

Die Funktion der CDF-Transporter MamB und MamM
beim magnetosomalen Eisentransport in
Magnetospirillum gryphiswaldense

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
Katja Junge

Bremen 2008

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von März 2004 bis September 2006 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen und von Oktober 2006 bis Januar 2008 am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Tag des Promotionskolloquiums: 08. Dezember 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel, Universität Bremen
2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schüler, Ludwig-Maximilians-Universität München

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
A EINLEITUNG	3
1 Vorkommen und Verteilung magnetotaktischer Bakterien	3
2 Funktion und Aufbau der Magnetosomen	4
3 Genetik der Magnetitbiomineralisation	5
4 Magnetosomensynthese	7
4.1 Magnetosomenvesikel- und Kettenbildung	7
4.2 Physiologische Bedingungen der Biomineralisation	8
4.3 Eisenaufnahme in MTB und Transport in die Magnetosomenvesikel	9
5 Cation diffusion facilitator (CDF)-Proteine	13
6 Zielsetzung	15
B MATERIALIEN UND METHODEN	17
1 Chemikalien und Gase	17
2 Organismen und Plasmide	17
3 Oligonukleotide	22
4 Mikrobiologische Methoden	28
4.1 Medienzusätze	28
4.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	28
4.3 Glycerolstocks	29
4.4 Kultivierung von <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	29
5 Einführung von DNA in Mikroorganismen	32
5.1 Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> durch Transformation	32
5.2 Übertragung von DNA in <i>M. gryphiswaldense</i>	33
6 Methoden zur Bestimmung von Wachstumsparametern	34
6.1 Bestimmung der Zelldichte	34
6.2 Bestimmung des Trockengewichtes	35
6.3 Reinheitskontrollen	35
6.4 Bestimmung des zellulären Magnetismus durch Streulichtmessung	35
6.5 Eisenbestimmung mittels AAS	35
6.6 Untersuchung der Eisenaufnahme mittels ^{55}Fe	36
6.7 Präparation von Zellen für die Elektronenmikroskopie	37
7 Molekularbiologische Methoden	37
7.1 Isolierung von Nukleinsäuren	37
7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	40
7.3 Größenbestimmung von Nukleinsäuren	40
7.4 Reinigung von Nukleinsäuren	41
7.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren	41
7.6 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	41
7.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
7.8 Reverse Transkription	43
7.9 Sequenzierung	44

7.10	Southern Hybridisierung	45
8	Plasmidkonstruktion	47
8.1	Konstruktion der Plasmide zur Deletion von <i>mamM</i> und <i>mamB</i> in MSR-1	47
8.2	Konstruktion von Plasmiden zur Genexpression in MSR-1	47
8.3	Plasmide zur Überexpression von <i>mamM</i> und <i>mamB</i> in pASK-Plasmiden	49
8.4	Plasmide zur Überexpression von <i>mamM</i> und <i>mamB</i> in pET-Derivaten	49
8.5	Plasmide zur Expression einer transkriptionellen Fusion von <i>mamM</i> und <i>mamB</i>	50
9	Proteinbiochemische Methoden	51
9.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
9.2	Konzentrieren von Proteinlösungen	51
9.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	51
9.4	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	53
9.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Antikörper	53
9.6	Strep-Tag II® Detektionssystem	54
10	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	55
10.1	Optimierungsversuche zur Proteinexpression	55
10.2	Expression zur Proteinreinigung	55
11	Proteinreinigung	56
11.1	Zellaufschluss	56
11.2	Reinigung und Solubilisierung der Membranfraktion	56
11.3	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	56
11.4	Rekonstitution von MamM in Proteoliposomen	58
11.5	Magentosomenisolierung und Zellfraktionierung	59
12	Fluoreszenzmikroskopie	60
13	Bioinformatische Methoden	60
13.1	Programme und Datenbanken	60
13.2	Blast-Analysen mit MamM und MamB	60
13.3	Alignments und Dendrogramme	61
C	ERGEBNISSE	62
1	Allgemeine Sequenzcharakteristika von MamM und MamB	62
2	Funktionelle Untersuchung der CDF-Transporter MamM und MamB in <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	64
2.1	Herstellung von unmarkierten „in frame“ <i>mamM</i> - und <i>mamB</i> -Deletionsmutanten	65
2.2	Phänotypische Beschreibung der Deletionsmutanten MSR-1(Δ <i>mamM</i>) und MSR-1(Δ <i>mamB</i>)	70
2.3	Versuche zur homologen Komplementation von Δ <i>mamM</i> und Δ <i>mamB</i>	71
2.4	Untersuchung der subzellulären Kompartimente des Wildtyp und der unmagnetischen Mutanten Δ <i>mamM</i> , Δ <i>mamB</i> und MSR-1B	75
2.5	Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten	76
2.6	Eisenaufnahmekinetik	78
2.7	Intrazelluläre Eisenverteilung in Δ <i>mamM</i> und Δ <i>mamB</i>	83
3	Lokalisierung von MamM und MamB in <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	85
3.1	<i>In vitro</i> Lokalisierung mittels Immunodetektion	86
3.2	<i>In vivo</i> Lokalisierung mittels GFP als Fusionsprotein	87
4	Untersuchungen zur Verteilung und Funktion von MamM- und MamB-Orthologe und anderer CDF-Proteine in MTB	89
4.1	Vorkommen von MamM- und MamB-Orthologen in Magnetosomeninseln und -fragmenten anderer MTB	89
4.2	Genomweite Analyse zum Vorkommen und der Verteilung von CDF-Proteinen in MTB	90

4.3	Klassifizierung der CDF-Proteine aus MTB	91
4.4	Heterologe Komplementation von $\Delta mamB$	94
4.5	Identifizierung spezifischer Motive in MTB-CDF-Transportern	95
5	Versuche zur Überexpression und Reinigung von MamM und MamB für <i>in vitro</i> Studien	97
5.1	Die Expression von <i>mamM</i> und <i>mamB</i> mittels P_{tetA} (IBA)	98
5.2	Optimierung der Expression von <i>mamM</i> und <i>mamB</i> mit dem pET-System	98
5.3	Rekonstitution von Strep-MamM in Proteoliposomen	105
5.4	Expression von MamM und MamB als transkriptionelle Fusion in pET51-b(+)	105
D	DISKUSSION	109
1	Erstellung von Deletionsmutanten in <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 - methodische Aspekte	109
2	Der unmagnetische Phänotyp von $\Delta mamB$ ist ausschließlich auf den Verlust von <i>mamB</i> zurückzuführen	112
3	$\Delta mamB$ und $\Delta mamM$ resultieren in unmagnetischen Phänotypen, in denen die Magnetitsynthese gestört ist	113
4	Der unmagnetische Phänotyp von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ ist direkt mit der Eisenaufnahme gekoppelt	115
4.1	Unmagnetische Mutanten haben ein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber Eisen	115
4.2	Der Eisengehalt der unmagnetischen Mutanten ist deutlich geringer als der des Wildtyps	116
4.3	MamB leistet nur unter magnetitbildenden Bedingungen einen Beitrag zur Eisenaufnahme von MSR-1	117
5	MamM- und MamB bilden eine phylogenetisch distinkte Gruppe innerhalb der CDF-Proteine	119
6	Das N-terminale CXXC-Motiv ist wahrscheinlich essentiell für die spezifische Funktion von MamM und MamB	121
7	MamM und MamB bilden möglicherweise eine funktionelle Einheit	122
8	MamM und MamB sind sowohl in der Cytoplasmamembran als auch der Magnetosomenmembran lokalisiert, jedoch letzterer stark angereichert	124
9	MamM und MamB können heterolog in <i>E. coli</i> exprimiert, gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert werden	126
10	Resümee und Ausblick	128
E	LITERATURVERZEICHNIS	131
F	ANHANG	144

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AHT	Anhydrotetrazyklin
AK	Antikörper
AMB-1	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1
AP	Alkalische Phosphatase
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumen
CDF	Cation Diffusion Facilitator
C_{mag}	Koeffizient der magnetisch induzierten Lichtstreuung
cpm	counts per minute
DAP	Diaminopimelinsäure
DDM	Dodecylmaltosid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>gfp</i> , GFP	Gen- Proteinbezeichnung Green Fluorescent Protein
Gm	Gentamycin
Gst	Glutathion-S-Transferase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
MAI	Magnetosomeninsel
Mb	Megabasenpaare
MC-1	magnetischer Kokkus MC-1
MM	Magnetosomenmembran
MMP	Magnetosomenmembranprotein(e)
MS-1	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1
MSR-1	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1
MTB	Magnetotaktische Bakterien

MV-1	magnetisches Vibrio MV-1
NTA	Nitrilotriessigsäure
OATZ	oxic-anoxic transition zone
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPM	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TBS	Tris-buffered Saline
Tc	Tetrazyklin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMH	Transmembranhelices
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Magnetotaktische Bakterien (MTB) bilden zur Orientierung im Erdmagnetfeld intrazelluläre membranumschlossene Nanokristalle eines magnetischen Eisenminerals. Für die Bildung dieser Kristalle nehmen Zellen magnetotaktischer Bakterien bis zu 4 % des Trockengewichtes an Eisen auf, wobei etwa 90 % auf die Magnetosomen entfallen (Moench und Konezka, 1978; Schüler und Baeuerlein, 1998; Heyen und Schüler, 2003; Grünberg *et al.*, 2004). Für die Präzipitation des aufgenommenen Eisens in den Magnetosomenvesikeln muss dieses über die Magnetosomenmembran (MM) geschleust werden.

Vorangegangene proteomische Analysen der MM von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 identifizierten in dieser zwei Proteine, welche zur Familie der „cation diffusion facilitator“ (CDF) gehören (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004). Diese ubiquitär verbreiteten Proteine vermitteln den Export von divalenten Schwermetallkationen über intrazelluläre Membranen von Pro- und Eukaryoten (Nies, 2003). Für die magnetosomenmembranständigen CDF-Transporter MamM und MamB wurde daher eine Funktion im magnetosomalen Eisentransport postuliert (Schüler, 2003; Grünberg *et al.*, 2004). Gegenstand dieser Arbeit war deshalb die Charakterisierung von MamM und MamB sowie die Aufklärung ihrer Funktion bei der Biomineralisation in MSR-1.

Zunächst wurden *in frame*-Deletionsmutanten von *mamM* und *mamB* innerhalb des *mamAB*-Operons von MSR-1 mittels einem *cre/loxP*-basiertem Plasmidsystem erstellt. Fehlt eines der beiden Proteine, sind Zellen von MSR-1 unmagnetisch und produzieren keine Magnetitkristalle mehr. Die Zellen sind dabei in der Magnetitsynthese unterbunden, bilden aber weiterhin Magnetosomenleervesikel. Das Wachstumsverhalten gegenüber Eisen ist unterschiedlich zum Wildtyp. Unter Eisenmangel zeigte Δ *mamB* einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp. Eisenüberschuss hingegen hatte einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum der Mutante. Die Gesamteisenaufnahme der unmagnetischen Mutanten unter mikroaeroben Bedingungen war um das 20 bis 50fache geringer als die des Wildtyps und konnte nicht durch artifiziiell hohe Eisenkonzentrationen erhöht werden. Daraufhin wurde die initiale Eisenaufnahmekinetik unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen zwischen Wildtyp und Δ *mamB* verglichen. Während unter aeroben Bedingungen die Eisenaufnahme von MSR-1 Wildtyp und Δ *mamB* annähernd gleich war, wurde diese in MSR-1 unter mikroaeroben Bedingungen deutlich erhöht. Die Versuche demonstrierten, dass MamB nur unter mikroaeroben, also magnetitbildenden Bedingungen einen Einfluss auf die Eisenaufnahme von MSR-1 hat.

Die Lokalisation von MamM und MamB in MSR-1 wurde *in vivo* mittels Gfp-Fusionen genauer definiert. C-terminal fusioniertes MamM lokalisierte in der Cytoplasma- und Magnetosomenmembran. Die Proteine MamM und MamB sind allerdings in der MM stark angereichert, was durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt wurde.

Paraloge Sequenzen von *mamM* und *mamB* konnten in Magnetosomeninseln (MAI) oder -fragmenten weiterer MTB in einer konservierten Umgebung gefunden werden. Innerhalb der MAI sind *mamM* und *mamB*, neben *mamV* von *M. magneticum* AMB-1 und *M. magnetotacticum* MS-1, die einzigen CDF-Sequenzen. MamM- und MamB-Paraloge bilden zusammen mit MamV in der Familie der CDF-Proteine eine distinkte Untergruppe der CDF3-Transporter (Fe/Zn-Transporter) und wurden daher als MTB-CDF bezeichnet. Trotzdem war es nur möglich, den magnetischen Phänotyp von Δ *mamB* mit *mamB* des nah verwandten Stammes MS-1 wieder herzustellen. Neben den MTB-CDF-Transportern enthalten MTB im Vergleich zu anderen Mikroorganismen eine ungewöhnlich hohe Anzahl weiterer putativer CDF-Sequenzen, die möglicherweise in die zelluläre Eisenhomöostase eingreifen können. Die Sequenzuntersuchungen festigten die experimentell ermittelte spezifische Funktion der MTB-CDF bei der Magnetitsynthese.

In einem letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein heterologes System zur Expression und Reinigung der Membranproteine MamM und MamB in *E. coli* etabliert. Gereinigtes Strep-MamM wurde erstmals in Vesikeln aus *E. coli*-Lipiden rekonstituiert.

MamM und MamB wurden gemeinsam heterolog in *E. coli* exprimiert und über einen C-terminal an MamB fusionierten Strep-Tag gereinigt. Natives MamM konnte dabei mit MamB-Strep koeluiert werden, was einen ersten Hinweis auf eine Heterodimerbildung lieferte.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass MamB (und MamM) essentielle Rollen in der Magnetitbiomineralisation haben und dabei den Transport von Eisen in die Magnetosomenvesikel vermitteln.

A Einleitung

Magnetotaktische Bakterien (MTB) bestechen durch ihre Fähigkeit, passiv mit dem Erdmagnetfeld zu interagieren und sich darin auszurichten, welche auf der intrazellulären Biomineralisation von magnetischen Eisenmineralen beruht. Seit nunmehr über 30 Jahren stehen diese Bakterien im wissenschaftlichen Interesse (Blakemore, 1975). Die Aufklärung der molekularen Faktoren, welche die Biomineralisation steuern, ist von multidisziplinärem Interesse (Schüler, 2002; Komeili, 2007). So gibt es für funktionalisierte membranumschlossene Magnetitkristalle in dem Gebiet der Nano- und roten Biotechnologie ein breites Anwendungsspektrum (Reszka, 2000; Lang und Schüler, 2007; Matsunaga *et al.*, 2007). Das Wissen um die Mechanismen der Biomineralisation von MTB kann indes auch als vereinfachtes Modell für die Bildung magnetischer Eisenoxide in höheren Organismen dienen (Schüler, 2002).

1 Vorkommen und Verteilung magnetotaktischer Bakterien

Die Gruppe der MTB ist phylogenetisch und morphologisch heterogen. Vertreter finden sich vorwiegend innerhalb der α -Proteobakterien, aber auch innerhalb der γ - und δ -Proteobakterien. Daneben ist eine Spezies bekannt, die dem Nitrospira-Phylum zugehörig ist (Amann *et al.*, 2007). Allen gemein ist die intrazelluläre Bildung so genannter Magnetosomen, welche membranumschlossene Nanokristalle der magnetischen Eisenminerale Magnetit (Fe_3O_4) oder Greigit (Fe_3S_4) darstellen (Balkwill *et al.*, 1980; Schüler, 1999). Die meisten MTB bilden lediglich eines der beiden Minerale, jedoch sind mindestens zwei unkultivierte Spezies bekannt, die sowohl Greigit als auch Magnetit synthetisieren (Bazylinski *et al.*, 1995; Lins *et al.*, 2007).

Magnetotaktische Bakterien kommen ubiquitär in hohen Zellzahlen (10^3 bis 10^4 Zellen/ cm^3) in der oxisch-anoxischen bis anoxischen Übergangzone (OATZ) von Sedimenten oder Wassersäulen von Süß- als auch Salzwasserhabitaten mit stratifizierten chemischen Gradienten vor (Blakemore, 1982; Bazylinski *et al.*, 1995; Bazylinski und Williams, 2007). Magnetitbildner sind aus Süß- und Salzwasserhabitaten bekannt, während Greigitbildner ausschließlich in marinen Systemen vorzukommen scheinen, in denen Sulfid in Form von Schwefelwasserstoff vorkommt (Mann *et al.*, 1990a; Simmons *et al.*, 2004). Vor allem aber hat die Eisenkonzentration einen direkten Einfluss auf die Biomineralisation und damit auf die Verbreitung der MTB. In verschiedenen Studien zur Verteilung von MTB konnte eine klare Korrelation zwischen der Anhäufung magnetotaktischer Bakterien und der Menge an verfügbarem Eisen gezeigt werden (Simmons *et al.*, 2004; Flies *et al.*, 2005). In der Wassersäule eines Brackwassersees in

Massachusetts fanden sich die meisten MTB in Tiefen mit der höchsten Konzentrationen an gelösten und partikulären Eisen (bis 200 μM) (Simmons *et al.*, 2004). Zwar konnte dieser Zusammenhang in Untersuchungen von Mikrokosmen verschiedener Gewässer Norddeutschlands nicht bestätigt werden (Flies *et al.*, 2005), doch wurden in den Sedimentschichten, in denen MTB zu den abundanten Mikroorganismen gehören, Fe(II)-Konzentrationen zwischen 6 und 60 μM gemessen. Diese Eisenkonzentrationen sind für das Wachstum und die Biomineralisation sättigend, was in Kultivierungsexperimenten mit *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 gezeigt werden konnte (Schüler und Baeuerlein, 1996; Heyen und Schüler, 2003). Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigten aber auch, dass die vertikale Verteilung der MTB in der OATZ nicht allein von der Eisenverfügbarkeit abhängt, sondern ein komplexes Zusammenspiel des Vorhandenseins reduzierter und oxidiertes Schwefel- bzw. Sauerstoffverbindungen ist (Stolz, 1992; Bazylinski *et al.*, 1995; Spring und Bazylinski, 2002; Flies *et al.*, 2005).

2 Funktion und Aufbau der Magnetosomen

Allgemein anerkannt ist die Hypothese, dass es sich bei Magnetotaxis um einen Navigationsmechanismus handelt, der es den mikroaerophilen oder anaeroben Bakterien ermöglicht, in Regionen zu gelangen, die ihren Anforderungen an die Sauerstoffmenge oder andere chemische Gradienten genügen (Schüler, 1999). Das Zusammenspiel aus passiver Ausrichtung und aktivem aerotaktischen Verhalten wird daher auch als Magneto-Aerotaxis bezeichnet. Die Magnetotaxis vereinfacht die herkömmliche bakterielle Aerotaxis in chemischen Gradienten von einer dreidimensionalen zu einer eindimensionalen Suche (Frankel *et al.*, 1997).

Die meisten MTB allerdings produzieren mehr Magnetosomen als für die magnetische Ausrichtung notwendig sind (Spring *et al.*, 1993; Bazylinski und Frankel 2004). Beschrieben wurden auch Kristalle von überdurchschnittlicher Größe (Lins *et al.*, 2005), sowie Abweichungen von der Kettenanordnung der Magnetosomen (Lins *et al.*, 2007). Deshalb werden neben der Magnetotaxis weitere Funktionen für die Ablagerung von Eisen in Magnetosomen diskutiert. Eine mögliche Rolle wäre die Energiekonservierung und damit verbunden die Speicherung des Eisens als Elektronenakzeptor oder -donor. Doch bisher konnte die Wiederverwendung des Eisens aus Magnetit, selbst unter eisenlimitierten Bedingungen, nicht dokumentiert werden (Dubbels *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit ist eine Funktion in der Eisenhomöostase als Kompartiment zur Detoxifizierung des Cytoplasma (Bazylinski *et al.*, 1993). Aber dies würde im Widerspruch zu der hohen Eisenaufnahme der Zellen stehen und die Frage aufwerfen, weshalb MTB nicht die gleichen Systeme zur Detoxifizierung von Eisen verwenden wie andere

Prokaryoten. Zumal auf Grund einer Mößbauerstudie an *M. gryphiswaldense* vermutet werden kann, dass Eisen, welches zur Magnetitsynthese verwendet wird, als membranständige Fe-Spezies vorliegt (Faivre *et al.*, 2007). Somit bleiben andere Funktionen als die Navigation weiterhin spekulativ.

Die Magnetosomen sind intrazelluläre Einschlüsse, die aus Nanokristallen des Eisenminerals Magnetit (Fe_3O_4) oder Greigit (Fe_3S_4) und einer Phospholipiddoppelschicht, der Magnetosomenmembran (MM), bestehen (Gorby *et al.*, 1988). Die einzelnen Gruppen der MTB bilden Kristalle, die sich in ihrer Anzahl, Größe und Form unterscheiden. Innerhalb einer Art sind die Kristalle jedoch einheitlich aufgebaut (Mann *et al.*, 1990; Bazylinski *et al.*, 1994). Die strukturelle Perfektion und die hohe chemische Reinheit der Magnetosomen lassen auf eine biologische Kontrolle der Mineralisation schließen. Im Zellinneren des Großteils der MTB sind die Magnetosomen in einer oder mehreren parallelen Ketten angeordnet (Schüler, 1999). Durch die Anordnung der Magnetosomen in einer oder mehreren Ketten parallel zur Zellachse werden zu einem gesamten Dipolmoment addiert (Frankel und Bazylinski, 1994; Schüler, 1999). Dadurch wird einer einzelnen Zelle ein Dipolmoment verliehen, welches groß genug ist, diese parallel zum Erdmagnetfeld auszurichten (Bazylinski und Frankel, 2004).

3 Genetik der Magnetitbiomineralisation

In allen Magnetit produzierenden Bakterien, die daraufhin untersucht worden sind, gibt es Hinweise, dass die Kristalle von einer Membran, der so genannten Magnetosomenmembran, umgeben sind (Balkwill *et al.*, 1980; Gorby *et al.*, 1988; Matsunaga *et al.*, 1990; Schüler und Baeuerlein, 1997; Martins *et al.*, 2007). Die Magnetosomenmembran ist eine 3 bis 4 nm dicke Lipiddoppelschicht, die in ihrer Zusammensetzung der der Cytoplasmamembran ähnelt. An dieser Doppellipidmembran sind eine Vielzahl von Proteinen assoziiert, die spezifisch für die Membran und magnetotaktische Bakterien sind (Gorby *et al.*, 1988). Diese Proteine stellen das Magnetosomensubproteom dar, welches sich von der Proteinzusammensetzung der anderen Zellbestandteile unterscheidet. Proteomstudien der Magnetosomenmembran von *M. gryphiswaldense* MSR-1 und *M. magneticum* AMB-1 brachten eine variable Anzahl an spezifischen Proteinen hervor (Grünberg *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). Für *M. gryphiswaldense* MSR-1 wurden bisher 20 spezifische Proteine identifiziert, die mit der Magnetosomenmembran assoziiert sind (MMPs) (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2007). Größtenteils konnten die Proteinhomologe innerhalb der 78 identifizierten MMPs aus *M. magneticum* AMB-1 wieder gefunden werden (Tanaka *et al.*, 2006). Die korrespondierenden Gene sind in *M. gryphiswaldense* mit anderen, nicht in der

Membran identifizierten Proteinen in mehreren Genclustern lokalisiert. Dabei liegen die Cluster *mamAB*, *mamGFDC*, *mamXY* und *mms6* sowie das Gen *mamW* innerhalb einer 130 kb langen Genomregion, die als Magnetosomeninsel (MAI) bezeichnet wurde (Ullrich *et al.*, 2005). Die Magnetosomeninsel von Stamm AMB-1 hat ein vergleichbares Muster, wurde aber auf nur 98 kb definiert (Fukuda *et al.*, 2006). Das *mtx*-Cluster und das Gen *mmeA* liegen im Kerngenom von *M. gryphiswaldense* (Richter *et al.*, 2007). Die Genprodukte von *mtxA* und *mamX* konnten in der Magnetosomenmembran von *M. magneticum* AMB-1 nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 2006), jedoch nicht in der von *M. gryphiswaldense* MSR-1 (Grünberg *et al.*, 2004). Dafür konnte hier nachträglich eine unbekannte Peptidsequenz der Magnetosomenmembran (Grünberg *et al.*, 2004) dem Genprodukt von *mamY* zugeordnet werden (Richter *et al.*, 2007).

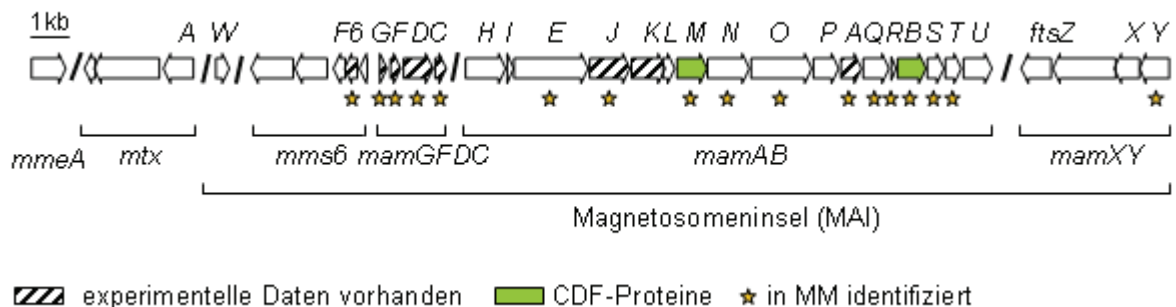


Abbildung 1. Molekulare Organisation der Magnetosomengene in *M. gryphiswaldense* MSR-1.

Primer-Extension-Versuche in *M. gryphiswaldense* bestätigten den Operoncharakter des *mamAB*- und *mamGFDC*-Clusters, deren Gene von einem jeweiligen Promotor kotranskribiert werden (Schübbe *et al.*, 2006).

Die genetische Organisation des *mamAB*-Clusters ist nicht nur unter den nah verwandten Magnetospirillen, sondern auch in dem phylogenetisch weiter entfernten magnetischen Kokkus MC-1 konserviert (Grünberg *et al.*, 2001). Daher lässt sich annehmen, dass die MAI über horizontalen Gentransfer in verschiedene bakterielle Spezies verteilt wurde. Dies würde wiederum die breite phylogenetische Verteilung der Biomineralisation erklären (Bazylinski und Schübbe, 2007). Die Magnetosomeninsel enthält sehr viele Insertionssequenzen, woraus sich vor allen unter oxidativem Stress eine hohe Instabilität der Region ergibt. Spontane Mutationen, die auf einer Reorganisation der Inselemente beruhen, resultieren oft in unmagnetischen Mutanten (Ullrich *et al.*, 2005).

Die Funktionen der meisten MMPs und Genprodukte der MAI sind unbekannt. Häufig lässt sich die vermeintliche Funktion auch nicht vermuten, weil den hypothetischen Sequenzen der Gene jegliche Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen fehlen. Den Genen *mms6*, *mamC*, *mamD*, *mamF*, *mamG*, *mamA*, *mamK* und *mamJ* lassen sich auf

Grund experimenteller Ergebnisse Rollen in der Magnetitbiomineralisation zuordnen (Arakaki *et al.*, 2003; Komeili *et al.*, 2004; Komeili *et al.*, 2006; Scheffel *et al.*, 2006; Scheffel und Schüler, 2007). Diese werden im Kontext dieser Einleitung abgehandelt. Einigen nicht charakterisierten Proteinen lassen sich durch Sequenzanalysen putative Funktionen zuweisen. Innerhalb des *mamAB*-Operons zeigt das Genprodukt von MamT Häm-Bindungsstellen. Die Proteine MamE und MamO können HtrA-ähnliche Serinproteasen und MamN, MamB, MamM Ionentransportern zugeordnet werden. Dabei zeigen MamM und MamB signifikante Ähnlichkeiten zu CDF-Proteinen. MamN könnte am Protonentransport über die MM beteiligt sein (Grünberg *et al.*, 2004). Für das *mtx*-Cluster wird eine Rolle in der Signalkaskade der Magnetfeldorientierung vermutet. Über die Funktionen des *mamXY*-Clusters ist bisher nichts bekannt. Das letzte Gen des Clusters beinhaltet allerdings Tubulindomänen und MamX sowie MamY weisen partielle Ähnlichkeiten mit Genprodukten des *mamAB*-Operons auf (Richter *et al.*, 2007; Scheffel *et al.*, 2007).

4 Magnetosomensynthese

Die Synthese bakterieller Magnetosomen ist ein komplexer Prozess, der eine Reihe verschiedener Schritte wie die Vesikelbildung, die Eisenaufnahme in die Zelle, den Transport des Eisens in die Vesikel, die kontrollierte Biomineralisation von Magnetit (oder Greigit) sowie die kettenförmige Anordnung der Vesikel beinhaltet. Viele der publizierten Modelle, vor allem zur Eisenaufnahme in die Magnetosomenvesikel und zur Präzipitation von Magnetit, bleiben jedoch vorerst Postulate, die einer letztendlichen Beweisführung bedürfen.

4.1 Magnetosomenvesikel- und Kettenbildung

Eine Kompartimentierung durch die Magnetosomenvesikel erfüllt die Anforderungen an eine kontrollierte Mineralisation von Magnetit. Innerhalb des Vesikels kann eine Kontrolle des Redoxpotentials und des pH-Werts in einem möglichst kleinen Raum gewährleistet werden (Bell *et al.*, 1987). Die Magnetosomenmembran ist für eine biologische Regulierung durch verankerte oder assoziierte Proteine ideal (Schüler, 2002). Auch ein chemischer Einfluss bei der Magnetitbildung wäre in dieser räumlichen Begrenzung denkbar, wie er durch Faivre *et al.* (2007) angedeutet wurde.

Die Magnetosomenvesikel invaginieren von der Cytoplasmamembran durch einen noch unbekanntem Mechanismus (Komeili *et al.*, 2006). Strittig bleibt vorerst die Frage, ob die Magnetosomenvesikel dauerhaft mit der Cytoplasmamembran verbunden sind oder

sich während ihrer Reifung oder der Magnetitsynthese ablösen (Bazylinski und Frankel, 2004; Komeili *et al.*, 2006; Komeili *et al.*, 2007; Scheffel, 2007; Scheffel und Schüler, 2007).

Die Bildung der Magnetosomenvesikel ist scheinbar unabhängig von der Magnetitsynthese. So wurden leere oder nur teilweise gefüllte Magnetosomenvesikel in eisengehungerten Zellen diverser magnetotaktischer Bakterien beobachtet. Zudem bilden MTB mehr Vesikel als letztendlich Magnetitkristalle gebildet werden (Bazylinski und Frankel, 2004; Komeili *et al.*, 2004; Scheffel *et al.*, 2006). Für die Kontrolle der Kristallanzahl und Aktivierung der Magnetosomenvesikel ist vermutlich MamA durch die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich (Komeili *et al.*, 2004).

Sind die einzelnen Membraninvaginationen gebildet, müssen diese in der Zelle in einer Kette angeordnet und stabilisiert werden. Innerhalb einer Kette sind gereifte Magnetosomenkristalle in der Kettenmitte zu finden, während unreife oder leere Vesikel am Kettenende liegen (Gorby *et al.*, 1988; Komeili *et al.*, 2004; Scheffel *et al.*, 2006). In *M. gryphiswaldense* MSR-1 und *M. magneticum* AMB-1 wurden subzelluläre Strukturen identifiziert, die die äußere Stabilität der Magnetosomenkette sichern. In beiden Organismen umgibt ein Netzwerk die Magnetosomen, welches ein magnetosomenspezifisches Cytoskelett darstellen könnte, das vermutlich aus MamK-Filamenten besteht (Komeili *et al.*, 2006; Scheffel *et al.*, 2006; Katzmann, 2007). Mit diesem Filament werden die Magnetosomenvesikel wahrscheinlich durch MamJ verknüpft (Scheffel *et al.*, 2006; Scheffel und Schüler, 2007).

Daneben scheinen verschiedene Proteine der Magnetosomenmembran Einfluss auf die Nukleation, Größe und Form der Kristalle zu haben. Mms6 von *M. magneticum* AMB-1 z.B. ist fähig, Eisen zu binden und fördert *in vitro* die Bildung von kubooktrahedrischen Kristallen mit einer geringeren Größenverteilung als rein chemisch gebildete Kristalle (Arakaki *et al.*, 2003). MamD, MamF, MamG und MamC haben einen additiven Einfluss auf die Kristallgröße in *M. gryphiswaldense* (Scheffel *et al.*, 2008).

4.2 Physiologische Bedingungen der Biomineralisation

Die Biomineralisation von Magnetit wird vor allem durch die Sauerstoffkonzentration, aber auch die Anwesenheit von Eisen, beeinflusst. Nach heutigem Kenntnisstand geschieht dies vor allem durch transkriptionelle Regulierung der Mineralisationsgene durch diese beiden Elemente (Schübbe *et al.*, 2006).

Für verschiedene Arten von *Magnetospirillen* wurde gezeigt, dass mikroaerobe oder anaerobe Bedingungen für die Magnetitsynthese unerlässlich sind. In den drei Arten *M. gryphiswaldense*, *M. magneticum* und *M. magnetotacticum* wird die

Magnetitbiomineralisation nur induziert, wenn die Sauerstoffkonzentration unter einem Wert von 20 mbar liegt, obwohl Wachstum über einen deutlich größeren Bereich möglich ist (0,25 bis 212 mbar). Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration steigt die Anzahl an gebildeten Magnetitpartikeln, wobei ein Maximum bei 0,25 mbar O₂ erreicht wird (Heyen and Schüler, 2003).

Verschiedene Arten von MTB synthetisieren Magnetit auch unter anoxischen Bedingungen, wobei N₂O bzw. Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor dient (Bazylinski *et al.*, 1988; Matsunaga *et al.*, 1991; Menke, 2003). Für *M. magnetotacticum* wurde eine Kopplung der Denitrifikation mit der Magnetitbiomineralisation bei anaeroben Bedingungen postuliert (Fukumori *et al.*, 1997), die bisher in keinem weiteren MTB bestätigt werden konnte.

Während die Größe und Form der Kristalle artspezifisch ist und durch die Anwesenheit von Sauerstoff und die Verfügbarkeit von Eisen nur gering beeinflusst werden, kann die Anzahl und Verteilung der Partikel in der Zelle in Abhängigkeit dieser Bedingungen stark variieren (Schüler und Frankel, 1999; Faivre *et al.*, 2007). Eisenaufnahmeexperimente mit *M. gryphiswaldense* zeigten, dass die Zellen selbst unter eisenlimitierten Bedingungen (< 1 µM) Magnetitsynthese betreiben können. Dabei werden sehr viel weniger Magnetitkristalle gebildet und das Wachstum ist verringert. Die Sättigung der Biomineralisation und des Wachstums setzt bei etwa 15 bis 20 µM Eisen ein (Schüler und Baeuerlein, 1996). Ein vergleichbares Verhalten gegenüber der verfügbaren Eisenkonzentration zeigt auch der magnetische *Vibrio* MV-1 unter anaeroben Bedingungen (Dubbels *et al.*, 2004).

Die Eisenaufnahmeraten von *M. gryphiswaldense* hängen von der physiologischen Beschaffenheit der Zellen ab. Zellen, die unter magnetitinduzierten, aber eisenlimitierten Bedingungen angezogen wurden, haben eine größere Eisenaufnahmekapazität als Zellen, die permanent mit Eisen versorgt wurden (Schüler und Baeuerlein 1997; Faivre 2007). Letztere zeigten die für *M. gryphiswaldense* typischen kubooktahedrischen Kristalle, wohingegen Kristalle eisengehungerter Zellen nach Zugabe von Eisen unregelmäßige Morphologien aufwiesen. Daraufhin wurde geschlossen, dass die Biomineralisation nicht ausschließlich einer biologischen Kontrolle unterliegt (Faivre *et al.*, 2007).

4.3 Eisenaufnahme in MTB und Transport in die Magnetosomenvesikel

Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste und als Spurenelement essentiell für das Wachstum der meisten Organismen. Eisen besitzt zwei stabile Valenzen (+II/+III), die in Abhängigkeit von den umgebenden Liganden leicht ineinander umwandelbar sind und

dabei ein Redoxpotential von -300 bis +500 mV umspannen können. Das ermöglicht den Einsatz von Eisen in biochemischen Redoxreaktionen als Elektronenakzeptor oder -donator (Andrews, 2003). Organismen verfügen über eine Vielzahl von Transportsystemen, die für die Aufnahme von Eisen in die Zelle verantwortlich sind (Braun und Hantke, 2007). Nimmt eine Zelle nicht genügend Eisen auf, wird eine Reihe von Stoffwechselwegen gehemmt, da Eisen Kofaktor entscheidender Enzyme ist. Ein Überschuss an freiem Eisen im Zellinneren (Zytoplasma) katalysiert die Entstehung freier Radikale in der so genannten Haber-Weiss-Fenton-Reaktion, die zu irreparablen Schäden an Makromolekülen wie DNA oder Proteinen führen können (Touati, 2000). Um eine effektive Eisenhomöostase zu erreichen, muss eine Zelle genügend Eisen für biochemische Abläufe aufnehmen, aber den Level an freien Eisen so regulieren, dass sie vor eiseninduzierter Toxizität geschützt ist. Bisher werden als Entgiftungsstrategien die Ablagerung von intrazellulärem Eisen in Speicherproteinen, die Expression von Systemen zur Regulation von oxidativem Stress, die Kontrolle der Expression von Proteinen des Eisenhaushalts durch Fur (Ferric uptake regulator) sowie der aktive Efflux überschüssiger Eisenionen in das Periplasma diskutiert (Andrews, 2003; Grass, 2005).

Die Verfügbarkeit und Aufnahmemöglichkeit von Eisen wird durch dessen chemischen Eigenschaften erschwert. Während Fe(II) unter neutralem pH-Wert sehr gut löslich ist (0,1 M), liegt das Löslichkeitsprodukt von Fe(III) bei 10^{-18} M und ist quasi unlöslich bei neutralem pH-Wert (Neilands, 1981; Cartron *et al.*, 2006). Fe(II) kann von den Bakterien direkt aufgenommen werden, ist aber nur unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen stabil. In aeroben und pH-neutralen aquatischen Habitaten hingegen wird Fe(II) schnell zu Fe(III) oxidiert, wodurch gelöstes Fe(II) in dieser Umgebung limitiert ist (Millero *et al.*, 1987; Wandersman und Delepelaire, 2004). Auf der anderen Seite bildet Fe(III) in einem aeroben Habitat in Abwesenheit von organischen Liganden inorganische Hydroxidkomplexe und kann nicht direkt von den Mikroorganismen aufgenommen werden (Krämer *et al.*, 2005). In dieser Tatsache und in dem fatalen Ergebnis der Reaktion von Eisen und Sauerstoff, mag begründet liegen, weshalb die Magnetitsynthese in MTB erst unter mikroaeroben Bedingungen an der oxisch-anoxischen-Übergangszone einsetzt.

Der Eisengehalt von MTB kann 2 bis 4 % der Biotrockenmasse ausmachen (Schüler und Baeuerlein 1998), wohingegen dies bei nicht-magnetotaktischen Bakterien wie *E. coli* nur 0,005 bis 0,022 % sind (Hartmann und Braun, 1981). Über 90 % des aufgenommenen Eisens finden sich in den Magnetosomen (Grünberg *et al.*, 2001). Da die Biomineralisation innerhalb membranumhüllter Kompartimente, den Magnetosomen, abläuft (Gorby *et al.*, 1988; Grünberg *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2006), gilt es eine zusätzliche Barriere beim Eisentransport aus der Umgebung zu überwinden.

Durch die erstaunlich hohe Eisenmenge, welche zur Magnetitsynthese benötigt wird, wurde nahe liegender Weise lange angenommen, MTB besäßen einzigartige hocheffiziente Eisenaufnahmesysteme (Schüler und Baeuerlein, 1998; Bazylnski und Frankel, 2004). Eine umfassende Studie zur Expression von eiseninduzierten Genen in *M. magneticum* zeigte aber, dass die gleichen Aufnahmesysteme wie in anderen gram-negativen Bakterien verwendet werden (Suzuki *et al.*, 2006).

Für die Gewinnung von Eisen aus Komplexen produzieren die meisten Mikroorganismen niedermolekulare Chelatoren, die Siderophore. Diese werden generell unter eisenlimitierten Bedingungen gebildet, und die Synthese unter eisenreichen Bedingungen reprimiert. Der Transport der Eisensiderophore von der extrazellulären Umgebung in die Zelle geschieht dann über spezifische energieabhängige Aufnahmesysteme (Neilands, 1981; Braun und Hantke, 2007). Die Produktion und Ausscheidung von Hydroxamatsiderophoren (und Catecholsiderophoren) wurde für *M. magnetotacticum* MS-1, *M. magneticum* AMB-1 und dem magnetischen Vibrio MV-1 beschrieben (Paoletti und Blakemore, 1986; Calugay *et al.*, 2003; Dubbels *et al.*, 2004). Interessanterweise ist die Synthese der Chelatoren unter eisenreichen Bedingungen induziert, im Gegensatz zu anderen Prokaryoten (Paoletti und Blakemore, 1986; Calugay *et al.*, 2003). Die Zellen sind also in der Lage, Fe(III) schnell in großer Menge für die Magnetitbildung aufzunehmen. Möglicherweise erfahren die Zellen durch die schnelle Weiterleitung des Eisens in die Magnetosomenvesikel, trotz des Eisenüberangebots, eine intrazelluläre Eisenlimitierung, die wiederum die Siderophorproduktion induziert. Weshalb die Zellen unter extrazellulärem Eisenmangel keine oder nur sehr wenige Siderophore bilden, konnte bisher nicht geklärt werden (Dubbels *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu synthetisiert *M. gryphiswaldense* keine Siderophore (Schüler und Baeuerlein, 1996). Trotzdem konnte für diesen Organismus gezeigt werden, dass der Großteil des verfügbaren Eisens als Fe(III) in einem energieabhängigen Prozess aufgenommen wird. Die Aufnahme von Fe(II) verläuft über einen diffusionsähnlichen, energieunabhängigen Prozess (Schüler und Baeuerlein, 1996). Die Aufnahme beider Oxidationsstufen von Eisen erscheint sinnvoll, da es in mikroaeroben Umgebungen in beiden Formen vorliegt). So sind in *M. magneticum* AMB-1 unter eisenreichen, mikroaeroben Bedingungen vorzugsweise Fe(II)-Aufnahmesysteme, wie Feo oder Ftr, positiv reguliert und Fe(III)-Aufnahmesysteme sind negativ reguliert (Suzuki *et al.*, 2006).

Wie das Eisen in *M. gryphiswaldense* ohne Siderophore in die Zellen gelangt, ist noch unklar. Diskutiert wird hierfür die mögliche extrazelluläre, assimilatorische Reduktion von Fe(III) (Xia *et al.*, 2007). Die indirekte Beteiligung von intrazellulären Eisenreduktasen an der Magnetitsynthese konnte bereits für *M. magnetotacticum* gezeigt werden (Paoletti und Blakemore, 1986; Short und Blakemore, 1986; Noguchi *et al.*, 1999) und wird für

M. gryphiswaldense und MV-1 vermutet (Dubbels *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2007). In *M. magneticum* AMB-1 scheint außerdem eine Ferredoxin-Oxidoreduktase an der intrazellulären Eisenreduktion beteiligt zu sein (Wahyudi *et al.*, 2003). Kürzlich wurde in diesem Organismus eine ATPase identifiziert, die an der Energetisierung der Eisentranslokalisierung über die Cytoplasmamembran beteiligt ist. Eine Transposonmutante dieses Gens war nicht fähig, Eisen in das Cytoplasma zu transportieren und Magnetit zu bilden. Welches spezifische Aufnahmeprotein mit der ATPase assoziiert ist, konnte nicht geklärt werden (Suzuki *et al.*, 2007). In dem magnetischen Vibrio MV-1 wurde ein eisenreguliertes periplasmatisches Bindeprotein gefunden, welches vermutlich Bestandteil eines kupferabhängigen Eisenaufnahmesystems ist und in Verbindung mit der Magnetitbiosynthese des Stammes steht (Dubbels *et al.*, 2004).

Die Eisenaufnahme in MTB und die Magnetitsynthese unterstehen einer strengen Kontrolle. Wie in anderen Prokaryoten, geschieht dies u.a. durch Homologe des globalen Eisenregulators Fur. So führt eine Mutation eines *fur*-Gens in *M. gryphiswaldense* zu einem unmagnetischen Phänotyp und hat damit einen indirekten Einfluss auf die Biomineralisation. Vermutlich reguliert dieses Fur-Homolog positiv die Eisenaufnahme in *M. gryphiswaldense* unter eisenreichen Bedingungen (Yijun *et al.*, 2007).

Ist das Eisen in die Zelle aufgenommen, wird der Teil, der zur Magnetitsynthese verwendet wird, an organische Verbindungen in der Cytoplasmamembran assoziiert und zu den Magnetosomenvesikeln weitergeleitet (Faivre *et al.*, 2007).

Für die Magnetitsynthese muss das Eisen über Magnetosomenmembran transportiert werden. Mittels Transposonmutagenese wurde in *M. magneticum* AMB-1 das Gen *magA* identifiziert, welches Ähnlichkeit zu dem K^+/H^+ -Antiporter KefC aus *E. coli* hat. Die Transposonmutante bildete kein Magnetit und nahm weniger Eisen auf. MagA wurde in der Cytoplasma- als auch Magnetosomenmembran durch Luziferasefusionen nachgewiesen. Da MagA, exprimiert in invertierten *E. coli*-Vesikeln, Fe(II) in einem energieabhängigen Prozess transportierte, wurde es als Fe^{2+}/H^+ -Antiporter postuliert, der das Eisen vom Cytoplasma in die Magnetosomen schleust. Widersprüchlich ist bei dem Postulat, dass die Expression von MagA unter Eisenmangel erhöht und unter Eisenüberschuss (die für die Magnetitbildung unerlässlich ist) erniedrigt ist (Nakamura *et al.*, 1995; Matsunaga und Takeyama, 1998). Auch konnte der direkte Beweis des Eisentransports über die Magnetosomenmembran nie erbracht werden. Zudem ist MagA in *M. gryphiswaldense* MSR-1 nicht Bestandteil des Magnetosomensubproteoms (Grünberg *et al.*, 2004). Jedoch enthält die Magnetosomenmembran von *M. gryphiswaldense* und *M. magnetotacticum* je zwei Proteine mit Ähnlichkeiten zu

Schwermetalltransportern, nämlich MamM und MamB. Ob die beiden Proteine MamM und MamB am magnetosomalen Eisentransport beteiligt sind, ist Gegenstand dieser Arbeit.

5 Cation diffusion facilitator (CDF)-Proteine

Nicht nur Eisen, auch andere Schwermetalle sind einerseits als Spurenelemente wichtig für den Zellstoffwechsel, andererseits aber toxisch, wenn sie im Überschuss vorliegen. Bakterien haben im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um die nachteiligen Effekte hoher intrazellulärer Metallkonzentrationen zu verhindern (Grass, 2007). Eine logische Konsequenz ist der aktive Efflux überschüssiger Metallkationen aus der Zelle heraus, bzw. in angrenzende Zellkompartimente. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen „cation diffusion facilitator“ (CDF)-Proteine (Paulsen und Saier, 1997). CDF-Proteine kommen ubiquitär in Eukaryoten und Prokaryoten vor und werden hauptsächlich als Exporter (oder Importer) zweiwertiger Kationen beschrieben (Nies, 1992; Nies and Silver, 1995). Eine Ausnahme bildet das humane ZnT5, welches bidirektional transportieren kann (Valentine *et al.*, 2007). Der Transport der Metalle über die innere Membran geschieht aktiv, hauptsächlich durch einen Protonengradienten im Antiport zu einem anderen Kation (Anton *et al.*, 2004; Chao und Fu, 2004; Grass *et al.*, 2005). Daneben wird in *B. subtilis* der aktive Export im Zusammenhang mit einem K^+/H^+ -Gradienten diskutiert (Guffanti *et al.*, 2002).

Das Substratspektrum von CDF-Transportern umfasst bisher Zn, Co, Cd, Ni, Mn und Fe (Anton *et al.*, 1999; Persans *et al.*, 2001; Delhaize *et al.*, 2003; Grass *et al.*, 2005). Der Export von Eisen aus der Zelle heraus ist erst seit kurzem bekannt (Grass *et al.*, 2005) und galt lange als Paradigma, da Eisen in vergleichbar größeren Mengen essentiell für das Wachstum ist.

Typische Vertreter der CDF-Proteine haben meist 6 transmembrane Helices (TMH) im N-terminalen Bereich und eine konservierte Signatur zwischen TMH I und II. Jedes CDF-Protein hat einen langen hydrophilen C-Terminus (Paulsen und Saier, 1997; Montanini *et al.*, 2007). Alle verfügbaren Daten lassen vermuten, dass CDF-Proteine *in vivo* homodimere Strukturen bilden (Bloß *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004). Bisher wurde lediglich in der Bäckerhefe ein heterodimerer CDF-Komplex gefunden, der Zn(II) aus dem Cytoplasma in das Endoplasmatische Retikulum (ER) schleust (Ellis *et al.*, 2005).

Mitglieder der Familie der CDF-Proteine haben eine ungewöhnlich weite Größenverteilung und Sequenzunterschiede. So sind CDF-Transporter von Prokaryoten kleiner als die von Eukaryoten (276 bis 316 Aminosäurereste gegen 366 bis 740 Aminosäurereste) (Paulsen und Saier, 1997). Trotzdem gruppieren sich die Proteine in

Stammbaumanalysen nicht nach ihrem phylogenetischen Ursprung, sondern durch ihre Substratspezifität (Nies, 2003; Montanini *et al.*, 2007). Demnach lassen sich die CDF-Proteine in drei Unterfamilien einteilen (Nies, 2003).

CDF-Transporter der Untergruppe 1 sammeln sich um DmeF aus *Cupriavidus metallidurans* CH34. DmeF vermittelt in erster Linie eine Resistenz gegenüber Co(II), weist aber von allen bisher beschriebenen CDF-Proteinen das breiteste Substratspektrum auf (Munkelt *et al.*, 2004). Ein Charakteristikum dieser Untergruppe ist eine histidinreiche Region, die sich mittig im Protein befindet und in Vertretern anderer Untergruppen fehlt. Diesem Motiv wird eine Beteiligung an der Metallbindung zugeschrieben (zu dieser Gruppe gehören auch MSC2 aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches Zn(II) in das ER transportiert (Li und Kaplan, 1997), sowie 10 homologe ZnT-Proteine (Seve *et al.*, 2004). ZnT1 bis ZnT10 sind Zinktransporter, die in Membranen verschiedener Kompartimente von eukaryotischen Zellen vorkommen. Bis auf ZnT3 ermöglichen sie den Export aus dem Cytoplasma. ZnT3 hingegen vermittelt den Influx von Zink in synaptische Vesikel (Palmiter *et al.*, 1996).

Das bevorzugte Substrat der Vertreter der Untergruppe 2 ist Zn(II), wobei auch der Transport von Co(II), Cd(II) und Ni(II) beschrieben wurde (Anton *et al.*, 1999; Grass *et al.*, 2001; Bloß *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Diese Proteine haben eine histidinreiche Region am N- oder C-Terminus, welche für ihre Funktion wichtig ist und zur Metallbindung beiträgt (Bloß *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004). In die Gruppe 2 fallen die meisten bekannten zinktransportierenden CDF-Proteine (Nies, 2003). Hierzu gehören vor allem die bakteriellen Zinkexporter ZitB aus *E. coli* und CzcD aus *C. metallidurans* (Anton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). Beide Proteine sind in der Lage Zn(II), Co(II) und Cd(II) vom Cytoplasma in das Periplasma zu transportieren (Anton *et al.*, 1999; Chao und Fu, 2004). Eukaryotische Vertreter sind z.B. MTP-Proteine aus *Arabidopsis* (Bloß *et al.*, 2002; Dräger *et al.*, 2004) oder Hefen (Kim *et al.*, 2004).

Die Untergruppe 3 stellt, neben Zinktransportern, eisentransportierende CDF-Proteine. Diesen Transportern fehlen die histidinreichen Sequenzmotive der Gruppen 1 und 2 völlig. Das erste gefundene bakterielle CDF-Protein ist FieF aus *E. coli*. Es vermittelt den Export von Fe(II) in das Periplasma und ist damit das erste bakterielle Eisenexportsystem, das jemals beschrieben wurde (Grass *et al.*, 2005). Ein FieF-Homolog ist auch in *C. metallidurans* an der Ausschleusung von Eisen beteiligt (Munkelt *et al.*, 2004). Beide Proteine sind auch in der Lage, *in vivo* Zn(II) als Substrat zu binden (Chao und Fu, 2004; Munkelt 2004; Wei and Fu, 2006). Ihre physiologische Rolle ist jedoch einzig in der Eisenhomöostase angesiedelt (Grass, 2007). Bereits 1997 wurden in *Saccharomyces cerevisiae* zwei homologe CDF-Proteine der Gruppe 3 identifiziert, die Fe(II) in die Mitochondrien transportieren (Li und Kaplan, 1997). In einer folgenden Untersuchung

konnte allerdings gezeigt werden, dass diese für die mitochondriale Eisenhomöostase nicht essentiell sind (Lange *et al.*, 1999). Zu dieser CDF-Untergruppe gehören neben Fe(II)/Zn(II)-Transportern auch solche, die nur Zn als Substrat haben. Z.B. hält Cot1 durch den Transport von überschüssigem Zink in die Vakuolen von eukaryotischen Zellen den Zinkhaushalt aufrecht (MacDiarmid *et al.*, 2000).

Wenn die Verteilung von CDF-Proteinen in verschiedenen Organismen verglichen wird, haben die meisten Prokaryoten null bis vier putative CDF-Sequenzen. Am häufigsten kommen zwei CDF-Proteine vor, eines aus Gruppe 2 und eines aus Gruppe 3 bzw. zwei aus Gruppe 3. Darin spiegelt sich vermutlich die höhere biologische Gewichtung von Eisen gegenüber anderen Metallen (Nies, 2003).

