cheng, J.F., Eisen, J.A., Sieracki, M.E. & Stepanauskas, R. (2009) Assembling the Marine Metagenome, One Cell at a Time. *PLoS One*, 4, e5299.
- Yau, S., Lauro, F.M., DeMaere, M.Z., Brown, M.V., Thomas, T., Raftery, M.J., Andrews-Pfannkoch, C., Lewis, M., Hoffman, J.M., Gibson, J.A. & Cavicchioli, R. (2011) Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6163-6168.
- Yi, H., Lim, Y.W. & Chun, J. (2007) Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* Petursdottir and Kristjansson 1999 to the genus *Ruegeria* Uchino et al. 1999. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**, 815-819.
- Yokoyama, A., Shizuri, Y., Hoshino, T. & Sandmann, G. (1996) Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. Arch Microbiol, 165, 342-345.
- Zdobnov, E.M. & Apweiler, R. (2001) InterProScan--an integration platform for the signaturerecognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, **17**, 847-848.
- Zeng, Y., Zou, Y., Grebmeier, J., He, J. & Zheng, T. (2012) Culture-independent and dependent methods to investigate the diversity of planktonic bacteria in the northern Bering Sea. *Polar Biol*, 35, 117-129.
- Zeng, Y.X., Zheng, T., Yu, Y., Chen, B. & He, J.F. (2010) Relationships between Arctic and Antarctic *Shewanella* strains evaluated by a polyphasic taxonomic approach. *Polar Biol*, 33, 531-541.
- Zhang, J. & Peterson, T. (1999) Genome rearrangements by nonlinear transposons in maize. *Genetics*, **153**, 1403-1410.
- Zhang, J. & Peterson, T. (2004) Transposition of reversed Ac element ends generates chromosome rearrangements in maize. *Genetics*, **167**, 1929-1937.
- Ziegler, K., Diener, A., Herpin, C., Richter, R., Deutzmann, R. & Lockau, W. (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *Eur J Biochem*, 254, 154-159.

8. Anhang



Abb. A1 Neighbor-Joining Baum der Roseobacter-Gruppe, basierend auf 16S rRNA Gensequenzen

Die entsprechenden NCBI accession-Nummern sind jeweils hinter der Organismenbezeichung in Klammern angegeben. Typstämme beschriebener Arten sind mit einem "T" markiert. Neighbor-Joining *bootstrap*-Werte über 50% sind an den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Verzweigungen, welche auch in Maximum-Likelihood Stammbäumen mit bootstrap-Werten >50% reproduziert werden konnten, sind zusätzlich mit den entsprechenden Maximum-Likelihood *bootstrap*-Werten in Klammern beschriftet. 16S rNRA Gensequenzen der *Gammaproteobacteria Methylococcus capsulatus* Texas und *Thiothrix nivea* JP2 dienten als outgroup. Beschriftungen von Organismen, deren Genomsequenzen im Rahmen dieser Arbeit für vergleichende Analysen herangezogen wurden, sind hervorgehoben.



Abb. A2 Syntenie-Plots der Genome ausgewählter Roseobacter Vertreter

Die Syntenie-Plots basieren auf paarweisen, mittels der MUMmer software (Kurtz *et al.* 2004) erstellten, Genom-*alignments*. Lineare Markierungen weisen auf Sequenzhomologien in zusammenhängenden Genomabschnitten hin. Homologe Genomabschnitte welche in den Vergleichsgenomen identische Orientierungen aufweisen, sind in Rot dargestellt, Inversionen sind in Blau dargestellt. Zum besseren Vergleich sind die entsprechenden Distanz-werte auf Multilokus Sequenzanalyse (MLSA)-Ebene und auf BLAST-basierter durchschnittlicher Nukleotididentitäts (ANIb)-Ebene (siehe 3.1.3) für jedes Genom-Paar angegeben. Trotz ihrer Ähnlichkeiten auf MLSA- und ANIb-Ebene weisen die *Octadecabacter*-Genome kaum Syntenien auf (A). Andere Vergleichsorganismen weisen, trotz ähnlicher oder höherer Distanzen auf MLSA- und ANIb-Ebene weitaus höhere Syntenien auf (B-F). Dies ist auch bei Organismen der Fall, welche von global entgegengesetzten Standorten isoliert wurden (C, D).

