

Umweltmikrobiologie

Proteomik-Werkzeuge für Mikroorganismen

RALF RABUS

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

Microorganisms play central roles in global elemental cycles and ecosystem functioning. The molecular basis and mechanisms of the various ecophysiological capacities of environmental microbes are, however, often unknown or not clearly understood. In this regard, proteomic approaches promise plenty of opportunities. This short note recapitulates state-of-the-art proteomic tools for environmental microbiology and presents selected research examples.

DOI: 10.1007/s12268-015-0608-5
© Springer-Verlag 2015

■ Gegenwärtig laufen in der Umweltmikrobiologie zwei wissenschaftlich-technologische Entwicklungsstränge auf interessante und vielversprechende Weise zusammen: Zum einen verdeutlichte die interdisziplinäre Umweltforschung (Biogeochemie, [molekulare] Ökologie und mikrobielle Physiologie) der letzten drei Jahrzehnte die zentrale Rolle von Mikroorganismen für die globalen Stoffkreisläufe und das Funktionieren von Ökosystemen in verschiedenen Habitaten. Zum anderen entwickeln sich moderne *Omic*s-Technologien ausgehend von technologisch anspruchsvollen und kostenintensiven Anfängen hin zu Standardmethoden der Lebenswissenschaften. Aktuelle und aufkommende Technologien zur DNA-Sequenzierung ermöglichen die Bestimmung der Genomsequenz praktisch jeder mikrobiellen Spezies von Interesse; in ähnlicher Weise nimmt der Zugang zu metagenomischen Informationen über mikrobielle Gemeinschaften in natürlichen Systemen rapide zu. Komplementär dazu haben Methoden, Instrumente und relevante Bioinformatik der Proteomforschung hinsichtlich Robustheit und Bedienbarkeit eine Reife erreicht, die sie zunehmend auch für den allgemeinen (Mikro-)Biologen anwendbar machen.

Auf der Ebene von kultivierungsabhängigen Experimenten ermöglicht genom-basierte Proteomik neue Einblicke in biochemische

Leistungen sowie Anpassungsstrategien und -mechanismen an wechselnde Umweltbedingungen [1, 2]. Im Fall von Habitatstudien erlauben *Meta-Omic*s-Ansätze konventionelle Diversitäts- und Strukturanalysen mikrobieller Gemeinschaften, um funktionale Informationen zu ergänzen [3]. Eine integrierte Umweltproteomik verspricht Fortschritte bei der offenen Kernfrage *when and how is it done*, da sie die Biokatalysatoren selbst ins Visier nimmt, und wurde 2013 in der *PROTEOMICS*-Sonderausgabe „*Environmental Microbial Proteomics*“ thematisiert (*Proteomics* (2013) 13:2697–2930).

Analytische Herausforderung

Im Gegensatz zu Nukleinsäuren sind Proteine weitaus vielfältiger. Dies bezieht sich auf die physikochemischen Eigenschaften, Komplexbildung, den dynamischen Bereich, posttranslationale Modifikationen, ihre subzelluläre Lokalisation und kontextspezifische Bildung. Entsprechend vielfältig sind die methodischen Herausforderungen für die Proteomforschung hinsichtlich Probenvorbereitung einschließlich subzellulärer Fraktionierung, Trennung und Detektion von Proteinen/Peptiden, Massenspektrometrie (MS)-basierter Proteinanalyse, Proteinidentifizierung und quantitativer Proteomik. Methodische Konzepte und theoretische Hintergründe stellten L. Wöhlbrand *et al.* kürzlich zusammen [4].

Abbildung 1 zeigt den Ablauf der kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Umweltproteomik.

