

Dr. Stefan M. Sievert

Alfried Krupp Senior Fellow

Mai 2009 – Oktober 2010

Kurzvita Stefan Sievert wurde 1966 in Mainz geboren. Er studierte Biologie und Biologische Ozeanographie in Mainz, Bremen und Seattle, USA. Er promovierte 1999 an der Universität Bremen und ging 2000 als postdoctoral scholar an das Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) in Woods Hole, Massachusetts, USA. Seit 2003 arbeitet er dort als Meereswissenschaftler und untersucht

die Zusammensetzung, Diversität und Funktion mikrobieller Gemeinschaften im Ozean. Unter anderem erforscht er die mikrobielle Ökologie von Tiefseehydrothermalsystemen und hat an mehreren Forschungsfahrten teilgenommen, nicht zuletzt als Fahrtleiter mit dem US-amerikanischen Forschungsschiff Atlantis und dem Forschungsunterseeboot Alvin.

Licht ins Dunkel bringen: Die Verwendung von metaproteomischen Analysen zur Aufklärung chemolithoautotropher Prozesse an Tiefseehydrothermalquellen

Tiefseehydrothermalquellen stellen ein einzigartiges und faszinierendes Ökosystem dar, an denen chemoautotrophe Mikroorganismen d.h., Organismen die mittels anorganischer Energiequellen Kohlendioxid in Biomasse umwandeln können, in der Basis der Nahrungskette stehen. Allerdings ist über die Physiologie und die metabolischen Fähigkeiten der meisten dort vorkommenden Mikroorganismen bislang nur sehr wenig bekannt. Dies limitiert nicht nur das Verständnis der ökologischen Bedeutung dieser Organismen, sondern auch das Verständnis über die Funktion des gesamten Ökosystems. Außerdem stellen diese Mikroorganismen ein enormes Reservoir an Biodiversität – und somit auch für potentiell wichtige bioaktive Wirkstoffe – dar. Die Anwendung von kultivierungsunabhängigen Methoden, welche die Gesamtheit der in einer mikrobiellen Gemeinschaft vorhandenen Gene (Metagenom) sowie die häufigsten Proteine (Metaproteom) erfassen, hat es in den letzten Jahren erlaubt, bisher nicht für möglich gehaltene Einblicke in das meta-

bolische Potential mariner Mikroorganismen zu erhalten. Das im Rahmen meines Aufenthaltes am Alfred Krupp Wissenschaftskolleg in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Schweder (primärer Kooperationspartner) und Prof. Dr. Hecker/Dr. Becher an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität durchgeführte Projekt stellt die erste Studie dar, welche das Metaproteom der freilebenden mikrobiellen Gemeinschaften an Tiefseehydrothermalquellen erfasst. Dies beinhaltet sowohl die Identifizierung quantitativ wichtiger metabolischer Prozesse, als auch die Möglichkeit zur Bestimmung neuartiger Proteine und Anpassungen. Um die aus der Umwelt erhaltenen Daten besser verstehen und interpretieren zu können, wurden des Weiteren Untersuchungen an Modellorganismen unter verschiedenen umweltrelevanten Wachstumsbedingungen durchgeführt.

Stef Sieft

Tiefseehydrothermalquellen, deren Entdeckung erst 30 Jahren zurückliegt, gelten als Paradebeispiel für Ökosysteme, in denen die Biomasseproduktion primär über mikrobielle Chemosynthese und nicht über Photosynthese erfolgt. Chemolithoautotrophe Mikroorganismen, d.h., Organismen, die mittels anorganischer Energiequellen Kohlendioxid in Biomasse umwandeln können, sitzen an der Schnittstelle dieser hochproduktiven Ökosysteme in denen sie die geothermische Energie in Biomasse umwandeln, die dann den höheren trophischen Stufen als Nahrung zur Verfügung steht. Während die Richtigkeit dieses konzeptionellen Gedankengerüsts als erwiesen gilt, gibt es jedoch noch immer große Lücken im Verständnis der Funktionsweise dieser Systeme.

