

Heme *b* abundance in marine particulate material
and heme *b* utilization and regulation patterns in
marine phytoplankton

Dissertation

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MATHEMATISCH - NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

EVANGELIA LOUROPOULOU

KIEL, JUNI 2019

1. Gutachter: Prof. Ruth Schmitz-Streit

2. Gutachterin: Prof. Eric Achterberg

Disputationsdatum: 18.09.2019

Zum Druck genehmigt

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Summary

Iron (Fe) is an essential micro-nutrient for all organisms in general, including marine phytoplankton, because it is a key component of biomolecules that participate in fundamental biological processes. One of the most biologically important groups of Fe biomolecules are hemes. Hemes consist of a tetrapyrrole ring (porphyrin) and a centrally coordinated Fe atom. Heme *b* (Fe-protoporphyrin IX) is considered the most common heme in marine phytoplankton and accounts for 20% of the intracellular Fe inventory. Heme *b* is involved in photosynthesis, respiration and nitrate assimilation in marine phytoplankton. In open-ocean surface waters, the concentrations of dissolved Fe can be very low thus not sufficient to sustain phytoplankton growth. Hence, Fe limitation leads to decreases in photosynthesis and nitrogen fixation (i.e. reduction of atmospheric di-nitrogen to biologically accessible forms of nitrogen) rates of phytoplankton as well as to lack of heme-bound-Fe, so called “*Anemia*”. We know that heme *b* concentrations in phytoplankton typically decline with low Fe supply, but the physical, chemical or biological processes driving heme *b* abundance in the ocean are still uncertain.

This PhD project investigates the impact of Fe limitation i) on heme *b* abundance in phytoplankton and marine particulate matter, and ii) on the production, utilization and degradation processes of heme *b* by field work and laboratory experiments. The main research questions driving this work are 1) Can heme *b* be used as a proxy of Fe limitation in field phytoplankton populations? 2) Is phytoplankton able to regulate their heme *b* pool to reduce Fe requirements under Fe limitation? 3) Does heme *b* regulation originate from a modification in the gene expression of proteins involved in its cycling?

The main findings of this study were the following:

- Sampling in the subpolar North Atlantic showed that changes in the abundance of heme *b* were mainly linked to changes in the biomass. A decoupling from the biomass-driven abundance occurred in Irminger Basin where heme *b* was low despite an elevated biomass. Comparison of the Irminger Basin to the Iceland Basin showed that dissolved-Fe concentrations were similar in these two areas and that Fe was not depleted. However, large diatoms dominated in the Irminger Basin and smaller-sized prymnesiophytes were mostly abundant in the Iceland Basin. Thus, heme *b* depletion in Irminger Basin was considered to be a regulatory response of the diatoms expressed by reduction of heme-Fe because of their size related higher Fe requirement. Similar patterns were observed in the past in prymnesiophyte populations, hence heme *b* depletion and regulation is not a class- or species-specific response but rather depends on the individual Fe requirements of each phytoplankton class. Reduction and regulation of heme *b* may thus occur in declining phytoplankton populations during the shifts from larger to smaller sized species.

- The systematic investigation of heme *b* abundance in different oceanographic regions of the Atlantic Ocean showed that heme *b* relative to biomass (as indicated by particulate organic carbon) was consistently low in areas characterized by low Fe supply (i.e. seasonally Fe limited Irminger Basin and the Subtropical South Atlantic gyre). Thus, this ratio gave a reliable indication of Fe-limited phytoplankton communities *in situ*. In addition, comparison of the measured to simulated heme *b* concentrations indicated that heme *b* could account for 0.17 to 9.1 % of the total biogenic Fe.
- Laboratory experiments in the two diazotroph species *Cyanothece* and *Trichodesmium* showed that low Fe supply restricted the production of heme *b* in both species since the abundance of protoporphyrin-IX (heme *b* precursor) declined under Fe limitation. Under Fe limitation, *Trichodesmium* reduced the overall Fe requirements by allocating the available Fe into the heme *b*-containing cytochrome *b_{6f}* and by reducing the nitrogenase production which thus resulted in declines in nitrogen fixation activity. *Cyanothece* also increased the utilization of heme *b* under Fe limitation, which however was not linked to increases in the cytochrome *b_{6f}*. Furthermore, heme oxygenase (HO), which catalyzes the degradation of heme *b*, remained downregulated under Fe limitation in both species. Interestingly, the transcripts of a second HO in *Cyanothece* increased under Fe limitation and were accompanied by an enhancement of the heme *b* relative to biomass ratios.