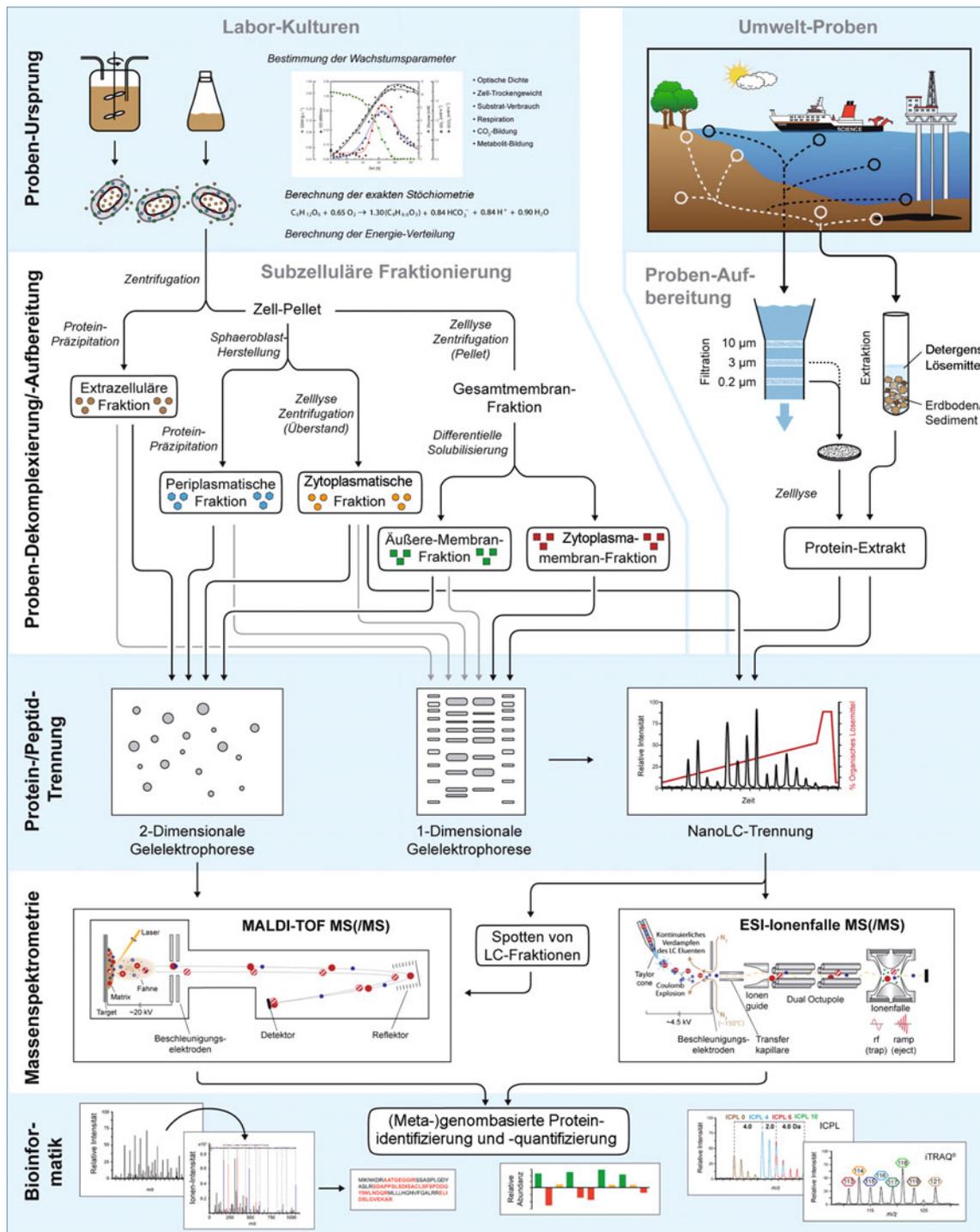
Probenvorbereitung

Reproduzierbarkeit und Effizienz der Probenvorbereitung sind grundlegend für Erfolg und Verlässlichkeit von Proteomanalysen. Während bei Laborkulturen beispielsweise Heterogenität in Morphologie oder Wachstumsphasen eine Rolle spielt, liegen die Herausforderungen im Fall von Umweltproben bei der niedrigen Zellzahl und Abtrennung unerwünschter Begleitorganismen bzw. -stoffe. Weitere wichtige Schritte, um die Komplexität der Probe zu verringern (Dekomplexierung), sind Zellaufschluss, subzelluläre Fraktionierung und Proteinsolubilisierung.

Trennung und Detektion von Proteinen

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) ist die höchstauflösendste Trenntechnik für lösliche Proteine. Membranproteine lassen sich aufgrund ihrer Hydrophobizität besser mittels klassischer SDS-PAGE separieren. Die Verwendung milder Detergenzien ermöglicht die elektrophoretische Trennung nativer Membranprotein(komplex)e mittels BN(*blue native*)-PAGE. Als Goldstandard für die quantitative Untersuchung von Proteomsignaturen hat sich die auf Fluoreszenzfarbstoffen basierende 2D-DIGE (differenzielle Gelelektrophorese) erwiesen [5]. 2D-DIGE könnte künftig weitere Verbreitung finden, wenn hochpreisige und wartungsintensive Laserscanner zur Digitalisierung der Gele durch digitalkamerabasierte Systeme ersetzt werden.