Α	O. arcticus 238 O. antarcticus 307 S. ruber M31	1 1 1		
	Proteorhodopsin	1 M	IK L L L I L GSV I A L P T F A A G G G D L D A S D Y T G V S F W L V T A A L L A S T V F F F V E 50	
			Helix A	
	O. arcticus 238	34	GQVKSEYK TALVITGLVTFIAAYHYFRIGQSWVDAYTLVDGVHVPTEKA 83	
	O. antarcticus 307	34	GQVKQEYKLALIVTGLVTFIAAYHYFRIGQSWVDAYTLVDGVHVPTEKV 83	
	S. ruber M31	38 F	NNV A <mark>P</mark> KY <mark>R</mark> ISMMV <mark>SALVVFIAGYHYFR</mark> ITS <mark>SWEAAYALQNGMY</mark> Q <mark>PTG</mark> EL 87	
	Proteorhodopsin	51 F	DRVSAKW <mark>K</mark> TSLT <mark>VSGLVTGIAFWHYMYMRGVWI</mark> ETG <mark>DSP</mark> 90	
			Helix B	
	O. arcticus 238	84 I	NSAYRY VDWLLTVPLLLIELILVMSLSRSETVSRATSLGLAALLMVALG 13	3
	O. antarcticus 307	84	NSAYRYVDWLLTVPLLLVELILVMSLSRSETVSRATSLGLAALLMVALG 13	3
	S. ruber M31	88	NDAYRYVDWLLTVPLLTVELVLVMGLPKNERGPLAAKLGFLAALMIVLG 13	7
	Proteornodopsin	91	- IV FRY IDWLLIVPLLIVEFYLILAAA INVAGSLFKKLLVGSLVMLVFG 13	8
	O arcticus 238	124		0
	O. antarcticus 307	134	POEVSDSU OVPWVFGOLSMVPFLWLVOLVKCLG - DALESOPENAR 17	0
	S. ruber M31	138	PGEVSENAAL EGTRGLWGELSTLP EVWLLY LLETOLG - DT LOROSSRVS 18	6
	Proteorhodopsin	139	MGE AG I MA AWP AF I I GC I AWVYM I YF I WAGF GK SACN TASPAVO 18	3
				-
	O. arcticus 238	180	LVR TARNV TV <mark>GSWC FYP</mark> VVY FAGAVGLE <mark>GP</mark> FA TVVVEV <mark>GY T I AD</mark> 22 [,]	4
	O. antarcticus 307	180	LVRLA <mark>R</mark> NVTV <mark>GSWCFY</mark> PVVYFA <mark>G</mark> AIGLE GATATVIVEVGYTIA <mark>D</mark> 224	4
	S. ruber M31	187 -	LL <mark>G</mark> NA <mark>R</mark> LLLLA <mark>TWGFY</mark> PIAYMIPMAF <mark>PE</mark> AFPSNT <mark>PG</mark> TIVALQVGYTIA <mark>D</mark> 23	6
	Proteorhodopsin	184	AYN TMMY LLIF <mark>G</mark> WAI <mark>Y</mark> PVGYFTGYLM <mark>GD</mark> <mark>G</mark> -GSALNLNLIYNLA <mark>D</mark> 22	7
	O. arcticus 238	225	IAKIAG FGVLIYMIAMRKSED TN DSIK TAV PAE 25	7
	O. antarcticus 307	225	IAKIAG FGVIIFLIALRKSEDPQNDKTLTVPAGEGPKDKNTKTVPAE 27	1
	S. ruber M31	237	LAKAGYGVLIYNIAKAKSEEEGFNVSEMVEPATASA 27	3
	Proteorhodopsin	228	VNNILFGLITWNVAVKESSNA 24	9
_				1
E	Rhodopsin He	erkunt	Aminosaure/Sequenzposition	L

BI	Rhodopsin Herkunft		Aminosaure/Sequenzposition						
	<i>O. arcticus</i> 238 Untergruppe II Xanthorhodopsin	Arg89	Asp92	Glu103	Glu137	Tyr196	Glu208	Asp224	Lys228
	<i>S. ruber</i> M31 Untergruppe I Xanthorhodopsin	Arg93	Asp96	Glu107	Glu141	Tyr203	Glu215	Asp236	Lys240
	EBAC31A08 Proteorhodopsin	Arg94	Asp97	Glu108	Glu142	Tyr200	Asp212	Asp227	Lys231
	Funktion	Proton release complex	Protonen Akzeptor	Protonen Donor	Proton release complex (putativ)	Proton pathway	Proton release complex	Gegenion für Schiffsche Base	Schiffsche Base
	(Referenz)	(Balashov 2000)	(Balashov 2000)	(Balashov <i>et al.</i> 2005)	(Beja <i>et al.</i> 2000)	(Balashov 2000)	(Balashov 2000)	(Balashov 2000)	(Balashov 2000)
	Äquivalente Position in Bacteriorhodopsin	Arg82	Asp85	Asp96	-	Tyr185	Glu194	Asp212	Lys216

Abb. A3 Rhodopsin-Aminosäuresequenzpositionen welche mit Protonenpumpenaktivität in Verbindung gebracht werden