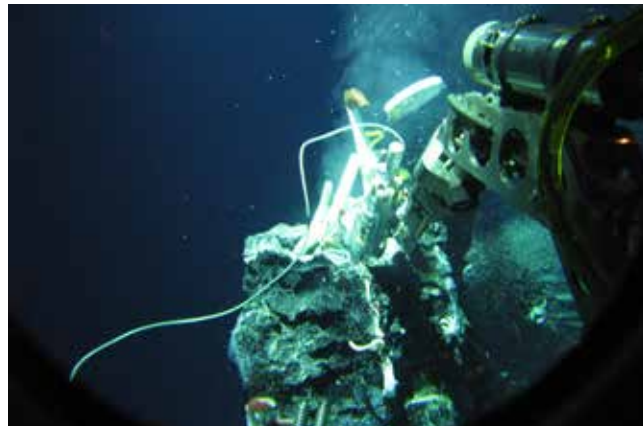
Ein zentrales Anliegen des am Alfred Krupp Wissenschaftskolleg durchgeführten Projektes war es daher, funktionelle Analysen der an den Tiefseehydrothermalquellen vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften durchzuführen, um damit zu einem besseren Verständnis der dort ablaufenden Prozesse und der beteiligten Mikroorganismen beizutragen. Hierzu ist ein eingehendes Verständnis der physiologischen Aktivitäten der in dem untersuchten System lebenden Mik-

roorganismen unabdingbar. Bis vor kurzem war es allerdings kaum möglich, funktionelle Analysen von natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften durchzuführen, da die Mehrheit der in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen sich nicht im Labor kultivieren lassen und sich somit einer funktionellen Analyse entziehen. Die Anwendung von kultivierungsunabhängigen Methoden, welche die Gesamtheit der in einer mikrobiellen Gemeinschaft vorhandenen Gene – das sogenannte Metagenom – erfassen, hat es jedoch in den letzten Jahren ermöglicht, einzigartige Einblicke in das genetische und damit auch metabolische Potential mariner Mikroorganismen zu erhalten. Allerdings erlaubt diese Technik nur begrenzte Rückschlüsse auf die tatsächlich in situ relevanten physiologischen Leistungen. Mithilfe neuer sensitiver Proteinanalysetechniken können nun auch die häufigsten Proteine einer mikrobiellen Gemeinschaft, das so genannte Meta-proteom einer Umweltprobe, bestimmt werden. Für eine solche anspruchsvolle Analytik bietet die E.-M.-Arndt-Universität Greifswald hervorragende Voraussetzungen und aufgrund der im Rahmen meines ‚fellowships‘ erhaltenen Daten konnten ganz neue Einblicke in die Struktur und Funktion dieser faszini-

nierenden Lebenswelt erzielt werden. Das Projekt hat folgende primäre Zielsetzungen:

- Identifikation der in der natürlichen Gemeinschaft vorkommenden aktiven Mikroorganismen
- Identifikation der wichtigsten Stoffwechselwege, wie z. B. zur Energiegewinnung und Kohlenstoffdioxid-Assimilation
- Angaben über die in situ Wachstumsbedingungen der in der natürlichen Gemeinschaft vorkommenden Mikroorganismen
- Identifikation von Umweltparametern steuern, welche die Expression von bekannten und bisher unbekannt Genen mittels Analyse von Reinkulturen unter definierten Bedingungen
- Entdeckung bisher unbekannter Proteine und Entschlüsselung ihrer Funktion

Als Ausgangsmaterial der Metaproteomanalysen dienten Proben, die während einer Forschungsfahrt zu den Tiefseehydrothermalquellen am Ostpazifischen Rücken auf 9° Nördlicher Breite genommen wurden. Die beprobte Warmwasserquelle („diffuse-flow vent,“) mit dem Namen ‚Crab Spa‘ (Abb. 1) wurde über die letzten Jahre von der AG Sievert mehrfach beprobt und dient als Modellsystem, um die an Tiefseehydrothermalquel-



len ablaufenden chemoautotrophen Prozesse besser zu verstehen. Für die in Greifswald durchgeführten Analysen werden relativ große Mengen an Biomasse benötigt, die mittels einer am Meeresboden positionierten Pumpe genommen wurden. Mit dieser Pumpe wurden die in ~1.000 Liter Hydrothermalflüssigkeit enthaltenen Mikroorganismen auf einem Filter in situ konzentriert.