Gelfreie, LC(*liquid chromatography*)-basierte Trennmethoden kommen vor allem auf Peptidebene, bei Membranproteinen und *whole cell shotgun*-Analysen zum Einsatz. Meist werden nanoLC-Systeme (mit Flussraten von etwa 300 Nanoliter pro Minute) mit *reversed phase*-Trennsäulen verwendet. Peptidtrennung mittels nanoLC kann *on-line* an ESI-MS (Massenspektrometrie) und *off-line* an MALDI-TOF-MS gekoppelt werden. Durch multidimensio-



◀ **Abb. 1:** Proteomik-Werkzeuge in der Umweltmikrobiologie. Bei Laborkulturen wird durch subzelluläre Fraktionierung (für Gram-negative Bakterien beispielhaft gezeigt) die Probenkomplexität reduziert. Bei Umweltproben liegt das Hauptaugenmerk zunächst auf ausreichender Probenmenge und Reduzierung der Probenheterogenität. Unabhängig von der Probenquelle erfolgt die Dekomplexierung von Proteingemischen auf Protein- oder Peptidenebene durch gelbsierte oder gefreie Trennmethode. In Abhängigkeit von Ursprung und Art der zu untersuchenden Protein-/Peptidprobe werden passende massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Die Identifizierung bzw. Quantifizierung der Proteine erfolgt schließlich mithilfe bioinformatischer Methoden. Modifiziert nach [4].

nale LC auf Basis zweier oder mehrerer unterschiedlicher Trennprinzipien ist Hochauflösung erreichbar; ein häufig verwendetes Verfahren ist dabei die Kopplung von SDS-PAGE und *reversed phase*-nanoLC, die GeLC.

Massenspektrometrie-basierte Analyse von Proteinen

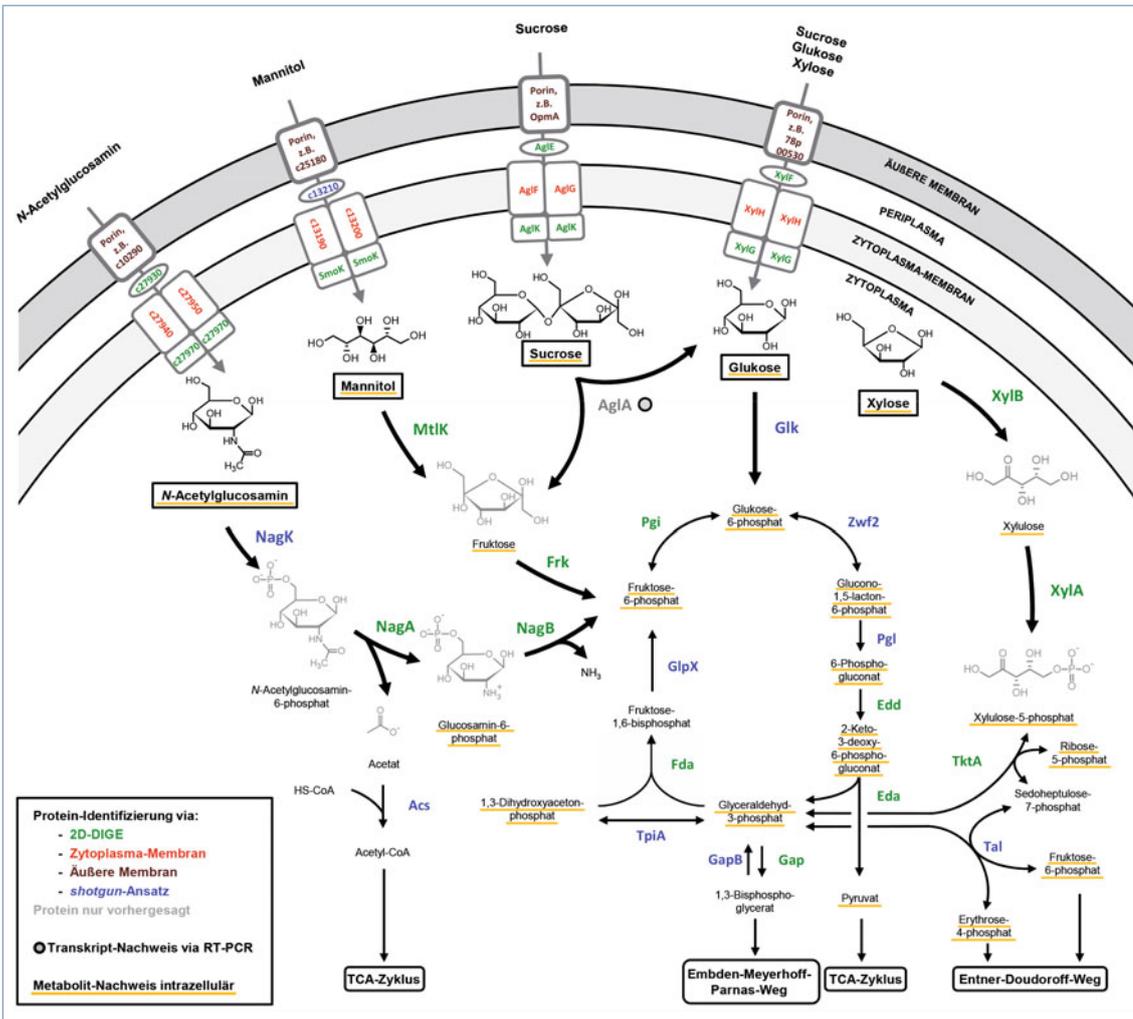
Massenspektrometer gehören zu den zentralen Proteomik-Technologien, seit weiche Ionisierungsmethoden die Überführung von Peptiden und Proteinen in die Gasphase ermög-

lichen. Die hohe m/z (Masse-zu-Ladung-Verhältnis)-Auflösung moderner MS-Geräte bildet die Grundlage für eine zuverlässige Proteinidentifizierung.