(A) *Alignment* des Untergruppe I-Xanthorhodopsins von *S. ruber* M31, der Untergruppe II-Xanthorhodopsine der *Octadecabacter*-Stämme und des Proteorhodopsins des Metagenom-Klons EBAC31A08. Die *alignment*-Positionen der Transmembran-Helices von Proteorhodopsin sind durch rote Linien markiert und beschriftet. Konservierte Aminosäuresequenzpositionen welche mit Protonenpumpen-Funktion in Verbindung gesetzt werden, sind durch schwarze Umrandung gekennzeichnet. (B) Aminosäuresequenzpositionen die in Proteo- und Xanthorhodopsinen mit Potonenpumpen-Funktion in Verbindung gesetzt werden. Die jeweilige Funktion der einzelnen Aminosäuren im Rahmen der Protonentranslokation ist gemeinsam mit der entsprechenden Referenz für jede dieser Sequenzpositionen angegeben. Äquivalente Sequenzpositionen in Bacteriorhodopsin sind in der untersten Zeile angegeben.



Abb. A4 Wachstumsversuche bei verschiedenen Nährstoffkonzentrationen und Beleuchtungszuständen Als Medium diente modifiziertes gepuffertes MB2216-Medium (pH 7,5) mit reduzierten Anteilen der Nährstoffe Hefeextrakt und Pepton. Es wurden jeweils nur 10%, 1% bzw 0,1% der normalerweise für MB2216-Medium verwendeten Mengen an Hefeextrakt und Pepton zugegeben (siehe 2.2.1). Kulturen wurden mit bzw. ohne Beleuchtung angezogen. Es wurden jeweils zwei Parallelen durchgeführt (a und b). Wachstum wurde durch Trübungsmessung mittels eines Klett-Summerson Photometers verfolgt. Für jede Kultur ist die optische Dichte (OD in Klett-Einheiten) gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen.

		1	1	1		1		1				1		1			1 1
l ocus tag	AMCf2	4. dehalogenans 2CP-1	4. dehalogenans 2CP-C	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	Anaeromyxobacter sp. K	d. xanthus DK 1622	S. cellulosum 'So ce56'	H. ochraceum DSM 14365	Locus tag	AMCf1	4. dehalogenans 2CP-1	4. dehalogenans 2CP-C	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	Anaeromyxobacter sp. K	И. xanthus DK 1622	S. cellulosum 'So ce56'	4. ochraceum DSM 14365
Locus lug	2	4	1	4	4	<	0	1	MMACf2 10	2	4	۲.	4	R	<	0)	<u> </u>
-									1000000000000000000000000000000000000								
-									$\frac{ V V C 2_20}{MMCf2_20}$								
-									$\frac{1000012}{100000000000000000000000000000$								
									$\frac{MMC12_{40}}{MMCf2_{50}}$								
									MMCf2_60								
_									MMCf2_70								
-									MMCf2_80								
_									MMCf2_90								
_									MMCf2 100								
MMCf1 20									MMCf2 120								
MMCf1 30									MMCf2 130								
MMCf1 40									MMCf2 140								
MMCf1 50									MMCf2 150								
MMCf1_60									MMCf2_160								
MMCf1_70									MMCf2_170								
MMCf1_80									MMCf2_180								
MMCf1_90									MMCf2_190								
MMCf1_100									MMCf2_200								
MMCf1_110									MMCf2_210								
MMCf1_120									MMCf2_220								
MMCf1_130									MMCf2_230								
MMCf1_140									MMCf2_240								
MMCf1_150									MMCf2_250								
MMCf1_160									MMCf2_260								
MMCf1_170									MMCf2_270								
MMCf1_180									MMCf2_280								
MMCf1_190									MMCf2_290								
MMCt1_200						<u> </u>			MMCt2_300			<u> </u>		ļ			
MMCt1_210									MMCt2_310								
MMCf1_220						ļ	ļ		-								
MMCt1_230									-					-			
IVIVICT1 240	I	1	1	1	I	1	1		-								

Abb. A5 Orthologe zwischen den MMC-Fosmiden und den Genomen bekannter Myxobakterien Orthologe wurden mithilfe bidirektionaler BLAST-Analysen bestimmt (siehe 2.10.3) und sind durch rote Färbung gekennzeichnet.

Tab. A1 Unterschiedliche Ergebnisse für die Grösse des Coregenoms und die Anzahl an einzigartigen Genen (*singletons*) bei bidirektionalen BLAST-Analysen ausgehend von unterschiedlichen Referenz-Genomen