Neben der Regulierung des Metallhaushalts sind CDF-Proteine in der Lage, in Signaltransduktionswege der Zelle einzugreifen. CDF1 des Nematoden *C. elegans* wurde als Transporter zur Regulierung der intrazellulären Zinkkonzentration beschrieben. Darüberhinaus kann CDF1 als positiver Regulator des Ras/Raf-Signalwegs fungieren, indem er in die Aktivierung von Raf-1 eingreift (Jirakulaporn und Muslin, 2004). Dadurch ist CDF1 indirekt in der eukaryotischen Zellteilung involviert (Yoder *et al.*, 2004).

6 Zielsetzung

MamM und MamB wurden mittels N-terminaler Sequenzierung (Edman-Abbau) als *bona fide* Proteine der Magnetosomenmembran von *M. gryphiswaldense* MSR-1 identifiziert (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004). Für die beiden CDF-Transporter wird seit längerem eine entscheidende Rolle im Eisentransport in die Magnetosomenvesikel vermutet (Schüler, 2002; Nies, 2003). In voran gegangenen Arbeiten konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die magnetosomenmembranständigen CDF-Transporter MamM und MamB tatsächlich essentiell für die Magnetitsynthese in *M. gryphiswaldense* MSR-1 sind. Die beiden markierten Deletionsmutanten *M. gryphiswaldense* MSR-1(Δ *mamM*::*Gm*) (Junge, 2004) und *M. gryphiswaldense* MSR-1(Δ *mamB*::*Gm*) (Schultheiss, 2004) waren nicht mehr in der Lage, Magnetitkristalle zu synthetisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen von MamM und MamB in Hinsicht auf die Magnetitbiomineralisation genauer untersucht werden. Hierzu sollten zunächst unmarkierte *in frame*-Deletionen der beiden Gene *mamM* und *mamB* generiert werden, um die Wahrscheinlichkeit auftretender polarer Effekte weitestgehend zu minimieren. Die Deletionsmutanten sollten im Anschluss phänotypisch untersucht werden. Ein spezielles Augenmerk war dabei der Eisenmetabolismus im Vergleich zum Wildtyp. Hierzu sollten Wachstums- und Eisenaufnahmeversuche durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf den Beitrag von MamM und MamB bei der Magnetitsynthese erlauben.

Weiterhin sollte die Lokalisierung von MamM und MamB, welche bisher nur *in vitro* gezeigt wurde, *in vivo* demonstriert werden. Dazu wurden Gfp-Fusionen erstellt und in verschiedenen magnetischen und unmagnetischen Mutantenhintergründen exprimiert.

Eine genomweite Analyse der Verteilung von CDF-Transportern in *M. gryphiswaldense* MSR-1 und anderen verfügbaren MTB-Sequenzen sollte eine mögliche spezifische Funktion von MamM und MamB bei der Magnetitbiomineralisation untermauern. Weiterhin sollte dies durch heterologe Komplementationsversuche experimentell vertieft werden. Aus diesen Sequenzanalysen wurde weiterhin versucht, Signaturen zu identifizieren, die eine derartige Spezialisierung der Proteine erklären würde.

Der letzte Teil der Arbeit befasste sich mit der heterologen Expression und Reinigung von MamM und MamB zur Rekonstitution in Proteoliposomen. Der *in vitro* Transport von Eisen in dieses artifizielle System aus Lipidvesikeln und einem gezielten Protein würde die Funktion von MamM und MamB direkt zeigen. Außerdem kann ein heterologes Expressionssystem für MamM und MamB als Ausgangspunkt für weitere biochemische Untersuchungen dienen.

B Materialien und Methoden

1 Chemikalien und Gase

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen und hatten Reinheitsgrad "zur Analyse" bzw. "reinst". Chemikalien und Kits für molekularbiologische und biochemische Arbeiten stammen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Qiagen (Hilden), Promega (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Novagen (Madison, USA), Genomed (Löhne), Pierce (Rockford, IL, USA), Roche (Basel, Schweiz), Machery-Nagel (Düren) und Cambrex Bio Science (Rockland, Me, USA). Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Ritterhude) bezogen.

2 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt, verwendete und neu konstruierte Plasmide in Tabelle 2 bzw. 3.

Tabelle 1. Bakterienstämme

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>suoE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> BW29427	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>rpsL</i> <i>hsdS</i> <i>lacZ</i> Δ M15 RP4-1360 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341::[erm pir]tra</i>	B.L. Wanner, Purdue University, IN, USA
<i>E. coli</i> S17-1	<i>pro</i> <i>thi</i> <i>hsdR</i> Tra+ <i>recA-</i> Tr ^R Sm ^R Ω RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> RosettaTM(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> pRARE (Cm ^R)	Novagen, Madison, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21 star(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB-mB) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> C41(DE3)	Derivat von BL21(DE3)	(Miroux und Walker, 1996)
<i>E. coli</i> C43(DE3)	Derivat von C41(DE3)	(Miroux und Walker, 1996)

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i>	Wildtyp	Universität Bremen
<i>Magnetospirillum</i>		
<i>M. magnetotacticum</i> MS-1	Wildtyp	(Schleifer <i>et al.</i> , 1991)
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	Wildtyp	(Schleifer <i>et al.</i> , 1991)
<i>M. gryphiswaldense</i> R1/S3	Rif ^R , Sm ^R , spontane Mutante	(Schultheiß und Schüler, 2003)
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1B	spontane Mutante, defizient in Magnetosomensynthese	(Schübbe <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. gryphiswaldense</i> Δ mamJ	Rif ^R , Sm ^R , Δ mamJ,	(Scheffel <i>et al.</i> , 2006)
<i>M. gryphiswaldense</i> Δ mamB::Km	Δ mamB::Km	diese Arbeit
<i>M. gryphiswaldense</i> Δ mamB	Δ mamB	diese Arbeit
<i>M. gryphiswaldense</i> Δ mamM::Km	Rif ^R , Sm ^R , Δ mamM::Km	diese Arbeit
<i>M. gryphiswaldense</i> Δ mamM	Rif ^R , Sm ^R , Δ mamM	diese Arbeit
Magnetischer Vibrio MV-1	Wildtyp	D. Bazylinski, University of Nevada, CA, USA
Fosmidklon „Warmisdorf 4“		C. Flies (Flies, 2004)

Tabelle 2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pGEM [®] -T Easy	Ap ^R <i>lacZ</i> T7-Promotor, Klonierungsvektor	Promega, Heidelberg
pCR2.1-TOPO	Ap ^R , Km ^R , <i>lacZ</i> α , T7-Promotor, Klonierungsvektor	Invitrogen
pCM184	ColE1, Ap ^R , Tc ^R , <i>loxP-kan-loxP</i>	(Marx und Lidstrom, 2002)
pCM157	oriV, Tc ^R ; <i>cre</i> expression vector	(Marx und Lidstrom, 2002)
pWM91	oriR6K <i>mob</i> RP4 <i>lacI</i> <i>Ptac</i> <i>tnp</i> mini-Tn10Km; Km ^R , Ap ^R	(Metcalf und Wanner, 1996)
pBBR1MCS-2	<i>lac</i> -Promotor, Km ^R , <i>mob</i> , broad hoste range-Expressionsvektor	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-3	<i>lac</i> -Promotor, Tc ^R , <i>mob</i> , broad hoste range-Expressionsvektor	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-4	<i>lac</i> -Promotor, Ap ^R , <i>mob</i> , broad hoste range-Expressionsvektor	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-2- <i>egfp</i>	<i>lac</i> -Promotor, Km ^R , <i>mob</i> , <i>gfp</i>	(Lang und Schüler, 2008)
pBBR1MCS-2-10G <i>egfp</i>	<i>lac</i> -Promotor, Km ^R , <i>mob</i> , <i>gfp</i> , 10-Glycin-Linker	(Lang und Schüler, 2008)
pPR-IBA1	T7-Promotor, Ap ^R , Strep-Tag	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA3	<i>tet</i> -promotor, <i>tet</i> -Repressor, Ap ^R , Strep-Tag	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA43	<i>tet</i> -promotor, <i>tet</i> -Repressor, Ap ^R , Strep-Tag	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA5	<i>tet</i> -promotor, <i>tet</i> -Repressor, Ap ^R , Strep-Tag, His6-Tag	IBA GmbH, Göttingen
pET-42a(+)	T7-Promotor, <i>lacI</i> , Km ^R , His ₁₀ -Tag, Gst-Tag, S-Tag	Novagen, Merck, Darmstadt
pET-16b	T7-Promotor, <i>lacI</i> , Ap ^R , His ₁₀ -Tag	Novagen, Merck, Darmstadt

Plasmid	Merkmale	Referenz
pET-51b(+)	T7-Promotor, <i>lacI</i> , Ap ^R , Strep-Tag, His10-Tag	Novagen, Merck, Darmstadt
pBBR1MCS2-fieF	Km ^R , <i>mob</i> , enthält <i>fieF</i> von <i>E. coli</i>	G. Grass, Universität Halle
pBBR1MCS2-zitB	Km ^R , <i>mob</i> , enthält <i>zitB</i> von <i>E. coli</i>	G. Grass, Universität Halle

Tabelle 3. Plasmidkonstrukte. Wenn nicht anders angegeben, ist der Ausgangsorganismus MSR-1

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert, Merkmal
Deletion		
pGem- <i>mamM</i> 5'	pGEM [®] -T Easy	1,6 kB 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment plus die ersten 6 bp von <i>mamM</i> ; pCM184
pGem- <i>mamM</i> 3'	pGEM [®] -T Easy	1,3 kB 3'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment plus die letzten 33 bp von <i>mamM</i> ; pCM184
pCM184- <i>mamM</i> 5'	pCM184	1,6 kB BglII-NcoI 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 5'
pCM184- Δ <i>mamM</i>	pCM184- <i>mamM</i> 5'	1,6 kB BglII-NcoI 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 5' und 1,3 kB Apal-SacI 3'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 3'
pGem- <i>mamB</i> 5'	pGEM [®] -T Easy	1,5 kB 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment plus die ersten 60 bp von <i>mamB</i> ; pCM184
pGem- <i>mamB</i> 3'	pGEM [®] -T Easy	1,6 kB 3'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment plus die letzten 63 bp von <i>mamB</i> ; pCM184
pCM184- <i>mamB</i> 5'	pCM184	1,5 kB EcoRI-Acc65I 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 3'
pCM184- Δ <i>mamB</i>	pCM184- <i>mamB</i> 5'	1,5 kB EcoRI-Acc65I 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 3' und 1,6 kB Apal-SacI 3'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 3'
pGem- <i>mamM</i> 5'WM	pGEM [®] -T Easy	1,7 kB 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment plus die ersten 6 bp von <i>mamM</i> ; pWM91
pGem- <i>mamM</i> 3'WM	pGEM [®] -T Easy	1,5 kB 3'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment plus die letzten 120 bp von <i>mamM</i> ; pWM91
pWM91- <i>mamM</i> 5'	pWM91	1,7 kB BcuI-SmaI 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 5'WM
pWM91- Δ <i>mamM</i>	pWM91- <i>mamM</i> 5'	1,7 kB BcuI-SmaI 5'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 5'WM und 1,5 kB SmaI-SacI 3'- <i>mamM</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamM</i> 3'WM
pGem- <i>mamB</i> 5'WM	pGEM [®] -T Easy	1,5 kB 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment plus die ersten 90 bp von <i>mamB</i> ; pWM91
pGem- <i>mamB</i> 3'WM	pGEM [®] -T Easy	1,6 kB 3'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment plus die letzten 120 bp von <i>mamB</i> ; pWM91
pWM91- <i>mamB</i> 5'	pWM91	1,5 kB BcuI-SmaI 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 5'WM
pWM91- Δ <i>mamB</i>	pWM91- <i>mamB</i> 5'	1,5 kB BcuI-SmaI 5'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 5'WM und 1,6 kB SmaI-SacI 3'- <i>mamB</i> -Deletionsfragment aus pGem- <i>mamB</i> 3'WM

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert, Merkmal
Komplementation		
pCR- <i>mamMMSR1</i> (MCS2)	pCR2.1-TOPO	1010 bp Fragment inkl. <i>mamM</i> von MSR-1 und 42 bp 5' des Startkodons
pCR- <i>mamBMSR1</i> (MCS2)	pCR2.1-TOPO	931 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MSR-1 und 39 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamBMS1</i> (MCS2)	pGEM [®] -T Easy	942 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MS-1 und 43 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamBMC1</i> (MCS2)	pGEM [®] -T Easy	953 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MC-1 und 42 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamBMV1</i> (MCS2)	pGEM [®] -T Easy	955 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MV-1 und 13 bp der RBS von pET-51b(+)
pGem- <i>mamBTK</i> (MCS2)	pGEM [®] -T Easy	905 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> eines Teichklonfosmids und 18 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamMMSR1</i> (MCS3)	pGEM [®] -T Easy	1052 bp Fragment inkl. <i>mamM</i> von MSR-1 und 42 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamBMSR1</i> (MCS3)	pGEM [®] -T Easy	922 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MSR-1 und 17 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>mamBMS1</i> (MCS3)	pGEM [®] -T Easy	945 bp Fragment inkl. <i>mamB</i> von MS-1 und 43 bp 5' des Startkodons
pGem- <i>ydfM</i>	pGEM [®] -T Easy	893 bp Fragment inkl. <i>ydfM</i> von <i>B. subtilis</i> und 45 bp 5' des Startkodons
pBBR1MCS2- <i>mamMMSR1</i>	pCR- <i>mamMMSR1</i> (MCS2)	1010 bp HindIII-XbaI Fragment von <i>mamM</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS2- <i>mamBMSR1</i>	pCR- <i>mamBMSR1</i> (MCS2)	931 bp HindIII-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS2- <i>mamBMS1</i>	pGem- <i>mamBMS1</i> (MCS2)	942 bp ApaI-SacI Fragment von <i>mamB</i> von MS-1 mit RBS
pBBR1MCS3- <i>mamMMSR1</i>	pGem- <i>mamMMSR1</i> (MCS3)	1052 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamM</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS3- <i>mamBMSR1</i>	pGem- <i>mamBMSR1</i> (MCS3)	922 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS3- <i>mamBMS1</i>	pGem- <i>mamBMS1</i> (MCS3)	945 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MS-1 mit RBS
pBBR1MCS4- <i>mamMMSR1</i>	pGem- <i>mamMMSR1</i> (MCS3)	1052 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamM</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS4- <i>mamBMSR1</i>	pGem- <i>mamBMSR1</i> (MCS3)	922 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MSR-1 mit RBS
pBBR1MCS4- <i>mamBMS1</i>	pGem- <i>mamBMS1</i> (MCS3)	945 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MS-1 mit RBS
pBBR1MCS2- <i>mamBTK</i>	pGem- <i>mamBTK</i> (MCS2)	905 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> eines Teichklonfosmids mit RBS
pBBR1MCS2- <i>mamBMV1</i>	pGem- <i>mamBMV1</i> (MCS2)	955 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>mamB</i> von MV-1 mit RBS
pBBR1MCS2- <i>ydfM</i>	pGem- <i>ydfM</i>	893 bp XhoI-XbaI Fragment von <i>ydfM</i> von <i>B. subtilis</i> mit RBS
Gfp-Fusion		
pGem- <i>mamM</i> (<i>gfpN</i>)	pGEM [®] -T Easy	966 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon für N-terminale <i>gfp</i> -Fusionen
pGem- <i>mamM</i> (<i>gfpC</i>)	pGEM [®] -T Easy	981 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Stopkodon, aber inkl. 15 bp vor dem Startkodon für C-terminale <i>gfp</i> -Fusionen

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert, Merkmal
pGem- <i>mamB(gfpN)</i>	pGEM [®] -T Easy	906 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon für N-terminale <i>gfp</i> -Fusionen
pGem- <i>mamB(gfpC)</i>	pGEM [®] -T Easy	908 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Stopkodon, aber inkl. 16 bp vor dem Startkodon für C-terminale <i>gfp</i> -Fusionen
pBBR1MCS2- <i>mamMegfp</i>	pGem- <i>mamM(gfpC)</i>	981 bp XhoI-NdeI Fragment von <i>mamM</i> ; C-terminale <i>egfp</i> -Fusion
pBBR1MCS2- <i>mamM10Gegfp</i>	pGem- <i>mamM(gfpC)</i>	981 bp XhoI-NdeI Fragment von <i>mamM</i> ; C-terminale <i>gfp</i> -Fusion mit 10x Glycinlinker
pBBR1MCS2- <i>mamBegfp</i>	pGem- <i>mamB(gfpC)</i>	908 bp XhoI-NdeI Fragment von <i>mamB</i> ; C-terminale <i>gfp</i> -Fusion
pBBR1MCS2- <i>mamB10Gegfp</i>	pGem- <i>mamB(gfpC)</i>	908 bp XhoI-NdeI Fragment von <i>mamB</i> ; C-terminale <i>gfp</i> -Fusion mit 10x Glycinlinker
pBBR1MCS2- <i>egfpmamM</i>	pGem- <i>mamM(gfpN)</i>	966 bp NdeI-BamHI Fragment von <i>mamM</i> ; N-terminale <i>gfp</i> -Fusion
pBBR1MCS2- <i>egfpmamB</i>	pGem- <i>mamB(gfpN)</i>	906 bp NdeI-BamHI Fragment von <i>mamB</i> ; N-terminale <i>gfp</i> -Fusion
Überexpression		
pGem- <i>mamM</i> (IBA1, 3,43)	pGEM [®] -T Easy	960 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Stopkodon
pGem- <i>mamM</i> (IBA 5)	pGEM [®] -T Easy	960 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon
pGem- <i>mamB</i> (IBA1, 3,43)	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Stopkodon
pGem- <i>mamB</i> (IBA 5)	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon
pPR-IBA1- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (IBA1, 3,43)	960 bp XhoI-SacI Fragment von <i>mamM</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA3- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (IBA1, 3,43)	960 bp XhoI-SacI Fragment von <i>mamM</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA43- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (IBA1, 3,43)	960 bp XhoI-SacI Fragment von <i>mamM</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA5- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (IBA 5)	960 bp XhoI-SacI Fragment von <i>mamM</i> ; N-terminale Strep-Tag-Fusion
pPR-IBA1- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (IBA1, 3,43)	897 bp BsaI-Fragment von <i>mamB</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA3- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (IBA1, 3,43)	897 bp BsaI-Fragment von <i>mamB</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA43- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (IBA1, 3,43)	897 bp BsaI-Fragment von <i>mamB</i> ; C-terminale Strep-Tag-Fusion
pASK-IBA5- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (IBA 5)	897 bp BsaI-Fragment von <i>mamB</i> ; N-terminale Strep-Tag-Fusion
pGem- <i>mamM</i> (pET42)	pGEM [®] -T Easy	960 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon
pGem- <i>mamB</i> (pET42)	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon
pET42- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (pET16)	960 bp BamHI-XhoI Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon; N-terminale Gst-Fusion
pET42- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (pET16)	897 bp BamHI-XhoI Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon; N-terminale Gst-Fusion

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert, Merkmal
pGem- <i>mamM</i> (pET16)	pGEM [®] -T Easy	960 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon
pGem- <i>mamB</i> (pET16)	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon
pET16- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (pET16)	960 bp NdeI-XhoI Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon; N-terminaler His-Tag
pET16- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (pET16)	897 bp NdeI-XhoI Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon; N-terminaler His-Tag
pGem- <i>mamM</i> (pET51)	pGEM [®] -T Easy	960 bp Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon
pGem- <i>mamB</i> (pET51)	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon
pET51- <i>mamM</i>	pGem- <i>mamM</i> (pET51)	960 bp BamHI-HindIII Fragment von <i>mamM</i> ohne Startkodon; N-terminale Strep-Tag-Fusion
pET51- <i>mamB</i>	pGem- <i>mamB</i> (pET51)	897 bp BamHI-HindIII Fragment von <i>mamB</i> ohne Startkodon; N-terminale Strep-Tag-Fusion
pGem- <i>mamB</i> Strep	pGEM [®] -T Easy	921 bp Fragment von <i>mamB</i> C-terminal fusioniert mit Strep-Tag
pGem- <i>mamM</i> Tan	pGEM [®] -T Easy	979 bp Fragment von <i>mamM</i> mit RBS von pET51 für Tandemkonstrukt in pET51
pGem- <i>mamM</i> StrepTan	pGEM [®] -T Easy	1003 bp Fragment von <i>mamM</i> mit RBS von pET51 C-terminal fusioniert mit Strep-Tag für Tandemkonstrukt in pET51
pGem- <i>mamB</i> Tan	pGEM [®] -T Easy	897 bp Fragment von <i>mamB</i> für Tandemkonstrukt in pET51
pGem- <i>mamB</i> StrepTan	pGEM [®] -T Easy	915 bp Fragment von <i>mamB</i> C-terminal fusioniert mit Strep-Tag für Tandemkonstrukt in pET51
pET51- <i>mamB</i> Strep	pGem- <i>mamB</i> Strep	921 bp NcoI-HindIII Fragment von <i>mamB</i> C-terminal fusioniert mit Strep-Tag
pET51- <i>mamB</i> StrepTan	pGem- <i>mamB</i> StrepTan	915 bp NcoI-BamHI Fragment von <i>mamB</i> C-terminal fusioniert mit Strep-Tag
pET51- <i>mamB</i> Tan	pGem- <i>mamB</i> Tan	897 bp NcoI-BamHI Fragment von <i>mamB</i>
pET51- <i>mamB</i> , <i>mamM</i>	pET51- <i>mamB</i> Tan pGem- <i>mamM</i> Tan	897 bp NcoI-BamHI Fragment von <i>mamB</i> und 979 bp BamHI-SacI Fragment von <i>mamM</i>
pET51- <i>mamB</i> Strep, <i>mamM</i>	pET51- <i>mamB</i> StrepTan pGem- <i>mamM</i> StrepTan	915 bp NcoI-BamHI Fragment von <i>mamB</i> C-terminal fusioniert mit Strep-Tag und 979 bp BamHI-SacI Fragment von <i>mamM</i>

3 Oligonukleotide

Die Konstruktion der Primer erfolgte mit Hilfe der Software MacVector 7.0, bzw. Accelrys Gene aus hinterlegten Sequenzen. Angefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind in der Primersequenz hervorgehoben. Bezogen wurden die Primer von MWG Biotech AG (Ebersberg) und Metabion (Martinsried). Sie wurden

nach Angabe des Herstellers mit bidest H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l (Stammlösung) gelöst. Die Endkonzentration der Arbeitslösung betrug 10 pmol/ μ l.

Tabelle 4. Verwendete Primer. Fett gedruckt sind angefügte Restriktionsschnittstellen, Kursiv gedruckt Basen zur Auffüllung von Leserahmen.

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktionsschnittstelle/ Verwendung/Zielplasmid
Deletion		
mamM3fw3	CCC GGG GAC ATG ATT ATT GGC GTC	SmaI, Deletion <i>mamM3</i> '-Fragment mit pWM91
mamM5rw3	CCC GGG AAT AAT CAC CAT CAG GGC	SmaI, Deletion <i>mamM5</i> '-Fragment mit pWM91
mamM3_rw	GAG CTC ACG GCG ATG TAC ACG G	SacI, Deletion <i>mamM3</i> '-Fragment mit pWM91
mamM5pWM_fw	ACT AGT GTC GAT GGA GTG GTC AA	SpeI (BclI), Deletion <i>mamM5</i> '-Fragment mit pWM91
mamB3pCM_rw	GAG CTC TAA CGA TCA TTG ACC CGT C	SacI, Deletion <i>mamB</i> mit pCM184-Vektor und pWM91 3'-Fragment
mamB5pWM_fw	ACT AGT GCT TGA GCG CTC CAT C	SpeI (BclI), Deletion <i>mamB</i> mit pWM91 5'-Fragment
mamB5pKpWM_rw	CCC GGG GGC GGT GAA TGC CAA	SmaI, Deletion <i>mamB</i> , pWM91, 5'-Fragment;
mamB3pKpWM_fw	CCC GGG GTA CGC CAG CGC ATC	SmaI, Deletion <i>mamB</i> ; pWM91, 3'-Fragment
mamM5_fw	AGA TCT GTC GAT GGA GTG GTC AA	BglII, Deletion <i>mamM</i> , pCM184, 5'-Fragment
mamM5_rw	CCA TGG TCA TCC TTA CCT ACT CCA A	NcoI, Deletion <i>mamM</i> 5'-Fragment pCM184
mamM3_fw	GGG CCC TCC AAG GTG GAT AAC TA	ApaI, Deletion <i>mamM</i> 3'-Fragment pCM184
mamM3_rw	GAG CTC ACG GCG ATG TAC ACG G	SacI, Deletion <i>mamM</i> 3'-Fragment pCM184
mamB3pCM_fw	GGG CCC CCA CAC GCC CGA GAT AT	ApaI, Deletion <i>mamB</i> , pCM184; 3'-Fragment
mamB5pCMpK_fw	GAA TTC GCT TGA GCG CTC CAT C	EcoRI, Deletion <i>mamB</i> , pCM184, 5'-Fragment
mamB5pCM_rw3	GGT ACC CGG CGG TGA ATG CCC A	Acc65I, Deletion <i>mamB</i> ; 5'-Fragment; pCM184
Komplementation		
ydfM_Bsub_fw2	CTC GAG CGG AGA GCG TAT ATA GAG CAC	XhoI, <i>ydfM</i> von <i>B. subtilis</i> mit Stopkodon, pBBR1MCS-2
ydfM_Bsub_rw2	TCT AGA TTC TTC GAA ATA AGG ATT TAC A	XbaI, <i>ydfM</i> von <i>B. subtilis</i> mit RBS pBBR1MCS-2
mamB-MC1fw	CTC GAG CCG CTT GAG GGA CAG AAA	XhoI, <i>mamB</i> von MC-1 mit RBS pBBR1MCS-2
mamB-MC1rw	TCT AGA TTT TTA AGC TAC GTC ACA	XbaI, <i>mamB</i> von MC-1 mit Stopkodon pBBR1MCS-2
mamB-MSR1fw2	CGA ATC CTG GGC TCC AAT CTT	<i>mamB</i> von MSR-1 mit RBS pBBR1MCS-2

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktionsschnittstelle/ Verwendung/Zielpiasmid
mamB-MSR1rw2	AGG CCG AAA GTC CAT GAT TCC	<i>mamB</i> von MSR-1 mit Stopkodon pBBR1MCS-2
mamM-MSR1fw2	ATG CTC CGT CGG AGC TGG G	<i>mamM</i> von MSR-1 mit RBS pBBR1MCS-2
mamM-msr1rw2	GAA CAC AGC GAG GGT GAT AAA TCC	<i>mamM</i> von MSR-1 mit Stopkodon pBBR1MCS-2
mamB-MS1fw2	ATT ATC GTA TCC TGG GCT CCA ATC TT	<i>mamB</i> von MS-1 mit RBS pBBR1MCS-2
mamB-MS1rw2	TGG CCG GAA GTC CAT G	<i>mamB</i> von MS-1 mit Stopkodon pBBR1MCS-2
mamBTKXhol_fw	CTC GAG CAT CGG GTA CTT CAA TCA ATG A	XhoI, <i>mamB</i> von Teichklonfosmid mit RBS pBBR1MCS-2
mamBTKXbal_rw	TCT AGA TCA GGC CTT AAC GCC GGA G	XbaI, <i>mamB</i> von Teichklon mit Stopkodon pBBR1MCS-2
mamB-MSR1_rw3	TCT AGA TCA GAC CCG GAC CGT CAC TGC	XbaI, <i>mamB</i> mit Stopkodon, pBBR1MCS-3, 4
mamM-MSR1_rw3	TCT AGA CTA GTT ATC CAC CTT GGA CAG C	XbaI, <i>mamM</i> mit Stopkodon, pBBR1MCS-3, 4
mamB-MS1_fw3	CTC GAG ATT ATC GTA TCC TGG GCT CCA A	XhoI, <i>mamB</i> von MS-1 mit RBS, pBBR1MCS-3, 4
mamB-MS1_rw3	TCT AGA TCA GGC CCG TGC CGC GGC	XbaI, <i>mamB</i> von MS-1 mit RBS, pBBR1MCS-3, 4
mamM-MSR1_fw3	CTC GAG ATG CTC CGT CGG AGC TGG G	XhoI, <i>mamM</i> von MSR-1 mit RBS, pBBR1MCS-3, 4
MamB_BamH1_SCfor	GGA TCC AAG TTC GAA AAT TCC AGA GAC TGC CG	BamHI, <i>mamB</i> von MSR-1, Basentausch TGC gegen TCC
MamB_BamH1_SSfor	GGA TCC AAG TTC GAA AAT TCC AGA GAC TCC CGG G	BamHI, <i>mamB</i> von MSR-1, Basentausch TGC gegen TCC und TGC gegen TCC
MamB_Sac1_rev	GAG CTC AGA CCC GGA CCG TCA CTG C	SacI, <i>mamB</i> von MSR-1, Basentausch
<i>gfp</i> -Fusion		
mamMgfpC_Ndelrw	CAT ATG GTT ATC CAC CTT GGA CAG C	NdeI, C-terminale Gfp-Fusion von <i>mamM</i> ohne Stopkodon
mamMgfpC_Xholfw	CTC GAG TTG GAG TAG GTA AGG ATG A	XhoI, C-terminale Gfp-Fusion von <i>mamM</i> Genanfang mit RBS
mamBgfpC_Xholfw	CTC GAG GTG GAA TAC ATG AAC CGA	XhoI, C-terminale Gfp-Fusion von <i>mamB</i> Genanfang mit RBS
mamBgfpC_Ndelrw	CAT ATG GAC CCG GAC CGT CAC TGC	NdeI, C-terminale Gfp-Fusion von <i>mamB</i> ohne Stopkodon
mamMgfpN_Ndelfw	CAT ATG AGG AAG AGC GGT TGC GC	NdeI, N-terminale Gfp-Fusion von <i>mamM</i> ohne Startcodon
mamMgfpN_BamHrw	GGA TCC CTA GTT ATC CAC CTT GGA CA	BamHI, N-terminale Gfp-Fusion von <i>mamM</i> mit Stopkodon
mamBgfpN_Ndelfw	CAT ATG AAG TTC GAA AAT TGC AGA GAC	NdeI, N-terminale Gfp-Fusion von <i>mamB</i> ohne Startcodon
mamBgfpN_BamHrw	GGA TCC TCA GAC CCG GAC CGT CAC	BamHI, N-terminale Gfp-Fusion von <i>mamB</i> mit Stopkodon

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktionsschnittstelle/ Verwendung/Zielplasmid
Überexpression		
mamMÜrwXho3431	CTC GAG GTT ATC CAC CTT GGA CAG CAT	XhoI, <i>mamM</i> , pASK-IBA3, 43; pPR-IBA1 ohne Stopkodon
mamMÜESacl_fw	GAG CTC AGG AAG AGC GGT TG	SacI, <i>mamM</i> , pASK-IBA3, 43, pPR-IBA1 ohne Startcodon
mamMÜE5Sacl_fw	GAG CTC AAG GAA GAG CGG TTG	SacI, <i>mamM</i> , pASK-IBA5 ohne Startcodon
mamB_rw_IBA1,3,43	ATG GTA GGT CTC AGC GCT GAC CCG GAC CGT CAC TGC GG	BsaI (Eco31I), <i>mamB</i> pASK-IBA3, 43; pPR-IBA1, ohne Stopkodon
mamB_fw_IBA43	ATG GTA GGT CTC AGG CCA AGT TCG AAA ATT GCA GAG ACT GC	BsaI, <i>mamB</i> , pASK-IBA43 ohne Startcodon
mamB_rw_IBA5	ATG GTA GGT CTC ATA TCA GAC CCG GAC CGT CAC TGC GG	BsaI (Eco31I), <i>mamB</i> , pASK-IBA5 ohne Stopkodon
mamB_fw_IBA1,3	ATG GTA GGT CTC AAA TGA AGT TCG AAA ATT GCA GAG ACT GC	BsaI (Eco31I), <i>mamB</i> , pASK-IBA3, pPR-IBA1 ohne Startcodon
mamB_fw_IBA5	ATG GTA GGT CTC AGC GCC AAG TTC GAA AAT TGC AGA GAC TGC	BsaI (Eco31I), <i>mamB</i> , pASK-IBA5 ohne Startcodon
mamMÜE-pET1_fw	GCG GGA TCC AGG AAG AGC GGT TGC GC	BamHI, <i>mamM</i> ohne Startcodon pET-42a(+)
mamMÜE-pET1_rw	GCG CTC GAG TTA GTT ATC CAC CTT GGA CA	XhoI, <i>mamM</i> TAA-Stopkodon pET- 42a(+)
mamBÜE-pET1_rw	GCG CTC GAG TTA GAC CCG GAC CGT CAC	XhoI, <i>mamB</i> pET-42a(+) TAA-Stopkodon
mamBÜE-pET1_fw	CAG GAT CCA AGT TCG AAA ATT GCA GAG ACT	BamHI, <i>mamB</i> pET-42a(+) ohne Startcodon
mamBÜEfw_NdeI	CAT ATG AAG TTC GAA AAT TGC AGA GAC T	NdeI, <i>mamB</i> pET-16b(+) ohne Startcodon
mamBÜErw_BamHI	GGA TCC TTA GAC CCG GAC CGT CAC	BamHI, <i>mamB</i> pET-16b(+) mit TAA-Stopkodon
mamMÜEfw_NdeI	CAT ATG AGG AAG AGC GGT TGC G	NdeI, <i>mamM</i> pET-16b(+) ohne Startcodon
mamMÜErw_BamHI	GGA TCC TTA GTT ATC CAC CTT GGA CAG	BamHI, <i>mamM</i> pET-16b(+) TAA-Stopkodon
mamMÜEfw_BamHI	GGA TCC GAG GAA GAG CGG TTG CGC	BamHI, <i>mamM</i> pET-51b(+) TAA-Stopkodon
mamMÜErw_HindIII	AAG CTT TTA GTT ATC CAC CTT GGA CA	HindIII, <i>mamM</i> pET-51b(+) ohne Startcodon
mamBÜEfw_BamHI	GGA TCC GAA GTT CGA AAA TTG CAG AGA CT	BamHI, <i>mamB</i> pET-51b(+) TAA-Stopkodon
mamBÜErw_HindIII	AAG CTT TTA GAC CCG GAC CGT CAC	HindIII, <i>mamB</i> pET-51b(+) ohne Startcodon
mamBTandNco_fw	CCA TGG CAA AGT TCG AAA ATT GCA GAG ACT G	NcoI, <i>mamB</i> , für Tandemkonstrukt
mamBTandBam_rw	GGA TCC TTA GAC CCG GAC CGT CAC T	BamHI, <i>mamB</i> , für Tandemkonstrukt

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktionsschnittstelle/ Verwendung/Zielplasmid
mamMTandBamH_fw	GGA TCC <u>AAG AAG GAG ATA</u> <u>TAC CAT GAG GAA GAG CGG</u> TTG CGC GGT CTG	BamHI, <i>mamM</i> , mit RBS aus pET51b(+), für Tandemkonstrukt
mamMTandSacl_rw	GAG CTC TTA GTT ATC CAC CTT GGA CAG CAT GAC CTC GTC GAA ACT CAG CGG C	Sacl, <i>mamM</i> , für Tandemkonstrukt
mamBTandStrBam_rw	GGA TCC <u>TTA CTT TTC GAA</u> <u>CTG CGG GTG GCT CCA GAC</u> CCG GAC CGT CAC TGC G	BamHI, <i>mamM</i> , C-terminaler Strep-Tag, für Tandemkonstrukt
mamMTandStrSacl_rw	GAG CTC <u>TTA CTT TTC GAA</u> <u>CTG CGG GTG GCT CCA GTT</u> ATC CAC CTT GGA CAG CA	Sacl, <i>mamM</i> , C-terminaler Strep-Tag, für Tandemkonstrukt
sonstige		
IdentMfw	CGG GGC TTT GGA GTA GGT AAG G	Identifizierung von Deletionen, liegt zwischen <i>mamL</i> und <i>mamM</i>
IdentMrw	AAA CGG CCA GAT GGC TGC C	Identifizierung von Deletionen; liegt am von Anfang <i>mamN</i>
South_M_pCM_fw	GTG AAA GAT AAA CTG CGC CC	Southern-Sonde <i>mamM</i> -Deletion, bindet ca. 40 bp vor <i>mamL</i>
South_M_pCM_rw	CGC AAA CAC CAA CAC AAT CC	Southern-Sonde <i>mamM</i> -Deletion, bindet 60 bp vor Ende <i>mamL</i>
South_B_pCM_fw	TCA GTC GGC GGA TAC CTA CAA G	Southern-Sonde <i>mamB</i> -Deletion, bindet mittig in <i>mamQ</i>
South_B_pCM_rw	CCT CGC CAA ATA CCT TGT CCA C	Southern-Sonde <i>mamB</i> -Deletion, bindet 30 bp nach Anfang <i>mamR</i>
ASpASK_Seq1f	TCG AAT GGC CAG ATG ATT AAT TCC	Kontrollprimer der pASK-IBA-Vektoren, upstream der MCS
AspPR_Seq1f	CTC GAT CCC GCG AAA TTA ATA CG	Kontrollprimer der pASK-IBA-Vektoren, downstream der MCS
pWM91_Seq_fw	AAG TGC CAC CTG ACG TCT A	Kontrollprimer pWM91, bindet vor der MCS
pWM91_Seq_rw	GAC CAT GAT TAC GCC AAG C	Kontrollprimer pWM91, bindet nach der MCS
pCM184_Seq1fw	AAC AAA TAG GGG TTC CGC	Kontrollprimer, bindet vor der 5'-MCS in pCM184
pCM184_Seq1rw	GAG ACA CAA CGT GGC TTT C	Kontrollprimer, bindet nach der 5'-MCS in pCM184
pCM184_Seq2fw	CCT GGT ATG AGT CAG CAA	Kontrollprimer, bindet vor der 3'-MCS in pCM184
pCM184_Seq2rw	TGA CAA TCA CGA AAC GCG	Kontrollprimer, bindet nach der 3'-MCS in pCM184
pET16b_fw	CCA AGG GGT TAT GCT AGT TAT TG	Kontrollprimer, bindet vor der MCS in pET-16b
pET16b_rw	ATA GGG GAA TTG TGA GCG G	Kontrollprimer, bindet nach der MCS in pET-16b
pCM_Km_fw	GGT GTT ATG AGC CAT ATT CAA C	Km-Kassette von pCM184
pCM_Km_rw	CTC TGC CAG TGT TAC AAC C	Km-Kassette von pCM184
pCM_Kontr_fw	ACC AAT GCT TAA TCA GTG AGG	Fragment der Ap-Resistenz auf pCM184

Name/Orientierung	Sequenz 5'→3'	Restriktionsschnittstelle/ Verwendung/Zielplasmid
pCM_Kontr_rw	ACG AGT GGG TTA CAT CGA AC	Fragment der Ap-Resistenz auf pCM184
mamLRTfw	TTG GTG ACG TTT CCG GTC AG	bindet 5`-Bereich in <i>mamL</i>
mamLRTrw	GAC GAT GTT TTT CCC AGG CAG	bindet 3`-Bereich in <i>mamL</i>
mamMRTfw	TAA CAG CCC CCT CAT CAA GAC C	bindet 5`-Bereich in <i>mamM</i>
mamMRTrw	CCT CGC AAA TTT CAT GCG CC	bindet 3`-Bereich in <i>mamM</i>
mamNRTfw	TCA CCC TCG CTG TGT TCA TC	bindet 5`-Bereich in <i>mamN</i>
mamNRTrw	GTG CGG AAA CAT ACG GTC AG	bindet 3`-Bereich in <i>mamN</i>
mamRRTfw	GGT GGA CAA GGT ATT TGG CG	bindet 5`-Bereich in <i>mamR</i>
mamRRTrw	AGA TTG GAG CCC AGG ATT CG	bindet 3`-Bereich in <i>mamR</i>
mamBRTfw	CAT TCA CCG CCG ATA TCT GC	bindet 5`-Bereich in <i>mamB</i>
mamBRTrw	TGG CCG GGC TGT TAT TTT CG	bindet 3`-Bereich in <i>mamB</i>
mamURTfw	TCG CCG CAA TCA TCA ATG C	bindet 5`-Bereich in <i>mamU</i>
mamURTrw	TCA TTG ACC CGT CCC ACA TC	bindet 3`-Bereich in <i>mamU</i>

4 Mikrobiologische Methoden

4.1 Medienzusätze

Substanzen, die den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt wurden, sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Alle Lösungen wurden steril filtriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Substanzen in bidest. H₂O gelöst.

Tabelle 5. Medienzusätze. Angegeben sind Endkonzentrationen in Fest- bzw. Flüssigmedium.

Substanz	Stammlösung in mg/ml	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration in µg/ml		
			MSR-1		<i>E. coli</i>
			fest	flüssig	fest + flüssig
Ampicillin	50				30
Gentamycin	10		30	10	10
Kanamycin	25		5	25	25
Tetrazyklin					
Rifampicin	30	Methanol	150		
Streptomycin	50		30	15	
Saccharose			5 %		
X-Gal	40	Dimethyl- formamid			ca. 10
DAP	1 M	0,5 M HCl			1 mM
AHT					
IPTG	1 M				0,4, bzw. 1 mM

4.2 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) angezogen. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotikakonzentrationen zugegeben. Als Anzuchtgefäße dienten sterile Sarstedtröhrchen und Erlenmeyerkolben (mit und ohne Schikanen). Bei den Erlenmeyerkolben wurde auf ein Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1:5 geachtet. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C (Inkubator CertomatRH, B. Braun Biotech Int., Melsungen) auf einem Schüttler (CertomatRR, B. Braun Biotech Int.) bei 180 rpm angezogen.

Beimpfte Agarplatten wurden aerob bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank (GFL 3033, Jürgens, Bremen) inkubiert. Nach der Inkubation bei 37 °C wurden alle Platten bei 4 °C aufbewahrt.

4.3 Glycerolstocks

Von Stämmen neu konstruierter, sequenzierter Plasmide wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurde 1 ml der Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit 25 % Glycerin versetzt bei -80 °C gelagert.

4.4 Kultivierung von *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Wenn nicht anders angegeben, werden im Folgenden mit 1 bis 2 % O₂ in 99 % N₂ begasten Kulturansätze als "mikroaerob" und Ansätze in Duranflaschen mit leicht geöffnetem Schraubdeckel als "aerob" bezeichnet.

4.4.1 Medien für *Magnetospirillum gryphiswaldense*

a) Standardmedium (pH 7,0)

Tabelle 6. Zusammensetzung und Einwaage des Standardmediums

	Stammlösung		Menge der Stammlösung/L		Endkonzentration	
HEPES	1	M	10	ml	10	mM
Na-Pyruvat	30	% (w/v)	10	ml	0,3	% (w/v)
Pepton					3	g/l
Hefeextrakt					0,1	g/l
NaNO ₃	1	M	4	ml	0,4	mM
KH ₂ PO ₄	100	g/l	1	ml	1	g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1	M	6	ml	0,6	mM
Fe(III)-Citrat	10	mM	5	ml	0,05	mM
Spurenelemente ¹⁾			1	ml		

1) komplexiert (nach (Widdel und Bak, 1992))

Spurenelementlösung, komplexiert (nach (Widdel und Bak, 1992))

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,1	g/l
Na ₂ EDTA	5,2	g/l
H ₃ BO ₃	30,0	mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100,0	mg/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190,0	mg/l
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24,0	mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2,0	mg/l
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	144,0	mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36,0	mg/l

Die Salze wurden nacheinander unter Erwärmen in Lösung gebracht. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,4 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

b) eisenfreies Medium

Für die Kultivierung in eisenreduziertem Medium wurde das Standardmedium modifiziert. Die Zusammensetzung blieb gleich, jedoch wurde das Medium ohne Zugabe von Fe(III)-Citrat und Spurenelementlösung hergestellt. Um den Resteisengehalt des Mediums (aus dem Pepton) weiter zu reduzieren, wurde das Medium mit nur 1 g/l Pepton angesetzt.

c) Modifiziertes MSR-Medium für Einzelkolonieversuche

Die Kultivierung von *M. gryphiswaldense* auf festem Medium erfolgte zu Beginn der Arbeit noch auf AK-Medium (Schultheiss und Schüler, 2003). Für dessen Herstellung wurden dem Standardmedium 1,5 % Bacto-Agar (Difco) und zur Komplexierung möglicher Radikale, die durch den Restsauerstoff entstehen können, wurden 0,3 % Aktivkohle zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium zusätzlich mit 100 mM 1,4-Dithio-DL-threit (DTT) reduziert. Die Eisenkonzentration wurde auf 500 µM erhöht.

Im Verlauf der Arbeit wurde das Festmedium umgestellt auf Standardmedium, welches mit 100 µM Eisen versetzt und mit 1,5 % Agar verfestigt wurde. Dem Medium wurden nach dem Autoklavieren entsprechende Antibiotika zugegeben.

d) Medium für Weichagarkulturen

Zur Herstellung von Weichagar wurde das Standardmedium mit 0,5 g/l Agar verfestigt. Frisch angesetzte, steril filtrierte 2 %ige Na-Cysteinlösung, pH 6 bis 8, wurde als Reduktionsmittel dem noch flüssigen Weichagar zugefügt und leicht vermischt.

4.4.2 Begasung von Kulturgefäßen

Für die mikroaerobe Kultivierung in Kulturflaschen wurde der Gasraum der Gefäße durch ein 1 bis 2 %iges O₂-Gasgemisch ausgetauscht. Die Begasung der Kulturgefäße erfolgte vor dem Autoklavieren mit Hilfe einer Begasungseinrichtung. Der Gasraum wurde ca. 10 x gespült, so dass die Atmosphäre über dem Medium vollständig ausgetauscht wurde.

4.4.3 Kultivierung von *M. gryphiswaldense* in Flüssigmedien

a) Arbeitskulturen

Alle Ansätze wurden mit 10 % (v/v) auf eisenfreiem oder eisenhaltigem Medium gewachsenen Zellen oder Stammkulturen inokuliert und 16 bis 24 h bei 28 bis 30 °C auf

einem Schüttler (INNOVAT M 4330, New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 100 bis 150 rpm inkubiert.

Arbeitskulturen wurden in 10 ml oder 100 ml mikroaeroben Standardmedium angesetzt und vor Versuchsbeginn teilweise mehrfach passagiert. Die Anzucht in Gegenwart von Antibiotika erfolgte nach Bedarf.

b) eisengehungerte Kulturen

Für Eisenaufnahmeversuche oder zur Gewinnung von mikroaeroben, unmagnetischen Zellen wurden die Kulturen mehreren Passagen in eisenfreiem Medium angezogen. Die Anzucht erfolgte analog zu MM Kap. 4.4.3 a) für max. 16 h. Um zu gewährleisten, dass die Zellen während des mikroaeroben Wachstums nicht sauerstofflimitiert werden, wurde ein Medium-Gasraum-Verhältnis von 1:10 eingestellt. Der Fortschritt des Eisenhungers wurde bei Wildtypkulturen am Magnetismus gemessen. Als eisenreprimiert wurden Kulturen mit einem $C_{\text{mag}} \leq 0,05$ definiert, was routinemäßig nach 3 Passagen vorlag. Nach Bedarf wurden Antibiotika zugesetzt.

c) Endpunktbestimmungen

Das Verfahren der Endpunktbestimmung wurde eingesetzt, um eisenkonzentrationsabhängiges Wachstum verschiedener MSR-1 Stämme zu vergleichen. Die eisenfrei gezogene Vorkultur wurde wie unter MM Kap. 4.4.3 b) beschrieben kultiviert. Als Grundmedium diente eisenfreies Medium (MM Kap. 4.4.1 b), welchem definierte Mengen Eisencitrat (0 bis 2 mM) zugesetzt wurden. Die Kulturen wurden in 5 ml Medium in 6-well-Platten inokuliert und mikroaerob in Begasungsgefäßen bei 28 °C vorsichtig geschüttelt (90 rpm). Beim Animpfen wurde darauf geachtet, dass die optische Dichten der Ansätze zu Beginn des Versuchs annähernd gleich, auf $OD_{565\text{nm}} = 0,04$, eingestellt wurden. Nach 24 h wurde die optische Dichte und der Magnetismus in einem Photometer gemessen (MM Kap. 6.1) und Proben zur AAS-Messung (MM Kap. 6.5) vorbereitet.

Die gemessenen Parameter wurden in einem Diagramm den eingesetzten Eisenkonzentrationen gegenüber gestellt.

d) Anzucht für Magnetosomenisolierung

Die Gewinnung von dichten, stark magnetischen Kulturen zur Isolierung von Magnetosomen erfolgte in 4 l MSR-Standardmedium und 1 l Luft in 5 l Duranflaschen mit geschlossenem Deckel. Durch dieses Medium/Gasraum-Verhältnis war genügend Sauerstoff zur Biomassenherstellung zur Verfügung, die gelöstsauerstoffmenge aber gering genug, um ausreichend Magnetosomen zu produzieren. Die Kulturen wurden 1:10

aus einer 500 ml Vorkultur angeimpft und für 24 h bei 28 bis 30 °C schüttelnd bei 100 rpm inkubiert. Nach Bedarf wurden Antibiotika zugesetzt.

e) Stammhaltung

Die Stammhaltung von *M. gryphiswaldense* MSR-1 erfolgte in 10 ml mikroaeroben Standardmediums in 20 ml Schraubdeckelröhrchen. Die Kulturen wurden auf einem Horizontalschüttler (Bühler, Düsseldorf) bei 100 rpm und 28 °C inkubiert. Die angewachsenen Zellen wurden dann bei 4 °C gelagert und alle 4 bis 6 Wochen überimpft.

4.4.4 Plattierungen

Beimpfte Platten wurden unter mikroaeroben Bedingungen (0,5 % O₂, 5 % CO₂, 94,5 % N₂) ca. 5 bis 10 Tage bei 28 °C inkubiert. Die Anzucht erfolgte in Anaerobentöpfen (Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen).

Die Anzucht von Zellen in Flüssigmedium nach Plattierungen erfolgte schrittweise. Einzelne Kolonien wurden in 100 µl Standardmedium für 24 bis 48 h mikroaerob bei 28 °C inokuliert und anschließend im 1 ml Maßstab weiter kultiviert, bis die Kulturen schließlich in 10 ml Arbeitskulturen vorlagen. Der Selektionsdruck wurde, wenn nötig, durch Zugabe von Antibiotika aufrechterhalten.

5 Einführung von DNA in Mikroorganismen

5.1 Übertragung von DNA in *E. coli* durch Transformation

5.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Die Herstellung wurde auf Grundlage des „Standard Protokolls für die SEM-Präparation kompetenter Zellen“ (Inoue *et al.*, 1990) durchgeführt.

Eine *E. coli* Übernachtskultur wurde 1:50 in 100 ml frisches LB Medium überimpft und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis inkubiert, danach in Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C und 4500 rpm (Universal 30R F, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet in 30 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ vorsichtig resuspendiert, für weitere 10 min auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde dann in 30 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ gewaschen, 30 min auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Die so behandelten Zellen wurden letztendlich in 2,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂, 10 % Glycerin resuspendiert und in 100 µl Aliquoten in Flüssigstickstoff Schock gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.1.2 Transformation

Die Übertragung der Plasmid-DNA in chemisch-kompetente *E. coli* erfolgte nach dem Hitzeschock-Verfahren. Für die Transformation wurden 50 bis 100 μl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Auf die Zellen wurden maximal 10 μl (100 bis 300 ng) der Plasmid-DNA gegeben und vorsichtig geschwenkt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C in einem Wasserbad. Der Ansatz wurde unmittelbar danach wieder für etwa 2 min auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 300 μl LB-Medium die Kultur für 1 h bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt (CertomatRR, CertomatRH, B. Braun Biotech Int.). Von dieser Suspension wurden je 100 μl und 150 μl auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.1.3 Selektion rekombinanter *E.coli*-Klone durch *lacZ α*

Ligationen wurden unter Zusatz von X-Gal und entsprechenden Antibiotika auf LB-Agarplatten ausgestrichen (Tabelle 4). Von Klonierungsvektoren, deren Multiple Cloning Site (MCS) innerhalb des *lacZ*-Gens liegt, kann bei erfolgreicher Ligation das *lacZ*-Gen nicht mehr exprimiert werden und die β -Galactosidase in *E. coli* nicht durch die auf dem Vektor codierte α -Kette komplementiert werden. Somit wird die Indigofarbstoffbildung aus X-Gal, ein Saccharoseanalog, unterbunden und die Kolonien bleiben weiß.

5.2 Übertragung von DNA in *M. gryphiswaldense*

5.2.1 Konjugation (Schultheiss und Schüler, 2003)

Die Plasmidübertragung in den Stamm MSR-1 durch Konjugation wurde mit Hilfe der Donorstämme *E. coli* S17-1 und BW29427 durchgeführt. Die zu übertragenden Plasmide verfügten alle über die *mob*-Region und wurden vorher wie in *E. coli* S17-1 oder BW29427 transformiert.

Bei dem verwendeten *M. gryphiswaldense* handelte es sich um eine spontane rifampicin- und streptomycinresistente Mutante, um nach der Übertragung gegen den Stamm S17-1 selektionieren zu können. *E. coli* BW29427 trägt eine Mutation in *dapA*, ist dadurch auxotroph für 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP), ein Baustein des Peptidoglykans, was essentiell für die Zellwandsynthese Gram-negativer Bakterien ist. Daher ist unter Verwendung dieses Stammes eine Gegenselektion mit Rifampicin und Streptomycin nicht nötig.