Die wichtigsten Ionisierungsmethoden sind MALDI (*matrix-assisted laser-desorption/ionization*) und ESI (*electrospray ionization*). Im Fall von MALDI werden die Peptide mit einer UV-absorbierenden Matrix ko-kristallisiert und durch Laserbeschuss (im UV-Bereich) ionisiert. Bei ESI wird eine wässrige Peptidlösung über eine feine Nadel und unter Hoch-

spannung versprüht; durch anschließende Verdunstung der gebildeten Analyttröpfchen nehmen die Peptide Ladung auf.

MALDI-TOF-MS ist weitverbreitet und besitzt hohe Massengenauigkeit und Empfindlichkeit. Nach Ionisierung durch MALDI erfolgt die Trennung der geladenen Peptide nach Beschleunigung im Hochvakuum durch einen TOF (*time-of-flight*)-Massenanalysator. Durch Tandem-MS lassen sich Peptidfragmentationen erzeugen und analysieren. Eine weitverbreitete Anwendung von MALDI-TOF-



◀ **Abb. 2:** Kataboles Netzwerk von *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 für die Verwertung ausgewählter Kohlenhydrate. Die Komplementarität der eingesetzten proteomischen Methoden ermöglichte eine nahezu vollständige Abdeckung des Netzwerks, ergänzt durch metabolische Daten (AG Schomburg, TU Braunschweig). Modifiziert nach [10].

MS ist die Analyse 2DE-separierter Proteine. Durch *off-line*-Kopplung an eine nanoLC können jedoch auch hoch komplexe Proben untersucht werden.

Die ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (*on-line* gekoppelt an eine nanoLC) werden typischerweise für die Untersuchung komplexer Proben eingesetzt. Zunächst werden Ionen aller *m/z* in der Falle gehalten und oszilliert. Zur Massenanalyse werden Ionen mithilfe einer *m/z*-abhängigen *rf* (radio frequency)-Spannung aus der Falle in den Analysator befördert. Eine Einschränkung von nanoLC-ESI-MS ist die Begrenzung auf etwa 10 bis 20 MS/MS-Spektren wegen des Zeitbedarfs pro MS/MS-Scan und des sich ständig verändernden LC-Eluentens. Die Möglichkeit zur Fragmentierung von Fragmentationen (*MSⁿ*) ist nützlich für die Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen. Orbitrap-Massenspektrometer sind Ionenfallen, bei denen ein konstantes elektrostatisches Potenzial eingesetzt wird und die sich durch eine hohe Auflösung auszeichnen. ESI-quadrupole-TOF-MS/MS-Geräte kombinieren die effiziente kon-

tinuierliche Ionisierung durch ESI mit der hohen Leistung von TOF-Analysatoren.

Identifizierung von Proteinen

In Abhängigkeit von der instrumentellen Massenauflösung und -genauigkeit liefert die MS-Analyse von Peptiden Informationen über deren Masse (PMF, Peptidmassen-Fingerprint) oder Aminosäuresequenz (PFF, Peptidfragment-Fingerprint). Die Proteinidentifizierung basiert auf dem Abgleich der experimentell bestimmten PMF/PFF mit auf Basis von Genomsequenzen berechneten Werten. Gängige bioinformatische Suchmaschinen sind beispielsweise Mascot und Sequest.

Quantitative Proteomik

Für differenzielle Proteomik ist die quantitative Bestimmung von kontextabhängigen Unterschieden in der Proteinabundanz von zentraler Bedeutung. Neben der gelbasierten DIGE-Methode wurden mehrere gelfreie, auf Isotopenmarkierung basierende Methoden entwickelt. Im Fall von SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) erfolgt

die Isotopenmarkierung (Aminosäuren) der Proteine während des Wachstums der Kulturen. Bei ICAT (*isotope-coded affinity tag*) und ICPL (*isotope-coded protein label*) werden die präparierten intakten Proteine mit Markern unterschiedlicher Massen markiert. Bei iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*) erfolgt die Markierung erst auf Peptidebene. Im Fall von SRM (*selected reaction monitoring*) geschieht die absolute Quantifizierung bereits bekannter Peptide (hinsichtlich Identität, Trenn- und Fragmentierungsverhalten) mithilfe synthetischer, markierter Peptide als interne Standards. Bei der markierungsfreien Quantifizierung werden die Peptidproben nicht gemischt, sondern einzeln analysiert. In der mikrobiellen Ökologie ist SIP (*protein stable isotope probing*) eine neue Methode, um metabolisch relevante Mitglieder von Bakteriengemeinschaften zu identifizieren.