	Coreç	genom	Singeltons			Coreç	genom	Singeltons		
Organismus	Anzahl Gene	Genom- Anteil	Anzahl Gene	Genom- Anteil	Organismus	Anzahl Gene	Genom- Anteil	Anzahl Gene	Genom -Anteil	
Citreicella sp. 357	744	16.4%	750	16.6%	Rhodobacterales sp. HTCC2083	749	17.9%	819	19.6%	
Citreicella sp. SE45	735	13.5%	906	16.7%	Rhodobacterales sp. HTCC2150	759	20.7%	589	16.1%	
Dinoroseobacter shibae DFL-12	745	17.8%	528	12.6%	Rhodobacterales sp. HTCC2255	757	16.8%	184	4.1%	
Jannaschia sp. CCS1	756	17.7%	549	12.8%	Rhodobacterales sp. MED193	744	16.4%	459	10.1%	
Ketogulonicigenium vulgare WSH-001	750	24.6%	705	23.1%	Rhodobacterales sp. R2A57	758	17.3%	950	21.7%	
<i>Loktanella</i> sp. CCS2	757	20.7%	457	12.5%	Rhodobacterales sp. SK209-2-6 Roseobacter	747	16.5%	573	12.6%	
<i>Loktanella</i> sp. SE62	746	16.2%	923	20.1%	denitrificans OCh 114	750	18.2%	382	9.3%	
Loktanella vestfoldensis SKA53	761	24.8%	269	8.8%	<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	748	16.5%	451	9.9%	
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC2654	749	15.9%	920	19.5%	<i>Roseobacter</i> sp. AzwK-3b	760	18.3%	698	16.8%	
Nautella italica R11	757	20.7%	298	8.2%	Roseovarius nubinhibens ISM	758	21.4%	285	8.0%	
Oceanibulbus indolifex HEL-45	745	17.9%	544	13.1%	Roseovarius sp. 217	742	15.5%	567	11.9%	
Dceanicola batsensis HTCC2597	754	17.9%	484	11.5%	<i>Roseovarius</i> sp. TM1035	747	18.2%	353	8.6%	
Oceanicola granulosus HTCC2516	759	20.0%	415	10.9%	Ruegeria lacuscaerulensis ITI- 1157	757	21.0%	361	10.0%	
Octadecabacter antarcticus 307	753	16.8%	892 ^A	19,9% ^A	<i>Ruegeria</i> pomeroyi DSS-3	739	17.4%	264	6.2%	
Octadecabacter arcticus 238	749	16.0%	1091 ^A	23,9% ^A	<i>Ruegeria</i> sp. KLH11	751	17.6%	765	17.9%	
bermudensis HTCC2601	737	13.5%	909	16.7%	<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	753	19.5%	250	6.5%	
arcticus DSM 23566	744	15.7%	418	8.8%	<i>Ruegeria</i> sp. TrichCH4B	747	15.8%	786	16.6%	
Phaeobacter caeruleus 13	736	14.3%	730	14.2%	<i>Ruegeria conchae.</i> TW15	749	17.1%	439	10.0%	
Phaeobacter daeponensis DSM 23529	742	17.3%	131	3.1%	Sagittula stellata E- 37	7/3	14 7%	728	11 1%	
Phaeobacter gallaeciensis 2.10	753	19.4%	90	2.3%	<i>Sulfitobacter</i> sp. EE- 36	755	21.7%	172	5.0%	
Phaeobacter gallaeciensis	752	19.4%	142	3.7%	<i>Sulfitobacter</i> sp. GAI101	747	17 00/	405	11 50/	
DSMI17395 Phaeobacter	754	19.4%	128	3.3%	Sulfitobacter sp.	/4/	17.8%	485	11.5%	
inhibens T5 Phaeobacter sp.	7//	18 0%	317	7 70/	NAS-14.1 <i>Thalassiobium</i> sp.	746	18.8%	323	8.2%	
Y4I "Ca. Planktomarina	/ 44	10.0%	317	1.1%	R2A62 Wenxinia marina	759	20.5%	671	18.2%	
temperata" RCA23	747	24.5%	293	9.6%	DSM 24838	755	18.7%	499	12.3%	