Eine 10 ml Stammkultur von MSR1 wurde in 100 ml aerobes MSR-Standardmedium überimpft und bei 28 °C und 100 rpm 24 h inkubiert. Der Donorstamm wurde als 5 ml

Übernachtskultur in LB-Medium angezogen. Von beiden Kulturen wurde die OD bei 565 nm gemessen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, wobei eine $OD_{565\text{ nm}}$ von 0,1 etwa einer Zellzahl von $3,4 \cdot 10^7$ entspricht. Für eine Plasmidübertragung wurden etwa 10^9 Zellen, für eine Insertion, bzw. Rekombination 10^9 bis 10^{10} Zellen verwendet. Das Gemisch wurde dann bei 4500 rpm 8 min pelletiert (Rotana 96R, Hettich Zentrifugen). Der Überstand wurde nahezu vollständig verworfen, das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert und auf eine AK-Platte, bzw. AK-Platte mit DAP aufgetropft. Nach leichtem Antrocknen wurde der Ansatz bei 28 °C unter mikroaeroben Bedingungen 4 h (bei Plasmidübertragungen) bis 8 h (bei Insertionsversuchen) inkubiert. Nach der Konjugation wurden die Zellen in 1 ml MSR-Standardmedium (mit 75 µg/ml Streptomycin bei *E. coli* S17-1) heruntergespült. Ansätze zur Deletionsmutagenese wurden über Nacht unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert um eine homologe Rekombination zu ermöglichen, bzw. die Antibiotikaresistenzen auszubilden. Ansätze zur Übertragung von „broad-hoste-range“ Plasmiden wurden direkt ausplattiert. Die Kulturen wurden anschließend in verschiedenen Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und etwa 10 Tage unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Konjugationen, die mit *E. coli* S17-1 durchgeführt wurden, wurden in der Gegenwart von Rifampicin und Streptomycin plattiert.

5.2.2 Anreicherung von Transkonjuganten

Eine MSR-1-Kolonie wurde steril in 100 µl MSR-Standardmedium resuspendiert und unter mikroaeroben Bedingungen 1 bis 2 Tage bei 28 °C in Anaerobengefäßen (Schütt Labortechnik GmbH) inkubiert. Die angewachsene Kultur wurde dann in 1 ml mikroaerobes MSR-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und nochmals für 1 bis 2 Tage (evtl. auf dem Schüttler bei 60 rpm) kultiviert. Die so angezogenen Transkonjuganten wurden dann in 10 ml mikroaerobes Medium überimpft und der Stammhaltung zugeführt (MM Kap. 4.4.3).

6 Methoden zur Bestimmung von Wachstumsparametern

6.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von *E. coli* und MSR-1 wurde durch Trübungsmessung über die optische Dichte (UV/VIS Spektrophotometer UV 1202, Shimadzu) in einer Plastikkuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen unbeimpftes Medium gemessen. Standardmäßig erfolgte die Messung von *E. coli* bei 600 nm, die von MSR-1 bei 565 nm. Zelldichten mit einer OD_{565} über 0,4 wurden mit unbeimpftem Medium verdünnt.

6.2 Bestimmung des Trockengewichtes

Das Trockengewicht von MSR-1 wurde anhand einer bereits ermittelten Beziehung berechnet: $TG(g/l) = 0,2875 \cdot OD_{565} - 0,0059$

6.3 Reinheitskontrollen

Vor und während jedem Versuch wurden die Kulturen von *Magnetospirillum gryphiswaldense* und *Escherichia coli* im Phasenkontrastmikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena) auf Reinheit und Beweglichkeit der Zellen überprüft. Der Magnetismus konnte mikroskopisch durch Anlegen eines Magneten getestet werden.

6.4 Bestimmung des zellulären Magnetismus durch Streulichtmessung

Der zelluläre Magnetismus lässt sich über die Änderung der Lichtstreuung am UV/VIS-Spektrophotometer (UV 1201V, Shimadzu) bestimmen (Schüler *et al.*, 1995). Da sich die Zellen parallel zu den Feldlinien ausrichten, wird zur Messung ein Permanentmagnet in zwei definierte Positionen angelegt, so dass die magnetischen Feldlinien die Küvette beim Messvorgang entweder parallel ($\Rightarrow E_{max}$) oder senkrecht ($\Rightarrow E_{min}$) zum Strahlengang durchlaufen. Der ermittelte Wert C_{mag} wird wie folgt berechnet:

$$C_{mag} = E_{max}/E_{min} - 1$$

Mit C_{mag} = Koeffizient der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung
E = Extinktion bei 565 nm

Aufgrund zunehmender Mehrfachstreuung ist die differentielle Lichtstreuung bei zunehmender Zelldichte nicht mehr proportional zum Magnetismus. Daher wurde die Zellsuspension zum Vergleich der Messwerte bei unterschiedlichen Zelldichten, mit sterilem Medium auf eine Zelldichte von $OD_{565} = 0,1$ verdünnt.

6.5 Eisenbestimmung mittels AAS

6.5.1 Probenvorbereitung

Je 1 ml der Zellsuspension wurde bei 13000 rpm (Biofuge 13, Heraeus, Hanau) 10 min pelletiert. Zur Bestimmung des extrazellulären Eisengehaltes wurden 900 μ l des Überstandes in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, mit 10 μ l 65 % HNO_3 versetzt und bei

RT gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Um das an der Zelloberfläche adsorbierte Eisen zu komplexieren wurde das Pellet in 500 μl AAS-Waschpuffer (20 mM HEPES, 5 mM EDTA) resuspendiert und erneut bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 μl 65 % HNO_3 gemischt. Zur Zellyse wurde die Suspension 3 h bei 98 $^\circ\text{C}$ aufgeschlossen. Zur Verringerung von Messfehlern wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

6.5.2 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Der Eisengehalt wurde spektroskopisch mittels Atomabsorption bestimmt (Perkin Elmer 3110, Wellesley, Ma, USA). Bei der Atomabsorptionsspektroskopie wurde eine Probe in einer Flamme mit einer Temperatur von 2000 bis 3000 K verbrannt und atomisiert. Für die Atomisierung wurde eine Kombination von Brenngas und Oxidationsmittel aus Acetylen/Luft im Verhältnis 1:2 verwendet. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 248 nm und einer Lampenstromstärke von 30 mA. Das Probenvolumen betrug mindestens 1 ml. Eine Kalibrierfunktion wurde mit einer AAS-Standard Eisenlösung im Bereich der Nachweisgrenze dieser Methode von 0 bis 10 ppm erstellt.

6.6 Untersuchung der Eisenaufnahme mittels ^{55}Fe

Die Untersuchung der Eisenaufnahme mittels ^{55}Fe erfolgte zur Messung der Kurzzeitkinetik direkt nach Induktion der Magnetitbildung durch Eisenfütterung. Die Methode wurde wie beschrieben (Schüler und Baeuerlein, 1996; Schübbe *et al.*, 2003) unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Hierbei bildeten die Zellen aber zu keinem Zeitpunkt Magnetit, weshalb der Versuch zusätzlich unter mikroaeroben Bedingungen etabliert wurde.

Für die Messungen wurden eisengehungerte Zellen verwendet, deren Anzucht wie in MM Kap. 4.4.3 beschrieben erfolgte. Die Zellen wurden für die Aufnahmeversuche abzentrifugiert (4500 rpm, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$), in frisch em eisenfreiem Medium (MM Kap. 4.4.1) zu einer $\text{OD}_{565 \text{ nm}} = 0,4$ bis 0,6 resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Für aerobe Aufnahmeversuche wurden 4 ml Zellsuspension in Luft exponierten Szintillationsröhrchen eingesetzt. Mikroaerobe Messungen wurden mit 10 ml Zellsuspension durchgeführt, die in mit 1 % O_2 begasten 100 ml Kulturflaschen vorgelegt wurden. Während der Versuchsdauer wurden die Zellsuspensionen langsam gerührt und bei 30 $^\circ\text{C}$ inkubiert.

Nach 10-minütiger Äquilibration der Zellen bei 30 $^\circ\text{C}$ wurden die Experimente durch Zugabe des Eisens gestartet. Pro Experiment wurden Aktivitäten von 200 kBq für aerobe

und 400 kBq für mikroaerobe Aufnahmeversuche eingesetzt. Diese Menge an $^{55}\text{FeCl}_3$ wurde so mit einer 100 mM Fe(III)-Citrat-Lösung gemischt, dass in der Zellsuspension Endkonzentrationen des Eisens von 1 μM bis 100 μM eingestellt werden konnten.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 200 μl Proben durch einen Nitrocellulosefilter (Sartorius, \varnothing 2 cm, Porengröße 0,45 μm) filtriert, mit 2 x 5 ml 0,1 M LiCl, 5 mM EDTA gewaschen und anschließend bei 50 °C getrocknet. Als Negativkontrolle wurden Proben vor Zugabe der Eisenlösung gemessen. Als Vergleichsgröße zur Bestimmung der aufgenommenen Eisenmenge dienten 50 μl der Suspension nach Zugabe des Eisens, welche ohne Filtrieren und Waschen direkt auf den Filter pipettiert und getrocknet wurden. Die Proben wurden in Szintillationsröhrchen mit einem Szintillationscocktail (Rotiszint[®] eco, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt und in einem Szintillationszähler gemessen. Aus der Zählung der Proben (angegeben in cpm = counts per minute), der Zelltrockenmasse (Kap. 6.2), des Probenvolumens und der Gesamteisenkonzentration (zurückgeführt auf die Zählung der Vergleichsgröße) konnte dann der Fe-Gehalt der Zellen berechnet werden.

Bei einer Versuchsdauer von mehr als einer Stunde, wurden zusätzlich die optische Dichte und die magnetische Ausrichtung bestimmt (MM Kap 6.1 und 6.2).

6.7 Präparation von Zellen für die Elektronenmikroskopie

Für die Präparation der Proben wurden Kohlefilm-Kupfer-Grids (300 mesh) verwendet, wobei die Zellen aufgrund ihrer negativen Oberflächeladung an dem Kupfergitter adsorbieren.

Für jede Präparation wurden 10^8 bis 10^9 Zellen/100 μl eingesetzt. Der Grid wurde mit der Kohlefilmseite auf den Zellsuspensionstropfen 10 min inkubiert und zweimal mit bidest H_2O gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde auf einem Filterpapier abgesaugt und der Grid 10 min getrocknet.

7 Molekularbiologische Methoden

7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

7.1.1 Plasmidpräparationen

a) Plasmidminipräparation

Plasmid Mini Kits eignen sich zur Präparation von bis zu 10 μg reiner Plasmid-DNA aus 5 ml *E. coli* Kulturen, die zur Sequenzierung und präparativen Restriktion verwendet wurde. Die Reinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Verwendet wurden

„QIAGEN Plasmid Mini Prep“ (Qiagen, Hilden) und „JETSPIN Plasmid Purification Kit“ (Genomed, Löhne).

b) Plasmidpräparation (modifiziert nach (Sambrock und Russel, 2001))

Diese Methode diente zur Isolierung größerer Plasmidmengen oder low-copy Plasmiden. 50 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 10 min bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml P1-Puffer (50 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Danach wurden 4 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und der Ansatz vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden 4 ml vorgekühlter P3-Puffer (3,94 M K-Acetat, pH 5,5) zugesetzt und der Ansatz 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur weiteren Reinigung des Überstandes wurde dieser über einen Papierfilter dekantiert und anschließend mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die so gefällte Plasmid-DNA wurde 1 h bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und anschließend in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

c) QIAGEN Plasmid Midi Kit

Mit dem Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) können bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus 100 ml *E. coli* Kulturen isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

7.1.2 Präparation von genomischer DNA aus *M. gryphiswaldense*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *M. gryphiswaldense*-Stämmen wurden die Zellen in 500 ml aerob für 24 h bei 28 °C in Standardmedium angezogen, um Verunreinigung der DNA durch Magnetosomen weitestgehend zu verhindern. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (J2-MC, Beckmann, Rotor JA10, München) 15 min bei 8000 rpm und 4 °C geerntet und in 9,5 ml TE-Puffer resuspendiert.

Dann wurde die Suspension mit 500 µl 10 % SDS-Lösung, sowie 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und der Ansatz 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Es wurden 1,8 ml 5 M NaCl hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurden 1,5 ml CTAB/NaCl-Lösung zupipettiert und geschwenkt. Das Gemisch wurde 20 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und nach Zugabe des gleichen Volumens an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) 5 min vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde bei 4 °C und 3000 rpm 10 min zentrifugiert (Rotana 96R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), wodurch drei Phasen entstanden. Die obere wässrige Phase mit den gelösten Gesamtnukleinsäuren wurde

vorsichtig abgenommen und in ein neues Sarstedtröhrchen überführt. Die Extraktion der Nukleinsäuren wurde zur vollständigen Abtrennung der organischen Phenol-Phase mit Chloroform-Isoamylalkohol (24/1) wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol im Sarstedtröhrchen. Zur besseren Fällung wurde der Ansatz 30 min bei -80 °C gelagert und die DNA 30 min bei 4 °C und 5000 rpm (Rotana 96R, Hettich Zentrifugen) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml TE-Puffer aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 20 µl RnaseA (10 mg/ml) 5 min bei 37 °C verdaut. Die DNA wurde danach mit 10 µl NaCl (5 M) sowie 2,5 Volumen Ethanol (96 %) erneut gefällt und bei 18000 rpm und 4 °C 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in 1 ml bidest. H₂O aufgenommen.

7.1.3 RNA-Isolierung aus *M. gryphiswaldense*

Die Isolierung von RNA aus *M. gryphiswaldense* MSR-1 erfolgte durch eine Modifikation der Methode von (Oelmüller *et al.*, 1990). Da RNA in der Regel eine sehr kurze Halbwertszeit hat, wurden alle Arbeitsschritte, soweit möglich, auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden mikroaerob in 100 ml Medium angezogen. Die Zellen wurden bei 4500 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert (Rotana 96R, Hettich Zentrifugen). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 mM Tris pH 8,5 gewaschen und bei 13000 rpm, 4 °C 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Die so geernteten Zellen konnten bei Bedarf in Flüssigstickstoff Schock gefroren und bei -20 °C gelagert werden.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wurde im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Das Probenpellet wurde in 500 µl eiskaltem AE-Puffer (20 mM Na-Acetat, pH 5,5, 1 mM EDTA) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 900 µl 60 °C heißes PCI und 10 µl 25 % SDS zugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde bei 60 °C 5 min inkubiert, sofort im Eisbad abgekühlt und bei 13000 rpm, 4 °C 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Die entstandene wässrige Oberphase wurde abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 62,5 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt. Erneut wurden die Nukleinsäuren mit 1 ml PCI extrahiert. Dazu wurde der Ansatz 5 min gemischt und dann bei 13000 rpm, 4 °C 5 min zentrifugiert. Zum Fällen der Nukleinsäuren wurde das 2,5 fache Volumen 96 % Ethanol zugegeben und der Ansatz 30 min bei -80 °C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden 20 min bei 13000 rpm und 4 °C sedimentiert und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem zehnmütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4 °C wurde das Pellet bei RT getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in bidest. H₂O aufgenommen.

Da bei RNA-Isolierungen Kontaminationen mit DNA möglich sind, wurde ein DNase-Verdau angeschlossen. Hierzu wurden pro μg RNA 1 U (1 U/ μl) RNase-freie DNase eingesetzt. Der Verdau wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 1 μl 25 mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C.

Zur schnellen Überprüfung der RNA-Präparation wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,5 %igem Agarosegel in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7). Eingesetzt wurden 2 μl der RNA-Lösung, die mit 1 μl Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) vermischt wurden. Als Probenstandard diente *E. coli* RNA.

7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Separation unterschiedlich großer DNA-Fragmente erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung in horizontalen Flachbettelektrophoresekammern (Sub-Cell GT Agarose Gel Elektrophoresis System, Biorad, München). Je nach Fragmentgröße wurde die Auftrennung in 1 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8, 1 mM EDTA) durchgeführt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Taschen des verfestigten Agarosegels mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer (MBI Fermentas) gemischt. Die aufgetragene Probenmenge richtete sich nach der DNA-Konzentration und Ansatzvolumen.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung von 100 bis 120 V bei kleinen Gelen (Minigelapparatur, 7 x 10 cm) und maximal 150 V bei großen Gelen (Midigelapparatur, 15 x 15 cm). Die Elektrophorese wurde abgebrochen, wenn die Bromphenolblaubande etwa dreiviertel des Gels durchlaufen hatte. Als Puffer in der Elektrophoresekammer diente ebenfalls 1 x TAE. Die Gele wurden anschließend in Ethidiumbromidlösung (0,5 $\mu\text{g/l}$) gefärbt und kurz in Wasser gewaschen, um unspezifische Hintergrundfärbung zu entfernen. Im UV-Durchlicht (254 nm) wurden die Fragmente (Gel iX Imager, Intas, Göttingen) nachgewiesen.

7.3 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Größenbestimmung von Fragmenten erfolgte im Vergleich zu Fragmenten definierter Größe, die den zu erwartenden Größenbereich der Probe abdeckten (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder bzw. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder Plus, MBI Fermentas).

7.4 Reinigung von Nukleinsäuren

Für die Reinigung von DNA aus PCR- oder Reaktionsansätzen, als auch die Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Elution aus Gelen, wurde die gesuchte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Das Gel sollte hierbei der UV-Strahlung so kurz wie möglich ausgesetzt werden, um eventuelle UV-induzierte Schäden zu vermeiden.

7.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine $OD_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrock und Russel, 2001).

Die Reinheit von DNA-Lösungen kann über die Quotienten der Absorptionswerte bei 280 nm und 230 nm bestimmt werden. Hierfür gelten folgende Richtwerte:

$$OD_{260} : OD_{280} = 1,8 \text{ (Sambrock and Russel 2001)}$$

$$OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 0,45 : 1 : 0,515 \text{ (Marmur 1961)}$$

Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol sind an einer deutlichen Steigerung der Absorption bei 280 nm erkennbar, Polysaccharide hingegen erhöhen die Absorption bei 230 nm.

7.6 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

7.6.1 Restriktionsverdau

Restriktionen dienen einerseits zur Überprüfung von klonierter DNA und andererseits zur Vorbereitung von Klonierungsvektoren und DNA-Fragmenten für die Ligation.

Für den jeweiligen Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die spezifischen 10x Restriktionspuffer der Hersteller (MBI Fermentas; Madison, USA) verwendet und im Ansatz entsprechend verdünnt.

Pro µg DNA wurden spezifische Enzymaktivitäten von 0,5 - 5 U eingesetzt. Alle Enzyminkubationen wurden für 2 bis 3 h bei 37 °C durchgeführt, soweit vom Hersteller nichts Gegenteiliges empfohlen wurde. Präparative Restriktionsansätze wurden auch über Nacht inkubiert.

7.6.2 T/A-Klonierungen

DNA-Polymerasen ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität hängen regelmäßig 3'-Adenin-Überhänge an die zu vervielfältigenden DNA-Fragmente. So amplifizierte Fragmente wurden in T/A-Klonierungsvektoren ligiert, die linearisiert vorliegen und komplementäre 3'-Thymin-Überhänge besitzen.

Fragmente, die mit Polymerasen mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität (proof reading-Aktivität) amplifiziert wurden, wurden vor der Ligation in T/A-Vektoren für 10 min bei 70 °C in Gegenwart von 0,5 U DNA-Polymerasen ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität inkubiert, um A-Überhänge zu generieren.

Für T/A-Klonierungen wurden die Vektoren pGem®-Teasy (Promega, Madison) und pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) routinemäßig nach Herstellerangaben verwendet und der Ansatz in *E. coli* DH5α oder *E. coli* Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert.

7.6.3 Ligation

Für die Ligation wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnittene und nachfolgend gereinigte Vektoren und Genfragmente verwendet.

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10 bis maximal 20 µl durchgeführt. Vektor- und Fragment-DNA wurde im Mengenverhältnis 1:1 bis 1:3 eingesetzt und mit dem entsprechenden Volumen 10x Ligationspuffer (MBI Fermentas) gemischt. Dann wurden 1 U T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) zugegeben und mit bidest H₂O auf das jeweilige Volumen aufgefüllt. Ligationen erfolgten über Nacht bei 4 °C.

Als Transformationsstämme dienten *E. coli* DH5α oder *E. coli* Top10 (Invitrogen, Karlsruhe)

7.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion diente der Amplifikation von zu klonierenden DNA-Fragmenten, sowie der Kontrolle von transformierten Ligationsansätzen und erzeugten Mutantenstämmen.

Generell wurden PCR-Amplifikationen mit der Taq-Polymerase (Promega, Metabion, Fermentas) durchgeführt. Daneben wurden Polymerasen mit proof reading-Aktivität (Phusion, Finnzymes, Finnland; 9Nm Polymerase, NEB, Ipswich) verwendet.

Als Template zur Generierung von Klonierungsfragmenten diente gereinigte genomische DNA, vereinzelt auch ganze Zellen. Zur Kontrolle von Transformationen wurde frisches Koloniematerial direkt im PCR-Ansatz verwendet.

Reaktionsansatz

PCR Puffer	1	x
Primer 1	0,4	µM
Primer 2	0,4	µM
dNTP-Mix	0,2	mM each
MgCl ₂	3	mM
Template	ca. 100	ng oder ganze Zellen
Polymerase	1,25	U
H ₂ O	ad 25	µl

Alle Amplifikationsreaktionen wurden in einem Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) oder einem TProfessional (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde vor den Amplifikationszyklen für 3 min (10 min bei Ansätzen mit ganzen Zellen) bei 96 °C denaturiert.

Im Allgemeinen wurde die PCR bei Standardbedingungen mit 30 Zyklen durchgeführt. Ein Reaktionszyklus bestand dabei aus einer Denaturierung der DNA für 30 s bei 96 °C, einer Hybridisierung der Primer an das Template für 30 bis 45 s bei 50 bis 62 °C und einer Elongation für 30 s bis 2 min bei 72 °C. Abschließend erfolgte eine Elongation für 10 min bei 72 °C. Die Hybridisierungstemperatur und -zeit, sowie die Elongationszeit wurde an die Primer bzw. Amplifikatlänge angepasst.

Für die Kontrolle der PCR-Amplifikate wurde die amplifizierte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Für die T/A-Klonierung wurde das PCR-Produkt nach der elektrophoretischen Kontrolle direkt, ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt.

7.8 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) wurde zum Nachweis der Transkription in Hinsicht auf polare Effekte in Transkonjuganten eingesetzt. Ausgehend von spezifisch gebundenen Oligonukleotiden konnte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ein zu isolierter mRNA komplementärer cDNA-Strang gebildet werden. Nach dieser Synthese folgte eine Standard-PCR (siehe Kapitel 8.4) mit genspezifischen Primern.

Für die Reaktion wurden 1 bis 5 µg RNA und 1 µl Hexanukleotidprimer-Mix (Roche, Basel, Schweiz, 8 nmol/µl, 1:50 verdünnt) gemischt und mit PCR-H₂O bis zu 11 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 70 °C 10 min erhitzt, um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren und PCR-Produkte, die auf Reaktionen mit den für die Reverse Transkription eingesetzten Oligonukleotidprimern zurückgehen, sind zu verhindern. Dann wurden 4 µl 5x RT-Puffer (MBI Fermentas) und 2 µl 10 mM dNTP dazugegeben und der Ansatz bis zu 19 µl aufgefüllt. Um die Hexanukleotide an die RNA anzulagern, folgte eine Inkubation bei

25 °C für 5 min. Die Synthese wurde durch Zugabe von 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl, MBI Fermentas) gestartet. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min bei 25 °C und einer Elongationsreaktion von 1 h bei 42 °C wurde die Reaktion bei 70 °C 10 min abgestoppt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Für jeden Ansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierbei wurde, statt der Reversen Transkriptase 1 µl PCR-H₂O verwendet.

Die anschließende PCR wurde mit 1 µl der cDNA, bzw. der Negativkontrolle ohne weitere Reinigung durchgeführt. Aus der Negativkontrolle sollten hierbei keine Amplifikate hervorgehen, um Verunreinigungen mit DNA auszuschließen. Als Positivkontrolle wurden die Amplifikationen zusätzlich mit genomischer DNA durchgeführt.

7.9 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden modifiziert nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dabei findet ausgehend von einem angelagerten Primer eine DNA-Neusynthese durch eine DNA-Polymerase statt. Durch Zugabe von unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxynukleotiden kommt es statistisch zu einer basenspezifischen Termination der Reaktion, wodurch Fragmente jeder möglichen Größe entstehen, die durch Anregung durch einen Laser vier photometrisch eindeutig erfassbare Einzelsignale ergeben. Diese Signale werden dann automatisch von der Analysesoftware des ABI 3100 Kapillarsequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) in Sequenzdaten umgewandelt.

7.9.1 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung wurde doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt. Als Primer wurden M13 fw/rw und individuelle Oligonukleotide verwendet. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI PRISM® BigDye™ Terminator v 3.0 Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit 0,5facher Menge des Herstellerprotokolls. Der Reaktionsansatz wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß wie folgt gemischt:

5 x BD Puffer	1,5	µl
BigDye Terminator v3.1	1	µl
Primer 1 (10 µM)	1	µl
Template-DNA	800	ng
H ₂ O	Ad 10 µl	

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) oder einem TProfessional (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Ein Reaktionszyklus bestand dabei aus Denaturierung der DNA für 10 s bei 96 °C, Hybridisierung der Primer an das Template für 15 s bei 50 bis 55 °C und Synthese für 4 min bei 60 °C. Dieser Zyklus wurde 30 x wiederholt. Nach der Reaktion wurden die Ansätze auf 4 °C gekühlt.

Die weitere Bearbeitung der Ansätze erfolgte durch den Sequenzierservice des Max-Planck-Instituts, Bremen oder des Instituts für Genetik, LMU, München.

7.9.2 Auswerten der Sequenzdaten

Die Sequenzdaten wurden mittels diverser bioinformatischer Analysesoftware ausgewertet. Rohdaten wurden mit Lasergene SeqMan (DNASTAR, Madison, WI) und Gene 2.0 (Accelrys, Tokio, Japan) editiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte in Gene 2.0 unter Verwendung von ClustalW zur Bestimmung von Sequenzhomologien innerhalb der sequenzierten Fragmente.

7.10 Southern Hybridisierung

7.10.1 Übertragen von DNA-Fragmenten auf Membranen

Beim Southern Blot (Southern, 1975) werden zuvor geschnittene DNA-Proben in präparativen Agarosegelen nach Größe aufgetrennt und anschließend nach dem Verfahren des trockenen Kapillarblottens auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™ N, Amersham) transferiert.

Nach der Elektrophorese wurde die DNA zunächst im Ethidiumbromidbad angefärbt und das Gel mit einem Maßstab fotografiert. Anschließend wurde das Gel 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Durch Inkubation des Gels wurde die DNA partiell hydrolysiert, wodurch sich speziell größere Fragmente leichter transferieren ließen. Anschließend musste die DNA zweimal 15 min in 0,5 M NaOH, 1 M NaCl denaturiert und zweimal 15 min in 1 M NH₄-Acetat, 0,02 M NaOH neutralisiert werden. Zwischen den Schritten wurde das Gel kurz in bidest H₂O gespült. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Agarosegel mit der Unterseite nach oben, die trockene Nylonmembran, 3 Lagen trockene Whatmanpaper, ein geeigneter Papierstapel und ein Gewicht. Die Übertragung wurde über Nacht durchgeführt. Zur Fixierung der DNA wurde die Membran in einem Crosslinker (Biolink DNA Crosslinker, Biometra) mit 0,125 J bestrahlt. Die so auf der Membran immobilisierte DNA konnte für Hybridisierungen eingesetzt werden.

7.10.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten basiert auf der Methode des "random primed labeling" unter Verwendung des HexaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas). Dabei wurde der komplementäre Strang in Gegenwart radioaktiv markierter Adenosintriphosphate durch das Klenow-Fragment neu synthetisiert.

Die Sonde wurde zunächst in einer PCR mit spezifischen Primern für das Zielfragment synthetisiert und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Abschließend wurde die Konzentration der doppelsträngigen DNA photometrisch bestimmt.

Die radioaktive Markierung erfolgte modifiziert nach Angaben des Herstellers: 0,1 µg DNA wurden mit 10 µl Hexanukleotidmix in 5-fach Reaktionspuffer versetzt und mit PCR-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 41 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde zur Denaturierung der DNA 10 min in einem Wasserbad mit kochendem Wasser inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Nach etwa 2 min wurden 3 µl dNTP (dCTP, dGTP, dTTP, je 330 µmol/l), 5 µl α-³³P dATP-Lösung (50 µCi) und 5 U/µl Klenow Fragment (exo-, in 50 % Glycerol) zugegeben und gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und konnte bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert werden.

7.10.3 Hybridisierung

Um unspezifische Bindungsstellen der Sonde auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran in 20 ml Church-Puffer (7 % (w/v) SDS, 1 % BSA (w/v), 1 mM EDTA, 250 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2) 1 h bei 65 °C und 70 rpm inkubiert (Mini Shake Hybridisierungsofen, Biometra). Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde direkt hinzugegeben, welche vorher 2 min bei 98 °C denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C und 70 rpm über Nacht. Die Membran wurde anschließend zweimal in 20 ml Waschpuffer (0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) 30 min bei 65 °C und 70 rpm gewaschen. Durch diese stringente Wäsche wurden ungebundene Sondenmoleküle entfernt. Die feuchte Membran wurde dann in Folie eingeschlagen.

Die Membran wurde in einer Expositionskassette (Molecular Dynamics, Krefeld) fixiert, ein Phosphor Screen (Kodak storage Phosphor screen, Molecular Dynamics) zur autoradiographischen Dokumentation aufgelegt und 3 bis 4 h exponiert. Der Phosphorscreen wurde mit dem Typhon 9400 Scanner (Amersham Pharmacia) gescannt.

8 Plasmidkonstruktion

8.1 Konstruktion der Plasmide zur Deletion von *mamM* und *mamB* in MSR-1

Zur Erstellung des Deletionskonstruktes von *mamM* in pCM184 wurden die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche um *mamM* mit den Primerpaaren mamM5_fw/ mamM5_rw und mamM3_fw/ mamM3_rw aus genomischer DNA von MSR-1 amplifiziert und in pGem-Teasy subkloniert. Die entstandenen Plasmide wurden pGem-*mamM5'* und pGem-*mamM3'* genannt. Die Klonierung des 5'-Fragments von pGem-*mamM5'* in die 5' von der *loxP*-Km^R-*loxP*-Kassette von pCM184 erfolgte über die Restriktionsschnittstellen BglII und NcoI. Das Plasmid wurde als pCM184-*mamM5'* bezeichnet. In einem nächsten Schritt wurden pGem-*mamM3'* mit Apal und SacI verdaut und das 3'-Fragment von *mamM* in den mit gleichen Enzymen geschnittenen pCM184-*mamM5'* ligiert. Das Konstrukt erhielt die Bezeichnung pCM184- Δ *mamM*.

Die Konstruktion der Deletionskassette von *mamB* erfolgte analog mit den Primerpaaren mamB5pCMpK_fw/mamB5pCM_rw3 und mamB3pCM_fw/mamB3pCM_rw. Die 5'- und 3'-Fragmente wurden in pGem-Teasy kloniert, als pGem-*mamB5'* und pGem-*mamB3'* bezeichnet und anschließend nacheinander in den pCM184 ligiert. Das 5'-Fragment wurde dabei in die EcoRI/Acc65I- und das 3'-Fragment in die Apal/SacI-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstellen von pCM184 gebracht. Das Plasmid zur Deletion von *mamB* wurde pCM184- Δ *mamB* benannt.

Für die Klonierung in pWM91 wurden die Restriktionsschnittstellen BcuI/SmaI, bzw. SmaI/SacI gewählt. Auch hier wurden die amplifizierten Fragmente in pGem-Teasy unterkloniert und nacheinander in den pWM91 ligiert. Die Amplifikation der flankierenden Bereiche um *mamM* erfolgte mit den Primern mamM5pWM_fw/ mamM5rw3 und mamM3fw3/ mamM3_rw, die der Bereiche um *mamB* mittels der Primer mamB5pWM_fw/ mamB5pKpWM_rw und mamB3pKpWM_fw/ mamB3pCM_rw. Nach der Ligation der Fragmente in pGem-Teasy wurden die Plasmide als pGem-*mamM5'*WM, pGem-*mamM3'*WM, pGem-*mamB5'*WM, pGem-*mamB3'*WM bezeichnet. Die daraus resultierenden Suizidvektoren erhielten den Namen pWM91- Δ *mamM* und pWM91- Δ *mamB*.

8.2 Konstruktion von Plasmiden zur Genexpression in MSR-1

Als Vektoren für die Genexpression in *M. gryphiswaldense* MSR-1 dienten Derivate des broad-host-range Plasmids pBBR1MCS (Kovach 1994), die sich in der Antibiotikaresistenz unterschieden (Kovach 1995): pBBR1MCS-2 (Km^R), pBBR1MCS-3

(Tc^R) und pBBR1MCS-4 (Ap^R). Die Primer wurden so gelegt, dass ein kurzer Bereich 5' des Gens, der die putative RBS abdeckte, mit amplifiziert wurde.

8.2.1 Plasmide zur homologen Komplementation

Die Wildtypgene von *mamM* und *mamB* wurden mit den Primerpaaren mamM-MSR1fw2/ mamM-msr1rw2, mamM-MSR1_fw3/ mamM-MSR1_rw3, mamB-MSR1fw2/ mamB-MSR1rw2, mamB-MSR1_fw3/mamB-MSR1_rw3 amplifiziert und dabei um die jeweiligen Restriktionsschnittstellen erweitert. Die Fragmente wurden in TA-Vektoren subkloniert, per Sequenzierung kontrolliert und anschließend in den HindIII/XbaI-verdauten pBBR1MCS-2 und in die XhoI/XbaI-verdauten pBBR1MCS-3 und pBBR1MCS-4 ligiert.

8.2.2 Plasmide zur heterologen Komplementation

Die homologen *mamB*-Gene von *M. magnetotacticum* MS-1, dem magnetischen Kokkus MC-1, dem magnetischen Vibrio MV-1 und eines Teichklons (Flies 2004), sowie *ydfM* von *B. subtilis* wurden mit den folgenden Primerpaaren an genomischer DNA der entsprechenden Organismen amplifiziert und dabei um die Restriktionsschnittstellen XhoI und XbaI erweitert: *mamB*_{MS-1} - mamB-MS1fw2/ mamB-MS1rw2, *mamB*_{MC-1} - mamB-MC1fw/ mamB-MC1rw, *mamB*_{MV-1} - mamB-MV1fw/mamB-MV1rw, *mamB*_{TK} - mamBTKXhoI_fw/ mamBTKXbaI_rw und *ydfM* - ydfM_Bsub_fw2/ ydfM_Bsub_rw2.

Die Fragmente wurden in pGem-Teasy subkloniert und nach Kontrolle der Basenabfolge in den XhoI/XbaI-linearisierten pBBR1MCS-2 kloniert und in MSR-1(Δ *mamB*) übertragen. *mamB* von MS-1 wurde zusätzlich in pBBR1MCS-4 ligiert. Die Plasmide pBBR1MCS2-*fieF1/4* und pBBR1MCS2-*zitB* wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Nies der Universität Halle/S. konstruiert und zur Verfügung gestellt.

8.2.3 Plasmide für *in vivo* Lokalisationsversuche mittels Gfp

Für die Konstruktion von *gfp*-Fusionen wurden *mamM* und *mamB* aus der genomischen DNA von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 mit den Primerpaaren mamMgfpC_XhoI_fw /mamMgfpC_NdeI_rw, mamBgfpC_XhoI_fw/mamBgfpC_NdeI_rw, mamMgfpN_NdeI_fw/mamMgfpN_BamHI_rw und mamBgfpN_NdeI_fw/mamBgfpN_BamHI_rw amplifiziert. Die N-terminalen Fusionen wurden um die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI, die C-terminalen Fusionen um XhoI und NdeI jeweils 5' und 3' der Sequenz erweitert. Die Fragmente wurden in pGemTeasy subkloniert und die Basenabfolge durch Sequenzierung überprüft. Die DNA-Fragmente von *mamM* und *mamB* wurden mit den

entsprechenden Restriktionsenzymen für die N- oder C-terminale Klonierung aus pGemTeasy wieder heraus geschnitten und in die mit den gleichen Enzymen geöffneten Zielvektoren ligiert. Letztere waren Derivate von pBBR1MCS-2, in dessen EcoRI-Schnittstelle *gfp* mit oder ohne N- bzw. C-terminalen 10-Glycin-Linker kloniert wurde. An *gfp* wurde 5' bzw. 3' eine zusätzliche NdeI-Schnittstelle zur Erzeugung einer translationalen in frame Fusion angefügt (Lang und Schüler, 2008). Die so entstandenen Plasmide mit den Fusionen *mamM-gfp*, *mamM-(GGA)10-gfp*, *gfp-mamM*, *mamB-gfp*, *mamB-(GGA)10-gfp* und *gfp-mamB*, wurden mittels *E. coli* BW29427 in verschiedene MSR-1-Mutantenstämme übertragen.

8.3 Plasmide zur Überexpression von *mamM* und *mamB* in pASK-Plasmiden

Als Expressionsvektoren wurden pASK-IBA3, pASK-IBA5 und pASK-IBA43 verwendet. Die Klonierung von *mamM* erfolgte in allen gewählten IBA-Plasmiden in die SacI- und XhoI-Schnittstelle der MCS, die von *mamB* in BsaI. Die Primer wurden so erstellt, dass ein durchgängiger offener Leserahmen zwischen den Zielgenen und dem Strep-Tag entsteht, d.h. gegebenenfalls wurden Nukleotide zum Auffüllen von Kodons in die Sequenz eingefügt. Die Amplifikation der Gene erfolgte mittels der Primerpaare: *mamM*ÜSacI_fw/*mamM*ÜrwXho3431 für *mamM* in pPR-IBA1, pASK-IBA3 sowie pASK-IBA43; *mamM*Ü5SacI_fw/*mamM*ÜrwXho3431 für *mamM* in pASK-IBA5; *mamB*_fw_IBA43/*mamB*_rw_IBA1,3,43 für *mamB* in pASK-IBA43; *mamB*_fw_IBA1,3/*mamB*_rw_IBA1,3,43 für *mamB* in pASK-IBA3 sowie pPR-IBA1; *mamB*_fw_IBA5/*mamB*_rw_IBA5 für *mamB* in pASK-IBA5

Für die Klonierung in Vektoren mit C-terminalem Tag wurden *mamM* und *mamB* aus genomischer DNA von MSR-1 ohne Stopkodon amplifiziert, um die gewählten Restriktionsschnittstellen erweitert und vor der Ligation in den Zielvektor in pGem-Teasy sequenziert.

8.4 Plasmide zur Überexpression von *mamM* und *mamB* in pET-Derivaten

Für die Klonierung von *mamM* und *mamB* in pET42-a(+) wurden beide Gene ohne Startcodon aus genomischer DNA von MSR-1 mit den Primerpaaren *mamM*ÜEpET1_fw/*mamM*ÜE-pET1_rw sowie *mamB*ÜE-pET1_rw/*mamB*ÜE-pET1_fw amplifiziert und um die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI erweitert. Die Gene wurden in pGemTeasy subkloniert und die Basenabfolge durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden beide Gene mit BamHI und XhoI verdaut und in den mit den

gleichen Enzymen geöffneten pET42-a(+) ligiert. Die entstandenen Plasmide wurden pET42-*mamM* und pET42-*mamB* genannt.

Die Amplifikation von *mamM* und *mamB* zur Expression in pET16-b erfolgte ebenfalls aus genomischer DNA von MSR-1 ohne Startkodon mit den Primerpaaren mamMÜEfw_Ndel/mamMÜErw_BamHI sowie mamBÜEfw_Ndel/ mamBÜErw_BamHI. Die Fragmente wurden in pGem-Teasy subkloniert. Aus pGem-Teasy wurden die Gene mit den durch die Amplifikation hinzu gefügten Restriktionsschnittstellen Ndel und BamHI heraus geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten pET16-b ligiert. Die so entstandenen Plasmide hießen pET16-*mamM* und pET16-*mamB*.

Für die Expression in pET51-b(+) wurden *mamM* und *mamB* N-Terminal mit dem Strep-Tag II fusioniert. Dazu wurden die Gene aus genomischer DNA von MSR-1 ohne Startcodon mit den Primerpaaren mamMÜEfw_BamHI51/mamMÜErw_HindIII sowie mamBÜEfw_BamHI51/mamBÜErw_HindIII amplifiziert und dabei um die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII erweitert. Diese Fragmente wurden zur Kontrolle der Basenabfolge in pGem-Teasy subkloniert und sequenziert. Anschließend wurden die Gene und der Zielvektor mit BamHI und HindIII geschnitten und ligiert. Die so entstandenen Plasmide pET51-*mamM* und pET51-*mamB* wurden zur Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) eingesetzt.

8.5 Plasmide zur Expression einer transkriptionellen Fusion von *mamM* und *mamB*

Die Fragmente wurden mit den folgenden Primerpaaren aus genomischer DNA von MSR-1 vervielfältigt: *mamM* mit mamMTandBamH_fw/mamMTandSacI_rw, *mamM*Strep mit mamMTandBamH_fw/mamMTandStrSacI_rw, *mamB* mit mamBTandNco_fw/mamBTandBam_rw und *mamB*Strep mamBTandNco_fw/ mamBTandStrBam_rw. Zur Kontrolle wurden die Amplifikate in pGem-Teasy subkloniert. In einem ersten Klonierungsschritt wurden *mamB* und *mamB*Strep mit NcoI und BamHI aus pGem-Teasy geschnitten und in den ebenfalls mit NcoI und BamHI geöffneten pET51-b(+) kloniert. Die so entstandenen Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft. Im nächsten Schritt wurden die Plasmide pET51-*mamB* sowie pET51-*mamB*Strep mit BamHI und SacI verdaut und jeweils mit den BamHI/SacI-geschnittenen Fragmenten *mamM* und *mamM*Strep ligiert. Dadurch entstanden die vier Plasmide pET51-*mamB,mamM*, pET51-*mamBstrep,mamM*, pET51-*mamB,mamMstrep* und pET51-*mamBstrep,mamMstrep*.

9 Proteinbiochemische Methoden

9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Da während Proteinpräparationen häufig Detergenzien eingesetzt wurden, wurde das „Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit“ (Sigma, Osterode), bzw. „BCA Protein Assay“ (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) angewendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokollen. Für die Messung wurden die Proteinproben entsprechend verdünnt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Kalibrierreihe, die durch Verdünnung einer 1 mg/ml BSA-Lösung erstellt wurde.

9.2 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden über Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra-15, Millipore, Beelerica, MA) aufkonzentriert. Dazu wurden bis zu 15 ml der Proteinlösung in die Filtereinheit gegeben und bei 5000 rpm solange zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht wurde. Die Porengröße der Filter richtete sich nach der Proteingröße. Die Filtereinheiten konnten mehrfach verwendet werden und wurden in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

9.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld wurde das Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad, Hercules, CA) verwendet. Die Gelgröße betrug etwa 8,3 x 6,2 x 0,1 cm.

9.3.1 Probenvorbereitung

Pro Minigel wurden etwa 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Dazu wurde die Konzentration von Proteinlösungen wie in Kap. 9.1 beschrieben bestimmt. Das passende Volumen an Protein wurde mit 10 mM Tris, pH 8 und 4 µl 5 x SDS-Ladepuffer (0,25 M Tris, pH 8, 25 % (w/v) Glycerin, 7,5 % SDS, 0,25 mg/ml Bromphenolblau, 12,5 % β-Mercaptoethanol) auf 20 µl eingestellt. Der so vorbereitete Ansatz wurde für die Elektrophorese eingesetzt.

Ganze Zellen wurden für die Auftrennung vorbereitet, indem die optische Dichte der Kultur bestimmt und die genommene Probe auf OD = 10 eingestellt wurde. Davon wurden 5 µl mit 15 µl 10 mM Tris, pH 8 und 5 µl 10 x SDS-Ladepuffer für die Auftrennung verwendet.

Vor dem Auftragen wurden die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert.

9.3.2 Lineare SDS-PAGE (nach (Lämmli, 1970))

Proteine wurden nach dem Verfahren von Lämmli (1970) in einer linearen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Porengröße des Gels, was über die Acrylamidkonzentration bestimmt wird, richtete sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. Im Allgemeinen bewegte sich die Trenngelkonzentration zwischen 10 und 12 %.

Zusammensetzung für 2 Gele:

	10 %		11 %		12 %	
H ₂ O	4,17	ml	3,83	ml	3,5	ml
4 x Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % SDS)	2,5	ml	2,5	ml	2,5	ml
Acrylamid*	3,33	ml	3,67	ml	4	ml
10 % Ammoniumpersulfat	50	µl	50	µl	50	µl
TEMED	5	µl	5	µl	5	µl

*Rotiphorese® Gel 30, Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1 (Carl Roth, Karlsruhe)

Die Bestandteile des Trenngels wurden vorsichtig gemischt und luftblasenfrei in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Das noch flüssige Gelgemisch wurde dann mit Wasser überschichtet, um eine ebene Trennschicht zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Wasser wieder entfernt und das Trenngel mit dem vorbereiteten Sammelgelgemisch überschichtet und ein Kamm eingesetzt.

Zusammensetzung für 2 Sammelgele (4 %):

H ₂ O	2,83	ml
4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 % SDS)	1,5	ml
Acrylamid*	0,67	ml
10 % Ammoniumpersulfat	30	µl
TEMED	3	µl

Nach Polymerisieren des Sammelgel wurde das Gel mit den vorbereiteten Proben beladen, die Elektrophoresekammer nach Herstellerangaben zusammengesetzt und der Anoden- und Kathodenraum mit Elektrophoresepuffer (12,5 mM Tris, 14,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS) aufgefüllt. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 120 V, die Auftrennung im Trenngel bei 150 bis 180 V.

9.3.3 Größenstandards

Die Zuordnung der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Vergleich mit Proteinstandards (Fermentas, St. Leon-Roth) definierter Größe und Menge, die im selben Gel mit aufgetrennt wurden und folgende Referenzgrößen hatten: Prestained Protein Molecular Weight Marker sowie PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Durch Verwendung bereits gefärbter Marker konnte zum einen der Verlauf der SDS-PAGE und zum anderen die Übertragungseffizienz der Western-Blots kontrolliert werden.

9.3.4 Coomassiefärbung

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele für 1 h bis über Nacht in Coomassiefärbelösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,5 % Coomassie Brilliantblau G-250) auf einem Kippschüttler inkubiert. Das Entfärben erfolgte in 20 % Ethanol, welches mehrfach gewechselt wurde, bis der Hintergrund des Gels weitestgehend farblos war. Das Gel wurde im Weißlicht mit einem Gel iX Imager (Intas, Göttingen) dokumentiert.

9.4 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot, (Towbin *et al.*, 1979))

Die Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte in einer Tank-Blot-Apparatur (Bio-Rad, Hercules, CA).

Nach dem Gellauf wurde das ungefärbte Polyacrylamidgel 15 min bis 1 h in Transferpuffer geschwenkt, um die für den Transfer störenden Salze auszuwaschen. Dabei wurde die PVDF-Membran und 4 Lagen Blottingpapier auf Gelgröße zugeschnitten und zusammen mit zwei Apparatur-bedingten Stoffauflagen kurz in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,375 % SDS) getränkt. Der Blot wurde aufgebaut, wobei das Gel und die Membran zwischen das Blottingpapier und die Stoffauflagen gelegt wurden. Da die Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode laufen, wurde der Blot so präpariert, dass die Membran vor dem Gel zur Anode gerichtet liegt. Der Transfer erfolgte 1 h bei 100 V. Zur gleichmäßigen Kühlung des Transferpuffers wurde ein Eisbehälter in die Apparatur eingebaut und der Tank auf einem Magnetprüher platziert. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit H₂O gewaschen.

9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Antikörper

Der spezifische Nachweis der auf PVDF-Membranen übertragenen Proteine erfolgte über enzymatisch katalysierten Farbreaktionen zwischen alkalischer Phosphatase (AP) und NBT (Nitroblautetrazolium)/ BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat). Die AP ist dabei an

einen sekundären Antikörper gebunden, der wiederum an einen Antikörper gekoppelt ist, der spezifisch an ein, auf die PVDF-Membran übertragenes Protein gebunden ist.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran, wurde diese zunächst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung (5 g Magermilchpulver in 100 ml TBS) inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem ersten, spezifischen Antikörper erfolgte direkt in Blockierungslösung in 1:2000 bis 1:5000 Verdünnungen für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran jeweils 10 min 3 x mit TTBS (TBS mit 0,5 ml/L Tween-20) und 1 x mit TBS (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte in TBS für 45 min bei RT. Routinemäßig wurde dieser 1:1000 verdünnt. Nach erneutem Waschen der Membran in TBS erfolgte der Farbnachweis mit NTB/BCIP (Roche, Basel, Schweiz) in H₂O, bis Banden deutlich zu erkennen waren. Die Reaktion wurde durch mehrfaches Spülen der Membran in H₂O gestoppt.

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 gelistet. Die Antikörper gegen MamM und MamB wurden aus synthetisierten Peptiden (MamM AS 285 - 308; MamB AS 270 - 280) gewonnen. Mit der Herstellung der AK wurde die Firma „Pineda Antikörper-Service“ (Berlin) beauftragt. Der Anti-MamB-AK wurde als Anti-Serum zum Nachweis von MamB eingesetzt. Leider war die Konzentration des anti-MamB-Antikörpers in dem erhaltenen Kaninchenantiserum zu gering, um diesen mittels Affinitätschromatographie in geeigneter Konzentration zu reinigen.

Tabelle 7. Verwendete Antikörper

Antikörper	Typ	Herkunft	Antigen
Primär			
Anti-MamM-AK	Peptid-AK, gereinigter AK	Kaninchen-IgG	MamM
Anti-MamB-IgG	Peptid-AK, Kaninchenserum	Kaninchen-IgG	MamB/Kontaminationen
Anti-MamK-AK	Protein-AK gereinigter AK	Kaninchen-IgG	MamK
Sekundär			
Anti-Kaninchen-IgG (AP-Konjugat)	gereinigte Fraktion	IgG- Ziege-IgG	Kaninchen-IgG

9.6 Strep-Tag II® Detektionssystem (IBA, Göttingen)

Fusionierte Strep-tag II® Peptide wurden mit einem Strep-Tactin-Peroxidasekonjugat nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte mit einem Kit, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde.

10 Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Die heterologe Expression von MSR-1-Membranproteinen erfolgte mit Hilfe verschiedener Promotoren (pTet und pT7//ac) und Fusionspeptide/proteine (Strep-tag, His-tag, Gst-tag). Ziel war es, ein Expressionssystem für die Reinigung von funktionalen MamM und MamB zu etablieren.

10.1 Optimierungsversuche zur Proteinexpression

Die Plasmidkonstrukte wurden vor jedem Optimierungsversuch frisch in die Expressionsstämme (Tabelle 1) transformiert. Für die Vorkultur wurde eine Kolonie in 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur wurde in 10 oder 100 ml Maßstab ausgehend von der Vorkultur angesetzt. Dazu wurde die Vorkultur 1:50 in frisches LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt, bis die Induktions-OD erreicht wurde. Zur Optimierung wurden Induktionen bei OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 2 untersucht. Die Optimierung der Expressionstemperatur erfolgte zwischen 12 und 37 °C. Hierzu wurden die Kulturen vor Zugabe des Induktors auf die jeweiligen Expressionstemperaturen eingestellt. Während der Optimierungsversuche variierten die Expressionszeiten zwischen 2 h und über Nacht. Genaue Bedingungen sind bei den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil angegeben

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression wurde 1 ml Probe genommen und direkt für SDS-PAGE aufbereitet (MM Kap 9.3.2). Der Nachweis der Expression erfolgte mittels Western-Blot und Immunonachweis mit spezifischen Antikörpern.

10.2 Expression zur Proteinreinigung

Die Plasmidkonstrukte wurden vor jedem Expressionsversuch frisch in die Expressionsstämme (Tabelle 1) transformiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgehend von frischem Koloniematerial bei 37 °C schüttelnd bei 200 rpm über Nacht. Die Hauptkultur wurde in 500 ml LB-Medium in 2 L Erlenmeyerkolben angezogen. Dazu wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugegeben und die Vorkultur 1:50 in das Medium überimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur auf 28 bis 30 °C gekühlt und anschließend induziert. Die Expression erfolgte für 3 h bei 28 bis 30 °C und 200 rpm. Die Induktion erfolgte für den T7//ac-

Promotor mit 0,4 bzw. 1 mM IPTG (Sigma-Aldrich, München) und für den Tet-Promotor mit 200 µg/ml Anhydrotetrazyklin (AHT, IBA, Göttingen).

Die Zellen wurden für 15 min bei 6500 rpm und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Weiterbearbeitung bei -20 °C gelagert.

11 Proteinreinigung

11.1 Zellaufschluss

a) French Press (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL)

Das Zellpellet wurde in 30 ml Tris-HCl, pH 8 resuspendiert und mit DNaseI (10 mg/ml) und Protease-Inhibitor-Cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer „French Press“ bei 1260 psi in drei Durchgängen. Zwischen den Aufschlüssen wurden die Proben auf Eis gekühlt.

b) Durchflußzellaufschluß

Das Zellpellet wurde in 30 ml Tris-HCl, pH 8 aufgenommen mit DNaseI (10 mg/ml) und Protease-Inhibitor-Cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann in einem Durchflussschließungsgerät (TS Series Benchtop, Constant Systems, Sanford, NC) in einer Passage bei 1,35 bar und 4 °C aufgeschlossen.

11.2 Reinigung und Solubilisierung der Membranfraktion

Nach dem Zellaufschluss wurden unlysierte oder nicht ganz aufgeschlossene Zellen für 30 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, der u.a. auch die Membranfraktion der Zellen enthält, wurde bei mindestens 100 000 g für 1 h bei 4 °C gesammelt (Ultrazentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL). Vom Überstand wurde eine Probe genommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Membranpellet wurde in 20 ml Tris-HCl, pH 8 resuspendiert und mit 2 % β-Dodecylmaltosid (DDM, Glycon, Luckenwalde) in Tris-HCl, pH 8 auf 40 ml aufgefüllt (1 % DDM Endkonzentration). Die so resuspendierte Membranfraktion wurde 1 h bei 4 °C solubilisiert. Nicht gelöste Membranreste wurden durch eine erneute Ultrazentrifugation für 30 min bei mindestens 100 000 g und 4 °C pelletiert.