Die hier skizzierten Methoden erlauben bereits detaillierte proteomische Untersuchungen von kultivierten Bakterien wie auch von Umweltproben. Künftige Verbesserungen

von Massenauflösung und Analysegeschwindigkeit der MS-Geräte sowie bei Trennverfahren und bioinformatischen Methoden versprechen weitere Fortschritte bei der Erfassung des gesamten Proteoms, von Proben mit geringer Biomasse und MS-basierter Quantifizierung.

Forschungsbeispiele

Wir untersuchten drei wichtige Schaltstellen des mikrobiellen Abbaus organischer Materie, die durch die Häufigkeit bzw. chemische Stabilität der Substrate definiert werden: Aminosäuren und Kohlenhydrate durch aerobe Heterotrophe (z. B. *Phaeobacter inhibens* DSM 17395), Fermentationsendprodukte durch vollständig oxidierende Sulfatreduzierer (z. B. *Desulfobacterium autotrophicum* HRM2) sowie Aromaten und Kohlenwasserstoffe durch Denitrifizierer (z. B. „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1) und Sulfatreduzierer (z. B. *Desulfobacula toluolica* Tol2). Der Proteogenomik kommt eine zentrale Rolle zu, da sie molekular-funktionale Einblicke in Umweltbakterien ermöglicht, für die in der Regel (noch) kein genetisches System zur Verfügung steht. Als Überblick sei auf aktuelle Übersichtsartikel verwiesen [1, 2], sodass im Folgenden nur einzelne Aspekte kurz und beispielhaft vorgestellt werden.

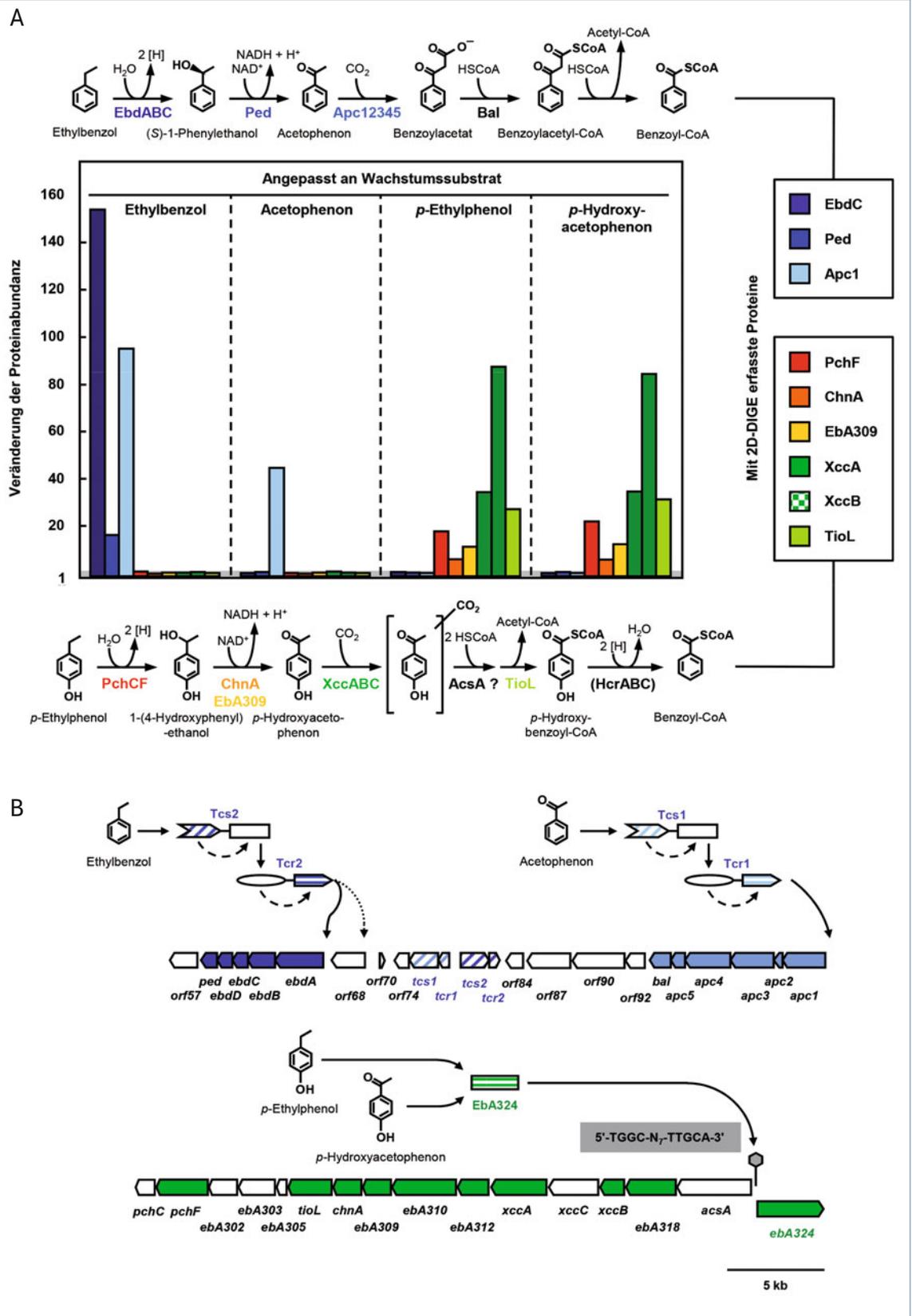
Das aerobe Alphaproteobakterium *P. inhibens* DSM 17395 ist ein versatiler Modellorganismus der Roseobacter-Gruppe, die zu den wichtigsten Komponenten des Bakterioplanktons in den Weltmeeren zählt. Aktuelle Arbeiten mit *P. inhibens* DSM 17395 befassen sich mit den molekularen Grundlagen des Habitat-Erfolgs dieser wichtigen Gruppe mariner Bakterien: Anpassung an komplexe Nährstoffbedingungen [6, 7], subzelluläre Proteomik [8] und Rekonstruktion kataboler Netzwerke [9, 10]. In **Abbildung 2** ist die proteogenomisch-metabolomische Rekonstruktion des katabolen Netzwerks für ausgewählte (Habitat-relevante) Kohlenhydrate dargestellt; die Kombination verschiedener proteomischer Methoden war entscheidend für eine nahezu vollständige Abdeckung. Insgesamt führten die bisherigen differenziell proteomischen Arbeiten mit *P. inhibens* DSM 17395 zu einer Reannotation von ca. 200 Genen (inklusive vieler mit bislang unbekanntem Funktionen), was