^AOhne Abzug TE-assoziierter Gene

Inhaltsverzeichnis des digitalen Anhangs

Tabelle	Beschreibung	Dateiname
DA01	Abgeschlossene und laufende Roseobacter Genomprojekte	Tab_DA01.xls
DA02	Binäre Matrix für gene content-Analysen (Text-Format mit Tabstops)	Tab_DA02.tab
DA03-DA53	Ergebnisse der Orthologensuche für die einzelnen Vergleichsstämme:	
DA03	Octadecabacter antarcticus 307	Tab_DA03.xls
DA04	Octadecabacter arcticus 238	Tab_DA04.xls
DA05	Nautella italica R11	Tab_DA05.xls
DA06	Phaeobacter arcticus DSM23566	Tab_DA06.xls
DA07	Phaeobacter caeruleus 13	Tab_DA07.xls
DA08	Phaeobacter daeponensis DSM23529	Tab_DA08.xls
DA09	Phaeobacter gallaeciensis 2.10	Tab_DA09.xls
DA10	Phaeobacter gallaeciensis DSM17395	Tab_DA10.xls
DA11	Phaeobacter inhibens T5	Tab_DA11.xls
DA12	Phaeobacter sp. Y4I	Tab_DA12.xls
DA13	Rhodobacteraceae sp. MED193	Tab_DA13.xls
DA14	Rhodobacteraceae sp. SK209-2-6	Tab_DA14.xls
DA15	Ruegeria conchae TW15	Tab_DA15.xls
DA16	Ruegeria pomeroyi DSS-3	Tab_DA16.xls
DA17	Ruegeria sp. KLH11	Tab_DA17.xls
DA18	Ruegeria sp. TM1040	Tab_DA18.xls
DA19	Ruegeria sp. TrichCH4B	Tab_DA19.xls
DA20	Rugeria lacuscaerulensis ITI-1157	Tab_DA20.xls
DA21	Oceanobulbus indolifex HEL45	Tab_DA21.xls
DA22	Roseobacter denitrificans OCh114	Tab_DA22.xls
DA23	Roseobacter litoralis Och149	Tab_DA23.xls
DA24	Sulfitobacter sp. EE36	Tab_DA24.xls
DA25	Sulfitobacter sp. GAI101	Tab_DA25.xls
DA26	Sulfitobacter sp. NAS141	Tab_DA26.xls
DA27	Citreicella aestuarii 357	Tab_DA27.xls
DA28	Citreicella sp. SE45	Tab_DA28.xls
DA29	Oceanicola batsensis HTCC2597	Tab_DA29.xls
DA30	Pelagibaca bermudensis HTCC2601	Tab_DA30.xls
DA31	Rhodobacteraceae sp. AzwK-3b	Tab_DA31.xls
DA32	Roseovarius nubinhibens ISM	Tab_DA32.xls
DA33	Roseovarius sp. SP217	Tab_DA33.xls
DA34	Roseovarius sp. TM1035	Tab_DA34.xls
DA35	Sagittula stellata E-37	Tab_DA35.xls
DA36	Ketogulonicigenium vulgare WSH-001	Tab_DA36.xls
DA37	Ketogulonicigenium vulgare Y25	Tab_DA37.xls
DA38	Loktanella sp. CCS2	Tab_DA38.xls
DA39	Loktanella sp. SE62	Tab_DA39.xls
DA40	Loktanella vestfoldensis SKA53	Tab_DA40.xls
DA41	Oceanicola granulosus HTCC2516	Tab_DA41.xls

DA42	Thalassiobium sp. R2A62	Tab_DA42.xls
DA43	Wenxinia marina DSM24838	Tab_DA43.xls
DA44	Dinoroseobacter shibae DFL-12	Tab_DA44.xls
DA45	Jannaschia sp. CCS1	Tab_DA45.xls
DA46	"Ca. Planktomarina temperata" RCA23	Tab_DA46.xls
DA47	Maritimibacter alkaliphilus HTCC2654	Tab_DA47.xls
DA48	Rhodobacteraceae sp. HTCC2083	Tab_DA48.xls
DA49	Rhodobacteraceae sp. HTCC2150	Tab_DA49.xls
DA50	Rhodobacteraceae sp. HTCC2255	Tab_DA50.xls
DA51	Rhodobacteraceae sp. R2A57	Tab_DA51.xls
DA52	Escherichia coli K-12 MG1655	Tab_DA52.xls
DA53	Parvarcula bermudensis HTCC2053	Tab_DA53.xls
DA54	BLAST-basierte durchschnittliche Nukleotididentitäts-Werte (ANIb) zwischen den Vergleichsstämmen	Tab_DA54.xls
DA55	Korrelationskoeffizienten der Tetranukleotid-Zusammensetzung in den Vergleichsstämmen	Tab_DA55.xls
DA56	Übersicht ausgewählter Merkmale in Regionen erhöhter Genomplastizität (RGPs) in den Genomen von Octadecabacter arcticus (Oar-RGP1-17, pOAR118, pOAR160) und Octadecabacter antarcticus (Oan-RGP1-16, pOAN63)	Tab_DA56.xls
DA57	Cyanophycin-Ligasen und Cyanophycin-Ligase-ähnliche Proteine deren Sequenzen für phylogenetische Analysen genutzt wurden	Tab_DA57.xls
DA58	Ergebnisse der vorläufigen Schwermetall-Versuche	Tab_DA58.xls
DA59	Liste von Rhodopsinsequenzen welche für phylogenetische Analysen und Screenings von Metagenomen herangezogen wurden	Tab_DA59.xls
DA60	Liste und Beschreibung der auf den MMC-Fosmiden kodierten Gene.	Tab_DA60.xls