11.3 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die durch Solubilisieren in 1 % DDM in Lösung gebrachten Membranproteine wurden direkt für Proteinreinigungen mittels Affinitätschromatographie eingesetzt. Alle Binde-, Wasch- und Elutionspuffer wurden mit 0,05 % DDM versetzt, um die Membranproteine in Lösung zu halten. Im Nachfolgenden werden die Reinigungen für die verwendeten Fusionspartner beschrieben.

a) Gst-Tag

Durch Vektordesign des pET-42a(+) Plasmids (Novagen, Merck, Darmstadt) wird ein Protein generiert, welches u.a. Gluthation-S-Transferase als N-terminalen Fusionspartner hat. Dieses Fusionsprotein kann dann über kovalent an eine Matrix gebundenes reduziertes Gluthation (Novagen, Merck, Darmstadt), unter Ausnutzung der Affinität von der Gluthation-S-Transferase gegenüber reduziertem Gluthation, gereinigt werden.

Die Proteinreinigung wurde als „Batch-Methode“ mit 2 ml Bettvolumen (BV) durchgeführt. Zwischen jedem Wasch- oder Elutionsschritt wurde das Affinitätsmaterial für 1 min bei 1000 g zentrifugiert.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach Herstellerangaben (Novagen). Die Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE auf das gereinigte Protein untersucht. Das Affinitätsmaterial konnte direkt, ohne weitere Reinigung, in 50 % Ethanol bei 4 °C gelagert werden.

b) His-Tag

Der His-Tag ist ein Fusionspeptid, welches lediglich aus 6, 8 oder 10 aufeinander folgenden Histidinresten besteht. Durch die hohe Affinität des His-Tags zu zweiwertigen Kationen kann ein Fusionsprotein mittels Metallaffinitätschromatographie gereinigt werden. Hierzu wird an eine Agarosematrix gebundenes Ni^{2+} verwendet. Während der Proteinreinigung bilden die Seitengruppen der Histidine einen Komplex mit Ni^{2+} , wodurch ein Fusionsprotein fest an die Affinitätsmatrix gebunden ist. Dieser Komplex kann gelöst werden, indem Imidazol das His-Fusionsprotein als Komplexpartner verdrängt. Zur Generierung von His-Fusionsproteinen wurde das pET-16b Plasmid (Novagen, Merck, Darmstadt) verwendet, welches einen N-terminalen 10 x Histidin-Tag kodiert.

Es wurden Säulen mit einem Säulenvolumen (SV) von 1 ml eingesetzt. Die IDA-Agarose (Novagen, Merck, Darmstadt) wurde dazu zwischen zwei poröse Kunststoffritten in eine einfache Plastiksäule (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) eingebracht. Die Proteinreinigung erfolgte nach Herstellerangaben (Novagen). Das Eluat wurde zu je 0,5 ml fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

c) Strep-Tag

Der Strep-Tag II ist ein kurzes genetisch optimiertes Peptid, bestehend aus 8 Aminosäuren in der Folge: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. Kern des Peptids ist die Histamin-Prolin-Glutamin-Sequenz, wodurch der Tag in der Biotinbindetasche von Streptavidin binden kann. Die Reinigung von Fusionsproteinen erfolgt über Strep-Tactin, welches an Sepharose immobilisiert wurde. Strep-Tactin ist ein genetisch manipuliertes Streptavidin-Derivat, welches eine höhere Affinität gegenüber dem Strep-Tag aufweist. Die Elution des Proteins erfolgt durch Verdrängung mittels Desthiobiotin.

Es wurden N- und C-terminale Fusionsproteine mittels verschiedener IBA-Vektoren (IBA, Göttingen) und pET-51b(+) (Novagen, Madison, USA) hergestellt. Strep-Tactin-Sepharose (IBA, Göttingen) wurde analog der Ni-IDA-Agarose in Säulen gepackt. Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte in 1 ml SV nach Herstellerangaben. Das Fusionsprotein wurde mit 6 x 0,5 SV Puffer E von der Säule eluiert und die Fraktionen gesammelt.

Die gesammelten Fraktionen wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

11.4 Rekonstitution von MamM in Proteoliposomen

15 mg Phospholipide von *E. coli* (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) wurden in 300 µl BisTris-Puffer (20 mM, pH 6.8) bei 40 °C 2 x 15 min im Ultraschallbad resuspendiert. 250 µl der Mischung wurde in BisTris-Puffer mit Octylglykosid (5 % w/v Endkonzentration) verdünnt. Dieses Aliquot wurde mit MamM (0.5 mg/ml Endkonzentration) in BisTris mit 5 % OG gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überschuss an Detergenz wurde mittels hydrophober Interaktionschromatographie, an einer Amberlite XAD-16 Säule (d = 2 cm, h = 7 cm, Volumen = 6 ml, Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min) adsorbiert. Die Säule wurde mit BisTris equilibriert, die Fraktionen wurden in 2 ml Volumina gesammelt. Die Fraktionen wurden vereint und bei 100000 x g für 90 min abzentrifugiert (TY65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman). Das Liposomenpellet wurde in 300 µl BisTris resuspendiert. Anschließend wurden 40 µl einer 2 mM PhenGreen SK Lösung (Molecular Probes, Oregon, USA) zugegeben. Die Größeneinstellung der Proteoliposomen erfolgte mit einem auf 37 °C vorgewärmten Lipofast und einer Membran mit einer Porengröße von 200 nm (MacDonald 1991). Nicht eingeschlossener Farbstoff wurde durch Gelfiltration (Sephadex G-25 mit 10 ml SV) abgetrennt. Die Säule wurde mit Tris-HCl Puffer (20 mM, pH 7.8) equilibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden vereint, bei 100000 x g für 90 min abzentrifugiert (TY65, L8-60M Ultrazentrifuge, Beckman) und anschließend in 150 bis 250 µl Tris-HCl, pH 8 resuspendiert.

11.5 Magentosomenisolierung und Zellfraktionierung (modifiziert nach Grünberg et al., 2004)

Die Isolierung von Magnetosomen aus *M. gryphiswaldense* MSR-1 erfolgte über eine spezielle magnetische Separationstechnik mit anschließender Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen. Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C (ggf. im Kühlraum) durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in Kap 4.4.3 beschrieben gezogen und bei 6500 rpm für 30 min geerntet. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 30 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte in einer French Press für 3 Passagen bei 1260 Psi oder in einem Durchflussschließgerät (TS Series Benchtop, Constant Systems, Sanford, NC) in einer Passage bei 1,35 bar. Nicht aufgebrochene Zellen und Polyhydroxybutyrate (PHB) wurden im Anschluss 30 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine magnetisierbare Säule mit 10 ml SV (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) mit 1 SV bidest. H₂O und 3 SV Extraktionspuffer equilibriert. Zur Generierung eines magnetischen Feldes wurde die Säule zwischen zwei Sm-Co-Magnete gespannt. Der Zellaufschluss wurde nun über die Säule gegeben, der Rohextrakt unten aufgefangen und bis zur weiteren Faktionierung auf Eis gestellt. Mit Magnetit gefüllte Magnetosomen adsorbieren an das magnetisierte Säulenmaterial und werden so zurück gehalten. In der Säule verbliebener Rohextrakt wird mit Extraktionspuffer von der Säule gespült, bis das Eluat klar bleibt. Anschließend werden die an die Säule gebundenen Magnetosomen mit 50 ml Hochsalzpuffer gewaschen, um elektrostatisch gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Zur Entfernung der dadurch zugefügten Salze wird die Säule erneut mit 50 ml Extraktionspuffer gewaschen. Die Magnete wurden nun entfernt und damit die Säule demagnetifiziert. Die Magnetosomen wurden mit 30 ml Extraktionspuffer von der Säule gespült. Die Säule wurde mit bidest. H₂O gespült und in 70 % Ethanol gelagert. Zwei Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit 8 ml 60 %iger Saccharoselösung befüllt, vorsichtig mit 15 ml der Magnetosomensuspension überschichtet und 1 h bei $\geq 100\ 000$ g zentrifugiert. Das Saccharosekissen und der Überstand wurden abgesaugt und die pelletierten Magnetosomen in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Die Magnetosomenmembran wurde dann mit 1 % (w/v) SDS bei 65 °C in Lösung gebracht. Magnetit wurde bei 13 000 rpm abzentrifugiert (5417R, Eppendorf, Hamburg).

Der Rohextrakt ohne Magnetosomen wurde erneut bei 3000 rpm 30 min zentrifugiert, um die restlichen PHBs abzutrennen. 10 ml des Rohextraktes wurden dann bei $\geq 100\ 000$ g 1 h zentrifugiert, um die Membranproteine von den löslichen Proteinen zu trennen. Der Überstand wurde aliquotiert. Das Membranpellet wurde mit Extraktionspuffer gewaschen, erneut 30 min bei $\geq 100\ 000$ g zentrifugiert und das Membranpellet in 500 μ l

Extraktionspuffer mit 1 % (w/v) SDS bei 65 °C gelöst. Alle Zellfraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

12 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellmembranen einer Zellsuspension von MSR-1 (mit den entsprechenden Plasmiden) mit FM4-64 bei einer Endkonzentration von 1,5 µM angefärbt (Invitrogen, Karlsruhe). Die gefärbten Zellen wurden dann auf einem Objektträger mit einem dünnen Agarosefilm (MSR-Standardmedium, ohne Hefeextrakt und Pepton, jedoch mit 1 % Agarose).

Die immobilisierten Zellen wurden in einem Zeiss LSM510 Mikroskop mit einem 100 x Objektiv und einer Photometrics Coolsnap HQ Kamera dargestellt. Die Bildbearbeitung fand mittels Metamorph 7.0 und ImageJ 1.36b statt.

13 Bioinformatische Methoden

13.1 Programme und Datenbanken

Die Auswertung von Sequenzierdaten erfolgte mit dem Programmpaket Lasergene von DNASTar Inc. (Madison, WI, USA) auf einem Windows-PC. Als Grundlage für weitere Sequenzabgleiche und bioinformatische Analysen wurde das "MacVector™ 7.0" Programmpaket (Oxford Molecular Ltd., Oxford, GB) oder Gene 2.0 (Accelrys, Tokio, Japan) verwendet.

Datenbankrecherchen wurden über NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) und Datenbankabgleiche über Blast-Suche durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analysen von Proteinsequenzen erfolgten über Onlinetools von SwissProt (<http://www.expasy.org>)

Die Grundlage für Sequenzanalysen und Primergestaltung war die Nukleotidsequenz der Magnetosomeninsel von MSR-1 (AC-Nummer: BX571782) und die Genomsequenz von MS-1 des Joint Genome Institut (Walnut Creek, Ca, USA, http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/magma/magma.home.html). In späteren Analysen wurde die Datenbank www.megx.net/jcoast/jcoast.jnlp verwendet.

13.2 Blast-Analysen mit MamM und MamB

Als Datenbank diente www.megx.net/jcoast/jcoast.jnlp. Die Sequenzvergleiche von MamM_{MSR-1} und MamB_{MSR-1} wurden in den Genomen von MSR-1, MS-1, AMB-1 und MC-1 mittels BlastP (Blast-Server 141.84.66.155/blast/blast.html mit einer Blosom 62 Matrix)

durchgeführt unter den vorgegebenen Standardeinstellungen durchgeführt. Treffer mit einem e-Wert $< e^{-4}$ wurden als homolog angesehen. Treffer mit einem e-Wert $> e^{-4}$ und $< 0,5$ wurden durch eine erneute BlastP-Suche (www.ncbi.nlm.nih.gov) unter Standardeinstellungen (Non-redundant Protein Sequences, Blossum 62-Matrix, Gap Costs 11:1) untermauert. Zeigten die Sequenzen bei diesem Datenbankvergleich lediglich Treffer mit relevanten e-Werten ($< e^{-4}$) zu CDF-Proteinen, wurden diese ebenfalls zu der Proteinfamilie zugeordnet. Sequenzen mit e-Werten > 1 wurden als falsch-positive Treffer gewertet.

13.3 Alignments und Dendrogramme

Multiple Alignments wurden in DSGene (Accelrys, Japan) mit ClustalW in einer Blossum62-Matrix mit einer „Open Gap Penalty“ = 10 durchgeführt.

Dendrogramme wurden in MEGA 3.1 mittels des Neighbor-Joining-Algorithmus (mit Bootstrap-Werten von 100) berechnet.

C Ergebnisse

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen zweier magnetosomenmembranständiger Proteine konnten den DNA-Sequenzen zweier Gene des *mamAB*-Clusters zugeordnet werden: *mamM* und *mamB*. Auf Grundlage von Sequenzhomologien wurden die entsprechenden Proteine MamM und MamB vorläufig in die Familie der CDF-Transporter eingeordnet (Schübbe *et al.*, 2003; Grünberg *et al.*, 2004). CDF-Proteine werden im Allgemeinen als ubiquitär vorkommende Schwermetalltransporter definiert, die die Metallhomöostase im Cytoplasma von pro- und eukaryotischen Zellen aufrechterhalten (Nies, 2003). Das Substratspektrum dieser Proteine umfasst bisher Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Fe^{2+} (Paulsen und Saier, 1997; Nies, 2003; Haney, 2005; Grass, 2007). In der Magnetosomenmembran (MM) von MSR-1 konnten neben MamM und MamB keine weiteren Proteine mit Ähnlichkeiten zu eisentransportierenden Proteinen gefunden werden. Daher lag die Hypothese nahe, dass CDF-Proteine auch als Eisentransporter fungieren können (Paulsen und Saier, 1997; Nies, 2003; Haney, 2005; Grass, 2007; Grünberg *et al.*, 2004). Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise auf die spezifische Funktion von MamM und MamB als MTB-CDFs bei der Magnetitbiomineralisation zu liefern.

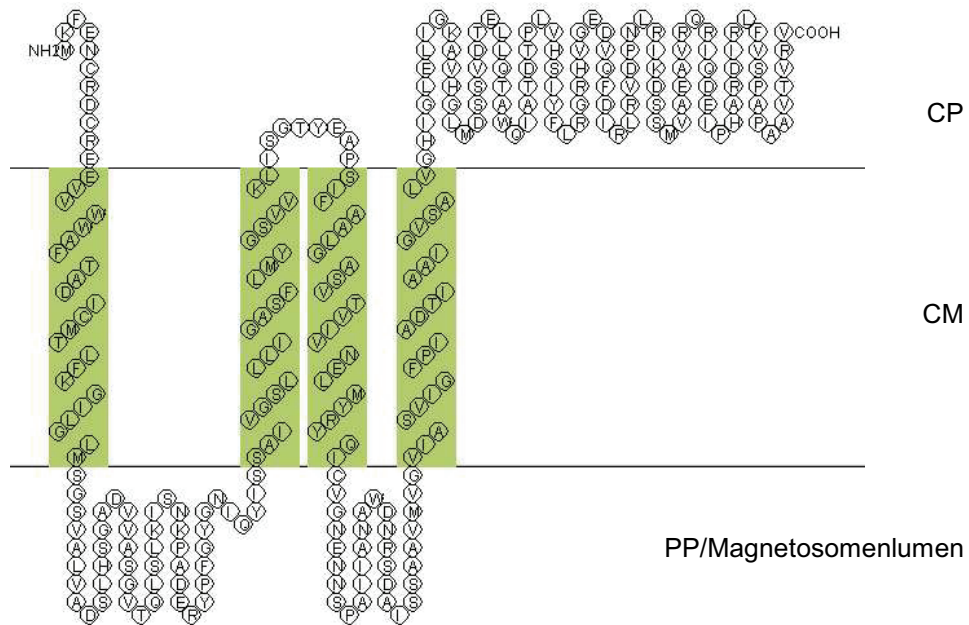
1 Allgemeine Sequenzcharakteristika von MamM und MamB

Die Sequenzen von MamM und MamB wurden mit bisher bekannten CDF-Proteinen verglichen. Beide Proteine liegen mit Größen von 297 AS (MamM) und 318 AS (MamB) innerhalb bzw. an der oberen Grenze der typischen Größenverteilung von prokaryotischen CDF-Proteinen, die zwischen 276 AS und 316 AS angegeben wurden (Paulsen und Saier, 1997). Die unterschiedliche Größe wird durch den variablen C-Terminus bedingt. Der isoelektrische Punkt der beiden Proteine liegt bei 5,88 für MamM und 5,35 für MamB.

MamM und MamB wurden aufgrund biochemischer Stabilitätsuntersuchungen der Magnetosomenmembran (Grünberg *et al.*, 2004) als membranassoziierte Proteine eingeordnet. Der hydrophobe Charakter der Proteine konnte durch Kyte-Doolittle-Hydrophathieplots (Protein Toolbox, Accelrys Gene) bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass MamM und MamB wie andere Vertreter der Familie der CDF-Proteine einen hydrophoben N-Terminus und einen hydrophilen C-Terminus haben, die jeweils etwa zwei Drittel, bzw. ein Drittel der Sequenz umfassen (Daten nicht gezeigt). Die aus der Primärstruktur ableitbare Topologie von MamM und MamB aus MSR-1 und die Anzahl der transmembranen α -Helices (TMH) wurden mittels verschiedener internetbasierter Vorhersageprogramme untersucht (TMHMM, Sosui, TopPred, www.expasy.org).

Demnach liegt der N-Terminus beider Proteine im Cytoplasma. In Abhängigkeit des verwendeten Algorithmus wurden für MamM 5 bis 6 TMH, für MamB 4 bis 5 TMH vorhergesagt (Abbildung 2).

MamB



MamM

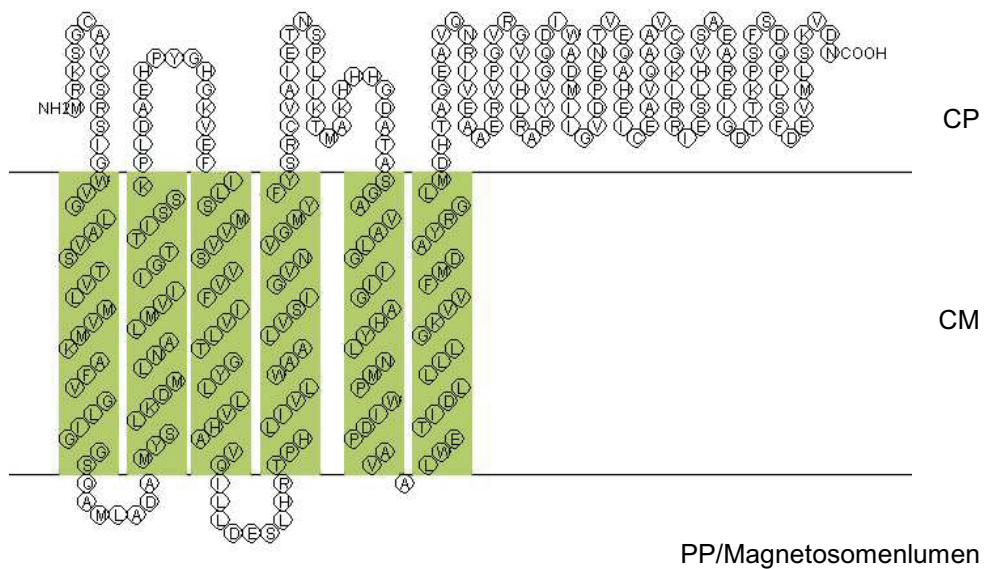


Abbildung 2. Vorhersage der transmembranen α -Helices nach dem internetbasierten Algorithmus „Sosui“. Transmembrane Bereiche sind grün unterlegt. CP - Cytoplasma, CM - Cytoplasmamembran, PP - Periplasma

Die für CDF-Transporter definierte familienspezifische Signatur, welche direkt nach der vorhergesagten TMH 1 beginnt, kann den Sequenzen von MamM und MamB zugeordnet werden. Lediglich die Aminosäureabfolge von MamM weicht an Position 10 von der

Konsensussequenz ab (Tabelle 8). Neben der Kationeneffluxdomäne (Pf01545) konnten in Pfam-Suchen keine weiteren signifikanten funktionellen Regionen in den Sequenzen von MamM und MamB gefunden werden (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

Zusammenfassend haben die Sequenzanalysen gezeigt, dass MamM und MamB in die Familie der CDF-Proteine eingeordnet werden können.

Tabelle 8. Signaturvergleich der CDF-Proteinfamilie mit MamM und MamB. Signaturvorgabe nach Montanini et al. 2007; rot unterlegt - jede AS außer den angegebenen möglich; blau unterlegt - in allen bekannten CDF-Proteinen vollständig konserviert.

	SC	X	ASG	LIVM	LIVMTAF	SATG	DAELSTY	SGALFM TV	DKNPQR	HDNEL
MamM	S	Q	A	M	L	A	D	A	M	Y
MamB	S	V	A	L	V	A	D	S	L	H
	XXX	D	XX	AGSLNTI	X ₂₀₋₂₅	G	XX	KNQRSY	X	DEGLN PQRST
MamM	SLK	D	ML	N	X ₂₁	G	HG	K	V	E
MamB	SGA	D	VV	A	X ₂₁	G	YG	N	I	Q

2 Funktionelle Untersuchung der CDF-Transporter MamM und MamB in *M. gryphiswaldense* MSR-1

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur Vermutungen zur Beteiligung von MamM und MamB an der Magnetitbiomineralisation, welche sich auf biochemische Analysen der Magnetosomenmembran und folgenden Sequenzanalysen stützten (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004). Um die Funktion der CDF-Proteine bei der Biomineralisation experimentell zu untersuchen, sollten Deletionsmutanten von *mamM* und *mamB* generiert und deren Phänotyp in Hinblick auf die Auswirkung der Deletion untersucht werden.

In einer vorausgegangenen Diplomarbeit wurden bereits zwei markierte Mutanten (MSR-1(Δ *mamM*::*Gm*) und MSR-1(Δ *mamB*::*Gm*) erzeugt (Junge, 2004; Schultheiss, 2004). Beide Mutanten zeigten unmagnetische Phänotypen mit einer verminderten Gesamteisenakkumulation. Jedoch waren die Deletionsmutanten nicht komplementierbar, wiesen damit vermutlich einen polaren Charakter auf und waren somit für weitere physiologische Untersuchungen nicht aussagekräftig.

Da *mamM* und *mamB* im *mamAB*-Cluster von einem Promotor (P_{mamH}) kotranskribiert werden (Schübbe *et al.*, 2006), war es ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit, unmarkierte, unpolare Deletionsmutanten beider Gene mittels homologer Rekombination zu erzeugen.

2.1 Herstellung von unmarkierten „in frame“ *mamM*- und *mamB*-Deletionsmutanten

Gerichtete unmarkierte Deletionsmutanten werden in dem für MSR-1 etablierten System (Schultheiss *et al.*, 2004) mit einem *sacB*-basierten Suizidplasmid (Schäfer *et al.*, 1994) erzeugt. Dazu werden die den Deletionsbereich umgebenden Bereiche in dieses Zielplasmid kloniert und in MSR-1 übertragen. Die Deletion wird in zwei Schritten erreicht: durch ein einfaches homologes Rekombinationsereignis einer der flankierenden Regionen wird das Zielplasmid in das Genom inseriert um anschließend in einer zweiten Rekombination zusammen mit dem Zielgen entfernt zu werden. Die Unterscheidung zwischen Insertion und Deletion erfolgt über den plasmidkodierte Suizidmarker.

Bisherige Versuche zur Deletion von Genen innerhalb der Magnetosomeninsel mit diesem *sacB*-basierten System waren auf Grund der geringen Rekombinationsraten und hohen Raten an falsch-positiven saccharoseresistenten Klonen bei der Negativselektion über SacB sehr arbeits- und zeitaufwändig, bzw. nicht zu erzeugen (Junge, 2004; Schultheiss, 2004; Schübbe, 2005; Scheffel *et al.*, 2006; Katzmann, 2007).

Deshalb sollten bei der Erzeugung der unmarkierten Deletionen von *mamM* und *mamB* neue Mutagenesestrategien getestet und etabliert werden. Einerseits wurde das Plasmid pWM91 eingesetzt, bei welchem das doppelte Rekombinationsereignis ebenfalls über *sacB* selektiert wird (Metcalf und Wanner, 1996). Das Plasmid ist konjugierbar, wird in Magnetospirillen nicht repliziert und wurde bereits erfolgreich für die Deletion von Magnetosomengenen in *M. magneticum* AMB-1 eingesetzt (Komeili *et al.*, 2004; Komeili *et al.*, 2006). Von einer Verwendung in MSR-1 wurde deshalb eine Verbesserung der Übertragungs- bzw. Rekombinationsrate im Vergleich zum alten System erwartet. Andererseits wurde ein neues Cre/*loxP*-basiertes Plasmidsystem gewählt (Marx und Lidstrom, 2002). Das auf den Plasmiden pCM184 und pCM157 basierende Cre/*loxP*-System kodiert zur Selektion von markierten Deletionsmutanten eine Kanamycinresistenz. Diese wird über die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens in das Genom integriert. Die Antibiotikumresistenz ist von *loxP*-Sequenzen flankiert, die es mittels einer von pCM157 *in trans* exprimierten Cre-Rekombinase erlauben, das Resistenzgen zu deletieren. Im Genom verbleibt eine *loxP*-Sequenz (Palmeros *et al.*, 2000). Zur Konstruktion der Deletionsvektoren enthält der pCM184 zwei MCS, die jeweils 5' und 3' von der *loxP*-*Km^R*-*loxP*-Kassette liegen. Auch dieses Plasmid ist in Magnetospirillen durch die *mob*-Gene des RP4-Plasmids konjugierbar, aber durch den Transkriptionsstartpunkt (*oriV*) von ColE1 nicht replizierbar. Das Plasmid pCM157 ist ein „broad host range“ Vektor, der aus kleinen mobilisierbaren IncP-Plasmiden hervorgegangen ist (Marx und Lidstrom 2002). Im Verlauf dieser Arbeit konnte das Cre/*loxP*-System erfolgreich für die unmarkierte Deletion von *mamC* aus MSR-1 verwendet werden (Gärdes, 2006).

Die Deletionsbereiche von *mamM* und *mamB* sollten nicht von Start- zu Stopkodon reichen, da die Gene des *mamAB*-Operons transkriptional oder translational gekoppelt sind (Schübbe *et al.*, 2006). Deshalb mussten die Deletionskonstrukte so erstellt werden, dass in der unmarkierten Mutante ein kurzes Nonsenspeptid translatiert wird, welches sich aus einem kurzen Bereich des N- und C-Terminus des ursprünglichen Gens zusammensetzt (siehe Abbildung 3). Durch die Wahl der Restriktionsschnittstellen bei der Konstruktion der Deletionskassette in pCM184 verbleiben neben den 34 bp der *loxP*-Sequenz weitere 51 bp der beiden multiplen Klonierungsstellen (MCS) des Plasmids im Genom der beiden Deletionsmutanten Δ *mamM* und Δ *mamB*. In der Δ *mamB*-Mutante verbleiben neben den plasmidspezifischen Sequenzen, 61 bp des 5'-Bereichs und weitere 65 bp des 3'-Bereichs. Hierdurch wird ein 65 AS langes Nonsens-Peptid gebildet. Das Deletionsfragment der Δ *mamM*-Mutante besteht aus 4 bp des 5'- und 18 bp des 3'-Bereiches von *mamM*, sowie den plasmidspezifischen Resten von pCM184. Dadurch umfasst der entstandene ORF Δ *mamM* 47 Kodons.

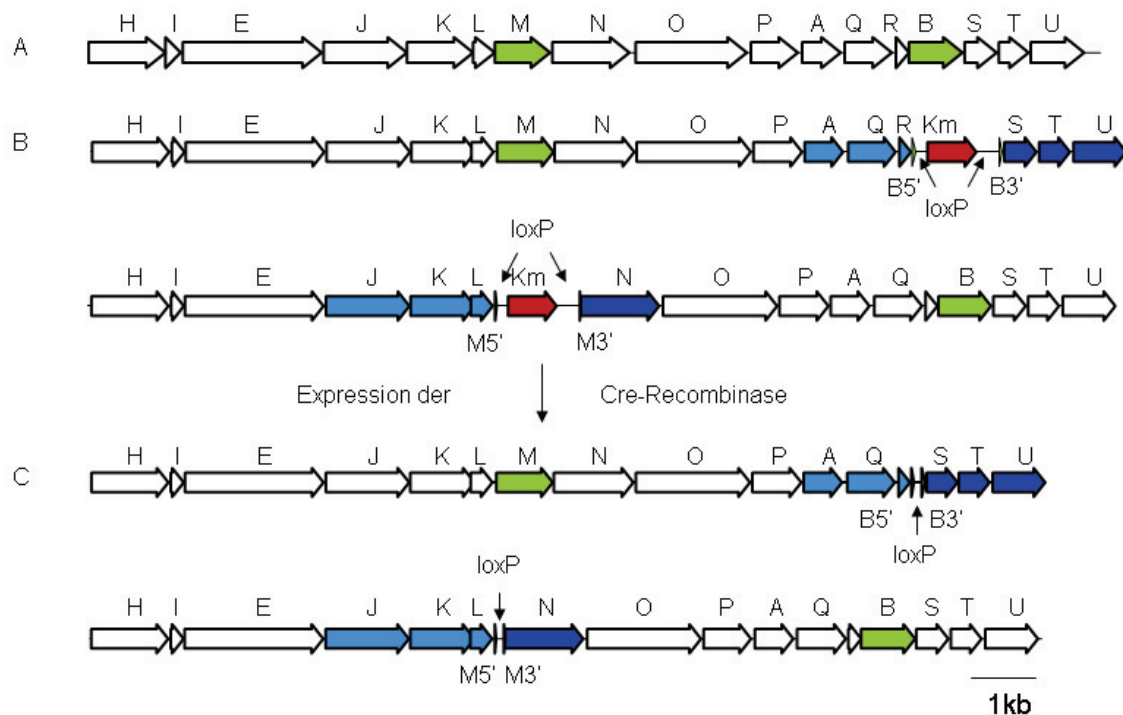


Abbildung 3. Molekulare Organisation des *mamAB*-Operons im Wildtyp und in den Deletionsmutanten nach einer Cre/*loxP*-vermittelten Rekombination. (A) Lokalisation von *mamM* (grün) und *mamB* (hellgrün) innerhalb des *mamAB*-Operons. (B) kanamycinmarkierte (rot) Deletionsmutanten von *mamM* und *mamB*. (C) Unmarkierte *in frame*-Deletionen durch Cre-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen. Im neu organisierten *mamAB*-Operon verbleibt lediglich ein ORF, welches aus einem kurzen Stück des 3'- und 5'-Bereichs von *mamM* oder *mamB* sowie einer *loxP*-Sequenz besteht. Die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche der Deletionskonstrukte sind in hell- bzw. dunkelblau unterlegt.

2.1.1 Versuche zur Erzeugung von unmarkierten Deletionen mittels pWM91

Konjugationsversuche mit pWM91 als Plasmidgerüst erzielten für das *mamB*-Deletionskonstrukt keine ampicillinresistenten Klone, weder bei Ansätzen mit *E. coli* S17-1, noch mit *E. coli* BW29427. Auch brachten Konjugationsversuche von pWM91- Δ *mamM* mit *E. coli* S17-1 keine ampicillinresistenten Klone hervor. Lediglich für pWM91- Δ *mamM* konnten in einer zweiten Konjugation mit *E. coli* BW29427 ca. 500 ampicillinresistente Klone selektiert werden (die Insertionsfrequenz lag bei etwa 10^{-7}), wovon 27 in einer Kontroll-PCR mit *mamM*-spezifische Primern als Insertionsmutanten bestätigt wurden (Abbildung 4). Die negative Selektion eines doppelten Rekombinationsereignisses über das *sacB*-Gen schlug fehl. Plattierungen auf saccharosehaltigem Festmedium zeigten keinen Unterschied in der Kolonienzahl zu Kontrollplattierungen ohne Saccharose. Der Versuch zur Erzeugung von Deletionsmutanten mit pWM91 wurde danach nicht weiter verfolgt.



Abbildung 4. Ergebnisse der PCR zur Kontrolle der Insertion von pWM91- Δ *mamM* in das Genom von MSR-1. Es wurden Primer verwendet, die spezifisch an *mamM* binden. Dadurch wurden im Falle einer Insertion zwei Bereiche amplifiziert, zum einen das Wildtypallel (ca. 1 kb) und zum anderen das Deletionskonstrukt (ca. 0,43 kb).

2.1.2 Versuche zur Erzeugung von unmarkierten Deletionen mittels pCM184

Die Konjugation von pCM184- Δ *mamM* mit *E. coli* BW29427 brachte in zwei von drei Konjugationsversuchen Transkonjuganten mit einer Insertionsfrequenz von jeweils etwa 10^{-7} hervor. Für die Insertion von pCM184- Δ *mamB* in das Genom von MSR-1 mittels Konjugation mit *E. coli* BW29427 waren zwei Konjugationsansätze nötig, wobei der zweite eine Insertionsfrequenz von etwa 10^{-7} aufwies. Die Integration der Plasmide in das Genom von MSR-1 wurde mittels PCR an jeweils 48 Transkonjuganten mit pCM184-spezifischen Primern bestätigt (Abbildung 5).

Überraschenderweise ergab eine mikroskopische Untersuchung, dass alle Insertionsmutanten von pCM184- Δ *mamB* unbeweglich und lediglich vier Insertionsmutanten von pCM184- Δ *mamM* beweglich waren. Alle unbeweglichen Klone wurden verworfen, da weitere Veränderungen im Genom der Mutanten nicht ausgeschlossen werden konnten. Die beweglichen Insertionsmutanten von

pCM184- $\Delta mamM$ wurden drei- bis viermal in MSR-Standardmedium transferiert und zur Identifizierung potentieller doppelter Rekombinationsereignisse auf Festmedium plattiert. Leider konnte bei keinem der 300 getesteten Klone ein zweites Rekombinationsereignis festgestellt werden. Eine Deletion des Plasmidgerüsts zusammen mit dem Wildtypgen hatte, anscheinend aufgrund einer zu geringen Rekombinationsrate, nicht stattgefunden.

Daraufhin wurde mit Transkonjuganten weiter gearbeitet, die aus Konjugationen mit *E. coli* S17-1 hervorgegangen waren. Aus dem Ansatz mit pCM184- $\Delta mamM$ konnten 72 ampicillinresistente Klone mit einer Insertionsfrequenz von etwa $7 \cdot 10^{-7}$ gewonnen werden. Der Versuch, pCM184- $\Delta mamB$ mittels *E. coli* S17-1 zu transferieren, resultierte in einem einzigen ampicillinresistenten Klon, was einer Insertionsfrequenz von $5 \cdot 10^{-9}$ entsprach.

Alle der untersuchten Insertionsmutanten waren nicht mehr in der Lage sich in einem magnetischen Feld auszurichten. Die 15 *mamM*-Insertionen und die einzelne *mamB*-Insertion wurden anschließend mikroskopisch untersucht. Auch hier zeigte sich, dass lediglich eine der pCM184- $\Delta mamM$ -Insertionen beweglich war. Diese wurde für weitere Selektionsschritte verwendet. Da die Insertion von pCM184- $\Delta mamB$ in das Genom von MSR-1 wiederum zu einer unbeweglichen Transkonjuganten führte, wurde mit dieser weitergearbeitet.

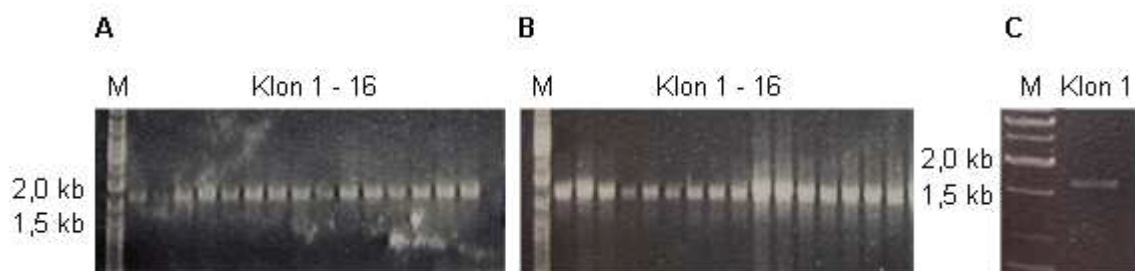


Abbildung 5. PCR zur Kontrolle der Insertion von pCM184- $\Delta mamM$ (A) bzw. pCM184- $\Delta mamB$ (B und C) in das Genom von MSR-1. Es wurden Primer verwendet, die das jeweilige 5'-Fragment des Deletionskonstruktes auf pCM184 vervielfältigen. Das Amplifikat von 1,7 kb bestätigte die Insertion.

Das Auffinden eines zweiten Crossover-Ereignisses wurde durch Vereinzelung der Klone auf Festmedium und anschließenden Replika-Plating erreicht (MM Kap. 4.4.4). Die Überprüfung der möglichen Deletionsmutanten *M. gryphiswaldense* ($\Delta mamM::Km$) und *M. gryphiswaldense* ($\Delta mamB::Km$) erfolgte im ersten Schritt per Amplifikation der plasmidkodierten Resistenzmarker. In den beiden markierten Deletionsmutanten konnte so eindeutig der Verlust der Ampicillinresistenz nachgewiesen werden, da das entsprechende Gen mit spezifischen Primern nicht mehr in den markierten Deletionsmutanten amplifiziert werden konnte. Der Erhalt der Kanamycinresistenz hingegen konnte durch Amplifikation des Gens gezeigt werden (Abbildung 6).

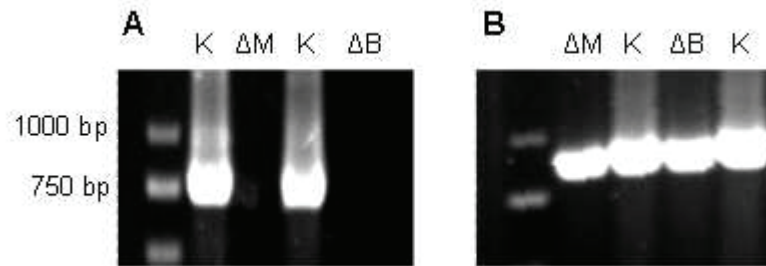


Abbildung 6. Kontrolle der markierten Deletionsmutanten MSR-1($\Delta mamM::Km$) und MSR-1($\Delta mamB::Km$) mittels PCR. Als Beispiel wird jeweils eine markierte Deletionsmutante gezeigt. (A) Nachweis des Verlustes der Ampicillinresistenz, welche auf dem Plasmidgerüst kodiert war. (B) Nachweis des Kanamycinresistenzgens, welches zwischen den *loxP*-Sequenzen der Deletionskonstrukte lag. ΔM - MSR-1($\Delta mamM::Km$), ΔB - MSR-1($\Delta mamB::Km$), K - Positivkontrolle (pCM184- $\Delta mamM$ bzw. B)

Unmarkierte Deletionsmutanten wurden durch Cre-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen generiert, was zum Verlust der Kanamycinresistenz führt (Abbildung 6). Hierzu wurde das „broad host range“-Plasmid pCM157 in die markierten Deletionsmutanten übertragen. Konjugation von pCM157 in *M. gryphiswaldense* ($\Delta mamM::Km$) und *M. gryphiswaldense* ($\Delta mamB::Km$) mittels *E. coli* BW29427 waren ineffizient und bedurften mehrerer Ansätze. Dies war vermutlich auf den Einsatz von Tetrazyklin zurückzuführen, da *E. coli* BW29427 in Gegenwart von Tetrazyklin zu einer starken Schleimbildung neigt, was anscheinend die Konjugationseffizienz stark herabsetzt. Die isolierten und mehrfach passagierten Transkonjuganten wurden mittels PCR auf den Verlust der Kanamycinkassette untersucht. Bei keinem der getesteten Klone konnte die Kanamycinresistenz nachgewiesen werden. Somit wurden zwei unmarkierte Deletionsmutanten ausgewählt und mit MSR-1($\Delta mamM$) und MSR-1($\Delta mamB$) benannt.

Die abschließende Kontrolle der Deletionsmutanten auf Verlust der Zielgene *mamM* bzw. *mamB* und Erzeugung eines neuen durchgängigen ORFs erfolgte durch Sequenzierung der Deletionsstellen von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$. Die Basenabfolge des Deletionsfragments von $\Delta mamB$ war wie erwartet. Allerdings zeigte sich innerhalb des *mamM*-Deletionsfragments ein Stopkodon, wodurch die Translation nach 63 bp abbricht und ein nur 21 AS langes Nonsens-Peptid generiert wird. Innerhalb der 5'-MCS von pCM184 liegt in allen drei Leserahmen ein Stopkodon, welches sich durch die Wahl der Restriktionsschnittstellen zur Klonierung des 5'-Fragments nicht vermeiden ließ.

Auch auf Proteinebene mittels Western Blot konnten mit spezifischen anti-MamM- bzw. anti-MamB-Antikörpern keine Signale detektiert und dadurch die Deletion zusätzlich verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Somit war die unmarkierte *in frame*-Deletion von *mamM* und *mamB* nur mit einem Cre/*lox*-basierten System und *E. coli* S17-1 als Donor erfolgreich.

2.2 Phänotypische Beschreibung der Deletionsmutanten MSR-1($\Delta mamM$) und MSR-1($\Delta mamB$)

Die Zellen beider Mutanten zeigten keine Reaktion auf ein starkes magnetisches Feld, weder unter dem Mikroskop, noch bei der semiquantitativen Messung der magnetischen Ausrichtung im Photometer (C_{mag}). Mikroskopische Beobachtungen zeigten, dass die $\Delta mamB$ -Mutante unbeweglich war, die $\Delta mamM$ -Mutante war beweglich wie der Elternstamm.

Unter Anzuchtbedingungen, in denen Magnetit gebildet wird (Flüssigmedium mit 50 μM Fe, mikroaerob), ist das Zellpellet einer magnetischen MSR-1 Kultur typischerweise schwarzbraun, was durch die Farbe der Magnetitkristalle hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu waren die Zellpellets der Deletionsmutanten beige bis rosa, die Koloniefarben auf Festmedium gelblich-weiß.

Damit sind diese Eigenschaften identisch zu denen der spontanen unmagnetischen Mutante MSR-1B (Schübbe *et al.*, 2003). Dies deutete darauf hin, dass die Deletionsmutanten $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ nicht mehr in der Lage sind, Magnetit zu synthetisieren (Abbildung 7).

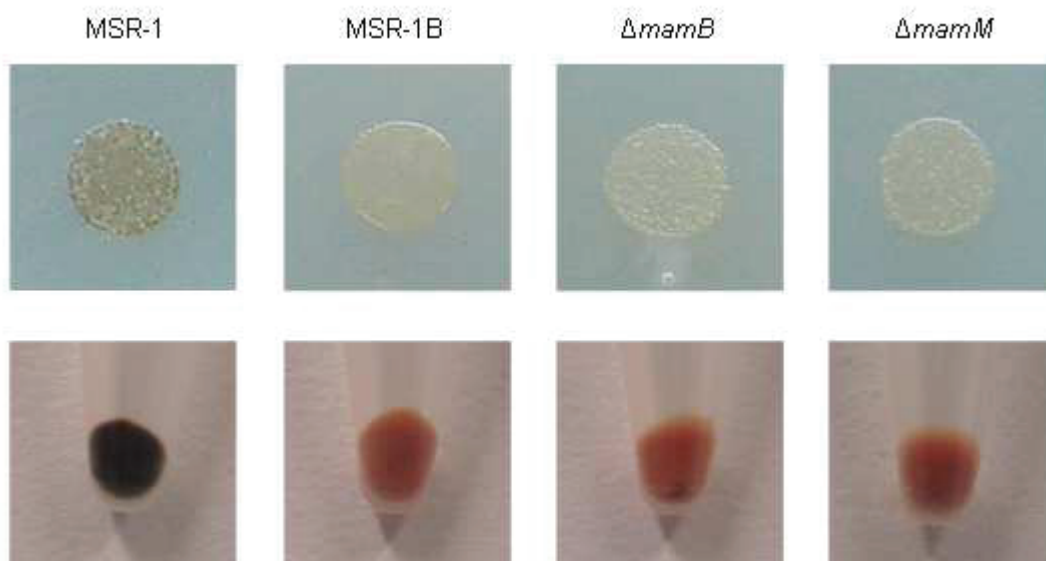


Abbildung 7. Kolonie- und Pelletfarbe von MSR-1 Wildtypzellen und der unmagnetischen Mutanten MSR-1B, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$. Die Bildung des schwarzen Minerals Magnetit in Wildtypzellen führt zu einer schwarzbraunen Färbung der Kolonie oder des Zellpellets. Unmagnetische Mutanten hingegen bilden weiß-beige Kolonien und beige-rosa Zellpellet.

TEM-Untersuchungen bestätigten die oben genannten Ergebnisse. In keiner untersuchten Zelle konnten Magnetitkristalle gefunden werden (Abbildung 8). In Aufnahmen von $\Delta mamB$ konnten außerdem keine Flagellen beobachtet werden, was die Unbeweglichkeit der Mutante erklärt.

Die phänotypischen Untersuchungen demonstrierten, dass die Deletionsmutanten einer der beiden CDF-Transporter der MM die Fähigkeit verloren haben, Magnetit zu bilden.

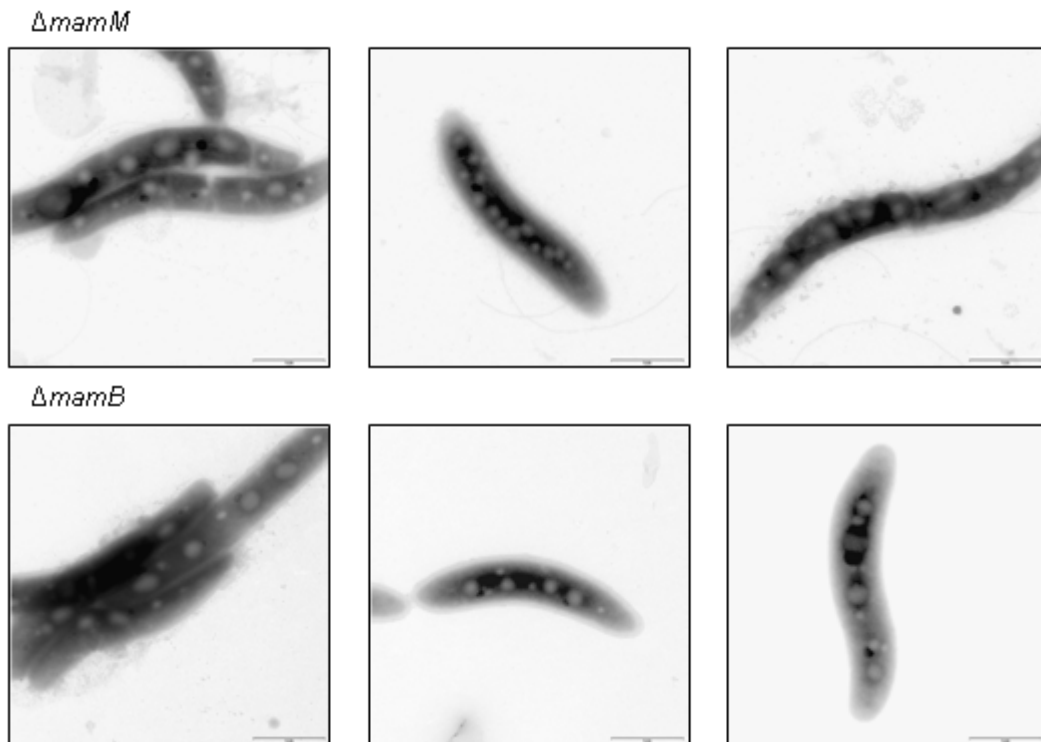


Abbildung 8. TEM-Aufnahmen der Deletionsmutanten MSR-1($\Delta mamM$) und MSR-1($\Delta mamB$). Repräsentativ wurden jeweils drei Beispielaufnahmen gewählt.

2.3 Versuche zur homologen Komplementation von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$

Durch die Komplementation der generierten Mutanten $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ sollte untersucht werden, ob der beobachtete Phänotyp tatsächlich ausschließlich auf die Deletion der Gene innerhalb des *mamAB*-Operons zurückzuführen war und nicht auf polaren Effekten oder sekundären Mutationen beruht. Dazu wurde das Wildtypallel inklusive einer putativen Ribosomenbindungsstelle in ein Derivat des broad-host-range Plasmids pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1995) kloniert und in der jeweiligen Mutante vom plasmidständigen *lac*-Promotor exprimiert. So konnte kontrolliert werden, ob die Expression des Gens *in trans* den magnetischen Phänotypen wieder herstellt. Diese replikativen Plasmide wurden per Konjugation in $\Delta mamM$ sowie $\Delta mamB$ übertragen.

2.3.1 Expression von *mamB*_{MSR-1} in Δ *mamB*

Der Phänotyp von Δ *mamB* zeigt keine Reaktion auf ein magnetisches Feld, was mit der Unfähigkeit Magnetit zu bilden, einhergeht. Komplementierte Kulturen hingegen, welche *mamB in trans* von pBBR1MCS-2 und pBBR1MCS-4 exprimieren, zeigten eine schwache magnetische Ausrichtung. Die Wiederherstellung der magnetischen Orientierung erreichte jedoch nicht Wildtypniveau. Komplementationen mit *mamB* exprimiert von pBBR1MCS-2 erreichten unter Standardbedingungen (50 μ M Fe, mikroaerob) maximale C_{mag} -Werte von 0,09, von pBBR1MCS-4 Werte maximal 0,22 (eine vergleichend angezogene Wildtypkultur erreichte C_{mag} -Werte von > 1). Der durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) gemessene Eisengehalt von MSR-1(Δ *mamB*, pBBR1MCS-2-*mamB*) war doppelt so hoch wie der der Deletionsmutante (bei einem gemessenen $C_{\text{mag}} = 0,01$), was jedoch nur etwa ein Zehntel dem des Wildtyps entsprach. Der Magnetismus und Eisengehalt der komplementierten Stämme blieb auch bei Erhöhung der Eisenkonzentration im Medium auf 500 μ M unverändert.

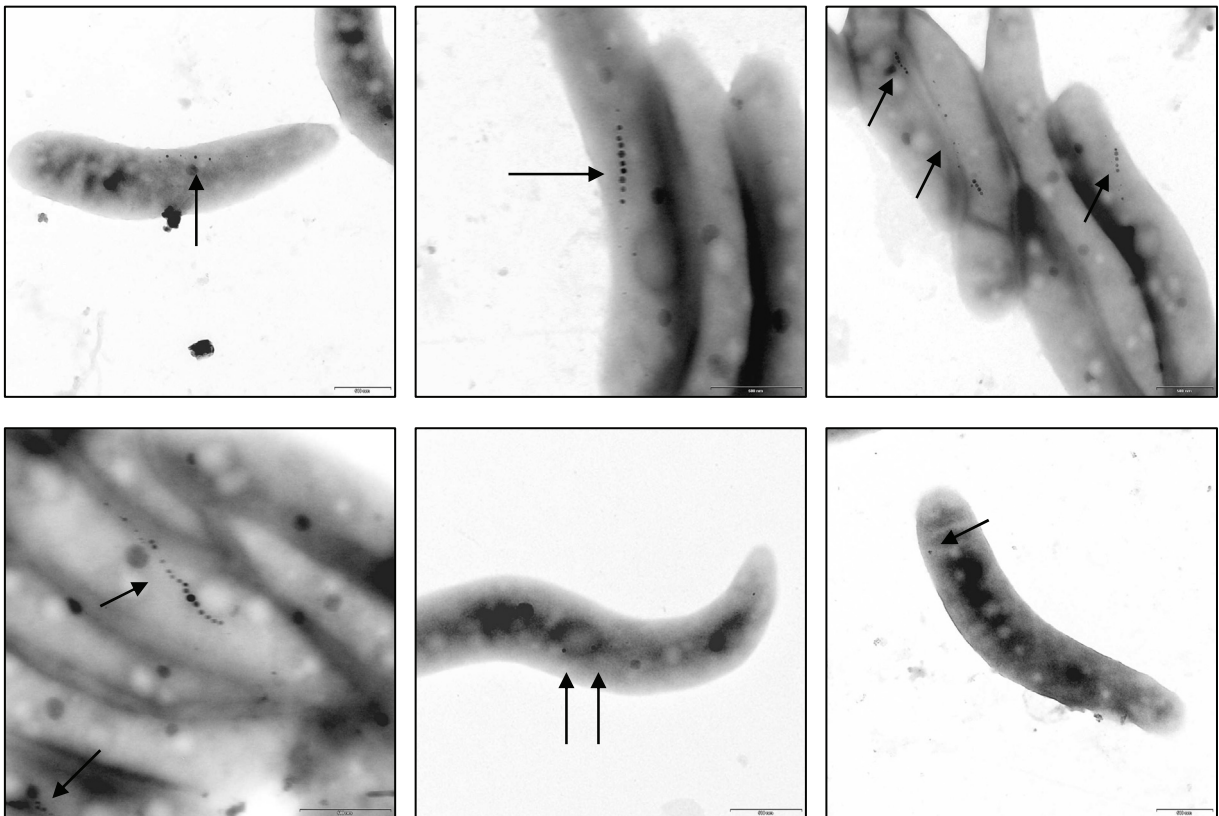


Abbildung 9. Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von Δ *mamB*-Zellen komplementiert mit pBBR1MCS2-*mamB*_{MSR-1}. Die Pfeile veranschaulichen die Lage der Magnetitkristalle

In TEM-Aufnahmen (Abbildung 9) der Kulturen war zu erkennen, dass nicht in allen Zellen Magnetitkristalle vorlagen. Daneben waren Zellen mit kurzen Ketten oder

Einzelkristalle, die in größeren Abständen auf einer Linie angeordnet sind, zu erkennen. Vereinzelt waren auch Zellen zu sehen, die nur ein oder zwei Kristalle aufwiesen. Häufig waren die Kristalle nicht ausgereift und hatten im Vergleich zum Wildtyp einen geringeren Durchmesser. Die verringerte magnetische Ausrichtung der komplementierten Stämme lag somit zum einen an dem geringen Anteil von magnetitproduzierenden Zellen und zum anderen an der Anordnung und Größe der Kristalle innerhalb der Zellen.