Overall this PhD project demonstrated that heme *b* depletion is a good indicator of Fe limited phytoplankton. Therefore, heme *b* concentrations and ratios relative to biomass can be used for mapping Fe limited areas in field studies. Furthermore, this study illustrated that many phytoplankton groups (diatoms, haptophytes and diazotrophs) are able to regulate their heme *b* pool as a response to Fe limitation in order to maintain their growth and activity, potentially via localization of Fe to non-heme Fe-proteins. It appears that there are diverse mechanisms for regulating the heme *b* pool including modifications in the production, utilization and degradation processes. This study documented that up- or downregulation of the genes encoding HO can be of primary importance for controlling heme *b* intracellular levels. Finally, the upregulation of a HO in *Cyanothece* raises the hypothesis of an existence of Fe acquisition mechanisms by prokaryotes either via internal Fe recycling or via breakdown of extracellular hemes.

This study contributes to the understanding of how the available Fe is utilized in the heme *b* pool of phytoplankton and provides information on the molecular adaptation capability of diverse phytoplankton groups to Fe limitation. This information is particularly useful for assessing phytoplankton's status in dynamically changing oceanic environments and specifically in the Atlantic Ocean because of the projected changes in atmospheric dust deposition from the Sahara desert. Knowledge of phytoplankton adaptation mechanisms can thus help us predict the implications of changing Fe supply on key biogeochemical processes in the ocean (e.g. carbon fixation, nitrogen fixation).

Zusammenfassung

Eisen ist ein essentieller Mikronährstoff für alle lebendigen Organismen der Erde, einschließlich des marinen Phytoplanktons, da Eisen in Biomolekülen eine Schlüsselrolle für grundlegende biologische Prozesse spielt. Eine der biologisch wichtigsten Gruppen von Eisen-Biomolekülen sind Häme. Häme bestehen aus einem Tetrapyrrolring (Porphyrin) und einem zentral koordinierten Eisen-Atom. Häm *b* (Fe-Protoporphyrin IX) gilt als das am häufigsten vorkommende Häm im marinen Phytoplankton und es beträgt 20% des intrazellulären Eiseninventars. Häm *b* ist an der Photosynthese, Zellatmung und Nitratassimilation im marinen Phytoplankton beteiligt. In der Oberflächenschicht des Ozeans können die Eisenkonzentrationen niedrig sein, was zu einer Limitierung des Phytoplanktonwachstums führen kann. Diese Eisenlimitierung führt zu einer Abnahme der Photosyntheseleistung und der Stickstofffixierung (d.h. Reduktion des atmosphärischen Distickstoffs zu biologisch zugänglichen Stickstoffformen) von Phytoplankton sowie zu einem Mangel an Häme-Eisen, der sogenannten "Anämie". Es ist allgemein bekannt, dass die Häm *b* Konzentration in Phytoplankton unter geringer Eisenverfügbarkeit abnimmt, aber bis jetzt sind die physikalischen, chemischen oder biologischen Prozesse, die diese Abnahme verursachen noch unbekannt.

Diese Dissertation untersucht die Auswirkungen der Eisenlimitierung auf Häm *b* Konzentrationen in Phytoplankton und auf die Bildungs-, Verarbeitungs- und Abbauprozesse von Häm *b* in Feld- und Laborexperimenten. Die wichtigsten Forschungsfragen, die diese Arbeit antreiben, sind 1) Kann Häm *b* als Proxy für die Eisenlimitierung von verschiedenen Phytoplanktongruppen im Ozean verwendet werden? 2) Ist Phytoplankton in der Lage ihren Häm *b* Pool zu regulieren, um den Eisenbedarf unter Eisenmangel zu reduzieren? 3) Reguliert Phytoplankton seine Häm *b* Konzentration durch eine Änderung der Gen-Expression der Proteine, die am Häm *b* Zyklus beteiligt sind?

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie waren die folgenden:

- Die Probenahme im subpolaren Nordatlantik zeigte, dass Häm *b* Konzentrationen positiv mit der Biomasse korrelieren. Eine Entkopplung hiervon erfolgte im Irminger Becken, wo trotz hoher Biomasse-Werte die Häm *b* Konzentrationen niedrig waren. Ein Vergleich des Irminger Beckens mit dem Island Becken zeigte, dass hier gelöste Eisenkonzentrationen ähnlich waren und dass keine Eisenlimitierung vorlag. Im Irminger Becken dominierten jedoch große Kieselalgen und im Island Becken waren kleinere Prymnesiophyten am häufigsten vorhanden. Die Kieselalgen im Irminger Becken regulierten ihre Häm *b* Konzentration aufgrund ihres größenbedingten höheren Eisenbedarfs herunter, was zu einer Konzentrationsabnahme des Häm-Eisen Komplexes führte. Häm *b* Limitierung und Regulierung sind keine klassen- oder artenspezifische Eigenschaften, sondern sie

hängen von dem individuellen Eisenbedarf jeder Phytoplanktonklasse ab. Bei dem Übergang von Kieselalgen zu Prymnesiophyten als dominante Phytoplanktongruppen, kann Reduktion und Regulierung von Häm *b* in der schwindenden Kieselalgenpopulation auftreten.

