

VU Research Portal

A step towards the molecular detection of life on Mars

Oliveira Lebre Direito, M.S.

2012

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Oliveira Lebre Direito, M. S. (2012). *A step towards the molecular detection of life on Mars*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Op weg naar de moleculaire detectie van leven op Mars

De ontdekking van organismen in extreme milieus op Aarde heeft onze kijk op het leven drastisch veranderd en de verwachtingen voor het vinden van leven buiten onze planeet naar boven bijgesteld. Naast het feit dat we weten dat er leven aanwezig is in extreme milieus, weten we ook dat dit leven zeer divers is. Onze buurplaneet Mars is het belangrijkste doel geworden in onze speurtocht naar buitenaards leven. Een aantal ontdekkingsmissies met robots staan op stapel en een paar van robots bevinden zich zelfs al op Mars. Deze missies gaan ter plekke monsters analyseren en in de toekomst monsters mee terug nemen.

Dit proefschrift gaat het gebied van planetair onderzoek en astrobiologie aan. Het betreft de ontwikkeling, evaluatie en optimalisatie van extractie- en amplificatiemethodes voor biomarkers, met de nadruk op het detecteren van nucleïnezuren, inclusief types daarvan die afwijken van de momenteel bekende vormen op Aarde. Voor het onderzoek in dit proefschrift is gebruik gemaakt van microbiel-ecologische moleculaire technieken, omdat deze belangrijk zijn bij het evalueren van mogelijk uitgestorven of nog steeds aanwezig leven op Mars. De nadruk ligt op complexe moleculen welke erfelijke informatie bevatten, zoals DNA (deoxyribonucleic acid), omdat alle vormen van leven deze moleculen bevatten. Het voordeel van het gebruik van deze moleculen als biomarkers is dat ze gemakkelijker te amplificeren zijn waardoor detectie op het niveau van enkele moleculen mogelijk is. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek omvat zowel fundamenteel onderzoek als methode ontwikkeling.

Hoofdstuk 1 bevat een inleiding op dit proefschrift die relevante onderwerpen toelicht, zoals de chemie van het leven, de zoektocht naar buitenaards leven met de nadruk op

Mars. Hij geeft ook een beeld van de planeet Mars, alsmede een beschrijving van de beschikbaarheid van energie- en koolstofbronnen en van vloeibaar water. Moleculen die indicatief zijn voor het leven (biomarkers), selectie van nucleïnezuren als biomarkers, problemen in hun detectie, niet-nucleïnezuur gebaseerde detectiemethoden, en de relevantie van het bestuderen van plaatsen op Aarde die lijken op plekken op Mars, komen ook allemaal aan de orde in dit hoofdstuk.

Hoofdstuk 2 beschrijft een studie van een extreem milieu op Aarde dat voor een Mars analagon doorgaat (het Mars Desert Research Station in Utah), met mineraalsamenstellingen en erosieprocessen vergelijkbaar met die op het oppervlak van Mars. Uit kweekonafhankelijke, op rRNA genen gebaseerde analyses van bodemonsters bleek dat het leven in deze extreme omgeving op Aarde divers is. In de meeste monsters werden Bacteriën gedetecteerd met een hoge alfa-en beta-diversiteit aan *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* en *Gemmatimonadetes*. De alfa-en beta-diversiteit van Archaea was erg laag. Een verscheidenheid aan eukaryoten werd geïdentificeerd, inclusief schimmels, groene algen en verschillende Protozoa. Een grote verscheidenheid aan veronderstelde extremofielen van de drie domeinen van het leven (Archaea, Bacteria en Eukarya) werd aangetroffen. De grote variatie over korte afstanden in het voorkomen en in de diversiteit van de soorten geeft de noodzaak aan van intensieve bemonstering, met veel monsters over korte afstand. Uit suppletie ('spiking') experimenten (dwz toevoeging van extern DNA) bleek dat er bij een aantal monsters een lage efficiëntie van DNA extractie was ten gevolge van adsorptie of degradatie. Hieruit bleek dat de DNA-extractie methoden nog verder geoptimaliseerd kunnen, en moeten, worden (in detail beschreven in hoofdstuk 3). Met betrekking tot toekomstige missies ter detectie op leven op Mars, geven de resultaten beschreven in dit hoofdstuk aan dat op elke locatie een hoge dichtheid van bemonstering essentieel is, evenals suppletie-experimenten om de extractieopbrengst van DNA uit Marsbodem vast te stellen.