Die Expression von $mamB_{MSR-1}$ in den komplementierten Zellen wurde immunochemisch mit einem Anti-MamB-Peptidantikörper nachgewiesen. Während das Signal für das Wildtyp-Protein von MamB in MSR-1 deutlich zu erkennen war, lag das Signal für die plasmidexprimierte Variante von MamB allerdings unter der Nachweisgrenze des Antikörpers (Abbildung 10). Die immunochemischen Untersuchungen zeigten, dass die *in trans* Expression von $mamB$ von einem heterologen Promotor vermutlich deutlich geringer ist als die Expression vom nativen Promotor des Wildtypstammes.

Obwohl die Menge an exprimiertem MamB die Magnetitsynthese zu begrenzen schien, können jedoch polare Effekte in $\Delta mamB$ ausgeschlossen werden.

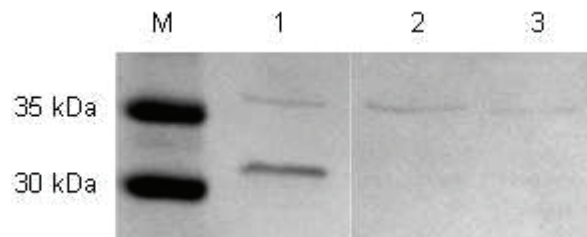


Abbildung 10. Nachweis der Expression von MamB unter Kontrolle des *lac*-Promotors in MSR-1($\Delta mamB$). M - Marker, 1 - MSR-1 Kontrolle, 2 - MSR-1($\Delta mamB$, pBBR1MCS2-*mamB*), 3 - MSR-1($\Delta mamB$, pBBR1MCS4-*mamB*). Bei ca. 36 kDa ist ein unspezifisches Signal zu erkennen, das durch den Einsatz eines nicht spezifisch gereinigten antiMamB-Antiserums hervorgerufen wird.

2.3.2 Expression von $mamM_{MSR-1}$ in $\Delta mamM$

Versuche zur Komplementation von MSR-1($\Delta mamM$) führte weder bei der Expression von $mamM$ in pBBR1MCS-2 noch in pBBR1MCS-4 zur Wiederherstellung des magnetischen Phänotyps. Allerdings lag die Expression von $mamM$ unter der Nachweisgrenze des Antikörpers (Daten nicht gezeigt). Trotzdem war eine nahe liegende Erklärung ein polarer Charakter der Mutation, d.h. dass die Transkription der im *mamAB*-Operon stromabwärts gelegenen Gene in $\Delta mamM$ unterbrochen oder eingeschränkt ist. Aus diesem Grund wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die Transkription der stromabwärts der Deletion gelegenen Bereiche des *mamAB*-Operons zu untersuchen. Zum Vergleich wurde das in Transkriptionsrichtung vor $mamM$ liegende *mamL*-Gen amplifiziert. Stromabwärts wurden

Fragmente der Gene *mamN* und *mamB* amplifiziert, um den gesamten Transkriptionsbereich des Operons abzudecken. Von jedem der getesteten Gene konnten in der $\Delta mamM$ -Mutante Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 11).

Zusätzlich wurde ein Western-Blot mit anschließendem immunochemischen Nachweis von MamB an Zellrohextrakten von $\Delta mamM$ durchgeführt. MamB, welches stromabwärts von *mamM* kodiert wird, konnte nicht im Zellrohextrakt der *mamM*-Deletionsmutante gefunden werden. Denkbar ist das Szenario, dass MamM für die Stabilität von MamB benötigt wird. Somit ließe sich auch erklären, weshalb ein Transkript von MamB vorliegt, aber kein Translationsprodukt. Vorerst kann dies nicht geklärt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass $\Delta mamM$ polar ist und die Transkription und/oder Translation der stromabwärts von *mamM* gelegenen Gene nur eingeschränkt stattfindet. Dies ließ sich jedoch mit der gewählten Methode der RT-PCR nicht quantitativ nachweisen.

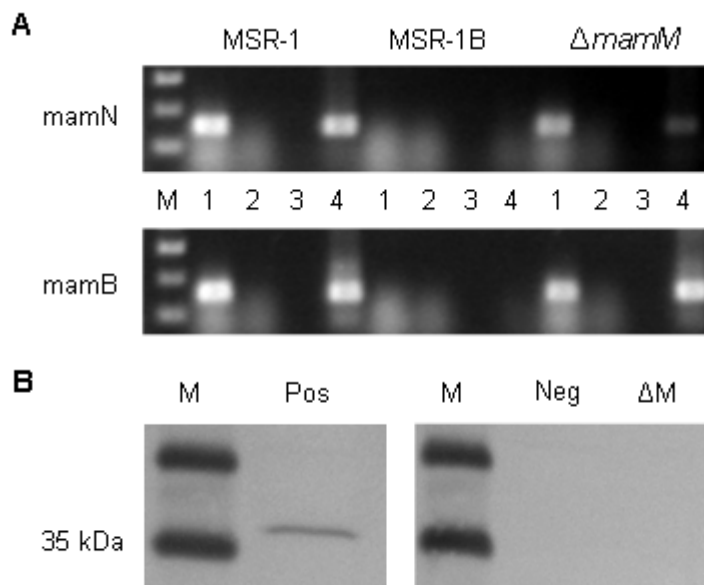


Abbildung 11. (A) RT-PCR an mRNA von MSR-1 (Positivkontrolle), MSR-1B (Negativkontrolle) und $\Delta mamM$. 1 - Positivkontrolle an genomischer DNA, 2 - nach DNase-Verdau, 3 - Reverse Transkription ohne Enzym, 4 - nach Reverser Transkription. (B) Western Blot mit anti-mamB-Antikörper an Membranfraktionen von MSR-1 - Pos, MSR-1B - Neg und $\Delta mamM$ - ΔM .

2.3.3 Expression von *mamM*_{MSR-1} in $\Delta mamB$

Zusätzlich zur Komplementation von $\Delta mamB$ mit *mamB* von MSR-1 wurde versucht, *mamM* von pBBR1MCS-2 in der Deletionsmutante zu exprimieren. Damit sollte untersucht werden, ob die Deletion von einem der beiden CDF-Transporter durch einen Dosiseffekt zu dem nicht-magnetischen Phänotyp führt, d.h. dass die Menge der CDF-Transporter in

der MM durch das Entfernen von *mamB* zu gering ist, einen magnetischen Phänotypen zu generieren. Die Komplementation von $\Delta mamB$ mit *mamM* von MSR-1 war nicht erfolgreich und stellte den magnetischen Phänotypen nicht wieder her. Allerdings war in immunochemischen Kontrolle die MamM-Expression im Vergleich zum Wildtyp nicht deutlich höher. Aus den Daten wird aber vorläufig geschlossen, dass *mamM* und *mamB* nicht untereinander ersetzt werden können.

2.4 Untersuchung der subzellulären Kompartimente des Wildtyp und der unmagnetischen Mutanten $\Delta mamM$, $\Delta mamB$ und MSR-1B

In verschiedenen vorangegangenen Arbeiten an Magnetospirillen war zu erkennen, dass die Magnetosomenleervesikel bereits vor der Magnetiteinlagerung in der Zelle in Ketten in Assoziation zur Cytoplasmamembran angeordnet sind, also unabhängig von der Magnetitsynthese gebildet werden (Gorby *et al.*, 1988; Komeili *et al.*, 2004; Komeili *et al.*, 2006; Scheffel, 2007). Daher sollte in einem nächsten Versuch untersucht werden, ob $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ durch die Deletion der beiden mutmaßlichen Eisentransporter nur in der Magnetitsynthese gehemmt sind, oder ob dies einen Effekt auf die Bildung der Vesikel ausübt.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Gerhard Wanner, Botanisches Institut, LMU München, Dünnschnitte der Mutanten und des Wildtyps im TEM untersucht. Die Zellen wurden wie unter MM Kap. 4.4.3 beschrieben angezogen. In den beiden Deletionsmutanten konnte die Bildung von Leervesikeln bestätigt werden (Abbildung 12) Deren Anordnung war in $\Delta mamB$ vergleichbar mit den Kontrollpräparationen des Wildtyps. Die Vesikel waren auch hier in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran zu finden und zeigten vereinzelt eine Verbindung zu dieser (siehe Abb. 12 unteres Bild in der Spalte $\Delta mamB$). Eine kettenförmige Anordnung der Leervesikel konnte nur in wenigen Zellen beobachtet werden und umfasste maximal drei bis fünf aufeinander folgende membranumgebende Strukturen, die in der gleichen Schnittebene bei der Präparation der Dünnschnitte lagen. In $\Delta mamM$ konnte eine kettenförmige Anordnung nicht gezeigt werden. Jedoch konnten Zellen beobachtet werden, in denen 2 bis 3 Vesikel zu sehen waren, die auch hier an der Zellmembran lagen. Von MSR-1B konnten in dieser Präparation nur insgesamt 4 Schnitte beobachtet werden, in denen 1 bis 2 vesikelartige Strukturen zu sehen waren. Ob dies echte Magnetosomenleervesikel waren oder nur Artefakte der Dünnschnittpräparation muss noch geklärt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse konnte geschlossen werden, dass die Mutanten $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ weiterhin in der Lage sind, Leervesikel zu produzieren und lediglich die Magnetitsynthese unterbunden wird.

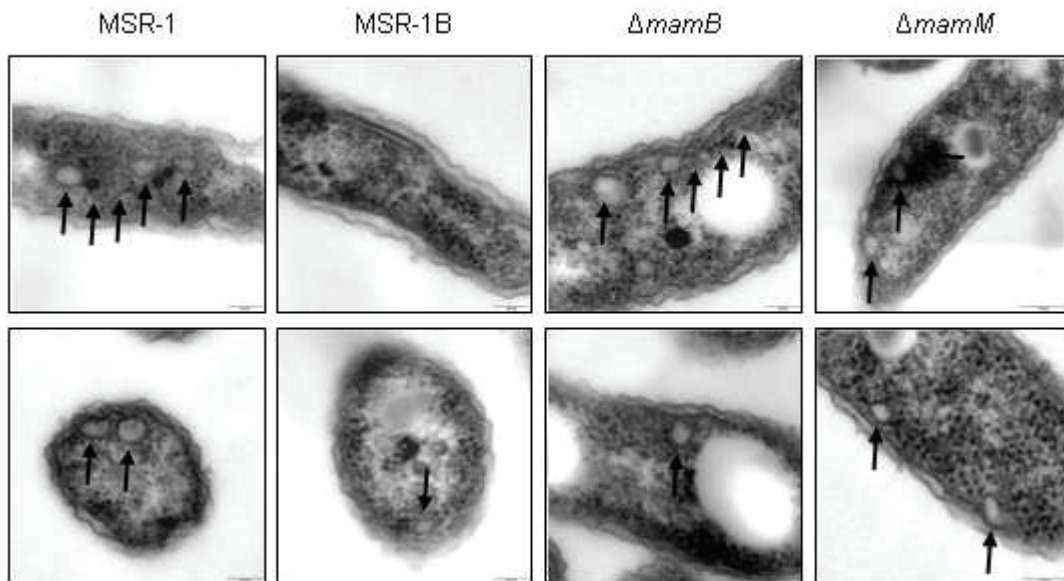


Abbildung 12. Dünnschnitte eisengehungerter Zellen von MSR-1 (Wildtyp), MSR-1B (spontane Mutante), $\Delta mamB$ und $\Delta mamM$. Jeweils zwei repräsentative Beispiele wurden für jeden der untersuchten Stämme dargestellt. Die Pfeile verweisen auf die Magnetosomenleeresvesikel.

2.5 Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten

2.5.1 Wachstumsverhalten bei verschiedenen Eisenkonzentrationen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Deletion von *mamM* bzw. *mamB* einen Effekt auf Wachstumsverhalten der Mutanten in Abhängigkeit der Eisenkonzentration zeigen. Dazu wurden Dosis-Wirkungs-Experimente mit Eisenkonzentrationen von 0 bis 2000 μM mit zuvor eisengehungerten MSR-Kulturen, wie in MM Kap. 4.4.3 c beschrieben, durchgeführt.

Das Wachstum des Wildtyps zeigte sich abhängig von der Eisenkonzentration (als Eisen-(III)-Citrat), ebenso die magnetische Ausrichtung der Zellen (c_{mag}). Wurde dem Medium kein weiteres Eisen zugegeben ($< 1 \mu\text{M}$ Gesamteisen), war keine magnetische Orientierung messbar und die Zellen erreichten die geringste OD_{565} . Mit steigender Eisenmenge nahm auch c_{mag} zu und erreichte eine Sättigung bei 50 μM Eisen, ebenso wie das Wachstum. Bei einer Konzentration von 2000 μM Eisen konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden.

Eisenabhängiges Wachstum war auch bei den Mutantenstämmen MSR-1B und $\Delta mamB$ deutlich zu erkennen. Allerdings hatten bereits Eisenkonzentrationen von $\geq 50 \mu\text{M}$ einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum. Die Dosis, die zu einer völligen Wachstumshemmung führte, war mit der des Wildtyps vergleichbar. Im Gegensatz zu MSR-1 erreichten MSR-1B und $\Delta mamB$ höhere Zelldichten bei niedrigen

Eisenkonzentrationen von $< 10 \mu\text{M}$, in denen die Magnetitsynthese in Wildtypzellen weiterhin stattfand, aber nicht gesättigt war. Dies könnte darauf hinweisen, dass dem Wildtyp bei sehr geringen Eisenkonzentrationen nicht das gesamte Eisen für biochemische Stoffwechselwege zur Verfügung steht, wie es den Mutanten durch die fehlende Magnetitbildung möglich ist. Das Wachstum von $\Delta mamM$ war nicht abhängig von der Eisenkonzentration (Abbildung 13).

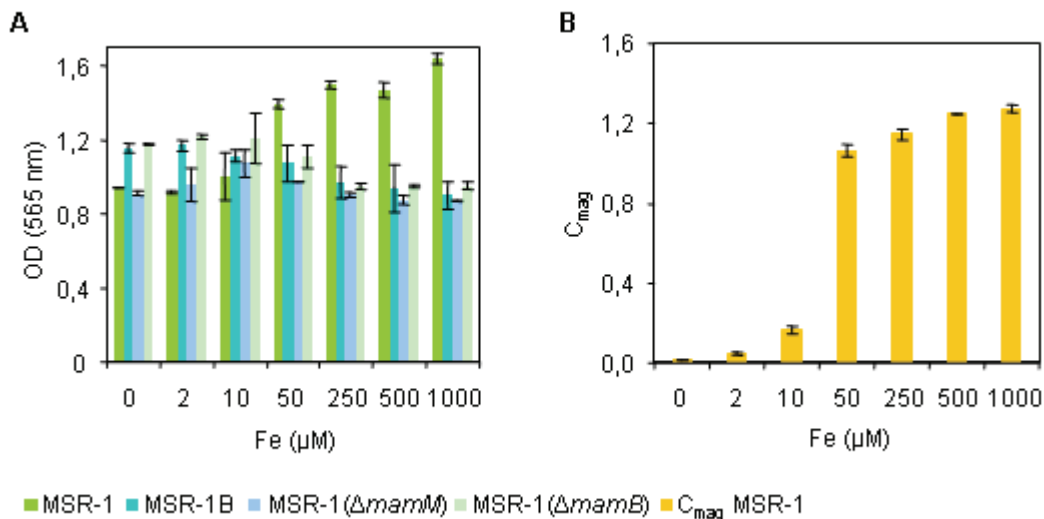


Abbildung 13. (A) Wachstum des Wildtyps MSR-1 und der unmagnetischen Mutanten MSR-1B, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ und (B) Magnetismus von MSR-1 bei Eisenkonzentrationen zwischen 0 und 1000 μM

2.5.2 Gesamteisenakkumulation des Wildtyps MSR-1 und der unmagnetischen Mutanten MSR-1B, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$

Wildtypzellen von MSR-1 nehmen für die Magnetitsynthese bis zu 4 % Eisen pro Gramm Trockengewicht auf (Blakemore, 1982). Von der spontanen Mutante MSR-1B und den markierten Deletionsmutanten $\Delta mamM::Gm$ sowie $\Delta mamB::Gm$ war bekannt, dass die Unfähigkeit Magnetit zu synthetisieren, auch mit einer verringerten Eisenaufnahme einher geht (Schübbe *et al.*, 2003; Junge, 2004). Bisher konnte dies jedoch nicht auf den Verlust eines einzigen Proteins zurückgeführt werden. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die unmarkierte Deletion ähnliche Auswirkungen auf den Eisenhaushalt der Zellen ausübte. Dazu wurde der Gesamteisengehalt von MSR-1 sowie der unmagnetischen Mutanten $\Delta mamM$, $\Delta mamB$ und MSR-1B mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Gesamteisengehalt des Wildtyps unter eisenreichen, magnetitinduzierten Bedingungen (mikroaerob, 50 μM bzw. 500 μM Eisen(III)-Citrat im Medium), mit 60 $\mu\text{M Fe/g TG}$, etwa 20 x höher war als der von

$\Delta mamB$ und MSR-1B (Abbildung 14). Die $\Delta mamB$ -Mutante wiederum hat unter diesen Bedingungen mit 3,3 μM Fe/ gTG einen etwa höheren Gesamteisengehalt als $\Delta mamM$ (1,4 μM Fe/ g TG). Unter Eisenmangel nahmen der Wildtyp und die Mutanten gleich viel Eisen auf. Die Eisenaufnahme der unmagnetischen Mutanten zeigte allerdings keine Konzentrationsabhängigkeit, wie es der Wildtyp tut.

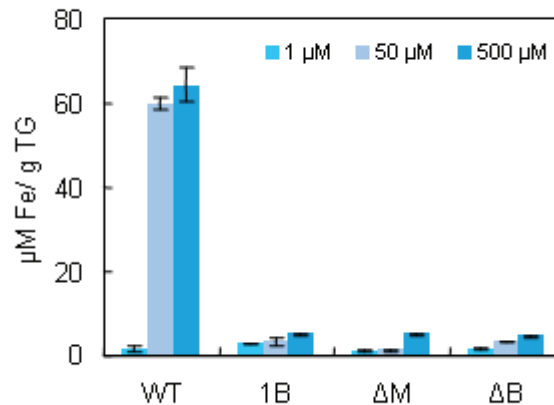


Abbildung 14. Vergleich des Eisengehalts von MSR-1, MSR-1B, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ ermittelt durch AAS an stationären Kulturen unter verschiedenen Eisenkonzentrationen im Medium nach 24 h Inkubation.

2.6 Eisenaufnahmekinetik

Die Unterschiede in der Eisenaufnahme zwischen Wildtyp und unmagnetischen Mutanten sollten in Kurzeitenaufnahmeexperimenten mit ^{55}Fe untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei vor allem die Frage nach dem Beitrag von MamB zur Eisenaufnahme in *M. gryphiswaldense* MSR-1.

2.6.1 Etablierung eines Eisenaufnahmeassays mit ^{55}Fe

Vorversuche mit dem bisher etablierten Protokoll (Schüler und Baeuerlein 1996; Schübbe 2003) führten zu verschiedenen Problemen bei der Durchführung und Auswertung der Experimente: (I) Die zuvor genutzten Anzuchten ermöglichten keine eisengehungerten und unmagnetischen Vorkulturen, in denen die Zellen aber unter magnetitinduzierenden Bedingungen kultiviert werden können, ohne dabei im Wachstum limitiert zu werden. (II) Bisher wurden die Aufnahmeexperimente unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das dabei verwendete Fe(III)-Chlorid bildet unter aeroben Bedingungen unlösliche Verbindungen. Außerdem findet unter aeroben Bedingungen keine Magnetitbildung statt,

wodurch die Eisenaufnahme des Wildtyps verringert und nicht mit der unter magnetitbildenden Bedingungen vergleichbar ist. Ein solcher Ansatz wäre ungeeignet, um den Anteil der CDF-Proteine am Eisentransport bei der Magnetitsynthese zu bestimmen.

Um die Probleme zu umgehen wurde (I) das Medium eisenfrei ohne Zusatz von Spurenelementen und ohne Fe(III)-Citrat mit nur 1 g/l Pepton hergestellt. Da Pepton bereits eine geringe Resteisenmenge enthält (U. Heyen, persönliche Mitteilung), konnte so die Eisenkonzentration des Mediums weitgehend reduziert werden. Die Menge an Pepton konnte nicht weiter reduziert werden, da Konzentrationen von $\leq 0,5$ g/l zu Wachstumshemmungen führten. Der Versuch, das Medium mittels Chelex 100 (ein chelatbildendes Harz mit einer hohen Affinität für polyvalente Metallionen) von Resteisen zu befreien, führte zu einer vollständigen Wachstumsinhibition durch das Medium, die nicht durch erneute Zugabe von Eisen aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit wurde für ein unlimitiertes Wachstum ein Resteisengehalt des eisenreduzierten Mediums von etwa $1 \mu\text{M}$ akzeptiert. Um eine Sauerstofflimitierung der mikroaeroben Kulturen zu verhindern, wurde ein Medium/Gasraum-Verhältnis von 1:10 eingestellt. Nach 2 bis 3 seriellen Transfers in diesem Ansatz war es möglich, Zellen zu züchten, die sich nicht mehr in einem magnetischen Feld ausrichten. C_{mag} konnte durch Eisenfütterung wieder induziert werden (Abbildung 15). Daher wurden nicht nur die Anzucht der Vorkulturen, sondern auch die Aufnahmeexperimente in diesem modifizierten Medium durchgeführt.

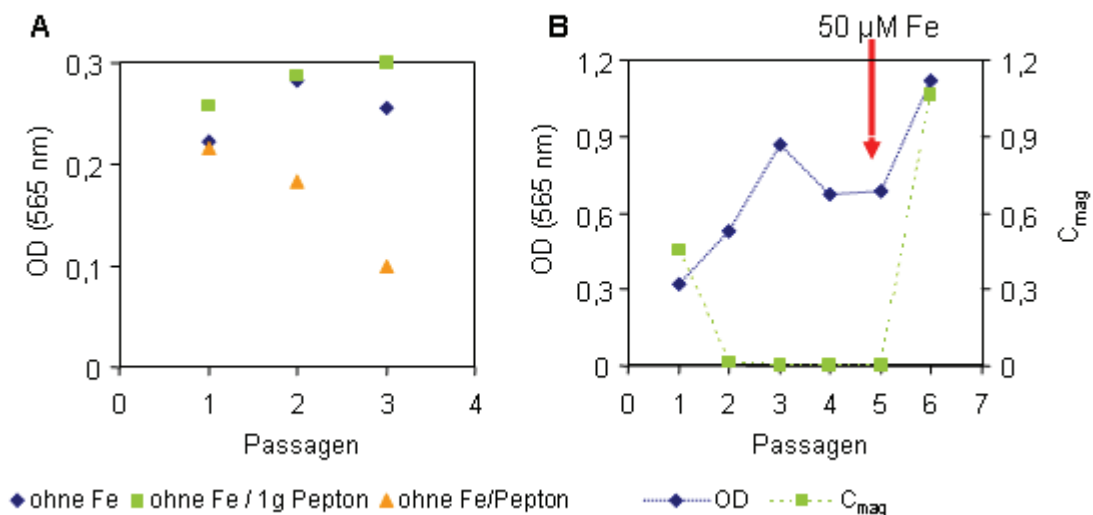


Abbildung 15. Modifizierung des Mediums zur Anzucht von eisengehungerten, aber magnetitinduzierten Kulturen von Stamm MSR-1. Jeweils 10 % wurden als Inokulum für einen weiteren Transfer verwendet. (A) Einfluss von Pepton auf das Wachstum von MSR-1. (B) eisenlimitiertes Wachstum von MSR-1 in Gegenwart von 1 g/l Pepton. Die Eisenzugabe ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

(II) Unter oxidierten Bedingungen sind viele Fe(III)-Verbindungen wie z.B. Fe(III)-Chlorid unlöslich. Komplexe aus Fe(III) und metallaffinen Chelatoren hingegen sind häufig in Wasser unter aeroben Bedingungen gut löslich. Deshalb wurde Eisen in aeroben als auch mikroaeroben Aufnahmeversuchen als komplexiertes Fe(III)-Citrat verwendet.

Während der aeroben Messungen stellte sich heraus, dass trotz der Eisenzugabe im Versuchsverlauf kein Magnetismus messbar war. Der hohe Sauerstoffeintrag während der Messung unterdrückte anscheinend die Magnetitsynthese. Daher wurde der Versuch zusätzlich unter mikroaeroben Bedingungen in begasten, abgeschlossenen Duranflaschen durchgeführt (MM Kap. 6.6). Um auch hier während des Versuches die Veränderungen in der Gasphase zu kompensieren wurde ein Medium/Gasraum-Verhältnis von 1:10 eingestellt. Nach Eisenzugabe war ein geringer C_{mag} erst nach 1,5 bis 2 h zu messen, weshalb die Versuchszeiten von 1 h auf 4 h ausgedehnt wurden.

2.6.2 Kinetik der aeroben und mikroaeroben Eisenaufnahme von MSR-1 Wildtyp und der unmagnetischen Mutanten ΔmamM , ΔmamB und MSR-1B

Mit dem verbesserten Protokoll wurden Eisenaufnahmeversuche zuerst aerob, dann mikroaerob mit 0 bis 100 μM Eisen(III)-Citrat durchgeführt. Aerob wurden nur die ersten 60 min betrachtet. Unter mikroaeroben Bedingungen wurden die Aufnahmeexperimente auf 4 h ausgedehnt, bis C_{mag} des Wildtyps annähernd die Sättigung erreichte (Abbildung 16), um die Eisenaufnahme tatsächlich mit der Magnetitbildung korrelieren zu können. Anhand der Daten konnten auch kinetische Parameter (v_{max} , K_{M}) des Eisentransports in MSR-1 berechnet werden. Hierzu wurde aus den Steigungen der Aufnahmekurven vor der Sättigung die Geschwindigkeiten für jede einzelne Substratkonzentration ermittelt werden. Diese konnten als Sättigungskurve dargestellt werden. Weiterhin wurde aus diesen Daten ein Lineweaver-Burke-Diagramm erstellt, aus dem sich K_{m} und v_{max} berechnen ließen.

In der Eisenaufnahme der unmagnetischen Mutanten MSR-1B und ΔmamB (Abbildung 17 B, D) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 17 A) unter mikroaeroben Bedingungen war ein deutlicher Unterschied in der Aufnahmerate zu erkennen. Während die Eisenaufnahme des Wildtyps abhängig von der zugesetzten Eisenkonzentration bis 100 μM anstieg, erreichten ΔmamB und MSR-1B bei $\geq 5 \mu\text{M}$ Eisen die Sättigung. Auch war die Eisenaufnahme nach 2 h gesättigt. Bemerkenswerterweise war die Eisenaufnahme von ΔmamM (Abbildung 17 C) noch stärker reduziert verglichen mit ΔmamB sowie MSR-1B.

Wildtypzellen nahmen in den ersten zwei Stunden hohe Mengen an Eisen auf, ohne dass in dieser Zeit eine magnetische Ausrichtung der Zellen messbar war. Erst als die Eisenaufnahme bei hohen Eisenkonzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) in die Sättigung eintrat, konnte

ein Anstieg des Magnetismus gemessen werden. Vermutlich wurden bereits in den ersten zwei Stunden Magnetitkristalle gebildet, die jedoch zu klein waren oder zu kurze Ketten bildeten, um die Zelle messbar in einem magnetischen Feld auszurichten.

Außerdem wurde die Eisenaufnahme von MSR-1 und $\Delta mamB$ unter aeroben, nicht magnetitsynthetisierenden Bedingungen untersucht. Zwischen MSR-1 und $\Delta mamB$ war jedoch deutlich zu erkennen, dass unter aeroben Bedingungen, in denen keine Magnetitbildung stattfand, die Eisenaufnahme in beiden Stämmen abhängig von der angebotenen Eisenmenge und nahezu gleich war (Abbildung 18). Dies spiegelte sich auch in den berechneten Werten v_{max} und K_M wieder, die unter aeroben Bedingungen mit $v_{max} = 0,15 \mu\text{M Fe min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ und $K_M = 8 \mu\text{M Fe}$ für den Wildtyp und $v_{max} = 0,16 \mu\text{M Fe min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ und $K_M = 8 \mu\text{M Fe}$ für $\Delta mamB$ annähernd gleiches Niveau haben. Daraus kann geschlossen werden, MamB hat unter aeroben Bedingungen keinen Einfluss auf die Eisenaufnahme in MSR-1.

Unter magnetitbildenden Bedingungen hingegen wurde die Eisenaufnahmerate des Wildtyps deutlich erhöht, v_{max} war mit $0,45 \mu\text{M Fe min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ 3 x höher als unter aeroben Bedingungen. Der K_m -Wert belief sich in einer ähnlichen Größenordnung wie der aerobe ($K_m = 6 \mu\text{M}$). Die Aufnahmeraten von $\Delta mamB$ unter mikroaeroben Bedingungen hingegen waren geringfügig höher als unter aeroben Bedingungen mit einem $v_{max} = 0,26 \mu\text{M Fe min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$. Interessanterweise unterschieden sich die K_M -Werte zwischen aerober und mikroaerober Eisenaufnahme der $\Delta mamB$ -Mutante. Der berechnete K_m -Wert lag bei $2 \mu\text{M}$ und war damit etwa 4 x niedriger als unter aeroben Bedingungen. Die Parameter von MSR-1B lagen bei $K_M = 4 \mu\text{M}$ sowie $v_{max} = 0,26 \mu\text{M Fe min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ und waren mit denen von $\Delta mamB$ vergleichbar.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass MamB ausschließlich einen Einfluss auf die Eisenaufnahme unter magnetitbildenden Bedingungen hat und somit zur Magnetitbiomineralisation beiträgt. Des Weiteren kann geschlossen werden, dass die Unterschiede zwischen aerober und mikroaerober Eisenaufnahme im Wildtyp durch die Weiterleitung des Eisens in die Magnetosomen hervorgerufen werden. Demnach ist in $\Delta mamB$ der Eisentransport in die Magnetosomenvesikel unterbrochen.

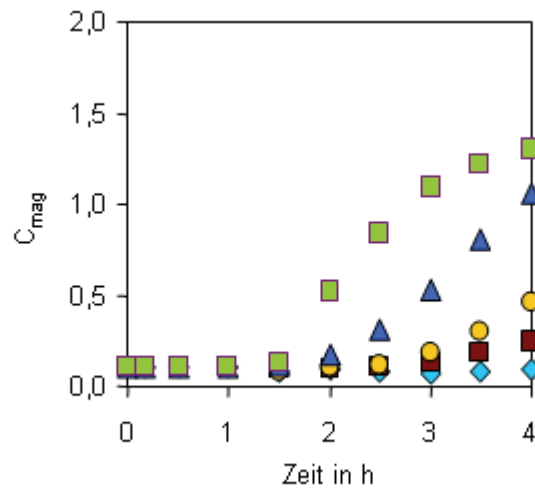


Abbildung 16. Entwicklung von c_{mag} nach Zugabe von Fe^{55} während der Eisenaufnahme von MSR-1 unter mikroaeroben Bedingungen

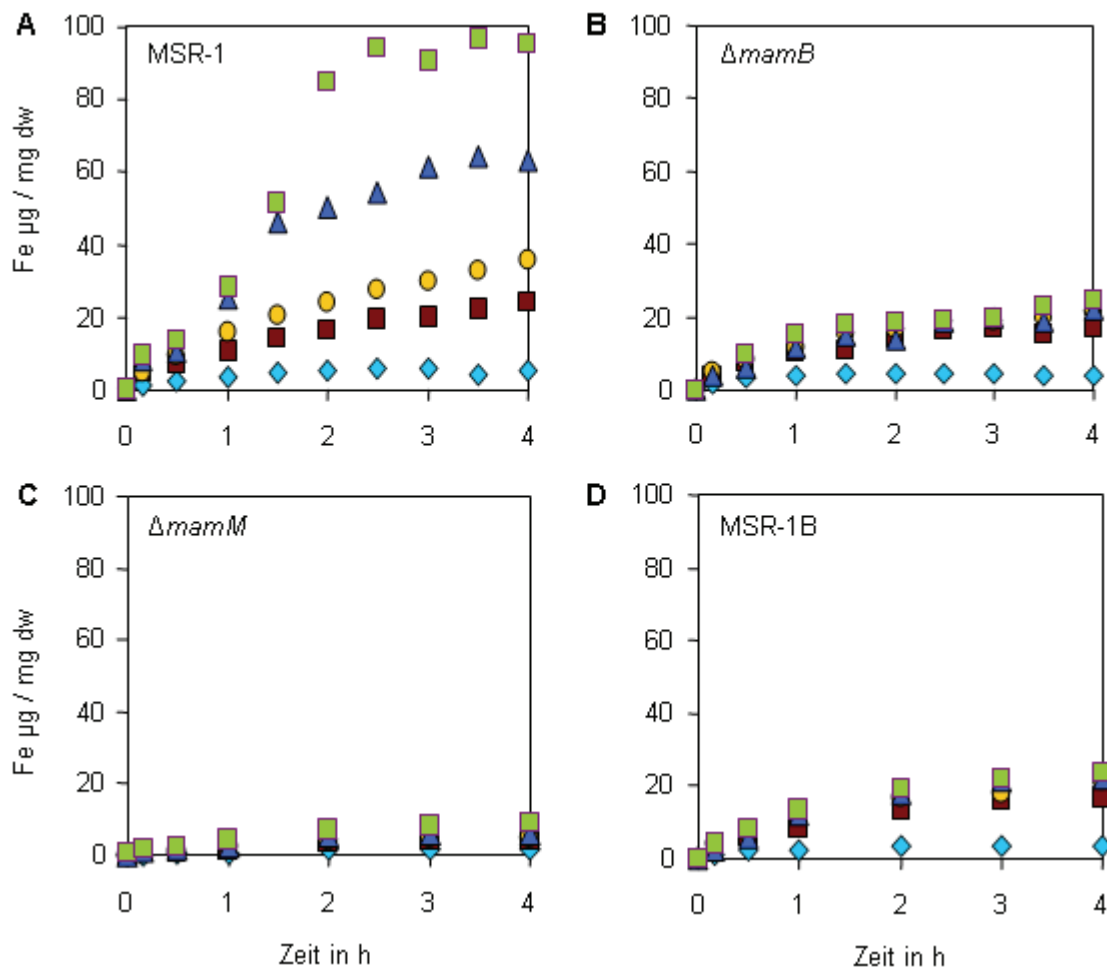


Abbildung 17. Eisenaufnahme von MSR-1, MSR-1B, ΔmamM und ΔmamB unter mikroaeroben Bedingungen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Kurven aus drei Experimenten.

◆ 1 μM ■ 5 μM ● 10 μM ▲ 50 μM ■ 100 μM

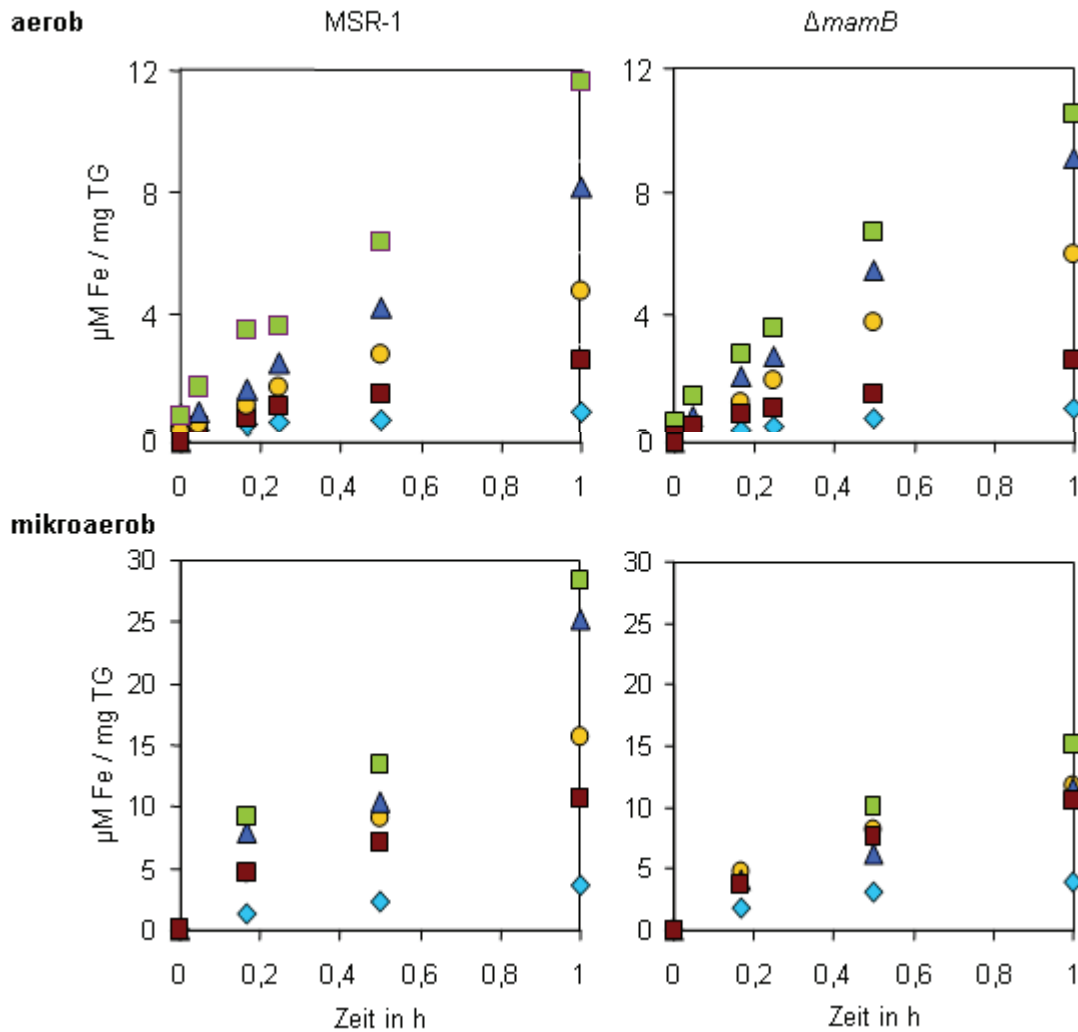


Abbildung 18. Eisenaufnahme von MSR-1 und $\Delta mamB$ unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Kurven aus drei Experimenten.

2.7 Intrazelluläre Eisenverteilung in $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$

Trotz der verringerten Aufnahme der nicht magnetitbildenden Mutanten ist der Eisengehalt dieser Mutanten immer noch höher als der typische Eisengehalt nicht-magnetischer Bakterien. Deshalb wurden die intrazellulären Eisenspezies mittels Mößbauerspektroskopie in Kooperation mit Prof. Dr. Berthold Matzanke-Markstein, Universität Lübeck, mit $\Delta mamB$ und $\Delta mamM$ identifiziert. Wildtypspektren wurden zum Vergleich aus Faivre et al. (2007) entnommen. Die Stämme aus einer eisenfrei gezogenen Vorkultur wurden in einem Oxystat-Fermenter bei 1 % O_2 und 150 μM Eisen kultiviert. Die Eisenaufnahme wurde durch Zugabe von ^{57}Fe induziert und die Spektren

nach einer Induktionsphase von 1h bzw. 20 h aufgenommen. Zum einen bestätigten die Ergebnisse der Mößbauerspektroskopie die Verhältnisse von MSR-1 und den unmagnetischen Mutantenstämmen bzgl. des Gesamteisengehaltes (Faivre *et al.*, 2007): Es zeigte sich, dass der Wildtyp unter den Versuchsbedingungen etwa 50 x mehr Eisen aufnimmt als $\Delta mamB$ und etwa 150 x mehr Eisen aufnimmt als $\Delta mamM$. Zum anderen wurde verifiziert, dass in den Deletionsmutanten Magnetit auch nicht in Spuren nachweisbar ist. Die Bildung von Magnetit lässt sich in Mößbauerspektren an zwei magnetisch aufgespalteten Sextetts, die den A- und B-Lagen von Eisen in Magnetit entsprechen, erkennen (Faivre *et al.*, 2007). Diese sind in Spektren des Wildtyps bereits nach 1 h zu erkennen und nach 20 h vollständig ausgebildet. In den unmagnetischen Deletionsmutanten fehlen diese (Abbildung 19). Während im Wildtyp Eisen hauptsächlich als Fe_3O_4 vorkommt, ist in den Mutantenstämmen ein wesentlicher Teil an Fe-S-Proteine gebunden. Auch Wildtypzellen enthalten Fe-S-Proteine, jedoch in geringeren Konzentrationen. Daneben wurden in allen Stämmen ferritinähnliche Verbindungen identifiziert, in Wildtypzellen allerdings 5 x mehr als in $\Delta mamB$. Die Menge an freiem oder nur schwach gebundenem Eisen war in allen Stämmen ähnlich. Die Spektren der Deletionsmutanten sind mit denen von MSR-1B vergleichbar (Faivre *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der Mößbauerspektroskopie bestätigen, dass die unmagnetischen Mutanten nicht in der Lage sind, Magnetit zu bilden und eine geringere Eisenaufnahme als der Wildtyp aufwiesen. Überschüssiges intrazelluläres Eisen, welches nicht zu Magnetitsynthese verwendet werden kann, wird in den Mutanten anscheinend an Fe-S-Clusterproteinen gebunden.

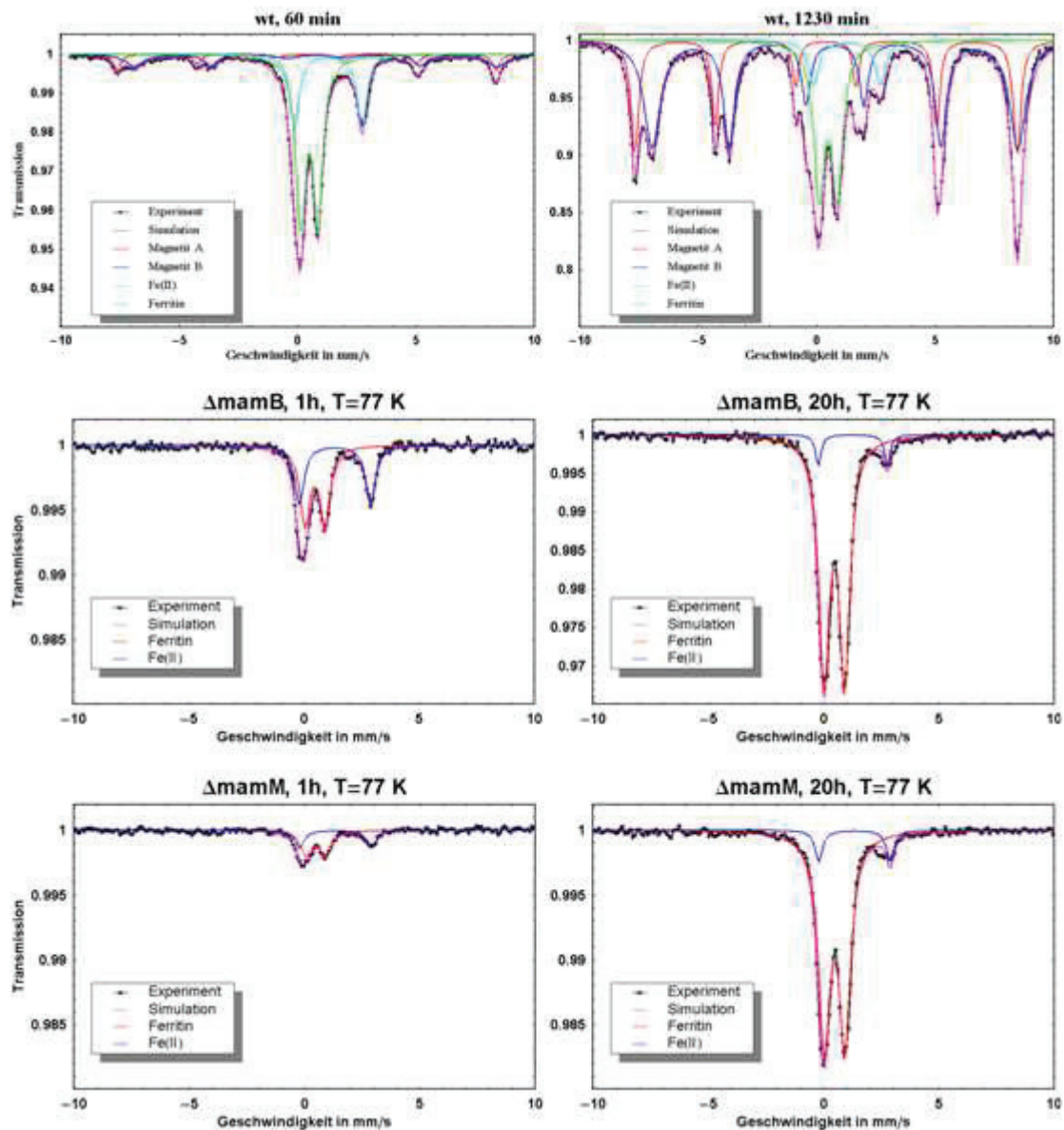


Abbildung 19. Mößbauerspektren von MSR-1, $\Delta mamB$ und $\Delta mamM$ nach 1 h und 20 h Wachstum mit ^{57}Fe . Abbildungen zur Verfügung gestellt durch Lars Böttger, Universität Lübeck

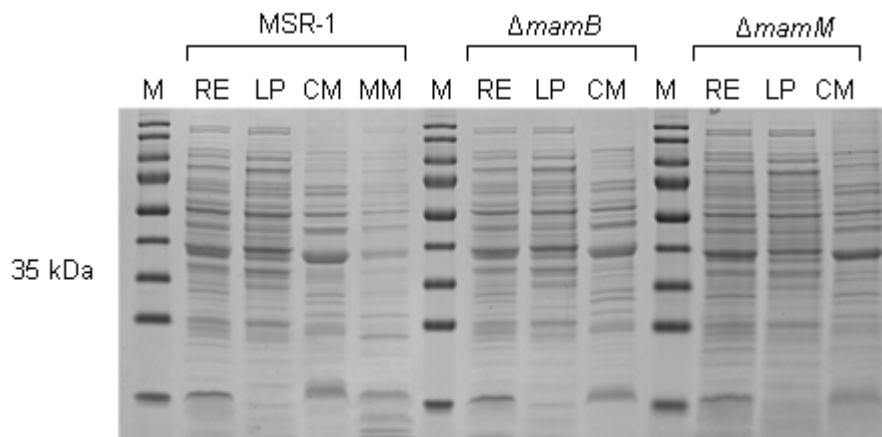
3 Lokalisierung von MamM und MamB in *M. gryphiswaldense* MSR-1

Um einen Hinweis auf den Mechanismus der Magnetosomenmembransynthese und das „Protein Targeting“ der beiden CDF-Transporter zu bekommen, sollte deren intrazelluläre Lokalisation detaillierter untersucht werden. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass MamM und MamB Bestandteil der magnetosomenmembranspezifischen Proteinfraction sind (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004). Allerdings war unklar, ob die Lokalisation spezifisch auf die MM beschränkt ist, oder ob beide Proteine ebenfalls in die Cytoplasmamembran integrieren.

3.1 *In vitro* Lokalisierung mittels Immunodetektion

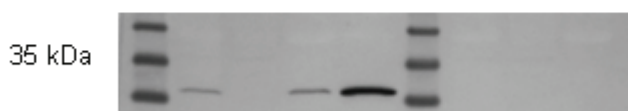
Zunächst sollte die Lokalisation von MamM und MamB *in vitro* immunochemische mit polyklonalen monospezifischen Peptidantikörpern untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden unter magnetitbildenden Bedingungen angezogene Kulturen von MSR-1 in Zellmembran-, Magnetosomenmembran- und lösliche Proteine fraktioniert und mittels Western Blot auf MamM und MamB untersucht.

A - SDS-PAGE



B - Western Blot

Anti-MamB



Anti-MamM



Abbildung 20. Western Blot von Zellfraktionen von MSR-1, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ mit spezifischen Antikörpern gegen MamM und MamB. (A) SDS-PAGE der Zellfraktionen. Rohextrakt (RE), lösliche Proteine (LP) und Membranproteine (CM). Im Falle von MSR-1 wurden zusätzlich die Magnetosomenmembranproteine (MM) isoliert. (B) Western Blots von MSR-1 und $\Delta mamB$ mit anti-MamB-Antiserum, sowie MSR-1 und $\Delta mamM$ mit anti-MamM-Antikörper.

MamM und MamB lieferten in der Immunodetektion je ein Signal im Zellrohextrakt, der Magnetosomen- und zusätzlich auch in der Cytoplasmamembran (Abbildung 20). In der löslichen Proteinfraction konnte kein Signal für MamM oder MamB gefunden werden. Dies bestätigte die Membranlokalisierung der Proteine und zeigte, dass die Zellfraktionierung vollständig war. Das Signal war sowohl für MamM als auch MamB in der CM schwächer als in der MM.

3.2 *In vivo* Lokalisierung mittels GFP als Fusionsprotein

Das Signal in der cytoplasmatischen Fraktion könnte auch auf eine Integration von MamM und MamB in Magnetosomenleervesikel zurückzuführen sein. Leervesikel können bei der Zellfraktionierung nicht von der CM getrennt werden. Deshalb sollte eine *in vivo* Analyse zur Proteinlokalisierung mittels dem „green fluorescent protein“ (GFP) durchgeführt werden.

Da die Lokalisation der N- und C-Termini von MamM und MamB sowie der Transport der Proteine und Integrationsmechanismus in die Membran unbekannt waren, wurden N- und C-terminale *gfp*-Fusionen konstruiert.

Dazu wurden *mamM* und *mamB* in die Zielvektoren ligiert. Die verwendeten Plasmide waren Derivate von pBBR1MCS-2, in welchen *gfp* mit oder ohne N- bzw. C-terminalen 10-Glycin-Linker kloniert wurde (Lang und Schüler, 2008). Die so entstandenen Plasmide mit den Fusionen *mamM-gfp*, *mamM-G₁₀-gfp*, *gfp-mamM*, *gfp-G₁₀-mamM*, *mamB-gfp*, *mamB-G₁₀-gfp* und *gfp-mamB* wurden in verschiedenen MSR-1-Mutantenstämmen exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Expression der Gfp-Fusionen ebenfalls vom *lac*-Promotor.

Zum Vergleich der Fluoreszenzmuster wurden die Gfp-Fusionen neben MSR-1 in MSR-1B, MSR-1(Δ *mamJ*) und MSR-1(Δ *mamM*) oder MSR-1(Δ *mamB*) betrachtet. Während in Δ *mamJ* die Magnetosomen nicht wie im Wildtyp in einer Kette innerhalb der Zelle angeordnet waren (Scheffel *et al.*, 2006), fehlten diese in MSR-1B völlig (Schübbe *et al.*, 2003). In beiden Fällen sollte sich das Fluoreszenzmuster deutlich von dem des Wildtyps unterscheiden.

Mikroskopische Betrachtungen der N-terminalen Fusionen von MamM als auch MamB zeigten, dass keines dieser chimären Proteine fluoreszierte. Weiterhin war es nicht möglich, Aufnahmen von C-terminalen MamB-Fusionen zu erhalten, da die Fluoreszenz in jedem der getesteten Stämme (MSR-1, MSR-1B, MSR-1(Δ *mamJ*), MSR-1(Δ *mamB*)) zu gering war.

Dagegen fluoreszierten die C-terminalen Fusionen von MamM. Wie erwartet, spiegelten die Fluoreszenzmuster den Phänotypen der Mutanten wider, der in TEM-Aufnahmen ersichtlich war (Abbildung 21). So konnte in allen Mutanten die Lokalisation in der Cytoplasmamembran als eine fluoreszierende Begrenzung der Zelle erkannt werden. Zusätzlich wurde in vielen Wildtypzellen ein Signal beobachtet, welches länglich in der Zellmitte angeordnet war. Dieses Signal war konsistent mit der Lage der Magnetosomenkette aus TEM-Aufnahmen. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass MamM-Gfp sowohl in die Magnetosomen als auch Cytoplasmamembran integriert wird. Da das Fluoreszenzsignal der MamM-Fusion sehr intensiv war und die Zellen nur eine

Größe von 3 x 0,7 µm hatten, war es im Allgemeinen sehr schwierig, die Lokalisierung zwischen Cytoplasma- und Magnetosomenmembran zu unterscheiden.

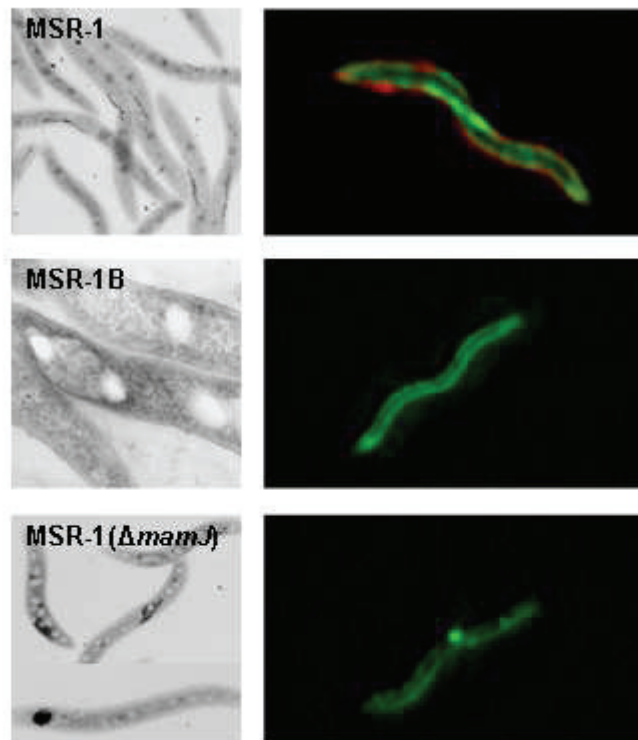


Abbildung 21. Lokalisation von C-terminalen MamM-Gfp-Fusionen im Vergleich mit den Phänotypen der transformierten Stämme. Linke Spalte - TEM-Aufnahmen von MSR-1, MSR-1B und $\Delta mamJ$. Rechte Spalte - Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der gleichen Stämme. Aus Gründen der Veranschaulichung wurde die TEM-Aufnahmen von MSR-1B aus Schübbe et al. 2003, die von $\Delta mamJ$ aus Scheffel et al. 2006 entnommen. Grün – Fluoreszenzsignal, rot – Gegenfärbung der CM mit FM-M64.