den Nutzen der Proteogenomik *sensu strictu* widerspiegelt.

Für das Sulfat-reduzierende Deltaproteobakterium *Desulfobacula toluolica* Tol2 wurde vor Kurzem das vollständige Genom (5,2 Megabasen) sowie relevante metabolische und subzelluläre Subproteome bestimmt [11]. Aus diesen Daten ließen sich detaillierte Netzwerke für Substratoxidation (zu CO₂) sowie für Membran- und Zytoplasma-lokalisierten Elektronentransport rekonstruieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass die *p*-Cresol-aktivierende Hydroxybenzylsuccinat-Synthase (Hbs) einen neuen Ast im Stammbaum der Aryl- und Alkylsuccinat-Synthasen repräsentiert (siehe unten). Der Phenylalaninabbau (via nicht-oxidativer Desaminierung) könnte für *Desulfobacula*-Phylotypen in C_{org}-reichen Sauerstoff-Minimum-Zonen von Bedeutung sein, wie sie typisch für Auftriebsgebiete sind (z. B. vor der Küste von Namibia).

Das denitrifizierende Betaproteobakterium „*A. aromaticum*“ EbN1 ist ein gut untersuchter Modellorganismus für den anaeroben Abbau aromatischer Verbindungen [2]. Durch differenzielle Proteogenomik wurden beispielsweise die anaeroben Abbauege für Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol etabliert und ein hohes Maß an substratspezifischer Regulation beobachtet (**Abb. 3**). Die beiden „Ethylbenzol“-Operons werden offensichtlich sequenziell durch zwei Zwei-Komponenten-Sensor/Regulator-Systeme (spezifisch für Ethylbenzol bzw. das Intermediat Acetophenon) reguliert [12]. Für die Expressionskontrolle des „*p*-Ethylphenol“-Operons wird hingegen ein einzelner σ⁵⁴-abhängiger Regulator (EbA324) vorgeschlagen [13]. Molekulargenetische kombiniert mit strukturellen Folgestudien zeigten, dass die vorhergesagte Dehydrogenase ChnA (jetzt Hped) verantwortlich für den (*R*-spezifischen) zweiten Reaktionsschritt im anaeroben Abbau von *p*-Ethylphenol ist [14]. Darüber hinaus konnte die vorhergesagte Regulatorfunktion von EbA324 (jetzt EtpR) durch *in-frame*-Deletion und Komplementation bestätigt werden (J. Büsing, L. Wöhlbrand, R. Rabus, unveröffentlicht). Folgeforschung mit „*A. aromaticum*“ EbN1 soll zunehmend auf systembiologischer Ebene stattfinden und sich u. a. Fragen nach der sensorischen Erkennung