- Systematische Untersuchungen der Häm *b* Konzentrationen in verschiedenen ozeanographischen Regionen des Atlantiks zeigten, dass das Verhältnis von Häm *b* zur Biomasse (d.h. partikulärer organischer Kohlenstoff) in Gebieten des Atlantiks konstant niedrig war, die durch eine geringe Eisenkonzentration charakterisiert waren (d.h. im saisonal Eisenlimitierten Irminger Becken und im subtropischen südatlantischen Strömungswirbel). Das Häm *b* zu Biomasse Verhältnis ist ein zuverlässiger Indikator für Eisenlimitierung im Ozean für verschiedene Phytoplanktongruppen. Darüber hinaus ergab sich aus gemessenen und mit den in einem Model simulierten Häm *b*-Konzentrationen, dass Häm *b* circa 0,17 bis 9,1 % des gesamten biogenen Eisens im Ozean ausmachen kann.
- Laborversuche mit zwei diazotrophen Phytoplanktonarten *Cyanothece* und *Trichodesmium* zeigten, dass eine geringe Eisenkonzentration die Bildung von Häm *b* in beiden Arten einschränkte, da die Protoporphyrin-IX Konzentration (Häm *b* Vorprodukt) unter Eisenlimitierung abnahm. Unter Eisenmangel reduzierten *Trichodesmia* den gesamten Eisenbedarf, indem sie das verfügbare Eisen dem im Häm *b* enthaltenden Cytochrom *b_{6f}* zuführten und die Nitrogenaseproduktion unterdrückten. Das letztere führte zu einem Rückgang der Stickstofffixierung. *Cyanothece* erhöhte die intrazelluläre Häm *b* Konzentration unter Eisenlimitierung, was jedoch nicht im Zusammenhang steht mit einem Anstieg der Cytochrom *b_{6f}* Konzentrationen in den Zellen. Darüber hinaus war die Bildung von Hämoxygenase (HO), die den Abbau von Häm *b* katalysiert, bei beiden Arten unter Eisenlimitierung unterdrückt. Überraschenderweise nahmen die Transkripte einer zweiten HO in *Cyanothece* unter Eisenlimitierung zu und führte zu einer Verbesserung des Häm *b* zu Biomasse Verhältnisses.

Zusammenfassend hat diese Dissertation gezeigt, dass geringe Häm *b* Konzentrationen ein guter Indikator für Eisenlimitierung in Phytoplankton ist. Folglich könnten Häm *b*-Konzentrationen und das Häm *b* zu Biomasse Verhältnis zur Kartierung von eisenlimitierten Gebieten verwendet werden. Darüber hinaus hat diese Studie gezeigt, dass viele Phytoplanktonklassen (Kieselalgen, Haptophyten und Diazotrophen) in der Lage sind, ihr Häm *b* Inventar als Reaktion auf die Eisenlimitierung zu regulieren, um damit ihr Biomasse-Wachstum und ihre biologische Aktivität aufrechtzuerhalten, indem das knapp vorhandene Eisen nur überlebenswichtigen Proteinen zugewiesen wird. Es scheint, dass es verschiedene Mechanismen zur Regulierung des Häm *b*-Pools gibt, einschließlich Anpassungen in den Bildungs-, Verarbeitungs- und Abbauprozessen. Diese Studie zeigt, dass die Regulierung des Genpools, die die HO kodieren, von primärer Bedeutung für die Kontrolle des intrazellulären Häm *b* Levels sein kann. Schließlich wirft die Hochregulation der HO in *Cyanothece* die Frage auf, ob es weitere

Eisen-Akquisitionsmechanismen von Prokaryonten gibt, entweder über internes Eisenrecycling oder über den Abbau von extrazellulären Hämen.

Diese Studie trägt zum Verständnis bei, wie das verfügbare Eisen im Häm *b* Pool genutzt wird, und liefert Informationen über die molekularen Anpassungsmöglichkeiten verschiedener Phytoplanktongruppen auf Eisenmangel. Diese Informationen sind besonders wertvoll, um die Reaktion von Phytoplankton auf sich dynamisch verändernde Bedingungen im Ozean abzuschätzen. Hierzu zählt insbesondere der Atlantische Ozean, der unter dem Einfluss eines sich veränderenden atmosphärischen Eintrags von Staub aus der Sahara steht. Dieses vertiefte Wissen über Adaptionsmechnismen von Phytoplankton kann uns helfen, die Auswirkungen einer veränderten Eisenverfügbarkeit für wichtige biogeochemische Prozesse im Ozean (z.B. Kohlenstofffixierung, Stickstofffixierung) vorherzusagen.