De adsorptie van nucleïnezuren aan mineralen kan nadelige effecten hebben op de moleculaire microbiële ecologie studies, met name in omgevingen met lage biomassa, zowel op Aarde als op Mars. Hoofdstuk 3 richt zich op het verbeteren van de extractie van nucleïnezuren uit een scala van mineralen die relevant zijn voor zowel de Aarde als Mars. Kleimineralen, maar ook andere silicaten en niet-silicaten, hebben een zeer geringe extractie-efficiëntie (<1%) van toegevoegd DNA. Daarom werd de optimalisatie van de DNA extractiemethoden gericht op klei mineralen. Het meest efficiënt bleek een methode waarbij een geconcentreerde fosfaatoplossing (1 M fosfaat, 15% ethanol, gebufferd bij pH 8) bij de cellysis stap van het DNAextractieprotocol wordt gebruikt, om het DNA weg te concurreren van de adsorptieplaatsen. Deze methode verbeterde de DNA extractie-efficiëntie van kleimonsters tot 100-vuldig. Dit is van groot belang omdat klei kan worden beschouwd als een belangrijk doel voor de toekomstige Mars missies. Dit nieuwe protocol verbetert ook de DNA extractie van diverse andere minerale monsters, met behoud van reproduceerbare DGGE profielen. Deze methode bleek ook geschikt voor DNA met een laag molecuulgewicht (<1,5 kb). Het kan daarmee ook nuttig zijn voor onderzoek naar oud, of historisch DNA aangezien een dergelijk DNA de neiging heeft om te fragmenteren en degraderen. Dit kan ook relevant zijn voor Mars, want het leven op Mars zou uitgestorven kunnen zijn.

Aangezien mineralen zowel de microbiële samenstelling als de detectie daarvan kunnen beïnvloeden, werd er verder onderzoek uitgevoerd onder gebruikmaking van de geoptimaliseerde extractiemethode uit hoofdstuk 3. In hoofdstuk 4 is een *in situ* incubatie-experiment uitgevoerd, dat bestond uit het plaatsen van mineralen analoog aan mineralen die op Mars voorkomen, in een anaërobe, ijzer-reducerende aquifer in Banisveld (Boxtel, Nederland, EU). Deze omgeving diende als een analoog voor de Mars ondergrond en is rijk aan ijzer. Het belangrijkste doel was om de invloed van mineralen op microbiële gemeenschappen te bepalen. Dit experiment liet zien dat mineraalsamenstelling de structuur

van microbiële gemeenschappen beïnvloedt. In het bijzonder de beschikbaarheid van Fe(III) in de mineralen had een grote invloed op de gemeenschapstructuur. Geobacter soorten waren dominant in Fe(III)-rijke mineralen. Verschillen in bodemmineralen zullen bijdragen tot verschillen in microbiële gemeenschapstructuur van bodem en sediment monsters. In fosfaatrijke mineralen werd de hoogste diversiteit waargenomen en in kleirijke mineralen de geringste. Daarom is de mineraalsamenstelling van de Mars bodem een relevante factor bij het selecteren van locaties voor leven-detectie missies. Mineralen welke essentiële voedingsstoffen bevatten voor het leven, kunnen als mogelijke doelwitten fungeren.

In hoofdstukken 2-4 werden methoden gebruikt die op PCR (de polymerase kettingreactie) gebaseerd waren, maar alternatieven zijn gewenst voor de opsporing van leven omdat PCR sequentieinformatie vooraf vereist om de primers te definiëren, hetgeen nadelig is in de detectie van afwijkende nucleïnezuursequenties. Hoofdstuk 5 presenteert een systematische evaluatie van de vertekening (gerelateerd aan verschillen in GC-gehalte, DNA-integriteit en fragmentgrootte) geïntroduceerd door twee verschillende compleet-genoom amplificatie ('WGA') methoden bij het beoordelen van profielen van microbiële gemeenschappen. Voor deze beide methodes zijn geen gedefinieerde primers nodig. Een van de methodes wordt veel gebruikt (MDA - Multiple Displacement Amplification) en de andere is meer recent en een echte primer-vrije methode (pWGA - Whole Genome Amplification gebaseerd op primase). GC-gehalte, DNA-integriteit en grootte beïnvloeden de microbiële gemeenschapsprofielen. De vingerafdrukken van microbiële gemeenschappen gebaseerd op MDA, werden sterker beïnvloed door het GC-gehalte dan de pWGA-gebaseerde methode. DNA-fragmentatie interfereert ernstig met MDA en pWGA. pWGA amplificeerde licht DNA (<1,5 kb) niet, terwijl MDA inefficiënt was bij zulk DNA. De resultaten van pWGA waren meer vergelijkbaar met de resultaten verkregen door PCR en waren minder selectief voor soorten met een laag GC gehalte, terwijl toevoeging van synthetische primers noch

denaturatie vereist zijn bij deze methode. MDA is meer geschikt voor gefragmenteerd DNA. Hoofdstuk 5 bevat ook een discussie van de relevantie van vertekening die door de experimentele methode geïntroduceerd wordt, voor het detecteren van leven en voor andere moleculaire studies.

Hoofdstuk 6 is een algemene discussie van de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift en hoe deze bijdragen aan de zoektocht naar leven op Mars en naar nog onbekend leven op aarde. Geconcludeerd kan worden dat DNA detectiemethoden krachtig zijn. Hun specificiteit voor DNA moleculen die sterk lijken op het DNA dat wordt gebruikt door het huidig bekende leven op Aarde, een nadeel kan zijn in het aantonen van leven op andere planeten. Eerste stappen zijn gezet naar het kunnen detecteren van afwijkend DNA, maar meer in deze richting is nog meer onderzoek nodig.