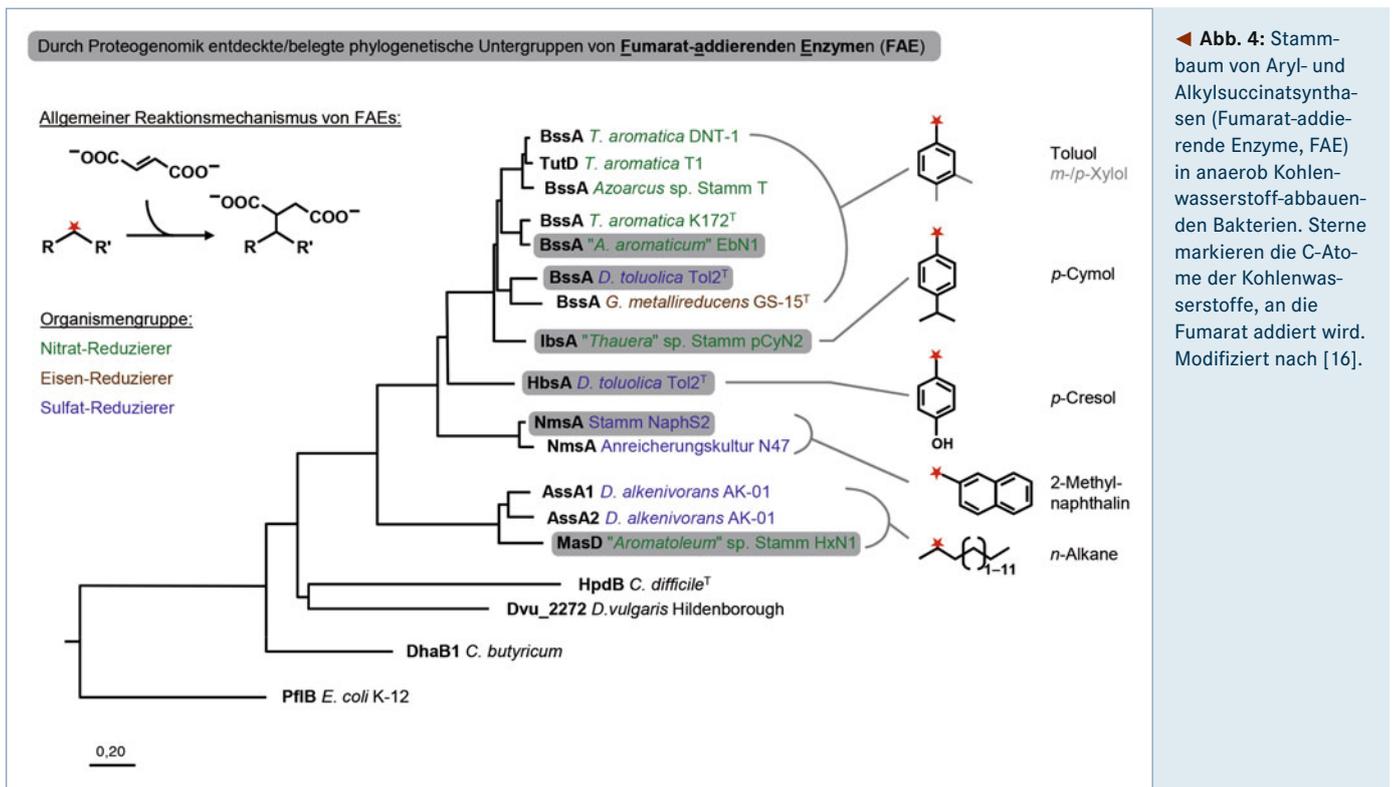
► **Abb. 3:** Substrat-spezifische Regulation des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und *p*-Ethylphenol im denitrifizierenden Betaproteobakterium „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. **A**, Abbauwege und substratspezifische Proteinprofile (mittels 2D-DIGE bestimmt). **B**, Beteiligte Gencluster, Sensor/Regulatorproteine und vorgeschlagene Kontrolle der Genexpression. Modifiziert nach [1].



nung bzw. Unterscheidung strukturell ähnlicher Substrate, der Modulation des katabolen Netzwerks sowie der generellen Wachstumskontrolle bzw. Energieverteilung widmen [2].