Der Filter wurde nach der Bergung der Pumpe direkt an Bord des Forschungsschiffes Atlantis eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Filter wurden gefroren nach Greifswald geschickt und dann dort weiter aufgearbeitet. In diesem Zusammenhang mussten zunächst Methoden zur Extraktion

Abb. 1 Die Warmwasserquelle ‚Crab Spa‘. Das Foto wurde aus dem Forschungsunterseeboot Alvin aufgenommen. Die Quelle liegt in einer Wassertiefe von 2.500 Meter.

der Proteine vom Filter optimiert werden, was keinen unerheblichen Zeitaufwand mit sich brachte. Nach der Optimierung der Extraktionsmethode wurden die in der mikrobiellen Gemeinschaft erhaltenen Proteine zunächst mittels 1-D SDS Gelelektrophorese vorgetrennt, anschließend verdaut, und die erhaltenen Peptide dann mittels hochauflösenden Massenspektrometern, die mit Nano-Liquid Chromatographie gekoppelt sind (LC-MS), analysiert. Anschließend erfolgte ein Abgleich der erhaltenen Massenspektren mit von Genomdatenbanken abgeleiteten Peptidsequenzen, anhand derer die Proteine identifiziert werden konnten.

Diese Analysen führten zu äußerst vielversprechenden Ergebnissen und werden in jedem Fall zu einem besseren Verständnis des Ökosystems beitragen. So weist zum Beispiel die Analyse des Metaproteoms unerwartet darauf hin, dass Nitrat eine große Bedeutung als Elektronenakzeptor für die Chemosynthese in diesem Ökosystem hat. Wir konnten im Metaproteom alle zur Denitrifikation von Nitrat zu molekularem Stickstoff (N_2) benötigten Enzyme nachweisen. Im Gegensatz dazu scheint die aerobe Respiration, d.h. die Verwendung von Sauerstoff, von geringerer Bedeutung zu sein. Des Weiteren zeigen un-

sere Ergebnisse ganz deutlich, dass die Fixierung von Kohlendioxid hauptsächlich über den reduktiven Zitronensäurezyklus abläuft, ein sogenannter alternativer Kohlenstofffixierungsweg, der zumindest an diesen Tiefseehydrothermalquellen den im Allgemeinen als bedeutsamer geltenden Calvin Zyklus an Wichtigkeit übertrifft. Zusätzlich bestätigen unsere Ergebnisse die herausragende Bedeutung der Epsilonproteobakterien als primäre Produzenten für diese Ökosysteme. Aufgrund genomischer Analysen wurde die potentielle Bedeutung dieser Organismen bereits erkannt, aber erst unsere Analysen zeigen, dass diese Organismen auch die dominanten aktiven Mitglieder der Gemeinschaft darstellen. Im Rahmen eines internationalen Arbeitstreffens über 'Deep-Sea Microbiology', das Anfang September in Brest (Frankreich) stattfand und zu dem ich eingeladen wurde, habe ich diese ersten Ergebnisse meiner Forschung am Alfred Krupp Kolleg vorgestellt und auch auf die Förderung durch die Stiftung verwiesen.

Des Weiteren wurden 2D-Gelanalysen der Proteome von drei verschiedenen Modellbakterien (*Sulfurimonas denitrificans*, *Caminiobacter mediatlanticus*, *Thermovibrio ammonificans*), die potentiell in dem untersuchten