In Zellen von MSR-1B hingegen konnte nur ein Signal in der Zellmembran gefunden werden. MamM-Gfp-Fusionen, die in $\Delta mamJ$ exprimiert wurden, zeigten neben dem Fluoreszenzsignal in der Cytoplasmamembran zusätzlich ein punktförmiges Signal in der Zelle, was an unterschiedlichen Positionen zu sehen war. Auch hier war das Fluoreszenzmuster konsistent mit dem in TEM-Aufnahmen ersichtlichen Phänotyp, in dem die Magnetosomen in dreidimensionalen Agglomeraten in der Zelle positioniert sind (Scheffel et al., 2006).

Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Lokalisierung zeigen, dass MamM und MamB nicht ausschließlich in die MM integriert werden, sondern vor oder während der Vesikelsynthese exprimiert und die CM translokalisiert werden. Die starke Anreicherung der Proteine in der MM zeigt aber auch, dass es einen Mechanismus geben muss, der die Proteine in der Membran an ihren Zielort leitet. Mit herkömmlichen internetbasierten Vorhersageprogrammen (www.expasy.org) konnten hierfür keine Signalsequenzen für

bekannte Translokalisationswege in Prokaryoten gefunden werden. Dies impliziert einen spezifischen Mechanismus für die Positionierung der Proteine in der MM.

4 Untersuchungen zur Verteilung und Funktion von MamM- und MamB-Orthologe und anderer CDF-Proteine in MTB

Die bisher in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass MamM und MamB eine spezifische Funktion innerhalb der Magnetitbiomineralisation von MSR-1 einnehmen. In einer kürzlich erschienenen Untersuchung konnten Orthologe zu MamM und MamB in der Magnetosomenmembran des nah verwandten Stammes AMB-1 identifiziert werden (Tanaka *et al.*, 2006). Dies lässt auf eine ähnliche Aufgabe der Proteine während der Biomineralisation schließen. Dieses Ergebnis impliziert die Frage, ob MamM- und MamB-Orthologe auch in Genom(teil)sequenzen anderer MTB zu finden und ob diese beiden Proteine die einzigen CDF-Transporter innerhalb der Magnetosomeninsel sind. Genomweite Analysen sollten die Verteilung von CDF-Transportern im Vergleich zu MamM und MamB in MTB aufzeigen. Haben MamM und MamB tatsächlich eine Sonderstellung, sollte nach charakteristischen Sequenzmotiven oder Aminosäureresten gesucht werden, die für die spezifische Funktion der Proteine verantwortlich sein könnte.

4.1 Vorkommen von MamM- und MamB-Orthologen in Magnetosomeninseln und -fragmenten anderer MTB

Mittels BlastP (JCoast Blast-Server mit einer Blosum 62 Matrix unter vorgegebenen Bedingungen) wurden zunächst die Sequenzen von Magnetosomeninseln und -fragmenten von *M. magnetotacticum* MS-1 und *M. magneticum* AMB-1, sowie dem magnetischen Kokkus MC-1, dem magnetischen Vibrio MV-1 und dem Fosmidklon „Warmsdorf 4“ (Flies, 2004) nach Homologen von *mamM* und *mamB* untersucht. Der Fosmidklon „Warmsdorf 4“ ist ein aus Mikrokosmen des Dorfteichs in Warmsdorf generiertes 36 kB großes Fragment einer Magnetosomeninsel. Als mögliche Orthologe wurden dabei Sequenzen anerkannt, die einen möglichst niedrigen e-Wert ($< e^{-50}$) gegenüber der Zielsequenz aufwiesen (Lesk, 2003). Homologe Gene von *mamM* und *mamB* wurden in allen vorliegenden Sequenzen gefunden. In den Stämmen AMB-1 und MS-1 fiel insbesondere ein Gen auf, *mamV*, welches einen weiteren CDF-Transporter kodiert. In beiden Stämmen ist *mamV* jeweils das letzte Gen des *mamAB*-Operons und damit eine dritte CDF-Gensequenz innerhalb der MAI. Daneben wurden in den untersuchten MAIs keine weiteren CDF-Sequenzen gefunden.

In den Genomsequenzen der bekannten Magnetospirillen sind *mamM* und *mamB* innerhalb des *mamAB*-Operon lokalisiert. Eine ähnliche Anordnung der Gene des *mamAB*-Operons wie in den Spirillen ist selbst in dem ferner verwandten magnetischen Kokkus MC-1 zu finden; d.h. die Genomumgebung von *mamM* und *mamB* ist in den untersuchten magnetischen Bakterien, trotz der phylogenetischen Unterschiede dieser Mikroorganismen, stark konserviert.

Die höchste Sequenzähnlichkeit zu MamM und MamB von *M. gryphiswaldense* MSR-1 zeigen die orthologen Sequenzen von *M. magnetotacticum* MS-1. Die Sequenzen des magnetischen Vibrio MV-1, des Fosmidklons „Warmsdorf 4“ und des magnetischen Kokkus MC-1 einen deutlichen Unterschied gegenüber MamM und MamB von MSR-1 (Tabelle 9). Untereinander sind MamM und MamB aus MSR-1 nur zu 25 % identisch und 48 % ähnlich. Damit sind die MamM- und MamB-Orthologe der herangezogenen MTB untereinander ähnlicher als die paralogen Proteine MamM und MamB innerhalb eines Organismus.

Da Sequenzen von MamM- und MamB-Orthologen in allen MAIs zu finden sind, kann vermutet werden, dass die Proteine auch in anderen MTB als MSR-1 eine wichtige, vielleicht sogar ähnliche Rolle in der Biomineralisation haben. Deshalb werden die Proteine im Folgenden als MTB-CDF bezeichnet.

Tabelle 9. Vergleich der orthologen Proteinsequenzen von MamM (A) und MamB (B) von MS-1, MV-1, MC-1 und dem Fosmidklon „Warmsdorf 4“.

A	MamM	MS-1	MV-1	MC-1	Warmsdorf 4
	% identisch	94	53	40	51
	% ähnlich	98	68	58	67
B	MamB	MS-1	MV-1	MC-1	Warmsdorf 4
	% identisch	94	52	44	53
	% ähnlich	98	70	66	74

4.2 Genomweite Analyse zum Vorkommen und der Verteilung von CDF-Proteinen in MTB

Die Analyse von MSR-1, MS-1, AMB-1 und MC-1 auf das Vorhandensein von weiteren CDF-Proteinen wurde auf das gesamte Genom ausgeweitet, um die Anzahl und Verteilung weiterer Kandidaten dieser Proteinfamilie zu untersuchen. Die Sequenzvergleiche von MamM_{MSR-1} und MamB_{MSR-1} in den untersuchten Genomen von MSR-1, MS-1, AMB-1 und MC-1 mittels BlastP identifizierten eine Reihe weiterer mutmaßlicher CDF-Transporter, die außerhalb der MAIs lagen. In jedem untersuchten

Genom wurden neben den *mamM*- und *mamB*-Orthologen innerhalb der MAIs weitere CDF-Sequenzen gefunden.

Im Genom von MSR-1 finden sich außerhalb der MAI neben *mamM* und *mamB* die Sequenzen *mgr0906*, *mgr2883* und *mgr3242*, die Ähnlichkeiten zu CDF-Transportern aufweisen. Das Genom von AMB-1, welches als lückenlose geschlossene Sequenz vorliegt (Matsunaga *et al.*, 2005), enthält *mamM* (*amb0967*), *mamB* (*amb0974*) und *mamV* (*amb0978*), sowie 5 weitere offene Leserahmen (*amb885*, *amb1007*, *amb1013*, *amb1205*, *amb1234*), die zur Familie der CDF-Transporter gezählt werden können. Das Gen *amb1007* ist interessanterweise zu 100 % identisch zu *mamB* (*amb0974*). Von den vorliegenden Genomen magnetotaktischer Bakterien weist MS-1 die größte Anzahl an CDF-Genen auf. Neben Homologen von *mamM* (*mtac3522*), *mamB* (*mtac3531*) und *mamV* (*mtac3535*) finden sich 7 weitere CDF-Gene (*mtac0003*, *mtac2067*, *mtac2116*, *mtac2852*, *mtac2856*, *mtac2899*, *mtac4476*) im Genom von MS-1. Im Genom von MC-1 sind nur 4 CDF-Gene (*mmc1_2250*, *mmc1_2256*, *mmc1_3150*, *mmc1_3400*) zu finden, von denen *mmc1_2250* MamB und *mmc1_2256* MamM kodiert.

4.3 Klassifizierung der CDF-Proteine aus MTB

Die Sequenzen, die durch die genomweite Analyse gefunden wurden, wurden nun in einem multiplen Sequenzalignment verglichen. Diese Untersuchung sollte zum einen Aufschluss über eine mögliche funktionelle Verteilung der gefundenen CDF-Proteine geben und zum anderen die eventuelle Sonderstellung bzw. spezifische Sequenzmotive der MTB-CDF ermitteln.

Dazu wurden die ermittelten DNA-Sequenzen aus MTB in Proteinsequenzen übersetzt und mit ausgewählten CDF-Proteinen verglichen. Es wurde darauf geachtet, dass CDF-Proteine aller drei Domänen (Bakterien, Archaeen, Eukaryoten) und aller CDF-Unterfamilien (Nies, 2003) vertreten waren. Insgesamt wurden für die Erstellung des Dendrogramms 53 CDF-Transporter (davon 31 MTB-zugehörig) heran gezogen. (Abbildung 22). Eine Auflistung der Proteine mit Herkunftsorganismus und NCBI accession number ist im Anhang dieser Arbeit zu finden.

Die CDF-Proteine lassen sich in zwei große Gruppen einordnen, zum einen in Zink/Kobalt/Cadmium-Transporter und zum anderen in Eisen/Zink-Transporter (Nies, 2003; Montanini *et al.*, 2007). Innerhalb der Eisen/Zink-Transporter bilden die CDF-Proteine der Magnetosomenmembran eine distinkte Untergruppe, die sich deutlich von anderen Untergruppen abhebt (Abbildung 22 Klammer1). Im Folgenden wird diese Gruppe als MTB-CDF bezeichnet. Diese Untergruppe spaltet sich wiederum in zwei Zweige. Der eine umfasst alle MamM- und der andere alle MamB-Orthologe.

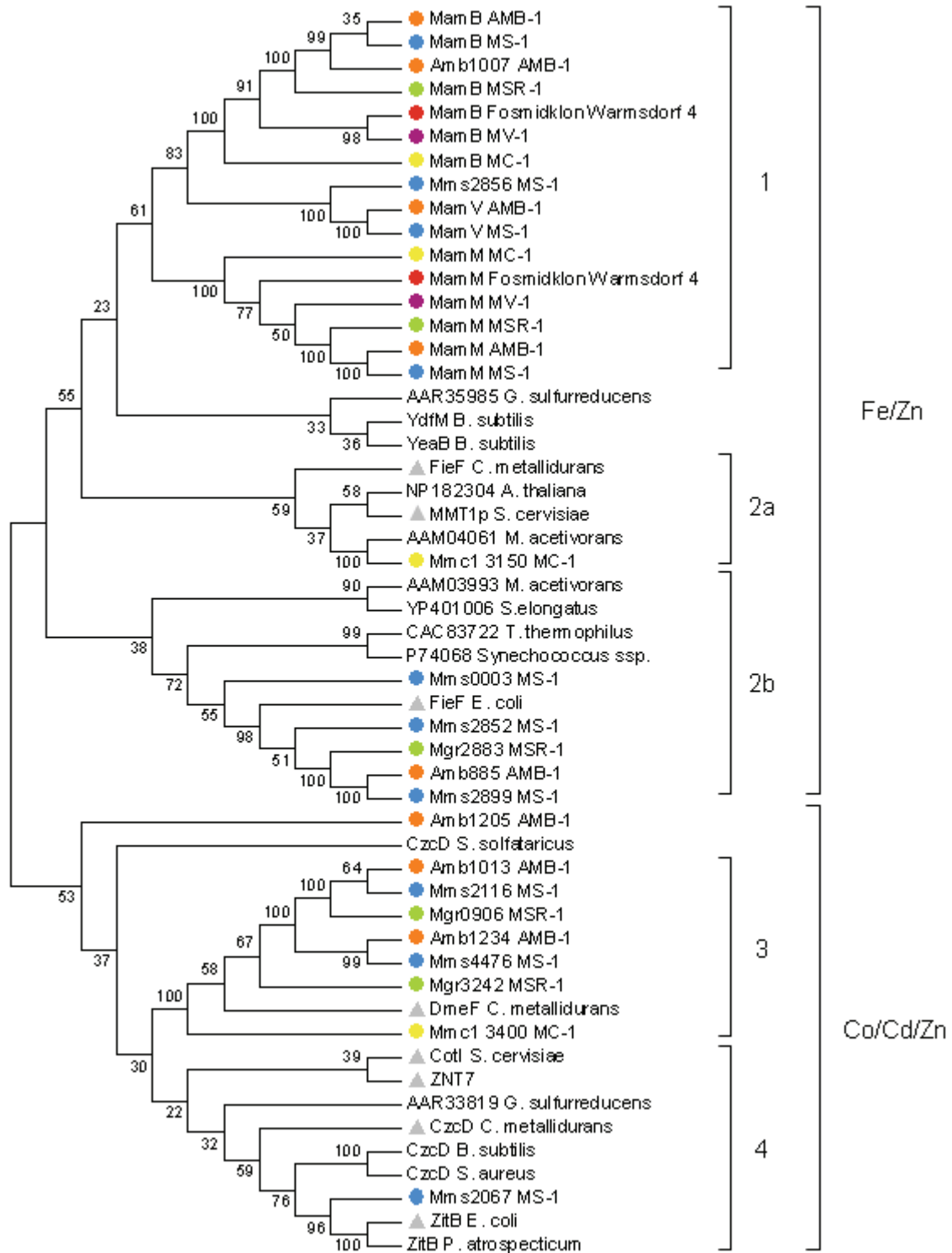


Abbildung 22. Dendrogramm zur Veranschaulichung der Sequenzähnlichkeiten von Vertretern der CDF-Transporter aller Lebensdomänen. Da der Baum nur der Veranschaulichung dient, wurde auf die Angaben der Astlängen verzichtet. Die farblichen Markierungen ordnen die CDF-Proteine der einzelnen MTB zu: Grün - MSR-1, Blau - MS-1, Orange - AMB-1, Rot - Fosmidklon „Warmsdorf 4“, Lila - MV-1, Gelb - MC-1. CDF-Proteine, von denen bereits experimentelle Daten vorliegen sind mit einem grauen Dreieck markiert. 1 bis 4 - im Text besprochene Untergruppen, Fe/Zn - eisen- und zinktransportierende CDF-Proteine, Co/Cd/Zn - CDF-Proteine, die am Kobalt-, Cadmium- und Zinkhaushalt beteiligt sind

MamV bildet im MamB-Cluster einen eigenen Zweig, zu dem auch ein weiteres CDF-Protein, Mms2856, aus MS-1 gehört, welches als einziges außerhalb der MAI liegt.

Eine weitere Untergruppe (Abbildung 22 Klammer 2a) beinhaltet CDF-Proteine mit Ähnlichkeiten zu MMT1p aus *S. cerevisiae*, bei dem eine Rolle im Eisentransport nachgewiesen wurde (Li and Kaplan, 1997). Unter den einbezogenen Sequenzen der MTB kodiert nur das Genom von MC-1 mit *mmc1_3150* einen repräsentativen Vertreter dieser Gruppe, der als ein weiteres eisentransportierendes, nicht MTB-CDF-Protein postuliert werden kann.

FieF von *E. coli* und dessen Orthologe bilden eine weitere Untergruppe (Abbildung 22 Klammer 2b). In diese Untergruppe reihen sich mehrere CDF-Proteine magnetotaktischer Spirillen ein. Die Proteine Amb0885, Mgr2883, Mms2852 und Mms2899 zeigen eine deutliche Sequenzähnlichkeit zu FieF_{*E. coli*}. So hat Mgr2883 eine Sequenzidentität von 42 % und eine Sequenzähnlichkeit von 59 % zu FieF von *E. coli*. Zum Vergleich ist MamB von MSR-1 mit FieF_{*E. coli*} zu 23 % identisch und 42 % ähnlich, MamM zu 21 % bzw. 45 %. Ein weiteres CDF-Protein von MS-1, Mms0003 gehört ebenfalls in diese Gruppe, bildet aber einen eigenen Zweig in diesem Cluster. Im Falle dieser Proteingruppe zeigt MS-1 eine Redundanz von 3 orthologen Sequenzen, die in keinem anderen untersuchten MTB-Genom zu beobachten ist.

Die Proteine Mgr0906, Mgr3242, Amb1013, Amb1234, Mms2116, Mms4476 und *mmc1_3400* bilden zusammen mit DmeF von *Cupriavidus metallidurans* eine Untergruppe innerhalb der Zink/Kobalt/Kadmium-Transporter (Abbildung 22 Klammer 3). Auffällig ist, dass in MSR-1, MS-1 und AMB-1 jeweils zwei homologe Proteine im Genom kodiert sind.

Mit dem Protein Mms2067 besitzt einzig MS-1 ein Homolog zu ZitB von *E. coli* (Abbildung 22 Klammer 4). In den verbleibenden untersuchten MTB-Genomen konnten keine Homologe gefunden werden, die in diese CDF-Untergruppe gehören. Im Gegensatz zu den drei ZitB-Homologen von *E. coli*, *P. atrospecticum* und *S. typhimurium* hat Mms2067 einen histidinreichen N-Terminus, anstatt eines histidinreichen C-terminalen Motivs. Auch konnten in den untersuchten Genomen keine Homologe zu CzcD gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass magnetotaktische Bakterien neben den bisher bekannten MTB-CDF MamM und MamB weitere CDF-Proteine kodieren, die den Sequenzanalysen zufolge das Substratspektrum bei der CDF-vermittelten Metallhomöostase abdecken. Das Vorkommen der CDF-Proteine außerhalb der MAI ist sehr viel heterogener als das der MTB-CDF innerhalb der MAI. Auch zeigen die Magnetospirillen eine Redundanz an CDF-Sequenzen mit Homologie zu FieF_{*E. coli*} bzw. DmeF_{*C.metall.*}. Die FieF-Homologen übernehmen wahrscheinlich eine vergleichbare Funktion in der Zelle wie FieF in *E. coli*. Auch bilden die MTB-CDF eine eigenständige

Untergruppe innerhalb der Fe/Zn-Transporter. Zusammengenommen bekräftigen die Ergebnisse der Sequenzuntersuchungen die Arbeitshypothese, dass MamM und MamB eine spezifische Funktion in MTB haben und vermutlich Eisen in die Magnetosomenvesikel transportieren.

4.4 Heterologe Komplementation von $\Delta mamB$

Die bioinformatischen Analysen hatten ergeben, dass die MTB-spezifischen MamM- und MamB-Homologe auf Grund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit eine eigenständige Untergruppe in den Fe/Zn-transportierenden CDF-Proteinen bilden. Deshalb war es von Interesse, ob diese ebenso wie ferner verwandte Proteine innerhalb dieser Gruppe den magnetischen Phänotypen von $\Delta mamB$ wieder herstellen können.

Um dies zu untersuchen, wurden die homologen *mamB*-Gene von MS-1, MC-1, MV-1 und des Fosmidklons „Warmsdorf 4“ (Flies, 2004) in pBBR1MCS-2 kloniert und in MSR-1($\Delta mamB$) übertragen. *mamB* von MS-1 wurde zusätzlich in pBBR1MCS-4 ligiert. Es wurden auch Proteine außerhalb der MTB-CDF für die heterologe Komplementation gewählt. Die Gene *ydfM* von *B. subtilis*, *fieF* von *E. coli* und *zitB* von *E. coli* wurden ebenfalls in pBBR1MCS-2 kloniert.

MSR-1($\Delta mamB$) wurde in diesem Ansatz nur durch *mamB*_{MS-1} komplementiert. Interessanterweise war die magnetische Ausrichtung mit maximalen Werten von $C_{mag} = 0,5$ höher als die Komplementation mit *mamB*_{MSR-1}. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den durch AAS gemessenen Eisengehalten der beiden mit *mamB*_{MSR-1} und *mamB*_{MS-1} komplementierten Stämmen wieder (Daten nicht gezeigt). Die mit *mamB*_{MS-1} komplementierte Kultur nahmen etwa 3 x mehr Eisen auf als die mit *mamB*_{MSR-1} komplementierte. Zum Zeitpunkt des Versuchs wurden C_{mag} -Werte von 0,01 für MSR-1 $\Delta mamB$ (pBBR1MCS-4-*mamB*_{MSR-1}) und 0,4 für MSR-1 $\Delta mamB$ (pBBR1MCS-2-*mamB*_{MS-1}) berechnet.

TEM-Aufnahmen zeigten, dass der Anteil an Zellen, in denen Magnetitkristalle zu sehen waren, bei der Komplementation mit *mamB*_{MS-1} höher war als bei der Komplementation mit *mamB*_{MSR-1}. Im Gegensatz zu der Komplementation von $\Delta mamB$ mit *mamB*_{MSR-1} konnten aber seltener kurze Magnetosomenketten beobachtet werden. Die Zellen enthielten häufiger kleinere Kristalle, die in größeren Abständen entlang einer Achse in der Zelle angeordnet waren.

MamB_{MSR-1} und MamB_{MS-1} sind in den Magnetitbiomineralisationsprozessen von *M. gryphiswaldense* und *M. magnetotacticum* funktional äquivalent und können untereinander ausgetauscht werden.

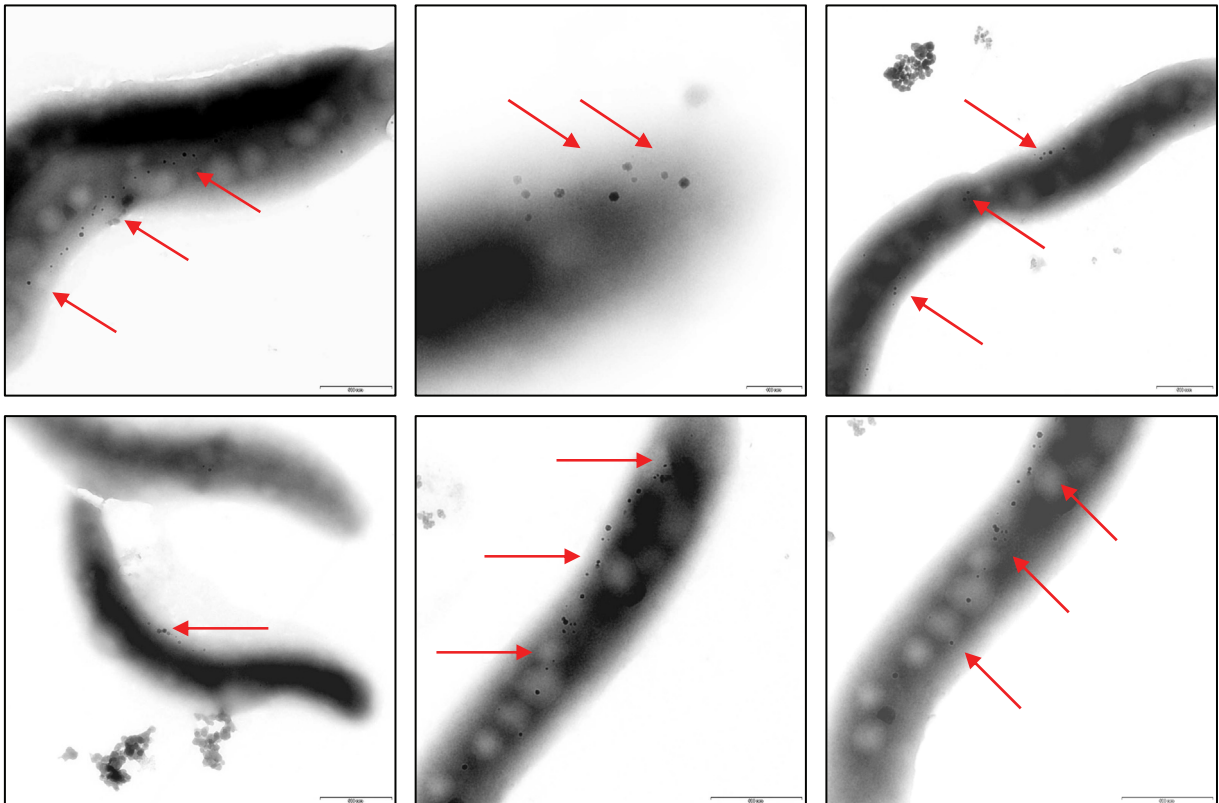


Abbildung 23. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\Delta mamB$ komplementiert mit *mamB* von MS-1. Die Pfeile veranschaulichen die Lage der Kristalle.

Da die MamB-Paraloga von MV-1, MC-1 und des Fosmidklons immerhin über 50 % Sequenzidentität und etwa 70 % -ähnlichkeit zu MamB_{MSR-1} verfügen, war anzunehmen, dass auch diese funktional äquivalent sind. Die Komplementation mit *mamB*-Homologen anderer verwandter magnetotaktischer Bakterien führte jedoch augenscheinlich nicht zu einem magnetischen Phänotyp. Ebenso waren die Gene *ydfM*, *fieF* und *zitB* nicht in der Lage, die Magnetitsynthese wieder herzustellen.

4.5 Identifizierung spezifischer Motive in MTB-CDF-Transportern

Ausgehend von dem erstellten multiplen Alignment (Kap. 4.3) sollte versucht werden, spezifische Signaturen der MTB-CDF zu identifizieren, die relevant für deren Funktion bei der Magnetitbiomineralisation sein können.

Wie schon erwähnt, zeigen CDF-Proteine die höchste Konservierung im membranständigen Bereich, besonders in einer Region, die als transmembrane Domäne II bezeichnet wird. Alle bisher bekannten CDF-Proteine enthalten geladene Aminosäurereste, die hoch konserviert sind und somit wichtig für die Funktion der Transporter sein könnten. Diese Aminosäuren sind auch in allen MamM-, MamB- und MamV-Homologen zu finden (G32, S37, A39, A42, D43, D50, G75, D159, D182, L208).

Darüberhinaus lassen sich keine Motive oder Aminosäurereste finden, die spezifisch für die Untergruppe der Fe/Zn-CDF-Proteine sein können, mit Ausnahme eines Lysins (AS 28), welches in CDF-Proteinen der Co/Cd/Zn-Untergruppe durch ein Glutamat ersetzt ist. Den magnetotaktischen CDF-Proteinen lassen sich jedoch spezifische Sequenzabschnitte zuordnen (Abbildung 24). Im N-terminalen, nicht membranständigen Bereich der Proteine fällt ein CXXC-Motiv auf, welches von A6 bis A9 reicht. Außerdem ist C140 nur in MTB-CDF konserviert. Ein weiteres auffälliges Sequenzmotiv, bestehend aus Gly-Leu-Met-Asp, erstreckt sich von A207 bis A210. Innerhalb dieser Sequenz ist L208 in nahezu allen untersuchten CDF-Proteinen konserviert (Ausnahme ZnT7). Das folgende Aspartat ist in einem Großteil der CDF-Transporter konserviert oder durch ein Glutamat substituiert. Die genaue Aminosäureabfolge Gly-Leu-Met-Asp aber ist nur in MTB-CDF zu finden und könnte daher Einfluss auf die Proteinfunktion haben.

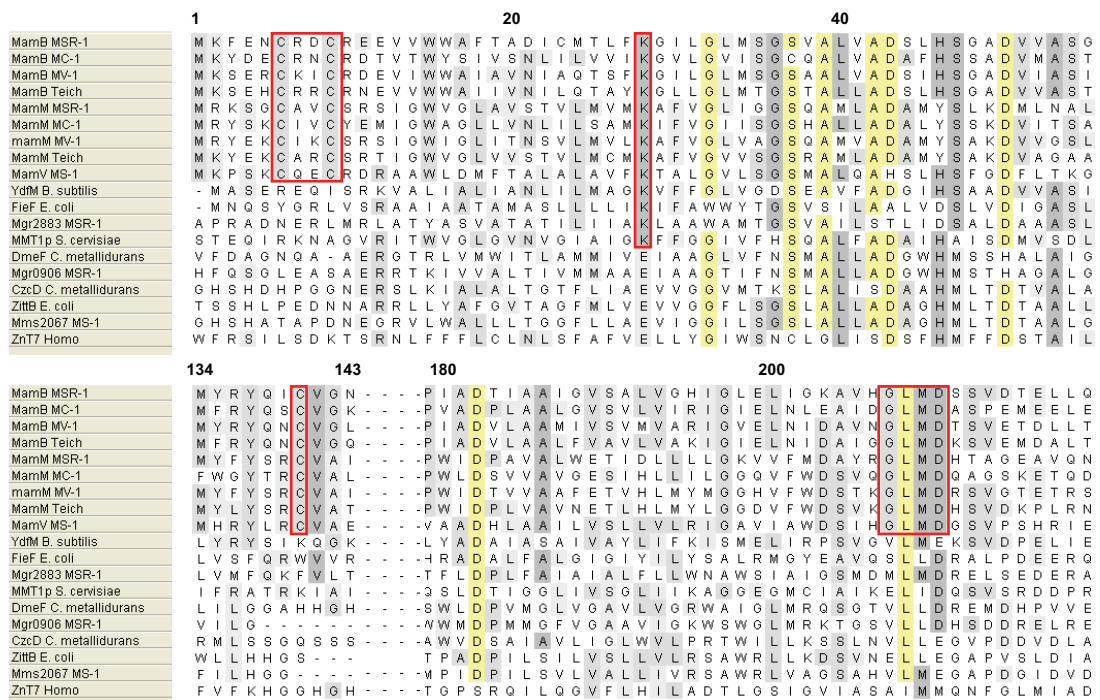


Abbildung 24. Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments von MTB-CDFs und weiterer repräsentativer Vertreter der CDF-Transporter. Grau unterlegt - Konservierung 50 bis 89 %, gelb unterlegt - 90 bis 100 % Konservierung, roter Kasten - konserviert in MTB-CDF

Einen ersten Anhaltspunkt einer möglichen Beteiligung des CXXC-Motivs an der Funktion der MTB-CDF-Proteine sollten Komplementationsexperimente von $\Delta mamB$ mit Aminosäureaustauschvarianten von MamB_{MSR-1} geben. Es wurden zwei Derivate von MamB in pBBR1MCS-2 konstruiert und *in trans* in $\Delta mamB$ exprimiert. In das Protein wurden ein Einfachaustausch von C6S und ein Doppelaustausch von C6S sowie C9S eingeführt. Allerdings stellte keine der beiden Austauschvarianten MamB_{C6S} sowie MamB_{C6S,C9S} den magnetischen Phänotypen von $\Delta mamB$ wieder her.

Die Expression der beiden Varianten wurde mittels Western-Blot überprüft. Die Kontrolle mit dem anti-MamB-Antikörper war möglich, da das Epitop (A270 bis A280) nicht von der Mutation beeinflusst ist. Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, war die Expression von MamB_{C6S} und MamB_{C6S, C9S} deutlich geringer als die von nativem MamB in MSR-1 Wildtypzellen, aber höher als die Expression der homologen Komplementation von $\Delta mamB$. Ein funktionales Protein hätte demnach den magnetischen Phänotypen teilweise wieder herstellen sollen. Aus diesem vorläufigen Komplementationsexperiment konnte daher geschlossen werden, dass das CXXC-Motiv essentiell für die Funktion der magnetosomenmembranständigen CDF-Proteine ist. Darüberhinaus konnten keine Sequenzauffälligkeiten in MamM- und MamB-Homologen gefunden werden, die Hinweise auf eine mögliche Funktion oder Spezifität der Proteine geben.

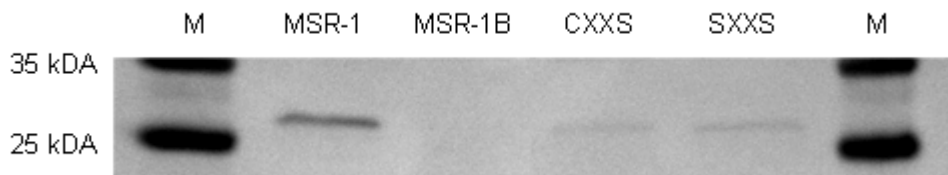


Abbildung 25. Expressionskontrolle der Aminosäureaustauschvarianten von MamB_{MSR-1} mittels Western-Blot an Zellrohextrakt von MSR-1, MSR-1B und $\Delta mamB$ komplementiert mit pBBR1MCS-2-*mamB*_{C6S} (CXXS) und pBBR1MCS-2-*mamB*_{C6S, C9S} (SXXS). M - Marker

5 Versuche zur Überexpression und Reinigung von MamM und MamB für *in vitro* Studien

Für die geplanten biochemischen *in vitro* Experimente, z.B. Transportstudien in Proteoliposomen oder Eisenbindungsversuche, sind große Mengen an gereinigtem Protein eine notwendige Voraussetzung. Die Reinigung der Proteine direkt aus der MM von MSR-1 war an dieser Stelle nicht sinnvoll, weil die MMP weniger als 1 % des Gesamtzellproteins von MSR-1 und davon wiederum MamM und MamB einen Anteil von jeweils nur etwa 7 bis 8 % ausmachen (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004).

Daher sollte versucht werden, MamM und MamB durch Überexpression in *E. coli* anzureichern. Ziel war es, die Proteine in die Cytoplasmamembran von *E. coli* und nicht als „Inclusion Bodies“ zu exprimieren, um die nativen Proteine korrekt gefaltet aus der Membran reinigen zu können. Da bisher keine Erfahrungen zur heterologen Expression von Membranproteinen aus *M. gryphiswaldense* MSR-1 in *E. coli* vorlagen, sollten zunächst verschiedene kommerziell erhältliche Systeme getestet werden, deren Proteinreinigungsprinzip auf Affinitätstags basieren.

5.1 Die Expression von *mamM* und *mamB* mittels P_{tetA} (IBA)

In einem ersten Ansatz wurde versucht, *mamM* und *mamB* mit dem TetA-Promotor/Operator-System von IBA (Göttingen) zu exprimieren, da dieses bereits für andere CDF-Proteine wie CzcD von *C. metallidurans* CH34 (Anton 2001) oder FieF von *E. coli* (Grass *et al.*, 2005) erfolgreich für die Überexpression in *E. coli* angewandt wurde. In diesem System ist der anhydrotetrazyklininduzierte *tetA*-Promotor strikt reguliert durch den *tetR*-Repressor (Terpe 2006). Die zu exprimierenden Gene *mamM* und *mamB* wurden in pASK-IBA3, pASK-IBA5 und pASK-IBA43 mit N- oder C-terminal Strep-Tag zur späteren Affinitätsreinigung fusioniert (siehe MM Kap. 8).

Expressionsversuche wurden in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), BL21star(DE3) und JM83 bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen nach der Induktion (37 °C, 28 °C und 12 °C) Die Induktion erfolgte nach Herstellerangaben bei einer $OD_{600} = 0,6$. Leider konnten im Gegensatz zu MamK-Strep (Positivkontrolle, (Schübbe *et al.*, 2005)) in keinem dieser Expressionsversuche MamM- oder MamB-Fusionsproteine in Zellrohextrakten nach der Induktion nachgewiesen werden. Daher wurde nicht versucht, dieses System weiter zu optimieren. Vielmehr sollte nach einem besser geeigneten Ansatz gesucht werden.

5.2 Optimierung der Expression von *mamM* und *mamB* mit dem pET-System (Novagen)

Die Wahl für ein weiteres Expressionssystem fiel daher auf das pET-System, eines der weit verbreiteten Überexpressionssysteme für pro- sowie eukaryotische Gene. Hierbei steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle der T7-RNA-Polymerase (Studier und Moffatt, 1986). Die T7-RNA-Polymerase ihrerseits steht unter der strikten Kontrolle des *lac*-Promotors und wird zusätzlich über den *lacI*-Repressor reguliert. Dadurch wird die Basalexpression sehr niedrig gehalten. Die Expression bedarf spezieller Stämme, meist BL21(DE3)-Derivate, die das Gen der T7-RNA-Polymerase tragen (Terpe, 2006).

5.2.1 Die Plasmidsysteme pET16-b und pET42-a(+)

Als Expressionsvektoren wurden pET16-b und pET42-a(+) der Firma Novagen gewählt. Als Expressionsstämme dienten *E. coli* BL21(DE) und BL21star(DE3), sowie C41(DE3) und C43(DE3). Letztere sind Derivate von BL21(DE3), die durch eine noch nicht näher charakterisierte Mutation daraus hervorgegangen sind und sich für die Expression toxischer Membranproteine als besonders geeignet erwiesen haben (Miroux and Walker, 1996). In weiteren Experimenten wurde zusätzlich versucht, die Expression in *E. coli*

Rosetta(DE3) zu optimieren. Rosetta(DE3) geht aus BL21(DE3) hervor und trägt das Plasmid pRARE, welches zusätzliche, in *E. coli* seltene tRNAs, u.a. auch CCC für Prolin, kodiert (Novagen). So sind von 10 Prolinen in MamM 5 und in MamB 4 durch CCC kodiert.

a) Expression von MamB in pET42-a(+)

Zur Expression von MamB wurde eine N-terminale Glutathion-S-Transferase-Fusion (Gst-Fusion) in pET42-a(+) verwendet. Erste Expressionsansätze wurden in BL21(DE3) und BL21star(DE3) unter Standardbedingungen (37 °C, Induktion bei $OD_{600} = 0,6$ für 3 h) durchgeführt. Ein ca. 60 kDa großes Fusionsprotein war auf SDS-Gelen nur in Zelllysaten von BL21star(DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG zu sehen. Zur weiteren Steigerung der Proteinproduktion wurde die Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) zu optimiert.

Die Anzucht der Zellen nach der Induktion erfolgte bei 25°C und 37°C. Induziert wurden die Zellen bei optischen Dichten von $OD_{600} = 0,6, 1,7$ bzw. 2,1. Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, kann das etwa 60 kDa große Gst-MamB in Rosetta(DE3) unter allen getesteten Bedingungen temperatur- und wachstumsphasenabhängig exprimiert werden.

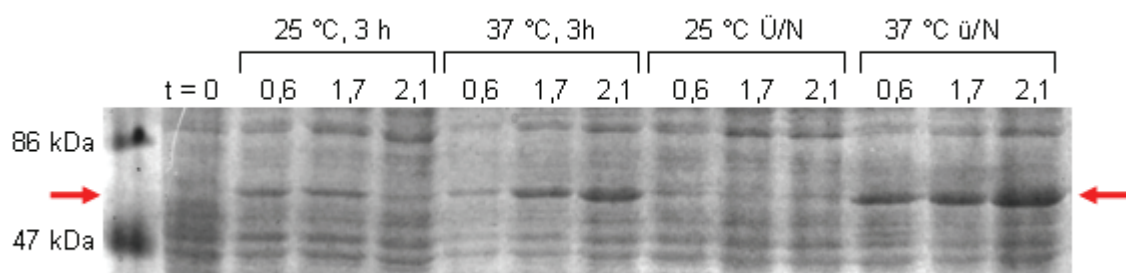


Abbildung 26. SDS-PAGE der Expression von Gst-MamB in *E. coli* Rosetta(DE3). Anzuchttemperaturen - 25 °C, 37 °C; OD_{600} zum Zeitpunkt der Induktion - 0,6, 1,7, 2,1 Expressionszeit - 3 h, über Nacht (ü/N); Negativkontrolle ($t = 0$) - Rohextrakt vor der Induktion; der Pfeil veranschaulicht die Lage von Gst-MamB.

Während der Proteinreinigung zeigte sich, dass das gesamte überexprimierte Gst-MamB in der unlöslichen Zellfraktion zu finden war (Abbildung 27), was darauf hinweist, dass das Fusionsprotein als Einschlusskörper (IB - inclusion bodies) in der Zelle abgelagert wurde. Das Protein wurde schließlich aus den IB mit 6 M Harnstoff gelöst und unter denaturierenden Bedingungen in einer Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Glutathion gereinigt (Abbildung 27). Hierbei war deutlich zu erkennen, dass nur ein geringer Teil des Fusionsproteins Gst-MamB an die Säule gebunden hatte und unter definierten Bedingungen wieder von der Säule eluiert werden konnte. Der Großteil des Proteins interagiert nicht mit dem Säulenmaterial oder wurde bereits während des

Waschens von der Säule eluiert. Der Versuch, das Protein über den ebenfalls N-terminal fusionierten His₆-Tag zu reinigen, konnte das Ergebnis nicht verbessern.

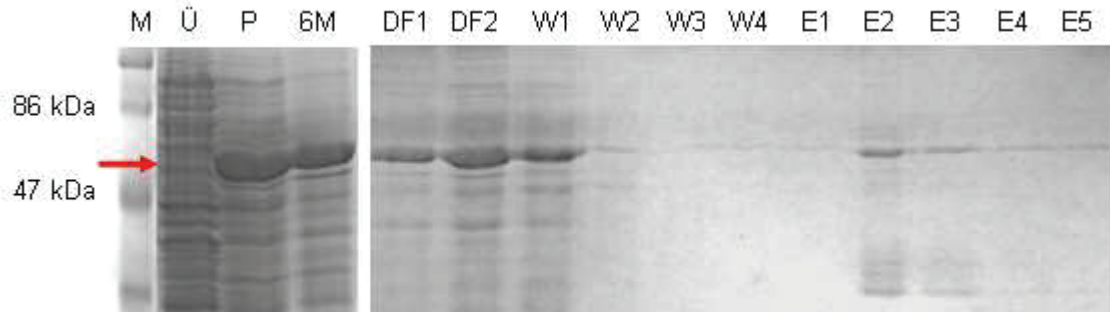


Abbildung 27. SDS-PAGE unterschiedlicher Fraktionen während der Reinigung von Gst-MamB an immobilisiertem Gluthation. M - Marker, Ü - Überstand nach Zellaufschluss, P - unlöslicher Rest nach Zellaufschluss, 6 M - Überstand nach Lösen des Restes in 6 M Harnstoff, DF1 und DF2 - Durchflussfraktionen bei Affinitätschromatographie, W1 bis W4 - Waschfraktionen, E1 bis E5 - Elutionsfraktionen. Der Pfeil veranschaulicht die Lage von Gst-MamB.

b) Expression und Reinigung von MamM und MamB fusioniert mit einem His₁₀-Tag in pET16-b

Die Ausbeute an gereinigtem Gst-MamB war zu gering, um das Fusionsprotein weiter zu prozessieren. Auch konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob das Protein nach der Behandlung mit Harnstoff richtig gefaltet ist. Deshalb wurde in einem neuen Ansatz versucht, MamM und MamB mit einem kurzen Tag zu fusionieren.

Dazu wurden *mamM* und *mamB* in pET16-b ligiert. Die Expression der N-terminal His₁₀-Fusionsproteine wurde in C41(DE3), C43(DE3) und Rosetta(DE3) durchgeführt. Auch in diesem Ansatz wurde versucht, die Expression hinsichtlich der Anzucht- (12 °C, 28 °C, 37 °C) und Induktionsbedingungen (OD₆₀₀ = 0,6 bzw. 1,3) zu optimieren. Es sollten Bedingungen gefunden werden, die eine Integration der Proteine in die Cytoplasmamembran von *E. coli* ermöglichen. MamM als auch MamB konnten in allen gewählten Stämmen unabhängig von den getesteten Bedingungen exprimiert werden. Somit wurde die Expression bei OD₆₀₀ = 1,3 und 28 °C für 6 h als Standard definiert. Trotz der gleichen Klonierungsstrategie für *mamM* und *mamB* wurde His₁₀-MamB in einer deutlich höheren Menge exprimiert als His₁₀-MamM (Abbildung 28).

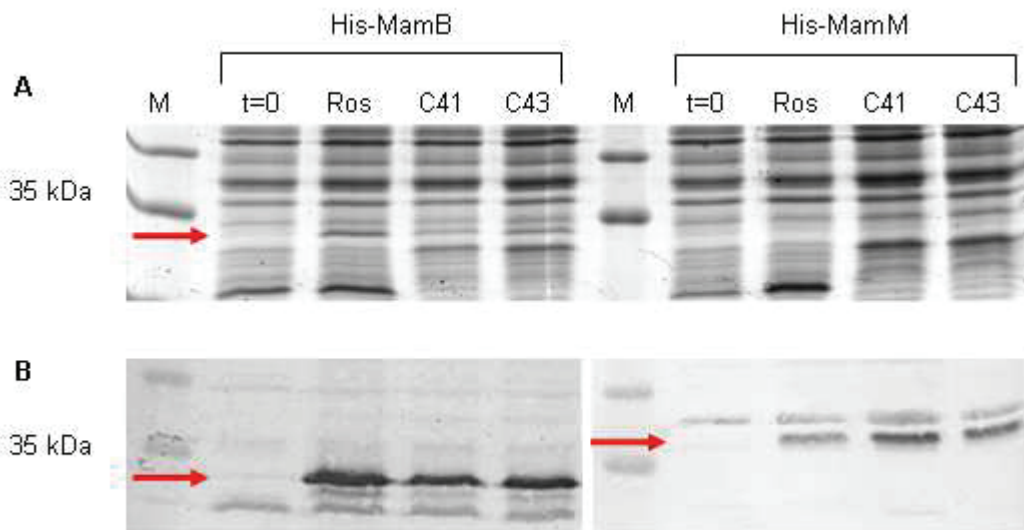


Abbildung 28. Expressionskontrolle von MamM und MamB mit N-terminalem His-Tag in pET16-b bei 30 °C mittels SDS-PAGE und Western Blot. (A) SDS-PAGE. (B) Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen MamM bzw. MamB. Als Negativkontrolle (t=0) diente Rohextrakt von uninduzierten Zellen. M - Marker, (Ros) Rosetta(DE3), (C41) C41(DE3), (C43) C43(DE3). Der Pfeil veranschaulicht die Lage der Zielproteine.

Allerdings zeigte sich, dass MamB nach dem Zellaufschluss nur in den unlöslichen Zellfraktionen gefunden werden konnte und nicht in die Cytoplasmamembran integrierte. MamM hingegen wurde, wenn auch nicht vollständig, in die Cytoplasmamembran der Expressionsstämme eingebaut. Überraschenderweise war die Integration von MamM in die Membran bei *E. coli* Rosetta(DE3) effektiver als bei den C-Stämmen (Abbildung 29).

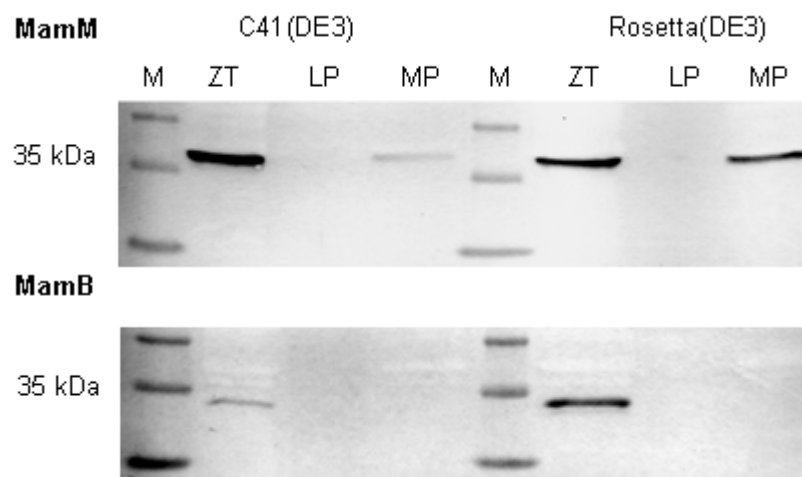


Abbildung 29. Western Blot und Immunodetektion mit Protein-spezifischen Antikörpern an Zellfraktionen nach der Expression von His-MamM bzw. His-MamB. Untersucht wurden die unlöslichen Zellbestandteile (ZT) nach dem Zellaufschluss, sowie die löslichen Proteine (LP) und Membranproteine (MP) nach der Ultrazentrifugation in *E. coli* Rosetta(DE3) und C41(DE3).

MamM wurde mittels DDM aus der cytoplasmatischen Zellfraktion einer 1-L-Kultur solubilisiert, über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und kontrolliert (Abbildung 30). In höher konzentrierten Elutionsfraktionen war His₁₀-MamM als dominierende Bande zu erkennen.

Die Aufkonzentrierung von His₁₀-MamM führte bereits bei Proteinkonzentrationen über 2 mg/ml zu einer Präzipitation, die nur durch Zugabe von SDS wieder gelöst werden konnten. Auch blieb es trotz der Einhaltung der Expressionsbedingungen schwierig, die Proteinausbeute zu reproduzieren. Die höchste Ausbeute lag bei etwa 1,5 mg gereinigtem Protein aus 1 l Kultur.

Da MamB nicht in die CM integrierte, wurde versucht, das Protein aus den Zelltrümmern zu solubilisieren. Dazu wurde der Rohextrakt nach dem Zellaufschluss direkt mit DDM inkubiert. Zwar war es möglich, MamB auf diese Weise zu reinigen, aber die Gesamtausbeute an MamB lag nur bei 0,1 mg/ml (etwa 100 µg), was für weitere Arbeiten zu gering war. In Western Blots der Elutionsfraktionen waren auf der theoretischen Höhe von His₁₀-MamB (34,5 kDa) deutlich zwei Signale zu sehen, wobei es sich um His₁₀-MamB und ein Abbauprodukt handeln könnte (Abbildung 30).

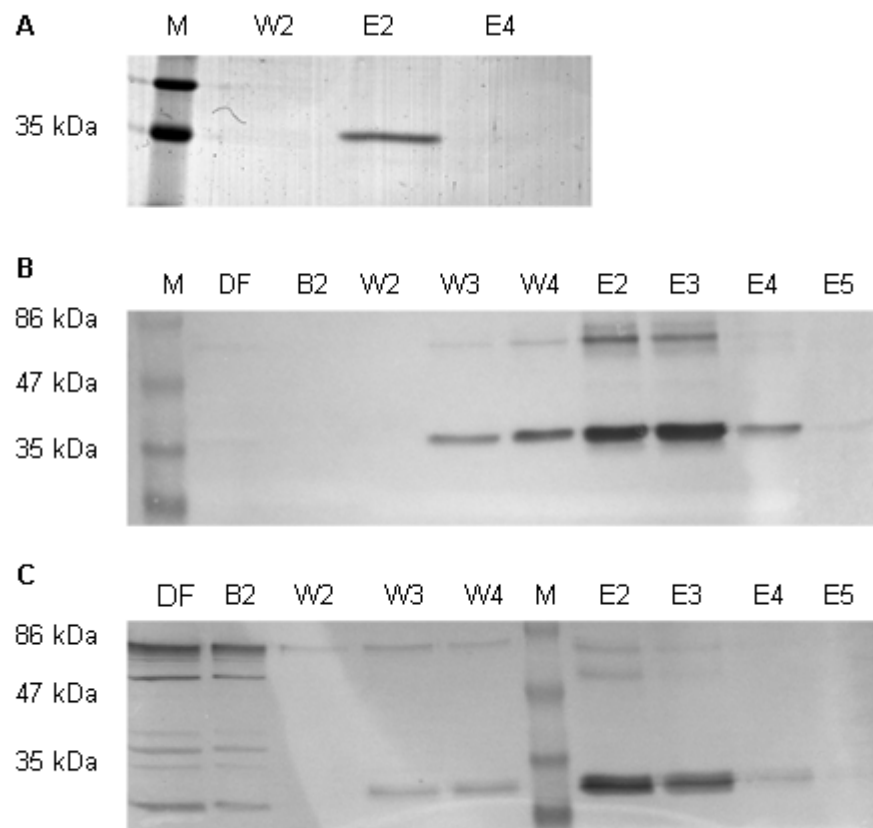


Abbildung 30. Reinigung von His-MamM und His-MamB mittels Affinitätschromatographie. (A) SDS-PAGE. Aufgetragen wurden eine Waschfraktion, sowie die Elutionsfraktionen 2 und 4 von His-MamM. (B) und (C) Western Blot verschiedener Fraktionen der Reinigung von His-MamM und His-MamB. (DF) Durchfluss, (E2 bis E5) Elutionsfraktionen, (B2) Bindefraktion, (W2 bis W4) Waschfraktionen

5.2.2 Expression in pET51-b(+)

Wie in den vorangegangenen Experimenten bestätigt wurde, erlaubt die Expression von hydrophoben Proteinen in die Cytoplasmamembran keine hohen Proteinausbeuten. Es erschien daher sinnvoll, die Proteinprozessierung nach der Reinigung zur Vermeidung von Ausbeuteverlusten so gering wie möglich zu halten. Da der Gst-Tag größer ist als das Zielprotein und der His-Tag Metalle bindet, hätten beide Affinitätspartner für die geplanten Transportstudien in Proteoliposomen entfernt werden müssen, was mit den nach der Expression gereinigten Proteinmengen nicht durchzuführen gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde für die Expression von MamM und MamB ein weiteres System getestet, welches es erlaubt, den Affinitätstag am Zielprotein zu lassen.