In den letzten Jahren hat die proteogenomische Untersuchung von neu isolierten Umweltbakterien maßgeblich dazu beigetragen, die weite Verbreitung von Aryl- und Alkylsuccinat-Synthasen (Fumarat-addie-

rende Enzyme, FAEs) im anaeroben Abbau von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen zu erkennen. Die Phylogenie der katalytischen Untereinheiten zeigte darüber hinaus ein substratspezifisches Ver-



zweigungsmuster dieser Enzyme (**Abb. 4**). Letzteres ist eine wichtige Grundlage für die funktionale Interpretation der Verbreitung der codierenden Gene im Habitat, wie sie durch moderne *Meta-Omics* untersucht wird [15]. Somit dient die Proteogenomik nicht nur dazu, das metabolisch/physiologische Verständnis von Modellorganismen zu verbessern, sondern auch dazu, validierte funktionale Marker für Habitat-orientierte Studien bereitzustellen. ■

Literatur

- [1] Rabus R (2014) Fifteen years of physiological proteo(gen)omics with (marine) environmental bacteria. *Arch Physiol Biochem* 120:173–187
- [2] Rabus R, Trautwein K, Wöhlbrand L (2014) Towards habitat-oriented systems biology of „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. Chemical sensing, catabolic network modulation and growth control in an anaerobic aromatic compound degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:3371–3388
- [3] Teeling H, Fuchs BM, Becher D et al. (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* 336:608–611
- [4] Wöhlbrand L, Trautwein K, Rabus R (2013) Proteomic tools for environmental microbiology – a roadmap from sample preparation to protein identification and quantification. *Proteomics* 13:2700–2730
- [5] Rabus R (2012) An overview of 2D DIGE analysis of marine (environmental) bacteria. In: Cramer R, Westermeier R (Hrsg) *Difference gel electrophoresis (DIGE): Methods and Protocols*. *Methods Mol Biol* 854:355–370, Springer Science+Business Media
- [6] Zech H, Hensler M, Koßmehl S et al. (2013) Adaptation of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 to growth with complex nutrients. *Proteomics* 13:2851–2868
- [7] Zech H, Hensler M, Koßmehl S et al. (2013) Dynamics of amino acid utilization in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. *Proteomics* 13:2869–2885
- [8] Koßmehl S, Wöhlbrand L, Drüppel K et al. (2013) Subcellular protein localization (cell envelope) in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395. *Proteomics* 13:2743–2760
- [9] Drüppel K, Hensler M, Trautwein K et al. (2014) Pathways and substrate-specific regulation of amino acid degradation in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 (archetype of the marine *Roseobacter* clade). *Environ Microbiol* 16:218–238
- [10] Wiegmann K, Hensler M, Wöhlbrand L et al. (2014) Carbohydrate catabolism in *Phaeobacter inhibens* DSM 17395, member of the marine *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microbiol* 80:4725–4737
- [11] Wöhlbrand L, Kube M, Mussmann M et al. (2013) Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Environ Microbiol* 15:1334–1355
- [12] Kühner S, Wöhlbrand L, Hufnagel P et al. (2005) Substrate-dependent regulation of anaerobic ethylbenzene and toluene metabolism in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J Bacteriol* 187:1493–1503
- [13] Wöhlbrand L, Wilkes H, Halder T et al. (2008) Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by „*Aromatoleum aromaticum*“ strain EbN1: pathway, involved proteins and regulation. *J Bacteriol* 190:5699–5709
- [14] Büsing I, Höffken W, Breuer M et al. (2015) Molecular genetic and crystal structural analysis of 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol dehydrogenase from „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* (im Druck)
- [15] von Netzer F, Pilloni G, Kleindienst S et al. (2013) Enhanced gene detection assays for fumarate-adding enzymes allow uncovering of anaerobic hydrocarbon degraders in terrestrial and marine systems. *Appl Environ Microbiol* 79:543–552
- [16] Strijkstra A, Trautwein K, Jarling R et al. (2014) Anaerobic activation of *p*-cymene in denitrifying Betaproteobacteria: methyl group hydroxylation versus addition to fumarate. *Appl Environ Microbiol* 80:7592–7603

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ralf Rabus
 AG Allgemeine und Molekulare Mikrobiologie
 Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM)
 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
 Carl-von-Ossietzky-Straße 9–11
 D-26111 Oldenburg
 Tel.: 0441-798-3884
 Fax: 0441-789-3404
 rabus@icbm.de

AUTOR



Ralf Rabus

Jahrgang 1966. Biologiestudium an der LMU München. 1995 Promotion. 1995–1996 Postdoc am Max-Planck-Institut (MPI) für marine Mikrobiologie, Bremen. 1997–1999 Postdoc an der University of California, San Diego (UCSD), USA. 1999–2006 Wissenschaftler am MPI für marine Mikrobiologie, Bremen. 2002 Habilitation im Fach Mikrobiologie. Seit 2006 Professor und Leiter der AG Allgemeine und Molekulare Mikrobiologie am Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM) der Universität Oldenburg.