System vorkommen, durchgeführt. Im Fall von *Sulfurimonas denitrificans* wurden zwei verschiedene umweltrelevante Wachstumsbedingungen miteinander verglichen. Insgesamt wurden 24 Gele ausgewertet, von denen wiederum 7 Gele für die Identifikation der häufigsten Proteine mittels Massenspektroskopie und Abgleich mit Genomdatenbanken ausgewählt wurden. Die Ergebnisse der 2D-Gelanalysen befinden sich zum größten Teil noch in der Auswertung. Aber auch hier können wir schon erste sehr interessante Befunde festhalten. So konnte gezeigt werden, dass *Sulfurimonas denitrificans* mit Thiosulfat als Elektronendonator bestimmte in der Denitrifikation involvierte Enzyme (Nitritreduktase, N_2O -Reduktase) deutlich stärker exprimiert als mit Wasserstoff als Elektronendonator. Die Gründe hierfür sind noch nicht klar, sind aber auf jeden Fall von ökologischer Relevanz. Mit Thiosulfat konnte außerdem eine höhere Expression eines zur Beweglichkeit benötigten Proteins gefunden werden. Generell wurde mit Wasserstoff eine erhöhte Expression von stressrelevanten Proteinen festgestellt. Es ist auch interessant, dass die meisten Enzyme, die für die Oxidation von Thiosulfat benötigt werden auch mit Wasserstoff exprimiert sind, während dies umgekehrt nicht der Fall zu

sein scheint. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für das Bakterium in der Umwelt reduzierte Schwefelverbindungen eine größere Rolle spielen und nur bei dem Vorhandensein von Wasserstoff die entsprechenden Enzyme gebildet werden. Wie bereits festgestellt, muss ein Großteil der Daten erst noch analysiert werden. Es wird erwartet, dass dies in den nächsten Monaten abgeschlossen sein wird und die Ergebnisse in die Publikation von mindestens zwei hochrangig zu veröffentlichenden Manuskripten mündet. Mein Aufenthalt hat weiterhin die Zusammenarbeit mit den AGs Schweder und Hecker/Becher vertieft und weitere Forschungsaktivitäten sind geplant. Auch wurde die Zeit in Greifswald genutzt, um ein gemeinsames Manuskript mit der AG Schweder zu vervollständigen und um an anderen Manuskripten weiterzuarbeiten. Insgesamt war die Zeit am Alfried Krupp Wissenschaftskolleg sehr fruchtbar und produktiv, auch dank der hervorragenden Betreuung durch die Mitarbeiter des Kollegs, und ich möchte mich ganz herzlich bei der Alfried Krupp von Bohnen und Halbach-Stiftung für die erhaltene Unterstützung bedanken.

Hügler M, and Sievert S.M. 2011. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. Annual Review of Marine Science. Vol. 3, in press.

Xie W., F. Wang, L. Guo, Z. Chen, S. M. Sievert, J. Meng, G. Huang, Y. Li, Q. Yan, S. Wu, X. Wang, S. Chen, G. He, X. Xiao, and A. Xu. 2010. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. ISME Journal, advance online publication, October 7, 2010; doi:10.1038/ismej.2010.144.

Hügler, M., J. M. Petersen, N. Dubilier, J. F. Imhoff, and S. M. Sievert. Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. PloS One, accepted with minor revisions.

Foustoukos, D. I., J. L. Houghton, W. E. Seyfried Jr, S. M. Sievert, and G. D. Cody. Kinetics of H_2 - O_2 redox equilibria and metastable formation of H_2O_2 under low temperature hydrothermal conditions. Geochimica et Cosmochimica Acta, accepted with revisions.

Gardebrecht A., S. Markert, H. Felbeck, A. Thürmer, D. Albrecht, A. Wollherr, J. Kabisch, R. Lehmann, R. Daniel, H. Liesegang, S. M. Sievert, M. Hecker, T. Schweder. Proteogenomic comparison of the endosymbionts from the deep-sea tubeworms *Riftia pachytila* and *Tevnia jerichonana* reveals an identical physiology. In preparation.

Sievert S. M., T. Schweder, D. Becher, J. Lange, A. Thürmer, M. Hecker, S. D. Schuster, R. Daniel, and others. Metaproteogenomic enabled insights into chemolithoautrophy at deep-sea hydrothermal vents. In preparation (estimated submission 03/2011).

Sievert, S. M., T. Schweder, S. Markert, C. Vetriani, and others. Comparative proteogenomic analyses of *Thermovibrio ammonificans* and *Caminibacter mediatlanticus*, two chemolithoautrophic deep-sea hydrothermal vent bacteria performing dissimilatory reduction of nitrate to ammonium. In preparation (estimated submission in 6/2011).