Beide Gene wurden in pET51-b(+) N-Terminal mit Strep-Tag II fusioniert und die Plasmide pET51-*mamM* und pET51-*mamB* zur Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) eingesetzt.

Zur Optimierung der Expression wurde ein Versuch durchgeführt, in dem, wie auch schon zuvor, die Induktions-OD, die Induktionszeit sowie die Expressionstemperatur systematisch variiert wurden. Die Expressionsmenge von MamB war sehr niedrig und mittels Western Blot an Zellrohextrakten nur schwach detektierbar (Abbildung 31.). Die Synthese von MamB erfolgte nur, wenn zwischen $OD_{600} = 0,6$ bis 1,2 induziert wurde. Auch war hier deutlich zu erkennen, dass Induktionszeiten von länger als 4 h zu einem schnellen Abbau des Zielproteins führte. Bei 15 °C und bei 37 °C war MamB in der Immunodetektion als Doppelbande zu sehen. Dieser Effekt war bei 28 °C am geringsten ausgeprägt.

Die Expressionsrate von MamM war mit der der vorherigen Versuche in pET16-b vergleichbar. Auch hier zeigte sich, dass niedrigere Temperaturen kombiniert mit der Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase zu höheren Proteinexpressionsraten führen. Wie bei MamB war die Proteinsynthese ebenfalls an ein enges Zeitfenster gekoppelt. Dies resultierte in einem Abbau des Zielproteins mit zunehmender Expressionszeit. Als optimale Expressionstemperatur wurde 28 °C ermittelt, da hier die Induktionszeit mit 4 h sehr kurz gehalten werden konnte und die synthetisierte Proteinmenge am höchsten war (Abbildung 31).

Unter den optimierten Bedingungen wurden MamM und MamB in 2 l Kulturen exprimiert und über Affinitätsreinigung an immobilisierten Strep-Tactin gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden vereint und vorsichtig mittels Ultrafiltration aufkonzentriert, ohne das Protein zu präzipitieren. Leider war, wie schon in früheren Reinigungsversuchen, die Menge an MamB für weitere *in vitro* Versuche zu gering (etwa 150 µg bei 0,1 mg/ml). Aus 2 l Kulturvolumen konnten hingegen ca. 4 mg Strep-MamM

mit einer Konzentration von 1,2 mg/ml gewonnen werden (Abbildung 32), welche für Rekonstitutionsversuche in Liposomen verwendet wurden.

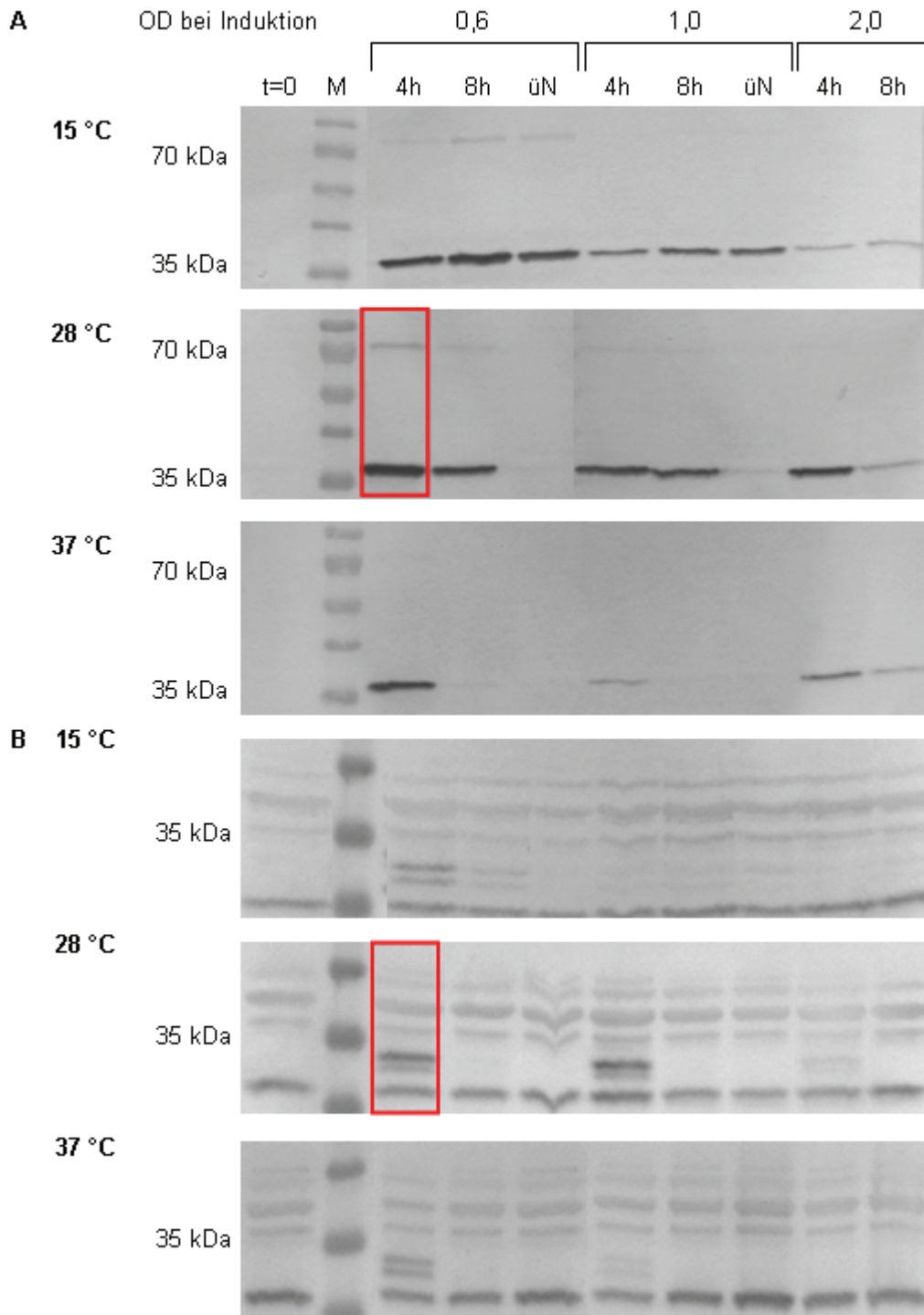


Abbildung 31. Expressionsoptimierung von MamM (A) und MamB (B) mit N-terminalen Strep-Tag in pET51-b(+). Gezeigt sind Western Blots von Zellrohextrakten von verschiedenen angezogener *E. coli* Rosetta(DE3) Kulturen. Variiert wurden die Wachstumstemperatur nach der Induktion (15 °C, 28 °C, 37 °C), die Expressionszeit (4 h, 8 h, über Nacht - üN) sowie die optische Dichte bei der Induktion ($OD_{600} = 0,6, 1$ bzw. 2). Als Negativkontrolle ($t = 0$) diente Rohextrakt vor der Induktion. M - Marker; Rahmen - durch den Versuch definierte Standardbedingungen

5.3 Rekonstitution von Strep-MamM in Proteoliposomen

Die Expression und Reinigung von MamM und MamB wurde in erster Linie durchgeführt, um die Proteine für *in vitro* Metalltransportstudien einzusetzen.

In einem ersten Versuch, der in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nies (Universität Halle) durchgeführt wurde, wurde das gereinigte Strep-MamM in Vesikeln aus polaren *E. coli*-Lipiden rekonstituiert. Der Einbau des von Strep-MamM in die Proteoliposomen wurde durch Immunodetektion kontrolliert (Abbildung 32). Wie auch bereits während der Proteinreinigung war bei höher konzentrierten Proben eine zweite Bande von etwa 70 kDa zu finden, welche auf eine mögliche Dimerbildung schließen lässt.

Obwohl die Rekonstitution von MamM in Liposomen erfolgreich war, mussten initiale Eisentransportstudien letztendlich auf Grund methodischer Probleme des Assays verworfen werden.

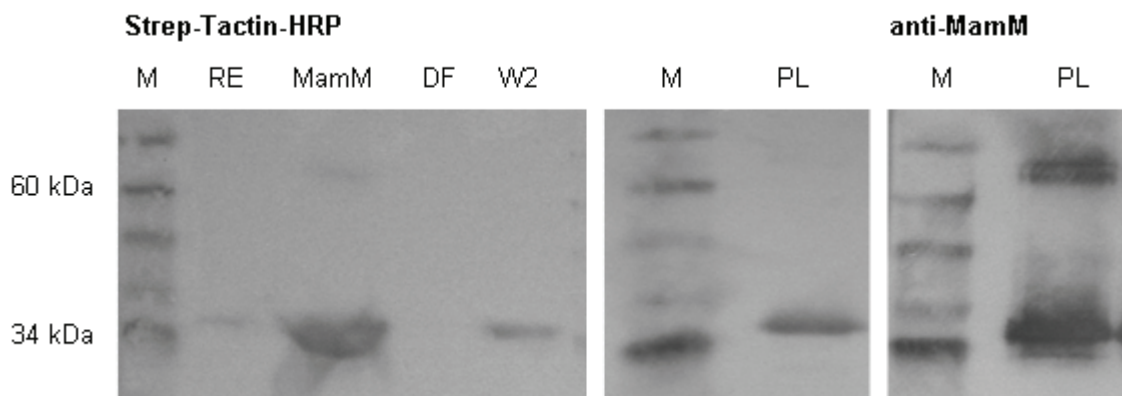


Abbildung 32. Western Blots der Reinigung von Strep-MamM aus 2 l Kultur und dessen Einbau in Proteoliposomen. Die Reinigung von Strep-MamM wurde mit Strep-Tactin-HRP-Konjugat überprüft (linker Blot). Der erfolgreiche Einbau von Strep-MamM in Proteoliposomen wurde mit Strep-Tactin-HRP-Konjugat (Blot in der Mitte) und anti-MamM-Antikörper (rechter Blot) gezeigt. M - Marker, RE - *E. coli* Rosetta(DE3) Rohextrakt, MamM - gereinigtes und konzentriertes MamM, DF - Durchfluss der Affinitätschromatographie, W2 - Waschfraktion 2, PL - MamM-Proteoliposomen

5.4 Expression von MamM und MamB als transkriptionelle Fusion in pET51-b(+)

Die Deletion eines der beiden CDF-Proteine aus der MM führte zu einem Phänotypen, der kein Magnetit synthetisiert. Des Weiteren wurden bisher untersuchte CDF-Transporter aus Pro- sowie Eukaryoten als funktionale Homodimere beschrieben (Bloß *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2005). Ellis *et al.* (2005) beschrieben erstmals ein CDF-Protein, das als funktionelles Heterodimer, bestehend aus Msc2p und Zrg17p, Zink aus dem Cytoplasma in das endoplasmatische Retikulum von *S. cerevisiae* transportiert. Auch

hier führte die Deletion eines der beiden Gene zu vergleichbaren Phänotypen. Die Interaktion der beiden Proteine wurde u.a. mittels Tandem-Affinitäts-Reinigung in *S. cerevisiae* bewiesen.

Um eine mögliche Interaktion von MamM und MamB zu untersuchen, sollte der Ansatz der Tandem-Affinitätsreinigung (Rigaut *et al.*, 1999) modifiziert in *E. coli* durchgeführt werden. Hierzu wurden die Gene *mamM* und *mamB* in verschiedenen Kombinationen mit und ohne Strep-Tag als transkriptionelle Fusion in pET51-b(+) inseriert (Abbildung 33). Interagierten die beiden Zielproteine, sollte es möglich sein, beide Proteine gemeinsam durch die Affinitätschromatographie zu reinigen.

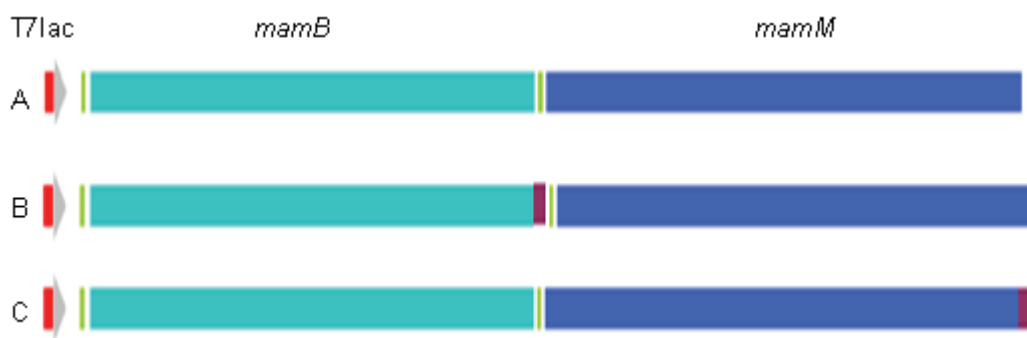


Abbildung 33. Schematische Darstellung von *mamM* (blau) und *mamB* (türkis) als transkriptionelle Fusion unter Kontrolle des T7/lac-Promotors (rot/grau). (A) Konstrukt ohne Affinitätstag. (B) Konstrukt mit C-terminalem *strep*-Tag an *mamB*. (C) Konstrukt mit C-terminalem *strep*-Tag an *mamM*. Grün - Ribosomenbindungsstelle, violett - *strep*-Tag

Da aus den vorangegangenen Expressionsversuchen vermutet werden konnte, dass N-terminale Fusionen die Expression und Membranintegration von MamB negativ beeinflussen, wurden die jetzigen StrepII-Fusionen C-terminal erstellt. Hierzu wurden die 24 bp der StrepII-Sequenz an das 3'-Ende des reversen Primers vor das Stopkodon angehängt und so bei der Amplifikation des Genes aus der genomischen DNA 3' an das Zielgen fusioniert. Auf Grund der Abfolge der Restriktionsenzyme der MCS von pET51-b(+) wurde *mamB* vor *mamM* in das Tandemkonstrukt eingesetzt. Das hatte zu bedeuten, dass für die Transkription von *mamB* die RBS der Expressionskassette des Vektors genutzt werden konnte. Für die Transkription von *mamM* wurde die RBS der Kassette in den Vorwärtsprimer integriert und so bei der Amplifikation 5' an *mamM* gehängt.

Mit den Plasmiden pET51-*mamBStrep,mamM* und pET51-*mamB,mamM* wurde ein Expressionsversuch im 1 l Maßstab in *E. coli* Rosetta(DE3) durchgeführt. Wie in Abbildung 34 zu erkennen ist, war es möglich, sowohl MamB als auch MamM als transkriptionelle Fusion zu exprimieren. In Western Blots mit anti-MamM- bzw. anti-MamB-Antikörpern konnte ein klares Signal in den erwarteten Größen von 34 kDa für

MamM, 32 kDa für MamB und 33 kDa für MamB-Strep in den induzierten Spuren detektiert werden. Überraschend war, dass die Expression von MamB, sowohl mit als auch ohne Strep-Tag, höher ist, als die von MamM. Zudem wurde das Protein mit Strep-Tag in die Cytoplasmamembran integriert, was in den vorherigen Expressionsversuchen missglückte. Somit konnte MamB erstmals in einer für die Reinigung ausreichenden Menge exprimiert werden. Die Affinitätsreinigung der Proteine erfolgte ausgehend von der solubilisierten Membranfraktion an Strep-Tactin-Sepharose.

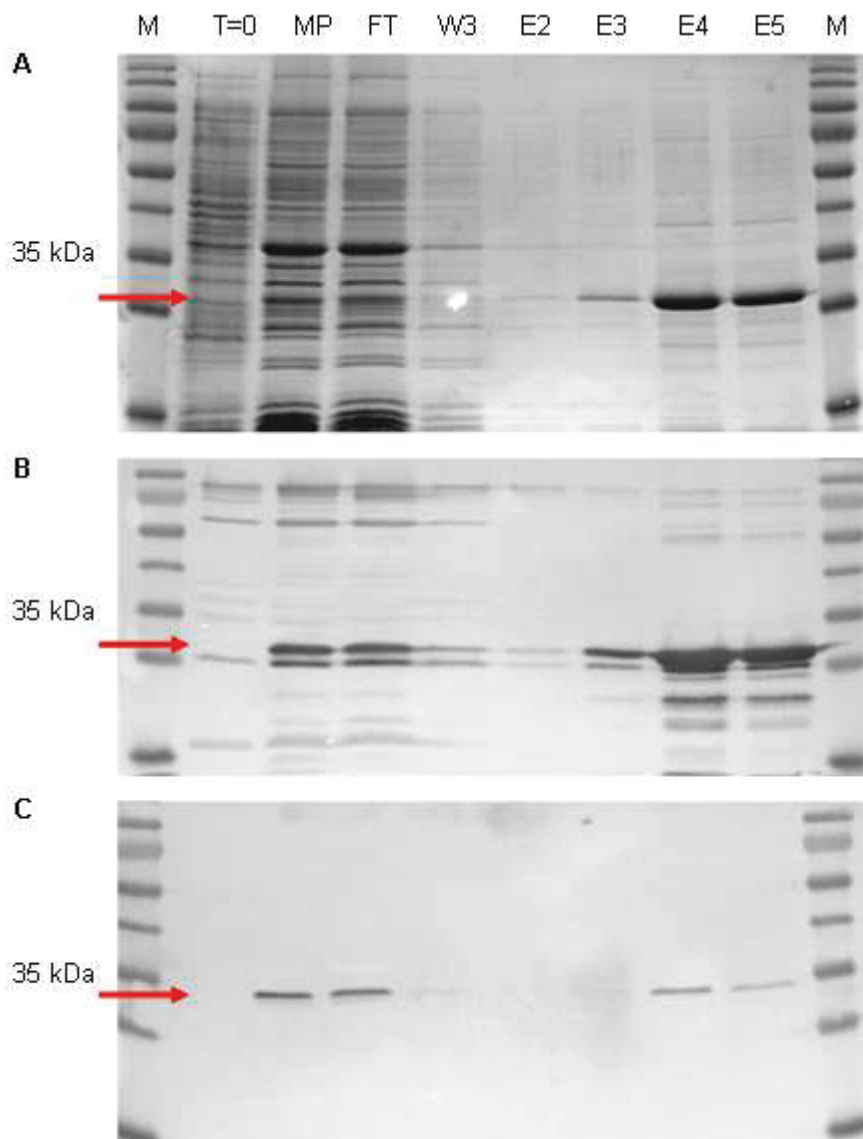


Abbildung 34. Gleichzeitige Expression und Reinigung von Strep-MamB und MamM in pET51-b(+). (A) SDS-PAGE der Expression und Reinigungsfraktionen. Strep-MamB ist deutlich zu erkennen und in den Elutionsfraktionen gesammelt. (B) Western-Blot von A mit anti-MamB-Antiserum (C) Western-Blot von A mit anti-MamM-Antikörper. Es war möglich, MamM zusammen mit Strep-MamB von der Säule zu eluieren. M -Marker, t =0 - Rohextrakt vor Induktion, MP - Membranfraktion nach Induktion, FT - Durchfluss der Strep-Tactin-Säule, W3 - Waschfraktion 3, E2 bis E5 - Elutionsfraktionen

Während der Reinigung hatte MamB-Strep nicht vollständig an das Säulenmaterial gebunden und ein Teil des Proteins wurde im Durchfluss gefunden. Die Elution von MamB-Strep erfolgte ab der 4. Elutionsfraktion. Das Protein wurde, wie in der SDS-PAGE und den Western Blots in Abbildung 34 zu sehen ist, durch die Elution stark aufkonzentriert. Der Hintergrund an unspezifisch eluierten Proteinen war noch hoch und bedarf weiterer Optimierung. In diesem Reinigungsexperiment konnte außerdem das ohne Strep-Tag exprimierte MamM zusammen mit den Elutionsfraktionen von MamB-Strep von der Affinitätssäule eluiert werden. Die Koelution war zwar nicht stöchiometrisch, aber liefert einen ersten Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen MamM und MamB, zumal in der Negativkontrolle gezeigt werden konnte, dass MamM und MamB ohne Strep-Tag nicht unspezifisch an das Säulenmaterial binden. Aus Zeitgründen war es nicht mehr möglich die gleichzeitige Reinigung von MamM und MamB über einen Tag zu optimieren, was wahrscheinlich durch Cross-Linking vor der Membransolubilisierung möglich gemacht werden könnte.

D Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung der beiden Proteine MamM und MamB aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Die beiden Proteine wurden bei der biochemischen Analyse der Magnetosomenmembran identifiziert und gehören zur Familie der „Cation Diffusion Facilitator“-Transporter (Grünberg *et al.*, 2004), welche an der Homöostase zweiwertiger Schwermetallkationen beteiligt sind (Nies, 2003; Haney, 2005). Die Fähigkeit von Vertretern dieser Proteinfamilie, Eisen zu transportieren, wurde diskutiert (Nies, 2003; Grünberg *et al.*, 2004) und zwischenzeitlich bewiesen (Munkelt *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2005). Um die Funktion von MamM und MamB bei der Magnetitbiomineralisation genauer zu definieren, wurden Deletionsmutanten der Gene *mamM* und *mamB* generiert und phänotypisch charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde auch die Lokalisation der beiden Proteine in MSR-1 untersucht. Des Weiteren wurde mittels Sequenzanalysen und heterologer Komplementation versucht, die Bedeutung von CDF-Transportern bei der Magnetitbiomineralisation von MTB auf andere Organismen auszudehnen. Darüberhinaus wurden Vorarbeiten zur *in vitro* Charakterisierung der Proteine MamM und MamB durchgeführt.

1 Erstellung von Deletionsmutanten in *M. gryphiswaldense* MSR-1 - methodische Aspekte

Die gerichtete Deletion ist für die funktionelle *in vivo* Charakterisierung eines Gens eine essentielle Technik, die jedoch für MTB noch nicht zu den Routinemethoden zählt und bisher nur selten dokumentiert ist. Deshalb werden in dem nachfolgenden Abschnitt kurz methodische Aspekte des molekularbiologischen Arbeitens in *M. gryphiswaldense* diskutiert.

Diese wenigen, auf gerichteter Mutagenese basierenden Fälle umfassen markierte Deletionen der Gene *mamM* (Junge, 2004) und *mamB* (Schultheiss, 2004), sowie Versuche zur unmarkierten Deletion der Gene *mamJ* (Scheffel *et al.*, 2006), *mamK* (Komeili *et al.*, 2006; Katzmann, 2007), *mamC* (Gärdes, 2006), *mamA* (Komeili *et al.*, 2004), *mamJKL* (Katzmann, 2007) und des gesamten *mamDFGC*-Operons (Grünberg, 2005).

Bisherige Deletionen in MSR-1 beruhten auf pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994), welche auf Grund der geringen Rekombinationsfrequenzen der Deletionskonstrukte zeitaufwändig waren. Versuche, mit pK19*mobsacB* Deletionsmutanten von *mamK*, *mamC* und *mamD* zu erzielen, wurde auf Grund zu geringer Rekombinationsraten gänzlich verworfen (Grünberg, 2005; Schübbe *et al.*, 2005).

Für die Deletion von *mamM* und *mamB* wurden deshalb zwei alternative Systeme mit unterschiedlichen Eigenschaften gewählt. Zum einen wurde ein *sacB*-abhängiges System verwendet, das auf dem Suizidplasmid pWM91 basiert (Metcalf and Wanner, 1996). Dieses Plasmid wurde gewählt, da es bereits erfolgreich zur unmarkierten Deletion von *mamA* und *mamK* in *M. magneticum* AMB-1 eingesetzt wurde (Komeili *et al.*, 2004; Komeili *et al.*, 2006). Zum anderen wurde ein *Cre/loxP*-basiertes Plasmidsystem ausgewählt, welches zur Generierung von unmarkierten Deletionen in gram-negativen Bakterien entwickelt wurde (Marx and Lidstrom, 2002). Parallel zu den Deletionen von *mamM* und *mamB* konnte dieses System erfolgreich an zur Deletion von *mamC* angewendet werden (Gärdes, 2006).

Die jeweiligen Fragmentgrößen der flankierenden Bereiche von *mamM* und *mamB*, über die die homologe Rekombination erfolgen sollte, variierten zwischen 1,3 und 1,7 kb und sind in der gleichen Größenordnung zu weiteren Deletionskonstrukten in MSR-1 (Gärdes, 2006; Scheffel *et al.*, 2006). Eine jüngere Studie zur Rekombination von MSR-1 am Beispiel der Gene *mamK* und *mamJKL* hat allerdings gezeigt, dass die Insertionsfrequenz mit der Länge der flankierenden Bereiche zunimmt und mind. 2 kb betragen sollte (Katzmann, 2007). Homologe Rekombinationen in AMB-1 hingegen wurden mit vergleichbar kürzeren Fragmenten von 0,75 bis 1,2 kb erzielt (Komeili *et al.*, 2004; Komeili *et al.*, 2006). In anderen gram-negativen Bakterien, wie z.B. *Geobacter sulfurreducens* genügen 0,6 kb zur Erzeugung eines homologen Strangbruchs (Leang *et al.*, 2003).

Der Versuch, Insertionen mit pWM91 zu generieren war nur durch Konjugation von pWM91- Δ *mamM* mit *E. coli* BW29427 erfolgreich. Allerdings waren zwei Konjugationsansätze nötig, von denen der erste ebenfalls keine Insertionsmutanten hervorbrachte. Ansätze, die auf pCM184 basierten, resultierten mit den Donorstämmen *E. coli* S17-1 und BW29427 in der Integration der Plasmide in das Genom von MSR-1. Die Insertionsraten lagen bei nur 10^{-7} bis 10^{-9} pro Rezipient. Ähnliche Raten ($1,1 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-8}$) wurden bei der Deletion von *mamK* und *mamJKL* mittels pK19*mobsacB* und pK19*mobGII* erzielt (Katzmann, 2007). Frühere Arbeiten dokumentierten Insertionsfrequenzen von $1,4 \cdot 10^{-5}$ mit pK19*mobsacB* (Junge, 2004) bzw. $2,2 \cdot 10^{-6}$ mit pCM184 als Plasmidgerüst (Gärdes, 2006), die damit deutlich bessere Effizienzen erzielten. Auch Gendeletionen in anderen Prokaryoten wie Mycobakterien oder *E. coli* haben mit 10^{-2} bis 10^{-4} deutlich höhere Insertionsraten als die bisher beschriebenen Beispiele aus MTB (McFadden *et al.*, 1996; Link *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den hier diskutierten Ergebnissen und der Deletion von *mamC* (Gärdes, 2006) konnte in der Arbeit von E. Katzmann keine Insertionen mittels pCM184 generiert werden.

Die Insertionsrate hängt dabei nicht nur von der Häufigkeit der homologen Rekombinationen ab. So wurde von D. Schultheiss (2003) gezeigt, dass bereits die Übertragungseffizienz von replikativen Plasmiden bei der Konjugation mit zunehmender Sequenzlänge abnimmt. Auch hing die Übertragungsrate vom verwendeten Plasmid ab. Mit Längen der Deletionsplasmide von *mamM* und *mamB* von etwa 9 bis 10 kB muss an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass bereits die Plasmidübertragungsrate gering ist.

In dieser Arbeit hat sich zum wiederholten Mal bestätigt, dass *sacB* als negativer Selektionsmarker zum Erfassen des zweiten Rekombinationsereignisses in MSR-1 ungeeignet ist. Das Gen *sacB* kodiert für eine Levansucrase, die einzelne Saccharosemoleküle zu langen Levanketten verbindet, die sich im Periplasma der Zellen anhäufen und so zum Zelltod führt (Reyrat *et al.*, 1998). Dadurch ist es möglich zwischen Insertionsmutanten und Deletionsmutanten zu unterscheiden. Jedoch war bei Plattierungen von Insertionsmutanten von MSR-1(pWM91- Δ *mamM*) auf saccharosehaltigem Festmedium kein Unterschied in der Kolonienzahl zu Kontrollplattierungen ohne Saccharose zu beobachten. Diese saccharoseresistenten Insertionsstämme wurden auf eine Mutation des *sacB*-Gens zurückgeführt. Dieses Phänomen wurde auch in vorherigen Deletionsansätzen in *M. gryphiswaldense* MSR-1 beobachtet (Junge, 2004; Katzmann, 2007). Der Aktivitätsverlust des SacB-Proteins wurde auch in verschiedenen anderen Bakterien dokumentiert und erreichte dabei Frequenzen bis zu 10^{-4} (Copass *et al.*, 1997; Link *et al.*, 1997; Papavinasasundaram *et al.*, 1998; van der Geize *et al.*, 2001), die weit über der Rekombinationsraten homologer DNA-Fragmente in MSR-1 liegen. Das wiederum macht eine Selektion eines spezifischen Rekombinationsereignisses über *sacB* unmöglich.

Die Deletionen von *mamM* und *mamB* umfassten nicht, wie in vorhergegangenen Deletionsversuchen (Junge, 2004; Schultheiss, 2004), den gesamten Bereich zwischen Start- zu Stopkodon, sondern wurden weiter in das jeweilige Gen verschoben. In den Deletionsmutanten wird an Stelle des Wildtypgens ein kurzes „Nonsense“-Peptid translatiert. Durch das Verbleiben der 3'-Bereiche von *mamM* und *mamB* sollten mögliche Shine-Dalgarno-Sequenzen der beiden stromabwärts gelegenen Genen, *mamN* bzw. *mamS* erhalten bleiben, da innerhalb des *mamAB*-Operons die nicht kodierenden Bereiche sehr kurz sind. In der *mamB*-Deletion war es zusätzlich wichtig, zumindest die ersten 4 bp des ORFs zu erhalten, da sich das Stopkodon von *mamR* und das Startkodon von *mamB* überschneiden. Im Falle der *mamM*-Deletion wurde bedingt durch die Wahl der Restriktionsschnittstellen in pCM184 ein vorzeitiges Stopkodon in die Sequenz eingefügt, was zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation des „Nonsense“-Peptids

führt. Welchen Einfluss dies auf den Phänotyp der Mutante haben könnte, wird im nächsten Abschnitt besprochen.

2 Der unmagnetische Phänotyp von $\Delta mamB$ ist ausschließlich auf den Verlust von *mamB* zurückzuführen

Für die Komplementationversuche wurden die Wildtypallele von *mamM* und *mamB* in Derivate des „broad host range“ Plasmids pBBR1MCS kloniert (Kovach *et al.*, 1994; Kovach *et al.*, 1995), in die jeweiligen Mutanten übertragen und dort konstitutiv von einem plasmidbasierten *lac*-Promotor exprimiert. Immunochemische Nachweise der *in trans* Expression zeigten, dass in komplementierten Deletionsstämmen erheblich weniger MamM bzw. MamB gebildet wird als in Kontrollzellen des Wildtyps. Häufig lag die Expressionsrate sogar unter der Nachweisgrenze des Antikörpers. Es ist anzunehmen, dass die konstitutive Expression der beiden Membranproteine durch den *lac*-Promotor der pBBR1MCS-Derivate nicht ausreichend ist.

So konnten in vorläufigen Versuchen in MSR-1 gezeigt werden, dass die Expression von EGFP vom *lac*-Promotor eine Größenordnung geringer ist als von den operoneigenen Promotoren P_{mamG} und P_{mamH} (C. Lang, persönliche Mitteilung). Eine mögliche Erklärung für die geringen Expressionslevel könnte in der Regulierung der Magnetosomengene in MSR-1 Wildtypzellen liegen. In Microarray und „real-time“ RT-PCR Experimenten wurde gezeigt, dass u.a. *mamM* und *mamB* durch Eisen und Sauerstoff reguliert werden (Schübbe *et al.*, 2006). Denkbar wäre, dass zum einen eine Hochregulierung der Expression vom *lac*-Promotor durch diese Elemente fehlt. Zum anderen ist möglich, dass die Struktur des aus *E. coli* stammenden Promotors von der Transkriptionsmaschinerie von MSR-1 schlechter erkannt wird.

Von der Deletionsmutante $\Delta mamM$ muss trotzdem vorerst angenommen werden, dass diese einen polaren Charakter hat. Zwar waren stromabwärts gelegene Gene mittels RT-PCR nachzuweisen, aber zum einen war die RT-PCR Untersuchung nicht quantitativ und MamB konnte immunochemisch nicht detektiert werden. Die Transkriptions-Translations-Maschinerie scheint in $\Delta mamM$ gestört zu sein. Der ausschlaggebende Grund für die Annahme, $\Delta mamM$ sei polar, ist allerdings, dass die Mutante nicht komplementierbar ist. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die *in trans* Expression von MamM immunochemisch nicht detektierbar war und die exprimierte Menge an MamM nicht ausreichte, den magnetischen Phänotyp wieder herzustellen. Letztendlich kann der Charakter von $\Delta mamM$ aber erst vollständig geklärt werden, wenn ein geeignetes Expressionssystem für *M. gryphiswaldense* MSR-1 zur Verfügung steht. Denn es ist auch denkbar, dass MamM einen Einfluss auf die Stabilität des stromabwärts translatierten MamB hat.

Die geringe Expression von plasmidkodiertem *mamB* erklärt zumindest die nichtquantitative Komplementation der Δ *mamB*-Mutante. In dieser ist C_{mag} stark vermindert und die magnetische Ausrichtung erreicht nur etwa 10 % von vergleichbaren Wildtypwerten. In TEM-Aufnahmen von Δ *mamB*(pBBR1MCS2-*mamB*_{MSR-1}) wurde ersichtlich, dass dies auf die Verteilung der Magnetosomen in den Zellen der komplementierten Kultur zurückzuführen ist. So ist die Anzahl der Magnetosomen pro Zelle variabel und nicht alle Zellen bilden Magnetitkristalle. In Zellen, die Kristallen enthielten, waren diese in nur kurzen Ketten angeordnet oder lagen vereinzelt, aber auf einer geraden Linie aufgereiht, vor. Da aber die Expression von *mamB* in Δ *mamB* *in trans* von einem heterologen Promotor erfolgte, lässt sich schließen, dass die Deletion von *mamB* keine Polarität der stromabwärts gelegenen Gene *mamS*, *T* und *U* verursacht. Der Verlust der Magnetitbildung von Δ *mamB* lässt sich allein auf den Verlust von *mamB* zurückführen. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass für die Magnetitsynthese innerhalb einer räumlichen Struktur eine präzise Kontrolle der Proteinstöchiometrie erforderlich ist.

Interessanterweise ist eine vollständige Herstellung des Wildtypphänotyps durch *in trans* Komplementation bisher in keiner Studie zur Deletion von Magnetosomengenen beschrieben worden. So wurde in einer Δ *mamK*-Mutante von AMB-1, deren Kettenbildung gestört ist, der Phänotyp des Wildtyps nur zu etwa 15 % komplementiert. Auch hier erfolgte die Expression *in trans* einem pBBR-Derivat (Komeili *et al.*, 2006). Daneben gibt es weitere Studien, in denen die Deletionen in Magnetospirillen zu Phänotypen mit verminderten C_{mag} -Werten (Deletion von *mamJ* in MSR-1, *mamA* in AMB-1) bzw. unmagnetischen Zellen (Deletion von *mamJKL* in MSR-1) führten. Auch hier konnte die Komplementation der Deletionsmutanten nicht die ursprüngliche magnetische Ausrichtung des Wildtyps erreichen (Komeili *et al.*, 2004; Katzmann, 2007; Scheffel und Schüler, 2007). Aber auch Komplementationsversuche in anderen Prokaryoten führen nicht zwangsläufig zur Wiederherstellung des Ausgangsphänotyps, wenn heterolog von einem Plasmid exprimiert wird. Zum Beispiel ist eine Deletion von *omcB* in *G. sulfurreducens* nur zu 40 % des Wildtypproteinlevels komplementierbar (Leang *et al.*, 2003). Selbst in *E. coli*, in dem genetische Arbeiten routinemäßig durchgeführt werden, ist die Wahl des Expressionssystems für das Maß der Komplementation ausschlaggebend (Eichhorn *et al.*, 2000).

3 Δ *mamB* und Δ *mamM* resultieren in unmagnetischen Phänotypen, in denen die Magnetitsynthese gestört ist

Die postulierte Rolle von MamM und MamB in der Magnetitbiomineralisation war zu Beginn dieser Arbeit lediglich auf proteomische Sequenzanalysen gestützt. Auf Grund der Analyse der MM und bereits konstruierter markierter Deletionen von *mamM* und *mamB*

wurde ein unmagnetischer Phänotyp von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ erwartet (Grünberg *et al.*, 2004; Junge, 2004; Schultheiss, 2004). Tatsächlich zeigten die beiden unmarkierten Deletionen von *mamM* und *mamB* keine Magnetitbildung. Die Funktion von MamM und MamB in *M. gryphiswaldense* MSR-1 ist somit essentiell für die Magnetitbiomineralisation.

Allerdings bilden $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ weiterhin Magnetosomenleervesikel. Die Anordnung der Leervesikel war dabei mit der aus Präparaten des Wildtyps vergleichbar. In der spontanen unmagnetischen Mutante MSR-1B hingegen konnten nur 4 Zellen mit bis zu 2 vesikelartigen Strukturen beobachtet werden. Während der Charakterisierung von MSR-1B konnte keine Leervesikel beobachtet werden (Schübbe *et al.*, 2003). Dieser Gegensatz bedarf weiterer Klärung.

Interessanterweise konnte in $\Delta mamB$ ein Leervesikel mit einer Verbindung zur Cytoplasmamembran beobachtet werden, was durch die Größe dieser Öffnung und Lage der Schnittfläche sehr selten zu sehen ist. Die dauerhafte oder temporäre Verbindung der Vesikel mit der CM wird in der Literatur eingehend diskutiert. Da es in früheren Publikationen mit den dort beschriebenen Methoden nicht möglich war, die Verbindungen darzustellen, wurde davon ausgegangen, die Vesikel seien von der CM separiert und liegen frei in der Zelle vor (Gorby *et al.*, 1988). Vesikel mit einer Verbindung zur CM konnten erstmals in AMB-1 beobachtet werden. Hier wurden nicht nur Leervesikel, sondern auch magnetitgefüllte Vesikel mit einer Verbindung zur CM gesehen. Deshalb postulierte Komeili *et al.* (2006), die Magnetosomen hätten eine permanente Verbindung mit der CM. In MSR-1 aber konnte durch Kryoelektronentomografie gezeigt werden, dass Vesikel auch frei im Cytoplasma liegen können (Scheffel *et al.*, 2006). Die Vesikel gehen allerdings durch Invaginationen der Cytoplasmamembran hervor. Ob die Vesikel mit der CM verbunden bleiben oder sich nach Maturation von dieser ablösen, bleibt zu klären. Unwahrscheinlich erscheint dagegen, dass eng verwandte Organismen individuelle Lösungen entwickelt haben, wie es in Komeili *et al.* (2007) vorgeschlagen wurde.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass $\Delta mamB$ unbeweglich war und keine Flagellen mehr bildet. Durch Komplementation von $\Delta mamB$ wird die Magnetitbildung wieder hergestellt, jedoch bleiben die Zellen unbeweglich. Deshalb muss die Unbeweglichkeit spontan während des Deletionsprozesses oder davor durch eine sekundäre Mutation, die keinen Einfluss auf die Magnetitbildung hat, entstanden sein. Dies bedarf jedoch weiterer Klärung und kann hier nicht gänzlich beantwortet werden.

4 Der unmagnetische Phänotyp von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ ist direkt mit der Eisenaufnahme gekoppelt

4.1 Unmagnetische Mutanten haben ein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber Eisen

Die Eisenaufnahme von MSR-1B ist unter Eisenüberschuss um das 3fache im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Das Wachstum dieser unmagnetischen Mutante war unter Eisenmangel ($< 1 \mu\text{M}$) und Eisenüberschuss ($80 \mu\text{M}$) verlangsamt. Außerdem war es nicht möglich, intrazelluläre Membranstrukturen in Ultradünnschnitten von MSR-1B zu finden. MSR-1B ist somit in der gesamten Biomineralisation gestört, was auf das Fehlen eines Großteils der MAI zurückzuführen ist (Schübbe *et al.*, 2003). Die Mutante ist durch die unspezifische Deletion genetisch undefiniert. Auf Grundlage dessen war ein Vergleich der genetisch definierten Mutanten $\Delta mamB$ (und $\Delta mamM$) mit MSR-1 und MSR-1B hinsichtlich des Wachstums und der Eisenaufnahme interessant, da in den Deletionsmutanten nur die Magnetitsynthese gestört ist, nicht aber die Vesikelbildung. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Dosis-Wirkungs-Experimente verdeutlichten, dass das Wachstum des Wildtyps mit steigender Eisenkonzentration stimuliert wird und bei Eisenkonzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ eine Sättigung erreicht. Die Sättigung von c_{mag} trat ebenfalls bei $> 10 \mu\text{M}$ ein, eine schwache Ausrichtung in einem magnetischen Feld war aber bereits bei ca. $2 \mu\text{M}$ extrazellulärem Eisen zu messen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren physiologischen Studien mit MSR-1 (Schüler und Baeuerlein, 1996). Die unmagnetischen Mutanten $\Delta mamB$ und MSR-1B hingegen erreichten bei Eisenkonzentrationen $< 10 \mu\text{M}$ eine ca. 30 % höhere Zelldichte als der Wildtyp. Durch die Hemmung der Magnetitsynthese steht diesen Mutanten das gesamte Eisen für den Zellstoffwechsel zur Verfügung. Mit zunehmender Eisenkonzentration wurde das Wachstum der unmagnetischen Mutanten gehemmt und erreichte nur noch etwa 60 % des Wildtypniveaus. Wahrscheinlich wirkt überschüssiges Eisen, welches nicht für die Magnetitsynthese verwendet werden kann, in den Zellen toxisch. Eine vollständige Wachstumsinhibierung war bei $> 1 \text{mM}$ Eisen zu beobachten und für alle Stämme gleich. Die hier angegebene Inhibitionskonzentration ist um ein Vielfaches höher als in vorherigen Studien angegeben (Schüler und Baeuerlein, 1996). Anzunehmen ist, dass der in der Laborroutine verwendete Wildtyp sich mittlerweile an das Wachstum in einer Umgebung mit artifiziell hohen Eisenkonzentrationen angepasst hat.

In diesem Dosis-Wirkungs-Experiment verhielten sich die unmagnetischen Mutanten $\Delta mamB$ und MSR-1B eher wie nicht-magnetotaktische Mikroorganismen. Bakterien benötigen mindestens $0,01 \mu\text{M}$ Eisen für ein minimales, jedoch $1 \mu\text{M}$ für optimales Wachstum (Neilands *et al.*, 1995). Für magnetitproduzierende Stämme ist die Eisenkonzentration, in der optimales Wachstum möglich ist, durch die Ableitung des

Eisens für die Biomineralisation, wesentlich höher. Die Magnetitbiomineralisation ist aber nicht essentiell für das Wachstum der Zellen, sondern ist ein eigenständiger Prozess, der in die Eisenhomöostase der MTB integriert ist.

Die Ergebnisse demonstrieren zum einen, dass in magnetitproduzierenden Zellen von MSR-1, die biochemischen Stoffwechselwege und die Biomineralisation um das extrazellulär verfügbare Eisen konkurrieren. Zwar konnte für MSR-1 gezeigt werden, dass die Magnetosomengene durch Eisen positiv reguliert werden (Schübbe *et al.*, 2006), doch scheint die Zelle die selbst bei geringen Eisenkonzentrationen hoch effiziente Biomineralisation nicht ausschalten zu können und synthetisiert weiterhin geringe Mengen Magnetit. Dadurch geht biochemisch notwendiges Eisen, welches z.B. als Kofaktor für Enzyme dient (Andrews, 2003), verloren. Zum anderen wurden neue Hinweise auf eine strikte Regulierung des Eisenhaushaltes in MTB gewonnen. Unmagnetische Mutanten weisen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Eisensensitivität, jedoch keine Wachstumshemmung, auf. Da überschüssiges Eisens hier nicht für die Magnetitsynthese verwendet werden kann, muss die Zelle andere Wege finden, mögliche toxische Effekte (Touati, 2000) zu kompensieren.

4.2 Der Eisengehalt der unmagnetischen Mutanten ist deutlich geringer als der des Wildtyps

Von MSR-1B war bekannt, dass dies u.a. durch eine deutlich geringere Eisenaufnahme ermöglicht wird (Schübbe *et al.*, 2003). Messungen des Gesamteisengehaltes zeigten, dass $\Delta mamB$ und MSR-1B etwa gleich viel Eisen aufnehmen und der Wert über verschiedene Eisenkonzentrationen konstant bleibt. Eine aufgenommene Eisenmenge von 1 bis 4 $\mu\text{M g}^{-1} \text{ TG}^{-1}$ deckt damit den biochemischen Metabolismus ab. Die Eisenaufnahme des Wildtyps liegt bei eisenreichen Bedingungen ($> 20 \mu\text{M}$) mehr als eine Größenordnung höher. Die genauen Werte, welche zwischen 20 bis 50fach über den der unmagnetischen Mutanten liegen, hängen dabei von den Kultivierungsbedingungen und der damit verbunden Menge an gebildetem Magnetit ab. So werden Eisengehalte von 1,3 % bis 4 % pro Gramm TG dokumentiert (Blakemore, 1982; Heyen und Schüler, 2003; Schübbe *et al.*, 2003). Die Deletionsmutante $\Delta mamM$ allerdings nimmt konstant etwa nur ein Drittel des Eisens der Mutanten $\Delta mamB$ und MSR-1B auf. Der genaue Grund hierfür konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr geklärt werden.

Dubbels *et al.* (2004) beschrieben eine spontane unmagnetische Mutante des magnetischen Vibrios MV-1, die unter Eisenmangel einen Wachstumsvorteil gegenüber Wildtypzellen hat und deren Eisenaufnahme ebenfalls 20 bis 80fach geringer war. Hier führten zwei spontane Punktmutationen in Wobbelposition eines kupferabhängigen Eisenpermeasegens zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen des mRNA-Transkripts,

was die Translation des Proteins verhinderte. Das Protein scheint direkt Einfluss auf die Eisenaufnahme auszuüben und dabei in Verbindung mit der Biomineralisation zu stehen. Calugay *et al.* (2004) beschreiben die Mutante NMA61 von *M. magneticum* AMB-1, in der die Insertion eines Transposons in ORF4 eines unbekanntes Genclusters zu einem unmagnetischen Phänotypen geführt hat. NMA61 zeigt die gleiche oder nur eine wenig verminderte Eisenaufnahmekapazität wie der Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen. In einer späteren Studie konnte für diese Mutante gezeigt werden, dass sie nicht mehr in der Lage ist, Eisen über die Cytoplasmamembran zu translokalisieren, sei es in oxidiert oder reduzierter Form. Der veränderte ORF4 stellte sich letztendlich als eine cytoplasmatische ATPase heraus, die die Energetisierung der Fe(II)-Aufnahmesysteme in AMB-1 ermöglichen soll (Suzuki *et al.*, 2007). Allerdings bleiben die Ergebnisse dieser Studie zweifelhaft, da die Mutante nicht komplementiert wurde und damit nicht bewiesen wurde, dass diese genetisch klar definiert ist.

Auffällig ist, dass der Eisengehalt der bisher beschriebenen unmagnetischen Mutanten verschiedener MTB noch höher als die nicht-magnetischer Prokaryoten wie *E. coli*, der mit 0,005 bis 0,022 % angegeben wird (Hartmann und Braun, 1981; Matzanke *et al.*, 1989; Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Mößbauerstudien, die begleitend zu zeitabhängigen Magnetit-Induktionsexperimenten an MSR-1B durchgeführt wurden, zeigten Spektren einer nicht näher identifizierten Verbindung, die möglicherweise Eisen-Schwefel-Proteine sein können, die in Wildtypzellen nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorkommen (Faivre *et al.*, 2007). Diese Spektren wurden auch in Mößbauerstudien von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ beobachtet. Es ist möglich, dass unmagnetische Mutanten überschüssiges Eisen durch die Einlagerung in Eisen-Schwefel-Verbindungen detoxifizieren. Dabei stellt sich die Frage, weshalb die Mutanten für die Detoxifizierung von Eisen nicht mehr Ferritine bilden, wie sie in anderen Organismen als klassische cytoplasmatische Eisenspeicherproteine dienen (Wandersman und Delepelaire, 2004). Eine alternative Interpretation wäre, dass Fe-S-Proteine auch als „Eisencarrier“ für die Magnetitsynthese fungieren und es in den unmagnetischen Mutanten zu einer Art Rückstau kommt, was zu einer Akkumulation der Fe-S-Proteine in der Zelle führt. Letztere Erklärung wäre mit den zwei, durch Faivre *et al.* (2007) vorgeschlagenen, metabolischen Routen des intrazellulären Eisens vereinbar. Route 1 bedient den allgemeinen Stoffwechsel (Ferritin und kleine Mengen an Fe^{2+}) und Route 2 die Biomineralisation (Fe^{2+} und Magnetit).

4.3 MamB leistet nur unter magnetitbildenden Bedingungen einen Beitrag zur Eisenaufnahme von MSR-1

Die Ermittlung kinetischer Parameter (K_m , v_{max}) der Eisenaufnahme in MTB wurden bisher nur für MSR-1 durchgeführt, obwohl dadurch detaillierte Informationen über die

Eisenverwertung gewonnen werden (Schüler und Baeuerlein, 1996; Schübbe *et al.*, 2003). Für die Berechnung der Parameter wurde die Eisenaufnahme von MSR-1, MSR-1B, $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$ unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen bei Eisenkonzentrationen von 0 bis 100 μM untersucht. Die Parameter K_M und v_{max} bestätigen, dass der Eisentransport in die Zellen unter aeroben Bedingungen bei MSR-1 und $\Delta mamB$ gleich ist. Daraus kann geschlossen werden, dass *mamB* unter Bedingungen, in denen kein Magnetit synthetisiert wird, keinen Beitrag für die Weiterleitung oder Verteilung von biochemisch genutztem Eisen in der Zelle leistet. Unter mikroaeroben, also magnetitbildenden Bedingungen, ein deutlicher Unterschied in der Eisenaufnahme zwischen Wildtyp und $\Delta mamB$ bzw. MSR-1B zu erkennen. Dabei wird deutlich, dass die stark erhöhte Eisenaufnahme des Wildtyps durch *mamB* ausgelöst wird und Eisen als Magnetit in die Magnetosomen abgelagert wird, was der Anstieg von C_{mag} zeigt. Zum einen ist in Wildtypzellen zu erkennen, dass die Aufnahmegeschwindigkeit des Eisens 3fach höher ist, ohne aber die Aufnahmekapazitäten zu ändern. Wahrscheinlich sind, in den zuvor unter Eisenmangel gezogenen Zellen, alle verfügbaren Aufnahmesysteme in der Cytoplasmamembran dereprimiert und nur die Umsatzrate des Eisens in mikroaerob gezogenen Zellen erhöht, da aufgenommenes Eisen zu einem Großteil in die Magnetosomen abgeführt wird. Für MSR-1 konnte bereits gezeigt werden, dass eisendefiziente Kulturen ein höheres Potential haben, Eisen aufzunehmen und Magnetit zu synthetisieren, als Zellen, die an eisenreiche Bedingungen adaptiert sind (Schüler und Baeuerlein, 1998). In $\Delta mamB$ und MSR-1B ist die Aufnahmegeschwindigkeit im Vergleich zu aeroben Bedingungen etwa 1,6fach höher, jedoch erreicht die Aufnahme eher die Sättigung als in Wildtypzellen. Die Tatsache, dass in diesen beiden Stämmen kein Magnetit gebildet wird und die Gesamteisenaufnahme in stationären Kulturen stark vermindert ist, lässt vermuten, dass die intrazelluläre Weiterleitung des Eisens in die Magnetosomenvesikel gestört ist. Dies würde auch im Einklang mit den weiter oben diskutierten Ergebnissen der Mößbauerstudien stehen, in denen Fe-S-Proteine in den unmagnetischen Mutanten angehäuft werden.

Bisher wurde lediglich ein Eisentransportprotein in MTB charakterisiert. Die unmagnetische Mutante NM5 aus AMB-1 trägt ein Tn5-Transposon in dem Gen *magA* (*amb3992*). Die Transporteigenschaften von MagA wurden in invertierten *E. coli*-Vesikeln nachgewiesen, wonach das Protein in *E. coli* als Exporter wirken sollte. Für MagA wurde eine Funktion als Fe/H-Antiporter vorgeschlagen (Nakamura *et al.*, 1995; Matsunaga und Takeyama, 1998). Daneben wurde die Lokalisation von MagA in der Magnetosomenmembran von AMB-1 angenommen. Aus diesen Ergebnissen heraus wurde MagA als das Protein postuliert, welches Fe(II)-Ionen über die MM transportiert. Allerdings ist die Mutante nie komplementiert worden und bei den Ergebnissen der

Lokalisationsversuche ist anzumerken, dass MagA in der MM nur vermindert im Vergleich mit der CM vorkommt. Dies lässt eher die Annahme zu, MagA ist in der CM lokalisiert (Matsunaga und Takeyama, 1998; Yoshino und Matsunaga, 2006). Darüberhinaus war es in einer proteinbiochemischen Analyse der MM aus AMB-1 nicht möglich, MagA in dieser nachzuweisen. Daher ist Rolle von MagA als Eisentransporter in die Magnetosomen zweifelhaft. In der MM von AMB-1 wurden hingegen MamM- und MamB-Orthologe gefunden (Tanaka *et al.*, 2006).

Aus den Ergebnissen der Eisentransportstudien kann geschlossen werden, dass MamB einen essentiellen Einfluss auf die Eisenaufnahme unter mikroaeroben Bedingungen und auch auf die Magnetitsynthese hat. MamB ist somit der erste charakterisierte magnetosomenspezifische Eisentransporter.