Literaturverzeichnis Anhang

- Balashov, S.P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1460**, 75-94.
- Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Boichenko, V.A., Anton, J., Wang, J.M. & Lanyi, J.K. (2005) Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science*, 309, 2061-2064.
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N. & DeLong, E.F. (2000) Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 289, 1902-1906.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S.L. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol*, 5, R12.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Beispiele mariner Wassermassen und Meereströmungen	9
Abb. 2	Herkunft exemplarischer Vertreter der Roseobacter-Gruppe	13
Abb. 3	Mikrobielle Rhodopsine. Schematischer Aufbau	15
Abb. 4	Graphische Übersicht der Octadecabacter Genome.	47
Abb. 5	Genomeigenschaften von Roseobacter-Vertretern mit unterschiedlicher	
	Lebensweise	49
Abb. 6	Neighbor-Joining Baum basierend auf der Gen-Ausstattung (gene content) von	
	Roseobacter-Vertretern mit Darstellung der entsprechenden COG-Kategorien	51
Abb. 7	Anteile an Genen verschiedener COG-Kategorien in Roseobacter-Vertretern	
	unterschiedlicher Lebensweise	53
Abb. 8	MLSA-basierte Phylogenie der Roseobacter-Gruppe	55
Abb. 9	Phylogenetische Stammbäume basierend auf rRNA-Gensequenzen	57
Abb. 10	Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Roseobacter-Vertretern basierend auf	
	Gesamtgenomvergleichen	59
Abb. 11	Phylogenetische Beziehungen zwischen Octadecabacter-Vertretern	
	unterschiedlicher geographischer Standorte	61
Abb. 12	Detailierte zirkuläre Darstellung der Octadecabacter Genome	64
Abb. 13	Regionale Anhäufung einiger Gruppen von transposablen Elementen (TEs) in	
	den Genomen von O. arcticus 238 und O. antarcticus 307	67
Abb. 14	Genomalignments der Octadecabacter-Stämme sowie verschiedener	
	Vergleichsorganismen	69
Abb. 15	Cyanophycin-Gencluster mit Typ VI Cyanophycin-Ligase	70
Abb. 16	Diversität bakterieller Cyanophycin-Ligasen	71
Abb. 17	Biogeographie von Gruppe-VI Cyanopycin-Ligasen in marinen und Eis-	
	assoziierten Standorten	74
Abb. 18	Gencluster der assimilatorischen Nitrat-Redukion in R. litoralis und	
	O. antarcticus	75
Abb. 19	Wachstum von O. antarcticus mit verschiedenen Stickstoffquellen	76
Abb. 20	Wachstum von Octadecabacter-Kulturen mit Ectoin als hauptsächlicher	
	Kohlenstoffquelle	77
Abb. 21	Gencluster RuBisCO-ähnlicher Gene in Roseobacter-Vertretern	78

Abb. 22	Gencluster der Typ IV Sekretionssysteme in O. arcticus 238 und	
	ausgewählten Vergleichsorganismen	79
Abb. 23	Phylogenie von Typ IV-Sekretionssystemen in Vertretern der Roseobacter-	
	Gruppe	80
Abb. 24	Gene Transfer Agent (GTA)-Gencluster und Umgebung in verschiedenen	
	Roseobacter-Vertretern	81
Abb. 25	Neighbor-Joining-Baum von GTA-Genprodukten in Vertretern der	
	Roseobacter-Gruppe	82
Abb. 26	Flagellen-Gencluster in O. arcticus 238 und O. antarcticus 307.	83
Abb. 27	Phylogenie der Flagellen-Gencluster in Vertretern der Roseobacter-Gruppe	
	und verwandten Organismen.	84
Abb. 28	RT-PCR mit Flagellin-spezifischen Primern	85
Abb. 29	Gasvesikel-Gencluster in beiden Octadecabacter-Stämmen	86
Abb. 30	Schwermetall-Resistenz-Gencluster in den Octadecabacter-Stämmen	87
Abb. 31	Rhamnose-Import- und Verwertungs-Gencluster in O. arcticus 238 und	
	O. antarcticus 307	89
Abb. 32	Rhamnose-Verwertung in den Octadecabacter-Stämmen	89
Abb. 33	Phylogenie mikrobieller Rhodopsine	91
Abb. 34	Habitat-Bevorzugung und detaillierte Phylogenie der Xanthorhodopsin	
	Untergruppen	93
Abb. 35	Anteil von Rhodopsin-Gensequenzen in Sanger-Sequenzierungs-basierten	
	Metagenomen	94
Abb. 36	Anteil von Rhodopsin-Gensequenzen in 454-Sequenzierungs-basierten	
	Metagenomen	96
Abb. 37	Vergleich der Genumgebungen von Xanthorhodopsinen der Untergruppen	
	I und II	98
Abb. 38	Potentielle Keto-Carotenoid-Bindestellen in verschiedenen Xanthorhodopsiner	1 99
Abb. 39	Western-Blots und Spektralanalysen heterolog exprimierter Rhodopsine	101
Abb. 40	Protonenpumpenaktivitäten heterolog exprimierter Rhodopsine	101
Abb. 41	Nachweis der Expression von Xanthorhodopsinen in nativen Octadecabacter-	
	Kulturen	102
Abb. 42	Versuche zur Keto-Carotenoid Bindefähigkeit von Untergruppe I- und	
	Untergruppe II-Xanthorhodopsinen	103

Abb. 43	Vergleich allgemeiner Genomeigenschaften zwischen MLSA-basierten	
	Roseobacter Gruppen	106
Abb. 44	Zusammenhang zwischen MLSA-basierter Phylogenie, gene content	
	Analysen und Lebensweise verschiedener Roseobacter-Vertreter	111
Abb. 45	Verteilung charakteristischer Eigenschaften innerhalb der Roseobacter-Gruppe.	115
Abb. 46	Vergleich der Lebensbedingungen von Organismen mit Xanthorhodopsinen	
	der Untergruppe I oder II	129
Abb. 47	Zusammenfassung der relativen Rhodopsin-Anteile in verschiedenen Habitaten	131
Abb. A1	Neighbor-Joining Baum der Roseobacter-Gruppe, basierend auf 16S rRNA	
	Gensequenzen	157
Abb. A2	Syntenie-Plots der Genome ausgewählter Roseobacter Vertreter	158
Abb. A3	Rhodopsin-Aminosäuresequenzpositionen welche mit	
	Protonenpumpenaktivität in Verbindung gebracht werden	159
Abb. A4	Wachstumsversuche bei verschiedenen Nährstoffkonzentrationen und	
	Beleuchtungszuständen	160
Abb. A5	Orthologe zwischen den MMC-Fosmiden und den Genomen bekannter	
	Myxobakterien	161

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Bakterienstämme	19
Tab. 2	Verwendete Plasmid-Vektoren	19
Tab. 3	COG-Kategorien	36
Tab. 4	Liste der nach spezifischen Genen durchsuchten Metagenom-Projekte	41
Tab. 5	Primer zur Amplifikation von Opsingenen	42
Tab. 6	In dieser Arbeit erzeugte rekombinante E. coli-Stämme zur heterologen	
	Expression von Opsingenen	42
Tab. 7	Genomeigenschaften der Untersuchten Roseobacter-Vertreter	48
Tab. 8	Anteile von Octadecabacter-Vertretern in polaren Habitaten	60
Tab. 9	Klassifikation der Transposablen Elemente von O. arcticus und O. antarcticus	
	anhand der ISFinder-Datenbank	65
Tab. 10	Pseudogene in O. arcticus und O. antarcticus	68
Tab. 11	Liste der Gruppe-VI Cyanophycin Ligasen und der zugehörigen Organismen	72
Tab. 12	Ergebnisse verschiedener Motilitäts-Tests mit O. arcticus 238 und	
	O. antarcticus 307	85
Tab. A1	Unterschiede in der Größe des Coregenoms bei bidirektionalen BLAST-	
	Analysen ausgehend von unterschiedlichen Referenz-Genomen	162

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Rolf Daniel für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die Unterstützung die er mir zuteil werden ließ, für seine konstruktiven Anregungen und nicht zuletzt auch für seine Geduld. Desweiteren möchte ich meinem Korreferenten Prof. em. Dr. Gerhard Gottschalk für sein Engagement, und auch dafür dass er uns Doktoranden auf seine freundliche Art und mit seinen interessanten Anekdoten an seinem Erfahrungsschatz teilhaben ließ, herzlich danken. Den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Pöggeler, Jun-Prof. Dr. Heimel, PD Dr. Hoppert und PD Dr. Kramer, möchte ich für die Bereitschaft diese Aufgabe zu übernehmen, ebenfalls herzlich danken.

Ein spezieller Dank geht an Dr. Sonja Voget, die mir mit ihrem unermüdlichen Engagement stets konstruktiv zur Seite stand, und bei der ich mir immer einen guten Rat abholen konnte. Bei der Korrektur dieser Arbeit und meines Papers war sie ebenfalls eine unentbehrliche Hilfe. Nicht zuletzt versteht sie es durch ihre fröhliche und hilfreiche Art, wenn nötig, auch sehr beruhigend zu wirken.

Unserem engen Kooperationspartner, der AG Simon des ICBM in Oldenburg, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Besonders hervorzuheben sind hierbei Prof. Dr. Meinhard Simon, Dr. Thorsten Brinkhoff, Dr. Mascha Wurst, Dr. Helge-Ansgar Giebel und Sara Billerbeck.

Der Crew sowie dem wissenschaftlichen Team der Polarstern-Expeditionen ANTXXVII-2 und ANTXXVII-4 möchte ich danken für die unvergesslichen und einzigartigen Erfahrungen, die ich im Rahmen dieser spannenden Ausfahrten machen durfte. Auch meinem Doktorvater und nicht zuletzt unseren Kooperationspartnern im Rahmen des SFB TTR51 möchte ich an dieser Stelle nochmal besonders dafür danken, dass mir die Teilnahme an diesen Expeditionen ermöglicht wurde.

Den TAs unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Kathleen Gollnow, Frauke-Dorothee Meyer und Mechthild Bömeke, möchte ich für ihre große Hilfe und ihren kompetenten Rat danken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch dem gesamten Team der AG Daniel und des G2Ls für die gute Zusammenarbeit danken.

Ein besonders inniger Dank geht an meine tapferen Mitstreiter und Doktorandenkollegen die mit mir viel Freud und Leid und einiges an Erfahrung geteilt haben. Im Speziellen möchte ich hierbei Sandra Wiegand, Katrin Hartwich, Andreas Leimbach, Marvin Djukic und Shiva nennen, mit denen ich mir so manche späte Abende und Wochenenden um die Ohren gehauen habe.

Bei meinen Eltern Claus und Sally, meiner Schwester Annie und meiner Nichte Carla möchte ich mich aus tiefstem Herzen dafür bedanken, dass ich mich immer darauf verlassen kann, dass sie für mich da sind. Auch dafür, dass sie es mir nicht übelnehmen, dass ich sie im Zuge meiner Arbeit oft schändlich vernachlässigt habe, bin ich ihnen unendlich dankbar.

Publikationsliste

- Brinkhoff, T., Fischer, D., Vollmers, J., Voget, S., Beardsley, C., Thole, S., Mussmann, M., Kunze, B., Wagner-Dobler, I., Daniel, R. & Simon, M. (2012) Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine *Myxobacteria*. *ISME J*, 6, 1260-1272.
- Voget, S., Wemheuer, B., Brinkhoff, T., Vollmers, J., Dietrich, S., Giebel, H.-A., Beardsley, C., Bakenhus, I., Billerbeck, S., Daniel, R. & Simon, M. (2013) Genome-based analysis and active role of a photoheterotrophic and CO oxidizing *Roseobacter* RCA population in the ocean. *ISME J* (Submitted).
- Vollmers, J., Voget, V., Dietrich, S., Gollnow, K., Smits, M., Meyer, K., Brinkhoff, T., Simon, M. & Daniel, R. (2013) Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecabacter* strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. *PLoS One*, 8, e63422.

Promovierenden-Erklärung der Georg-August-Universität Göttingen

Name:Vollmers, John FelixAnschrift:Hannoversche Str. 103, 37077 Göttingen

Ich beabsichtige, eine Dissertation zum Thema "Molekularbiologische Charakterisierung und vergleichende Genomik von ausgewählten Vertretern mariner *Roseobacter*-Stämme" an der Georg-August-Universität Göttingen anzufertigen. Dabei werde ich von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniel betreut.

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

2. Hilfe Dritter wurde bis jetzt und wird auch künftig nur in wissenschaftlich vertretbarem und prüfungsrechtlich zulässigem Ausmaß in Anspruch genommen. Insbesondere werden alle Teile der Dissertation selbst angefertigt; unzulässige fremde Hilfe habe ich dazu weder unentgeltlich noch entgeltlich entgegengenommen und werde dies auch zukünftig so halten.

3. Die Richtlinien zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis an der Universität Göttingen werden von mir beachtet.

4. Eine entsprechende Promotion wurde an keiner anderen Hochschule im In- oder Ausland beantragt; die eingereichte Dissertation oder Teile von ihr wurden nicht für ein anderes Promotionsvorhaben verwendet.

Mir ist bekannt, dass unrichtige Angaben die Zulassung zur Promotion ausschließen bzw. später zum Verfahrensabbruch oder zur Rücknahme des erlangten Grades führen.

Göttingen, den 27.06.2013

Lebenslauf

Dipl.-Biol. John Felix Vollmers Geboren am 30. April 1979 in Bad Soden

Seit 02/2008	Promotionsstudium						
	Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie und						
	Laboratorium für Genomanalyse, Institut für Mikrobiologie und						
	Genetik, Georg-August-Universität Göttingen						
Seit 01/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter						
	Abt. Evolutionary Functional Genomics (JunProf. Dr. Claudia						
	Acquisti), Institut für Evolution und Biodiversität, Westfälische						
	Willhelms-Universität Münster						
12/2006 - 08/2007	Diplomarbeit "Strukturanalyse mariner Myxobakterienpopulationen"						
	AG Biologie geologischer Prozesse (Prof. Dr. Meinhard Simon),						
	Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Carl von Ossietzky						
	Universität Oldenburg						
10/2001 - 08/2007	Studium der Biologie (Diplom)						
	Carl von Ossietzky Universität Oldenburg						
	Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik und Biochemie						
06/2000 - 05/2001	Zivildienst						
	Horst-Schmitt-Kliniken, Wiesbaden						
06/1999	Abitur						
	Pestalozzi-Gymnasium, Idstein (Taunus)						