5 MamM- und MamB bilden eine phylogenetisch distinkte Gruppe innerhalb der CDF-Proteine

Orthologe Sequenzen von *mamM* und *mamB* wurden in Genomen, Genomfragmenten und Magnetosomeninseln aller untersuchten Magnetospirillen und MTB anderer phylogenetischer Gruppen gefunden und wurden als MTB-CDF-Transporter bezeichnet. Daneben findet sich, als letztes Gen der *mamAB*-Cluster von AMB-1 und MS-1, ein weiterer ORF eines putativen CDF-Transporters - *mamV*. In dem Genom von MSR-1 und auch in den Magnetosomeninseln von MC-1 und MV-1 ist dieses Gen nicht vorhanden. Die biochemische Untersuchung der Magnetosomenmembran von AMB-1 brachte nur zwei Treffer zu potentiellen Kationentransportern hervor, nämlich die von Amb0967 (MamM) und Amb1007 (MamB) (Tanaka *et al.*, 2006). Überraschenderweise wurde die MamB-Proteinsequenz dem Gen *amb1007* und nicht dem Gen *amb0974*, welches im *mamAB*-Cluster von AMB-1 liegt, zugeordnet. Da es sich bei beiden Sequenzen um exakte Kopien mit einer Identität von 100 % auf DNA-Ebene handelt, kann erst die spezifische Deletion der beiden Gene zeigen, welche der Kopien translatiert und in die MM integriert wird. MamV wurde nicht als MMP identifiziert (Tanaka *et al.*, 2006).

In den vorliegenden Genomen von MSR-1, MS-1, AMB-1 und MC-1 finden sich neben den bereits erwähnten MTB-CDF-Proteinen eine Reihe weiterer CDF-Transporter, die alle Untergruppen dieser Proteinfamilie abdecken (Nies, 2003; Montanini *et al.*, 2007). Es zeigte sich, dass eukaryotische als auch prokaryotische CDF-Proteine, die einer gemeinsamen Unterfamilie zugeordnet werden können, aller Voraussicht nach ein vergleichbares Substratspektrum aufweisen. Sequenzanalysen der vorliegenden CDF-Proteine aus MTB können daher erste Hinweise auf dessen Funktion geben.

Die Genome von MC-1, MSR-1, AMB-1 und MS-1 besitzen neben den MTB-CDF-Transportern 2, 3, 5 bzw. 7 weitere Sequenzen möglicher CDF-Proteine, die außerhalb

der MAI liegen. Diese Proteinsequenzen decken das gesamte Substratspektrum ab und gehören den Untergruppen 1 und 3 an (Ergebnisse Kap. 4.3). Einzig MS-1 besitzt ein Homolog zu ZitB von *E. coli*, einem Zinktransporter der Untergruppe 2 (Grass *et al.*, 2001). MC-1 verfügt nur über 2 weitere mögliche CDF-Proteine. Diese sind ähnlich zu FieF bzw. DmeF aus *C. metallidurans* und könnten demnach ein breites Spektrum an divalenten Kationen transportieren. Die zentrale Rolle von liegt FieF in der Detoxifizierung von Fe(II), die von DmeF in der Kobalthomöostase. Aber auch der Eisentransport konnte für DmeF in *E. coli* demonstriert werden (Munkelt *et al.*, 2004). Die Genome der Magnetospirillen beinhalten Homologe zu FieF aus *E. coli* und DmeF aus *C. metallidurans*. FieF ist in *E. coli* für den Export von Fe(II) über der CM und somit für die Detoxifizierung des Cytoplasmas verantwortlich (Grass *et al.*, 2005). Interessant ist hierbei, dass die Spirillen über mehrere Paraloge eines CDF-Proteins verfügen. So hat MS-1 3 FieF-Homologe, AMB-1 immerhin 2. MSR-1 enthält zwar nur 1 FieF-Homolog, enthält dafür aber 2 Homologe zu DmeF, ebenso wie MS-1 und AMB-1. Damit besitzen magnetotaktische Spirillen unter den bisher untersuchten prokaryotischen Genomen die höchste Zahl von Vertretern dieser Proteinfamilie. Im Allgemeinen enthalten Bakterien und Archaeen 0 bis 4 CDF-Transporter, die überwiegend der Untergruppe 2 und 3 angehören (Nies, 2003; Munkelt *et al.*, 2004). Auffällig ist vor allem, dass Magnetospirillen eine überproportionale Anzahl an Fe(II)-CDF-Proteinen haben und somit ist anzunehmen, dass der cytoplasmatischen Metallhomöostase, vor allem der Regulierung des Eisens, eine große Bedeutung zukommt.

MTB-CDF-Proteine bilden eine eigenständige Untergruppe innerhalb der Fe/Zn-transportierenden CDF-Proteine. Die spezialisierte Funktion dieser Proteine wird dadurch unterstützt. Gegen eine funktionelle Äquivalenz der MTB-CDF und Fe/Zn-CDF-Transportern spricht auch, dass die Deletionsmutante $\Delta mamB$ nicht mit FieF_{*E. coli*} zu komplementieren ist. Ebenso verhält sich eine Komplementation mit YdfM von *B. subtilis*, obwohl die Sequenzähnlichkeit zu MamB hoch ist. Allerdings waren die MamB-Orthologe von MC-1, MV-1 und dem Teichklon ebenfalls nicht in der Lage, die Magnetitsynthese wieder herzustellen. Einzig MamB von MS-1 regeneriert die Biomineralisation. Einerseits ist auch hier nicht auszuschließen, dass die Expressionsrate vom plasmidbasierten Promotor zu gering ist. Andererseits ist es aber möglich, dass die Lokalisationsmaschinerie der MMP in Magnetospirillen so spezifisch ist, dass die eingesetzten Proteine nicht in den Syntheseweg in MSR-1 integriert werden können.

6 Das N-terminale CXXC-Motiv ist wahrscheinlich essentiell für die spezifische Funktion von MamM und MamB

Diverse hoch konservierte Aminosäurereste sind an der Bindung und dem Transport der Schwermetalle in CDF-Proteinen beteiligt. FieF aus *E. coli* ist strukturell und biochemisch das bestuntersuchte CDF-Protein. *In vivo* ist FieF ein Eiseneffluxprotein, *in vitro* ist es in der Lage, eine Reihe divalenter Kationen zu transportieren, u.a. auch Zink (Grass *et al.*, 2005; Wei und Fu, 2006). In 2007 konnte die Struktur des CDF-Transporters FieF mit Zn(II) als Bindungspartner aufgeklärt werden (Lu und Fu, 2007). Das Modell für die Zinktranslokation wird anhand der Strukturdaten wie folgt vorgeschlagen: Zn(II) wird aus dem Cytoplasma über die C-terminalen Bindungsstellen Z3 und Z4 (H232, H261, H283, D285) aufgenommen und über die Bindungsstelle Z2 (D68, H75) zu Z1 (D45 und D49 aus TMH2, sowie H153 und D157 aus TMH4) geleitet, wo es dann in das Periplasma abgegeben wird.

So sind D49 und D157 in allen CDF-Proteinen, einschließlich der MTB-CDF, konserviert. Eine spezifische Beteiligung von D157 an der Bindung von Zn(II) und Cd(II) durch FieF wurde *in vitro* gezeigt. Dieser Aspartatrest hat jedoch keine Bedeutung für die Fe(II)-Bindung (Wei und Fu, 2006). Weitere, an der Zinkbindung von FieF beteiligten, Aminosäurereste sind in den MTB-CDF-Homologen von MamM und MamB nur teilweise konserviert. So ist H153 in MamB durch ein Aspartat ersetzt. D45 ist in MamB, sowie anderen Vertretern der Untergruppe 1 und 2 ein Histidin, in MamM ist es gegen Tyrosin substituiert. MamB fehlt ebenfalls H75 der Bindungsstelle Z2. Die C-terminalen Bindungsstellen Z3 und Z4 sind in den Vertretern der Untergruppen 1 und 2 konserviert oder durch Aminosäurereste mit gleichen chemischen Eigenschaften ersetzt. In MTB-CDF-Transportern aber sind diese Reste nicht homolog und eine cytoplasmatische Zinkbindungsstelle ist nicht durch einen direkten Vergleich auszumachen. Die geringe Konservierung der für die Zinkbindung in FieF verantwortlichen Aminosäurereste ist ein weiteres Indiz für eine hohe Spezialisierung der MTB-CDF auf den Transport von Eisen *in vivo*. Des Weiteren ist das CDF3-spezifische L27 nicht an der Zinkbindung von FieF beteiligt (Lu und Fu, 2007). Da dieses Lysin in allen CDF-Proteinen der Untergruppe 1 und 2 durch ein Glutamat substituiert ist, ist es womöglich an der Eisenbindung beteiligt.

Darüberhinaus besitzen MTB-CDF-Proteine ein auffälliges CXXC-Motiv im N-terminalen, nicht membranständigen Bereich, das weder in Proteinen der CDF3, noch der anderen CDF-Untergruppen zu finden sind. Diesem Motiv werden in der Literatur verschiedene Funktionen zugeschrieben. In Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen sind CXXC-Motive auf Grund ihres variablen Redoxpotentials essentiell für die Katalyse der Redoxreaktion (Chivers *et al.*, 1997). In erster Linie ist dieses Motiv aber eine Metallbindedomäne. So finden sich CXXC-Domänen zur Koordination von Metallionen in

Zinkfingerproteinen oder Eisen-Schwefel-Clustern (Davis und o'Halloran, 2008) oder in verschiedenen Proteinen, die am Kupferstoffwechsel beteiligt sind, wie der kupferregulierte Transkriptionsfaktor CueR oder der kupfertranslokalisierenden P-Typ ATPase CopA aus *E.coli* (Rensing *et al.*, 1999; Rensing *et al.*, 2000). Auch in Metallchaperonen sind CXXC-Motive notwendig für die Metallbindung und Proteininteraktion (Tottey *et al.*, 2002).

Komplementationsversuche von $\Delta mamB$ mit Austauschvarianten des CXXC-Motivs in MamB waren unfunktional. Das N-terminale CXXC-Motiv scheint demnach essentiell für die Funktion von MamB in MSR-1 zu sein. Da der N-Terminus von FieF im Cytoplasma liegt (Lu und Fu, 2007) und auch Strukturvorhersagen diesen Bereich von MamM und MamB in das Cytoplasma lokalisieren, kann darüber spekuliert werden, dass die CXXC-Domänen an der Bindung von Eisen aus dem Cytoplasma beteiligt sind.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass in jüngeren Ansätzen immer häufiger darüber diskutiert wird, ob die Metallkationen von einem Bindeprotein, vielleicht ein Metallchaperon, im Cytoplasma gefangen und dann an die Metallbindungsstellen der CDF-Proteine geliefert werden (Chao und Fu, 2004; Haney, 2005; Lu und Fu, 2007; Nies, 2007). Erste Hinweise auf eine Interaktion von CDF-Transportern mit anderen Proteinen liefert der humane CDF-Transporter ZnT1 und sein Homolog CDF1 aus *C. elegans*, welche in der Lage sind, die Ras-vermittelte Signalkaskade zu regulieren (Bruinsma *et al.*, 2002). Die Regulierung geschieht durch direkte Interaktion des C-Terminus von ZnT1 oder CDF1 mit der regulatorischen Domäne von Raf-1 (Jirakulaporn and Muslin 2004). Auch für die Entgiftung von Kupfer wurden in Eu- sowie Prokaryoten wurden Metallchaperone gefunden. Zum Beispiel fungiert das Chaperon CopZ als Kupferlieferant für den Cu(I)-regulierten Repressor CopY. CopZ wiederum ist ein Homolog zu dem periplasmatischen Quecksilberchaperon MerT. Allen diesen Proteinen gemeinsam ist ein CXXC-Motiv (Rensing *et al.*, 1999). In MSR-1 wäre die Fe(II)-Lieferung an die Metallbindestelle von MamM und MamB durchaus denkbar. So könnten Fe(II)-Ionen effektiv eingefangen und gezielt der Fe₃O₄-Synthese zugeführt werden.

7 MamM und MamB bilden möglicherweise eine funktionelle Einheit

Doch weshalb benötigen MTB zwei divergente CDF-Proteine für den magnetosomalen Eisentransport? MamM und MamB aus MSR-1 sind funktional nicht äquivalent. Die Expression von MamM_{MSR-1} ist nicht in der Lage $\Delta mamB$ zu komplementieren. Auch der drastische Effekt der Deletion eines der beiden Gene, ein in der Magnetitsynthese unterbundener Phänotyp, spricht gegen die gleiche Funktion von MamM und MamB während der Biomineralisation. Zwei paraloge CDF-Proteine sind auch in der

Mitochondrienmembran von Hefen lokalisiert. Die eisentransportierenden Proteine MFT1p und MFT2p haben eine Identität von 52 % und eine Ähnlichkeit von 75 %. Eine einfache Deletion in einem der beiden Gene zeigt keinen Phänotyp. Die Doppeldeletion der Gene dagegen führt zu einem Wachstumsdefekt in eisenlimitierten Medium, was auf eine funktionelle Redundanz der Gene hinweist. Eine Überexpression eines der beiden Proteine ist in der Lage, die Wachstumslimitierung des Stammes $\Delta MFT1\Delta MFT2$ unter Eisenmangel zu kompensieren. MFT1p und MFT2p übernehmen demnach die gleiche Funktion im mitochondrialen Eisentransport und ergänzen einander (Li und Kaplan, 1997). MamM und MamB hingegen haben für die Magnetitbildung erforderliche, nicht redundante Aufgaben im Eisentransport.

Grundsätzlich werden CDF-Transporter *in vivo* als homodimere Proteine beschrieben (Nies, 2003; Haney, 2005). So konnten z.B. für den eukaryotischen Zinktransporter ZAT1p, für den prokaryotischen Eisentransporter FieF sowie für den ebenfalls prokaryotischen Cadmiumtransporter CzcD Homodimere nachgewiesen werden (Anton *et al.*, 2001; Bloß *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004; Wei und Fu, 2006). An einem anderen Beispiel konnte außerdem die Bildung von Heterodimeren aufgezeigt werden. Die CDF-Proteine Msc2p und Zrg17p sind Teil des Zinktransports in das Endoplasmatische Retikulum (ER) von Hefen. Der Phänotyp der Doppelmutante $\Delta msc2\Delta zrg17$ hatte, anders als im Falle von $\Delta MFT1\Delta MFT2$ keinen additiven Effekt auf die Zinkzufuhr in das ER. Bereits die Einzelmutationen führten zu vergleichbaren temperaturabhängigen, zinksupprimierten Wachstumsdefekten. Msc2p und Zrg17p greifen also in denselben Weg des Zinktransports in das ER ein. Auch war es nicht möglich, den Funktionsverlust des einen Transporters durch Überexpression des anderen zu kompensieren. Mittels „Tandem-Affinitäts-Reinigung“ (TAP) wurde dann die Interaktion von Zrg17p und Msc2p bewiesen (Ellis *et al.*, 2005).

Aufgrund der vergleichbaren Auswirkungen der Mutantenphänotypen von $\Delta mamM$ und $\Delta mamB$, sowie der Ergebnisse der Komplementationsversuche wurde vermutet, dass MamM und MamB ein Heterodimer bilden. Zur Untersuchung wurde das Prinzip der „Tandem-Affinitäts-Reinigung“ abgewandelt (Rigaut *et al.*, 1999) und durch die Verwendung des Strep-Tags in eine Ein-Schritt-Reinigung vereinfacht (Junttila *et al.*, 2005). Dazu wurde ein bicistronisches Operon aus *mamM* und *mamB* in einem Überexpressionsvektor (pET51-b) konstruiert und in *E. coli* exprimiert wurde. Für die Reinigung des potentiellen Komplexes wurde MamB mit einem C-terminalem Strep-Tag fusioniert. Nach der Reinigung war deutlich zu erkennen, dass ein Großteil von MamM mit MamB-Strep koeluiert. Die Anreicherung von MamM ist aber nicht so effizient wie die von MamB-Strep. Dies liegt zum einen an den artifiziellen Expressionsbedingungen in *E. coli*, die zur Folge hatten, dass die Expressionsrate von MamB-Strep höher war als von

MamM. Zum anderen bedarf die Reinigung der Membranproteine einer Solubilisierung der CM des Wirtsorganismus, was Einfluss auf die Stabilität des Proteinkomplexes haben kann.

Die gemeinsame Elution von MamM und MamB über einen Affinitätstag gibt einen Hinweis auf die Bildung eines funktionellen Komplexes *in vivo*. Für die Bildung eines solchen müssten MamM und MamB spezifisch interagieren. Deshalb ist es weiterhin möglich, dass die Komplementation von $\Delta mamB$ mit *mamB*-Derivaten magnetotaktischer Bakterien anderer phylogenetischer Gruppen erfolglos bleibt, weil diese Proteine nicht als Interaktionspartner von MamM in MSR-1 erkannt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass die bereits oben erwähnten Hefemutanten $\Delta msc2$, $\Delta zrg17$ oder $\Delta msc2\Delta zrg17$ nicht heterolog komplementierbar sind, wenn die humanen Zinktransporter ZnT5 und ZnT6 einzeln in der Mutante exprimiert werden. Andererseits demonstriert der Versuch auch die Spezifität der Interaktionspartner bei der Ausbildung eines heterodimeren CDF-Transporters (Ellis *et al.*, 2005).

8 MamM und MamB sind sowohl in der Cytoplasmamembran als auch der Magnetosomenmembran lokalisiert, jedoch letzterer stark angereichert

MamM und MamB sind *bona fide* Proteine der Magnetosomenmembran. Das konnte bereits durch proteomische Untersuchungen der MM gezeigt werden (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004). Offen blieb jedoch die Frage, ob die Proteine im Zellzyklus auch in anderen Zellfraktionen lokalisiert sind, was wiederum Hinweise auf den Lokalisierungsmechanismus von MamM und MamB geben würde.

Die *in vitro* Analyse mittels Antikörpern an Zellfraktionen von MSR-1 zeigte, dass MamM und MamB in der Cytoplasmamembran als auch der Magnetosomenmembranfraktion nachzuweisen sind. In der MM sind die beiden Proteine aber stark angereichert, wodurch MamM und MamB als Bestandteile der MM bestätigt sind. Allerdings kann durch diese Methode nicht geklärt werden, ob das Signal in der CM tatsächlich auf eine Integration der Proteine in diese hervor geht oder ob das Signal von Magnetosomenleervesikeln ausgeht, die mit der Cytoplasmamembran kofraktioniert werden.

Für weitergehende Informationen wurden *in vivo* Untersuchungen von MamM und MamB mit Gfp als Fusionspartner durchgeführt. Es zeigte sich, dass keine der N-terminalen Fusionen fluoreszierte. Obwohl die Lage des N-Terminus beider Proteine im Cytoplasma vorhergesagt wird, kann es möglich sein, dass der kurze N-Terminus von MamM und MamB durch die Nähe zu den hydrophoben Transmembransegmenten die Faltung des hydrophilen GFPs verhindert. C-terminale Fusionen von MamB

komplementierten zwar $\Delta mamB$, aber fluoreszierten nur sehr schwach, so dass es nicht möglich war, aussagekräftige Aufnahmen zu machen. Hier war es möglich, dass die *in trans* Expression der Fusionsproteine nicht ausreichte, um eine adäquate Fluoreszenz zu erzeugen.

Allerdings fluoreszierten C-terminale MamM-Gfp-Fusionen in einem ausreichenden Maße. Das Fluoreszenzmuster der Gfp-Fusion in MSR-1 bestätigte eine Lokalisierung der MamM in der Cytoplasmamembran und in der Magnetosomenmembran. Expressionen von MamM-Gfp in den Mutantenhintergründen spiegelten den jeweiligen Phänotyp wieder. So konnte in der magnetosomenfreien Mutante MSR-1B nur eine Lokalisation in der CM beobachtet werden. In $\Delta mamJ$ hingegen war ein zusätzliches punktförmiges Signal zu sehen, welches konsistent mit den kollabierten Magnetosomenketten des Mutantenphänotyps war. Das Fluoreszenzmuster von MamM-Gfp ist homogen über die gesamte CM verteilt. Leervesikel hingegen bilden bereits eine kettenförmige Struktur und sind nur vereinzelt über die Innenseite der CM verteilt (Komeili *et al.*, 2006; Scheffel *et al.*, 2006). Damit ist MamM das erste Magnetosomenmembranprotein von dem gezeigt werden konnte, dass es nicht ausschließlich in die MM, sondern *in vivo* auch in die Cytoplasmamembran integriert. Im Gegensatz dazu zeigten Gfp-Fusionen der MMPs MamC, MamF und MamG lediglich ein kurzes strichförmiges Signal in der Zellmitte, welches konsistent mit der Lage der Magnetosomenkette in MSR-1 ist, jedoch kein Signal in der CM (Lang und Schüler, 2008). Gfp-Fusionen der Proteine MamJ und MamK, die die Vesikel an einem Filament verankern bzw. das Filaments ausbilden, haben ein distinktes lineares Fluoreszenzsignal von Zellpol zu Zellpol (Komeili *et al.*, 2006; Scheffel *et al.*, 2006). Das Protein MamA wurde ebenfalls in der MM von MSR-1 und AMB-1 gefunden (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). Dieses Protein entwickelt eine dynamische Lokalisierung während des Zellwachstums. Während das Signal in der logarithmischen Wachstumsphase von Zellpol zu Zellpol reicht, sind in der stationären Phase punktförmige Signal zu erkennen (Komeili *et al.*, 2004).

Auffällig dabei ist, dass die verschiedenen Proteingruppen durch unterschiedliche Mechanismen in der MM positioniert werden. Während MamC, MamF und MamG vermutlich gezielt in die MM geleitet werden, wird MamM (und auch eventuell auch MamB) wahrscheinlich in einem ersten Schritt zufällig in die inneren Membranen inseriert. In die CM integriertes MamM kann nun auf zwei Wegen korrekt lokalisiert werden. Zum einen ist es möglich, das Protein selektiv in der CM zu degradieren. Zum anderen kann das Protein von der CM in die MM diffundieren und dort eingefangen werden (Rudner *et al.*, 2002). Denkbar wäre, dass in der MAI von MSR-1 Gene mit Ähnlichkeiten zu HtrA-Serinproteasen und PDZ-Domänen gefunden wurden. Diese Proteine können

verschiedene Funktionen bei der Proteindegradation und -positionierung übernehmen (Grünberg *et al.*, 2001; Schüler *et al.*, 2004).

9 MamM und MamB können heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert werden

Neben genetischen Experimenten sind biochemische Daten aus Metallbindungs- oder Aufnahmestudien von MamM und MamB rekonstituiert in Proteoliposomen unverzichtbar, um den Eisentransport direkt zu beweisen. Da die MMP in Wildtypzellen weniger als 1 % des Gesamtproteins ausmachen (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004), kein geeignetes Expressionssystem in MSR-1 zur Verfügung stand und zudem die Massenanzucht von MSR-1 zeitaufwändig ist, wurde ein heterologes System zur Expression und Reinigung von MamM und MamB in *E. coli* etabliert.

Die Suche nach einem geeigneten System zur Überexpression und Reinigung von integralen Membranproteinen bleibt jedoch nach wie vor schwierig (Loll, 2003; Klammt *et al.*, 2004; Eshaghi *et al.*, 2007). Anders als lösliche Proteine, die sich nach Loslösung vom Ribosom im Cytoplasma spontan falten, müssen Membranproteine von der Translokationsmaschinerie in die Membran inseriert werden. Da die Transkription, Translation und Translokation in Prokaryoten gekoppelt sind, kann die Überexpression eines Membranproteins den Sekretionsweg eines Organismus überlasten. Oft führt dies zu einem toxischen Effekt in der Zelle, zu einer Fehlfaltung mit anschließender Degradierung oder der Ablagerung des Proteins in „Inclusion Bodies“ (IB) (Drew *et al.*, 2003; Loll, 2003; Baneyx und Mujacic, 2004). Da die Rückfaltung von Membranproteinen schwierig und der Proteinverlust dieser Methode hoch ist, sollte die Bildung von IB vermieden und MamM und MamB in die CM exprimiert werden. Eine Strategie zur Vermeidung der IB-Bildung ist die Reduktion der Expressionstemperatur und damit verbunden die Reduzierung der Transkriptions-/Translationsrate (Terpe, 2006). Deshalb wurden für jeden neu konstruierten Expressionsvektor die Wachstumsbedingungen optimiert.

Allerdings zeigte sich, dass nicht jedes Plasmidsystem für die Expression von MamM und MamB geeignet ist. Von Plasmiden der pASK-Reihe (IBA Göttingen), erfolgt keine Expression von MamM oder MamB, weder mit N- noch mit C-terminalem Strep-Tag II. In erster Linie wurde diese Plasmidserie verwendet, weil mit dieser erfolgreich diverse prokaryotische CDF-Proteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden konnten. Neben der homologen Expression von ZitB (Lee *et al.*, 2002) und FieF (Grass *et al.*, 2005), konnte CzcD von *C. metallidurans* mittels pASK-IBA5 in *E. coli* exprimiert und bis zu 7 mg CzcD pro Liter Kultur gereinigt werden (Anton *et al.*, 2001; Weltrowski *et al.*, 2006).

Die Expression von Plasmiden der pET-Serie (Novagen) war in allen Fällen erfolgreich. Ein Kriterium für die ausreichende Proteinbildung und Membranintegration war die Auswahl der Expressionsstämme. Hier zeigte sich, dass *E. coli* Rosetta(DE3), ein Derivat von BL21(DE3), das meiste Protein bildet. Rosetta(DE3) trägt das Plasmid pRARE. U.a. codiert pRARE das tRNA-Gen *proL* (Kodon CCC), welches in *mamM* 5x und in *mamB* 4x vorhanden ist. In *E. coli* B-Stämmen ist CCC ein seltenes Kodon, was nur in 0,24 % aller Gene für Prolin kodiert ((Sorensen und Mortensen, 2005), www.kazusa.or.jp). Bereits die Überrepräsentation eines seltenen Kodons kann zu Translationsproblemen bei der Expression eines rekombinanten Proteins führen (Kane, 1995). Für eine erfolgreiche Überexpression von *mamM* und *mamB* scheint die ausreichende Bereitstellung von *proL* von Bedeutung sein.

Im Laufe der Versuche zeigte sich auch, dass MamM in *E. coli* in einer größeren Menge in die Membran integriert als MamB, wenn beide Proteine mit einem kurzen N-terminalen Affinitätstag (His-Tag, Strep-Tag) fusioniert sind. Möglich ist, dass ein N-terminaler Tag bei der Faltung und Integration von MamB störend wirkt. Bekräftigt wird diese Vermutung, weil MamB fusioniert mit einem C-terminalen Strep-Tag II stabil in die CM integriert. Weshalb ein gleich markiertes MamM stabil in die Membran exprimiert wird, obwohl der Aufbau des N-Terminus in beiden Proteinen ähnlich ist, bleibt vorerst ungeklärt.

Nicht jeder der getesteten Affinitätstags eignete sich für die Reinigung von MamM und MamB. Zwar wurde Gst-MamB ausreichend exprimiert, aber das Protein lag in Inklusionskörpern vor und konnte nur mit Harnstoff gelöst werden. Danach war eine Affinitätsreinigung nicht mehr möglich. Für biochemische *in vitro* Versuche hätte das gereinigte Gst-fusionierte MamB allerdings mittels spezifischer Proteasen von MamB getrennt werden müssen, da die Gst-Domäne auf Grund ihrer Größe vermutlich Einfluss auf die Faltung und Funktion des Transporters gehabt hätte (Terpe, 2003). Ebenso hätte ein His-Tag entfernt werden müssen, da der Tag selbst eine hohe Affinität zu divalenten Metallkationen aufweist und *in vitro* Experimente stören würde. Die gebildete Proteinmenge von MamM war aber nie höher als 1,5 mg pro l Kultur und damit nicht ausreichend für eine weitere Prozessierung. Um einen kurzen Tag zu finden, der aller Voraussicht nach nicht die Faltung der rekombinanten Proteine stört, aber auch keine Affinität zu potentiellen Substraten hat, fiel die Wahl für weitere Arbeiten auf den Strep-Tag II. Mit einem N-terminalen Strep-Tag konnten bis zu 2 mg MamM pro l Kultur gereinigt werden. Allerdings war es nicht möglich, in DDM solubilisiertes MamM über 2 mg/ml zu konzentrieren, ohne das Protein zu präzipitieren.

Die Instabilität von vielen Membranproteinen in Detergenzien, welche oft in der Inaktivierung der Proteinfunktion oder Präzipitation durch Konformationsänderungen

resultiert, wird in diversen Übersichtsartikeln diskutiert. Trotzdem bleibt dies weiterhin ein nur schwer zu überwindendes Problem. Lösungsansätze könnten in folgenden Arbeiten eventuell durch Variation der Art und der Konzentration der eingesetzten Detergenzien gefunden werden (Kiefer, 2003; Bowie, 2005; Zhou *et al.*, 2008).

Das so gereinigte MamM wurde in Proteoliposomen rekonstituiert und dies mittels Immunodetektion nachgewiesen. Als Grundlage hierfür diente ein Protokoll mit dem bereits FieF in Lipidvesikel eingebaut wurde (Grass *et al.*, 2005). Wie bereits in vorherigen Blot war neben dem Signal für MamM eine Bande in etwa der doppelten Größe zu sehen, was auf die Bildung eines Homodimers hindeutet. Auch wenn in dieser Arbeit angenommen wird, dass MamM und MamB in der MM ein Heterodimer bilden, steht diese Beobachtung nicht im Gegensatz zu dem Postulat. Proteoliposomen sind künstliche Vesikel aus einem eingesetzten, hoch konzentrierten Protein und Phospholipiden. Letztere bilden eine Lipiddoppelschicht, die die natürliche Beschaffenheit der CM ersetzen soll (Seddon *et al.*, 2004). Da alle bisher untersuchten Proteine der CM homo- oder heterooligomere Komplexe bilden, wäre es nicht überraschend, dass MamM in diesem Lipidsystem artifizielle Homodimere ausbildet, wenn es stabil integriert werden soll.

Auch wenn der direkte Beweis des Eisentransports in Proteoliposomen auf Grund methodischer Probleme nicht weiter verfolgt werden konnte, hat die Etablierung der Expression und Reinigung von MamM und MamB den Weg für künftige definierte biochemische Experimente geebnet.

10 Resümee und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von zwei Proteinen der Magnetosomenmembran untersucht. Die Proteine MamM und MamB gehören der Familie der CDF-Transporter an und fallen hier in die CFD3-Untergruppe potentieller Fe(II)-Transporter. In dieser wiederum bilden sie zusammen mit Orthologen aus anderen magnetotaktischen Bakterien eine distinkte Gruppe, die als MTB-CDF definiert wurde.

Der Schlüsselpunkt in der *in vivo* Untersuchung von *mamM* und *mamB* war die Erstellung von unmarkierten Deletionsmutanten, welche die Fähigkeit, Magnetit zu synthetisieren, verloren haben. Physiologische Studien haben gezeigt, dass der Verlust von *mamB* nur unter mikroaeroben Bedingungen einen Einfluss auf den Eisenhaushalt von MSR-1 hat. Zusammen mit der Beobachtung, dass Δ *mamB* Magnetosomenleervesikel bildet, MamB und MamM in der MM stark angereichert und die einzigen Proteine mit Ähnlichkeiten zu Metalltransportern sind, kann der spezifische Transport von Eisenionen über die Magnetosomenmembran durch MamB geschlussfolgert werden. Eine endgültige Aussage über die Funktion von MamM kann auf

Grund der Polarität der Mutante jedoch nicht gemacht werden. Die Deletionsmutanten bieten aber eine Möglichkeit für detaillierte Studien zum Eisentransport in die Magnetosomenvesikel. So können z.B. Aufnahmeexperimente mit respiratorischen Inhibitoren Aufschluss über die Energetisierung der CDF-Proteine geben. Da die Deletionsmutanten im Vergleich zu nicht-magnetischen Prokaryoten deutlich mehr Eisen aufnehmen, wäre eine Untersuchung der Eisenspeicherung dieser Mutanten interessant. Auch wirft die offensichtliche Anpassung der Eisenaufnahme in unmagnetischen Mutanten Fragen nach dem Hintergrund und der Art der Regulierung des Eisenhaushalts in MTB auf.

Mittels Gfp-Fusionen, exprimiert in verschiedenen Mutantenhintergründen, konnte die Integration von MamM in die CM als auch in die MM dargestellt werden. Damit lokalisiert MamM unterschiedlich zu MamC, welches ausschließlich in die MM inseriert. Daher wäre ein Ansatzpunkt für weitere Arbeiten, die Untersuchung der einzelnen Lokalisationswege für Proteine der MM. Zu klären bliebe des Weiteren, ob MamM in der CM aktiv ist. Auch bleibt die Frage, ob MamM spontan in beide Membranen integriert, oder ob es erst in die CM inseriert und anschließend in die MM geleitet wird.

Nicht alle der konstruierten Gfp-Fusionen von MamM und MamB fluoreszierten. Neben der möglichen Fehlfaltung der fusionierten Transmembranproteine, kann die Lage der Termini ausschlaggebend für die Funktion des Gfp sein. Mittels Gfp/PhoA-Fusionen und einem adäquaten Expressionssystem für MSR-1 könnte daher die Topologie von MamM und MamB in der MM ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, die Transportrichtung der Proteine zu untersuchen und dadurch zu klären, ob das Eisen direkt aus dem Periplasma in die MM gelangt oder über das Cytoplasma.

Auch bleibt die Frage, weshalb in der MM zwei verschiedene CDF-Proteine lokalisiert sind. Durch den drastischen Effekt der Deletion eines der Gene auf die Magnetitbildung kann ausgeschlossen werden, dass die Proteine die gleiche Aufgabe in der Synthese übernehmen, zumal eine Komplementation von $\Delta mamB$ mit MamM den magnetischen Phänotyp nicht wieder herstellte. Allerdings lieferte die heterologe Koexpression von MamM und MamB in *E. coli* erste Hinweise auf eine Heterodimerbildung. Die Methode war aber zum Abschluss der Arbeit noch in der Aufbauphase und bedarf weiterer Optimierung.

Interessant ist im diesem Zusammenhang auch, dass die heterologe Komplementation von $\Delta mamB$ nur durch *mamB* des nah verwandten *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 möglich war, nicht aber durch Paraloge weiter entfernter MTB. Auch die Komplementation mit FieF von *E. coli* und YdfM von *B. subtilis* blieb erfolglos. Hier bleibt zu klären, weshalb MSR-1($\Delta mamB$) nur MamB_{MSR-1} und MamB_{MS-1} als fehlenden Bestandteil der MM erkennt.

Auch zeigte sich nach der Untersuchung der vorläufigen Genomsequenz von MSR-1 und anderen Vertretern der MTB, dass diese Prokaryoten sehr viele und vor allem redundante CDF-Sequenzen aufweisen, die überproportional oft an einem potentiellen Fe(II)-Transport beteiligt sein könnten. Hier gilt es zu klären, welche Funktion die einzelnen CDF-Proteine haben und wodurch diese spezifisch abhängt.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein System zur heterologen Expression und Reinigung von MamM und MamB in *E. coli* etabliert. Dadurch ist es nun möglich, die Membranproteine für biochemische *in vitro*-Untersuchungen zu gewinnen. So können Metallbindungsstudien an nativen als auch chemisch modifizierten MamM und MamB durchgeführt werden. Außerdem sollte es möglich sein, die Proteine in Proteoliposomen zu rekonstituieren, wodurch der direkte Beweis des Metalltransportes erhalten werden kann. Letztendlich hat die Expression und Reinigung von MamM und MamB auch den Weg für deren künftige Strukturaufklärung geebnet.

E Literaturverzeichnis

- Abdul-Tehrani, H., A.J. Hudson, Y.S. Chang, A.R. Timms, C. Hawkins, J.M. Williams, P.M. Harrison, J.R. Guest and S.C. Andrews** (1999). Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**(5): 1415-28.
- Amann, R., J. Peplies and D. Schüler** (2007). Diversity and taxonomy of magnetotactic bacteria. In D. Schüler (ed), *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer Heidelberg: 25-36.
- Andrews, S. C., A.K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 215-237.
- Anton, A.** (2001). Genetische und biochemische Charakterisierung von CzcD und anderen Regulatoren der *czc*-vermittelten Schwermetallresistenz in *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle/Saale
- Anton, A., A. Weltrowski, C.J. Haney, S. Franke, G. Grass, C. Rensing and D.H. Nies** (2004). Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**(22): 7499-7507.
- Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl and D.H. Nies** (1999). CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia sp.* strain CH34. *J. Bacteriol.* **181**(22): 6876-6881.
- Arakaki, A., J. Webbs and T. Matsunaga** (2003). "A Novel Protein Tightly Bound to Bacterial Magnetite particles in *Magnetospirillum magnetotacticum* Strain AMB-1." *J. Biol. Chem.* **278**(10): 8745-8750.
- Balkwill, D., D. Maratea and R.P. Blakemore** (1980). "Ultrastructure of a magnetotactic spirillum." *J. Bacteriol.* **141**: 1399-1408.
- Baneyx, F. and M. Mujacic** (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* **22**(11): 1399-1408.
- Bazylnski, D.** (1995a). Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**(7): 337-343.
- Bazylnski, D. and S. Schübbe** (2007). Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **62**: 21-62.
- Bazylnski, D. and T. Williams** (2007). Ecophysiology of magnetotactic bacteria. In D. Schüler (ed), *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer Heidelberg: 37-75.
- Bazylnski, D.A., A. Garratt-Reed and R.B. Frankel** (1994). Electron-microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Res. Tech.* **27**(5): 389-401.
- Bazylnski, D.A., A. Garratt-Reed, A. Abedi and R.B. Frankel** (1993). Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* **160**(1): 35-42.

- Bazylinski, D.A. and R. B. Frankel** (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev.* **2**: 217-230.
- Bazylinski, D.A., R.B. Frankel and H.W. Jannash** (1988). Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature* **334**: 518-519.
- Bazylinski, D.A., R.B. Frankel, B.R. Heywood, S. Mann, J.W. King, P.L. Donaghay and A.K. Hanson** (1995b). Controlled biomineralization of magnetite and greigite in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(9): 3232.
- Bell, P. E., A.L. Mills and J.S. Herman** (1987). Biogeochemical conditions favoring magnetite formation during anaerobic iron reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(11): 2610-2616.
- Blakemore, R.P.** (1982). Magnetotactic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 217-238.
- Blakemore, R.P.** (1975). Magnetotactic bacteria. *Science* **190**: 377-379.
- Bloß, T., S. Clemens and D.H. Nies** (2002). Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organism and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**: 783-791.
- Bowie, J.U.** (2005). Solving the membrane protein folding problem. *Nature* **438**: 581-589.
- Braun, V. and K. Hantke** (2007). Acquisition of iron by bacteria. In S. Silver and D.H. Nies (ed), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer Heidelberg. **6**: 189-219.
- Bruinsma, J.J., T. Jirakulaporn, A.J. Muslin, and K. Kornfeld** (2002). Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling. *Dev. Cell.* **2**(5): 567-578.
- Calugay, R.J., H. Miyashita, Y. Okamura and T. Matsunaga** (2003). Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiol. Let.* **218**: 371-375.
- Cartron, M.L., S. Maddocks, P. Gillingham, C.J. Craven and S.C. Andrews** (2006). Feo-Transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**: 143-157.
- Chao, Y. and D. Fu** (2004). Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YiiP. *J. Biol. Chem.* **279**(17): 17173-17180.
- Chivers, P.T., K.E. Prehoda and R.T. Raines** (1997). The CXXC Motif: A Rheostat in the Active Site. *Biochemistry* **36**(14): 4061 -4066.
- Copass, M., G. Grandi and R. Rappuoli** (1997). Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori vacA* gene with a sucrose sensitivity marker. *Infect. Immun.* **65**(5): 1949-1952.
- Davis, A. and T. o'Halloran** (2008). A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nature Chemical Biology* **4**(3): 148-151.
- Delhaize, E., T. Kataoka, D.M. Hebb, R.G. White and P.R. Ryan** (2003). Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**(5): 1131-42.

- Dräger, D.B., A.G. Desbrosses-Fonrouge, C. Krach, A.N. Chardonnens, R.C. Meyer, P. Saumitou-Laprade and U. Krämer (2004).** Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant J.* **39**: 425-439.
- Drew, D., L. Fröderberg, L. Baars and J.W. de Gier (2003).** Assembly and expression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**(1): 3-10.
- Dubbels, B.L., A.A. DiSpirito, J.D. Morton, J.D. Semrau, J.N.E. Neto and D.A. Bazylinski (2004).** Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* **150**(2921-2945).
- Eichhorn, E., J.R. van der Ploeg and T. Leisinger (2000).** Deletion analysis of the *Escherichia coli* taurine and alkanesulfonate transport systems. *J. Bacteriol.* **182**(10): 2687-2695.
- Ellis, C.D., C.W. MacDiarmid and D.J. Eide (2005).** Heterodimeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **280**(31): 28811-28818.
- Eshaghi, S., M. Hedrén, M. Ignatushchenko Abdel Nasser, T. Hammarberg, A. Thornell and P. Nordlund (2007).** An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein Sci.* **14**: 676-683.
- Faivre, D., L.H. Böttger, B.F.F. Matzanke and D. Schüler (2007).** Intrazelluläre Magnetitbiomineralisation in Bakterien: ein eigener Stoffwechselweg unter Beteiligung von membrangebundenem Ferritin und einer Fe(II)-Spezies. *Angew. Chem.* **119**: 1-7.
- Flies, C. (2004).** Isolierung und kultivierungsunabhängige Untersuchungen von magnetotaktischen Bakterien aus marinen und limnischen Sedimenten. Dissertation Fachbereich Biologie/Chemie. Universität Bremen
- Flies, C., H.M. Jonkers, D. de Beer, K. Bosselmann, M.E. Böttcher and D. Schüler (2005).** Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 185-195.
- Frankel, R.B. and D.A. Bazylinski (1994).** Magnetotaxis and magnetic particles in bacteria. *Hyperfine Interact.* **90**: 135-142.
- Frankel, R.B., D.A. Bazylinski, J.S. Johnson and B.L. Taylor (1997).** Magneto-Aerotaxis in Marine Coccoid Bacteria. *Biophys. J.* **73**: 994-1000.
- Fukuda, Y., Y. Okamura, H. Takeyama and T. Matsunaga (2006).** Dynamic analysis of a genomic island in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 reveals how magnetosome synthesis developed. *FEBS Letters* **580**(3): 801-812.
- Fukumori, Y., H. Oynagi, K. Yoshimatsu, Y. Noguchi and T. Fujiwara (1997).** Enzymatic iron oxidation and reduction in magnetite synthesizing *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Phys. IV* **7**(C1): 659-662.
- Gärdes, A. (2006).** Deletionsmutagenese eines Magnetosomenproteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense* unter Etablierung eines Cre-loxP-Systems. Diplomarbeit Fachbereich naturwissenschaftliche Technik. Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven
- Gorby, Y.A., T.J. Beveridge and R.B. Blakemore (1988).** Characterization of the Bacterial Magnetosome Membrane. *J. Bacteriol.* **170**(2): 834-841.

- Grant, S. G., J. Jessee, F.R. Bloom and D. Hanahan** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Nat. Acad. Sci. **87**(12): 4645-4649.
- Grass, G.** (2007). New transport for old iron. In S. Silver and D.H. Nies (ed), Molecular Microbiology of heavy metals. Berlin Heidelberg, Springer Verlag Berlin Heidelberg. **7**: 220-233.
- Grass, G., B. Fan, B.P. Rosen, S. Franke, D.H. Nies and C. Rensing** (2001). ZitB (YgbR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**(15): 4664-4667.
- Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C.J. Haney, C. Rensing, D.H. Nies and D. Munkelt** (2005). FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. Arch. Microbiol. **183**(9): 9-18.
- Grünberg, K.** (2005). Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Magnetosomenmembran von *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Dissertation Fachbereich Biologie/Chemie. Universität Bremen
- Grünberg, K., C. Wawer, B.M. Tebo and D. Schüler** (2001). A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **67**(10): 4573-4582.
- Grünberg, K., E.C. Müller, A. Otto, R. Reszka, D. Linder, M. Kube, R. Reinhardt and D. Schüler** (2004). Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Appl. Environ. Microbiol. **70**(2): 1040-1050.
- Guffanti, A. A., Y. Wei, S.V. Rood and T.A. Krulwich** (2002). An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K^+ and H^+ . Mol. Microbiol. **45**(1): 145-153.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**(4): 557-580.
- Haney, C.J., G. Grass, S. Franke and C. Rensing** (2005). New development in the understanding of the cation diffusion facilitator family. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **32**: 215-226.
- Hartmann, A. and V. Braun** (1981). Iron uptake and iron limited growth of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol. **130**(5): 353-6.
- Heyen, U. and D. Schüler** (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl. Microbiol. Biotechnol. **61**: 536-544.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**(1): 23-28.
- Jirakulaporn, T. and A. Muslin** (2004). Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. J. Biol. Chem. **279**(26): 27807-27815.
- Junge, K.** (2004). Konstruktion und Charakterisierung von Insertionsmutanten des Gens für einen Magnetosomen-assoziierten CDF-Transporter. Fachbereich naturwissenschaftliche Technik. Diplomarbeit. Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven:

Junttila, M.R., S. Saarinen, T. Schmidt, J. Kast and J. Westermarck (2005). Single-step Strep-tag® purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics* **5**(5): 1199 - 1203.

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**(5): 494-500.

Katzmann, E. (2007). Genetische und ultrastrukturelle Untersuchungen zur Zellbiologie und Assemblierung der Magnetosomenkette in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie/Chemie. Universität Bremen

Kiefer, H. (2003). *In vitro* folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**: 57-62.

Kim, D., J.L. Gustin, B. Lahner, M.W. Persans, D. Baek, D.J. Yun and D.E. Salt (2004). The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* **39**: 237-251.

Klammt, C., F. Löhr, B. Schäfer, W. Haase, V. Dötsch, H. Rüterjans, C. Glaubitz and F. Bernhard (2004). High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **271**(3): 568 - 580.

Komeili, A. (2007). Molecular mechanisms of magnetosome formation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 351 - 366.

Komeili, A., H. Vali, T.J. Beveridge and D. Newman (2004). Magnetosome vesicles are present prior to magnetite formation and MamA is required for their activation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**(11): 3839-3844.

Komeili, A., Z. Li, D.K. Newman and G.J. Jensen (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**(5758): 242-245.

Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop and K.M. Peterson (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**(1): 175-6.

Kovach, M.E., R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop and K.M. Peterson (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**(5): 800-2.

Krämer, S.M., A. Butler, P. Borer and J. Cervini-Silva (2005). Siderophores and the dissolution of iron-bearing minerals in marine systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **59**(1): 53-84.

Lämmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 - 685.

Lang, C. and D. Schüler (2008). Expression of GFP fused to magnetosome proteins in microaerophilic magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **Epub ahead of print.**

Lang, C., D. Schüler and D. Faivre (2007). Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes. *Macromol. Biosci.* **7**: 144 - 155.

Lange, H., G. Kispal and R. Lill (1999). Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274**(27): 18989-18996.

- Leang, C., M.V. Coppi and D.R. Lovley** (2003). OmcB, a c-Type Polyheme Cytochrome, Involved in Fe(III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **185**(7): 2096-2103.
- Lee, S.M., G. Grass, C.J. Haney, B. Fan, B.P. Rosen, A. Anton, D.H. Nies and C. Rensing** (2002). Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**(2): 273-278.
- Lesk, A.** (2003). *Bioinformatik - Eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Li, L. and J. Kaplan** (1997). Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J. Biol. Chem.* **272**(45): 28485-28493.
- Link, A.J., D. Phillips and G.M. Church** (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**(20): 6228-6237.
- Lins, U., C.N. Keim and F.F. Evans** (2007). Magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes. *Geomicrobiol. J.* **24**: 43-50.
- Lins, U., M.R. McCartney, M. Farina, R.B. Frankel and P.R. Buseck** (2005). Habits of magnetosome crystals in coccoid magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(8): 4902-4905.
- Loll, P.J.** (2003). Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struct. Biol.* **142**(1): 144-153.
- Lu, M. and D. Fu** (2007). Structure of the Zinc transporter YiiP. *Science* **317**(5845): 1746-1748.
- MacDiarmid, C. W., L.A. Gaither and D. Eide** (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**(12): 2845-2855.
- MacDonald, R. C., R.I. MacDonald, B.Ph.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao and L.R. Hu** (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**: 297-303.
- Mann, S., N.H.C. Sparks, R.B. Frankel, D.A. Bazylinski and H.W. Jannasch** (1990). Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* **343**(6255): 258-261.
- Mann, S., N.H.C. Sparks, R.G. Board** (1990). Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology. *Adv. Microbiol. Physiol.* **31**: 125-181.
- Marmur, J.** (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Martins, J.L., C. Neumann-Keim, M. Farina, B. Kachar and U. Lins** (2007). Deep etching electron microscopy of cells of *Magnetospirillum magnetotacticum*: evidence for filamentous structures connecting the magnetosome chain to the cell surface. *Curr. Microbiol.* **54**: 1-4.
- Marx, C.J. and M. E. Lidstrom** (2002). Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* **33**(5): 1062-1067.
- Matsunaga, T.** (1990). Applications of bacterial magnets. *Trends Biotechnol.* **9**: 91-95.

- Matsunaga, T., T. Sakaguchi and F. Tadokoro** (1991). Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 651-655.
- Matsunaga, T., T. Suzuki, M. Tanaka and A. Arakaki** (2007). Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends Biotechnol.* **25**(4): 182 - 188.
- Matsunaga, T. and H. Takeyama** (1998). Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramolecular Sci.* **5**(3-4): 391-394.
- Matsunaga, T., Y. Okamura, Y. Fukuda, A.T. Wahyudi, Y. Murase and H. Takeyama** (2005). Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum sp.* strain AMB-1. *DNA Res.* **12**(3): 157-166.
- Matzanke, B.F., G.I. Müller, E. Bill and A.X. Trautwein** (1989). Iron metabolism of *Escherichia coli* studied by Mössbauer spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **183**: 371-379.
- McFadden, J.** (1996). Recombination in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **21**(2): 205-211.
- Menke, O.** (2003). Dissimilatorische Nitratreduktion in magnetotaktischen Bakterien. Diplomarbeit. Fachbereich Naturwissenschaftliche Technik. Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven.
- Metcalf, W.W., W. Jiang, L.L. Daniels, S.K. Kim and A. Haldimann and B. L. Wanner** (1996). Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ* alpha for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid* **35**(1): 1-13.
- Millero, F.J., S. Sotolongo and M. Izaguirre** (1987). "Oxidation kinetics of Fe(II) in sea water." *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**(4): 793-801.
- Miroux, B. and J. Walker** (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**(3): 289-298.
- Moench, T.T. and W. A. Konetzka** (1978). A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* **119**: 203-212.
- Montanini, B., D. Blaudez, S. Jeandroz, D. Sanders and M. Chalot** (2007). Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and a prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**(107).
- Munkelt, D., G. Grass and D.H. Nies** (2004). The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J. Bacteriol.* **186**(23): 8036-8043.
- Nakamura, C., J.G. Burgess, K. Sode and T. Matsunaga** (1995). An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum sp.* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **270**(47): 28392-28396.
- Nakamura, C., T. Kikuchi, J.G. Burgess and T. Matsunaga** (1995). Iron-regulated expression and membrane localization of the *magA* protein in *Magnetospirillum sp.* strain AMB-1. *J. Biochem.* **118**(1): 23-27.
- Neilands, J.** (1981). Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 715-731.

- Neilands, J.** (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**(45): 26723-26726.
- Nies, D.H.** (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* **27**(1): 17-28.
- Nies, D.H.** (2007). Bacterial transition metal homeostasis. In S. Silver and D.H. Nies (ed), *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer Heidelberg. **6**: 117-142.
- Nies, D.H.** (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**(2-3): 313-39.
- Nies, D.H. and S. Silver** (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**(2): 186-99.
- Noguchi, Y., T. Fujiwara, K. Yoshimatsu and Y. Fukumori** (1999). Iron reductase for magnetite synthesis in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* **181**(7): 2142-2147.
- Oelmüller, U., H.G. Schlegel and C.G. Friedrich** (1990). Differential stability of mRNA species of *Alcaligenes eutrophus* soluble and particulate hydrogenases. *J. Bacteriol.* **172**(12): 7057-7064.
- Palmeros, B., J. Wild, W. Szybalski, S. Le Borgne, G. Hernandez-Chavez, G. Gosset, F. Valle and F. Bolivar** (2000). A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* **247**(1-2): 255-264.
- Palmiter, R.D., T.B. Cole, C.J. Quaife and S.D. Findley** (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **93**: 14934-14939.
- Paoletti, L.C. and R.P. Blakemore** (1986). Hydroxamate production by *Aquaspirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* **167**: 73-76.
- Papavinasasundaram, K.G., M.J. Colston and E.O. Davis** (1998). Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Mol. Microbiol.* **30**(3): 525-534.
- Paulsen, I.T. and M.H. Saier** (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**(2): 99-103.
- Persans, M.W., K. Niemann and D.E. Salt** (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **98**: 9995-10000.
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra and B.P. Rosen** (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**(2): 652-656.
- Rensing, C., M. Ghosh and B.P. Rosen** (1999). Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181**(19): 5891-5897.
- Reszka, R.** (2000). Applications for magnetosomes in medical research. In E. Baeuerlein (ed), *Biomining*. Weinheim, Wiley-VCH: 81-92.
- Reyrat, J.M., V. Pelicic, B. Gicquel and R. Rappuoli** (1998). Counterselectable markers: Untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Inf. Immun.* **66**(9): 4011-4017.

- Richter, M., M. Kube, D.A. Bazylinski, T. Lombardot, F.O. Glöckner, R. Reinhardt and D. Schüler** (2007). Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function. *J. Bacteriol.* **189**(13): 4899-4910.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnol.* **17**(10): 1030-1032.
- Rudner, D.Z., Q. Pan and R.M. Losick** (2002). Evidence that subcellular localization of a bacterial membrane protein is achieved by diffusion and capture. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**(13): 8701-8706.
- Sambrook, J. and D. Russel** (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**(12): 5643-5647.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Pühler** (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**(1): 69-73.
- Scheffel, A.** (2007). Molekulare und strukturelle Untersuchungen zur Bildung von Magnetosomen und zur Assemblierung von Magnetosomenketten in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Dissertation. Fachbereich Biologie/Chemie. Universität Bremen
- Scheffel, A., A. Gärdes, K. Grünberg, G. Wanner and D. Schüler** (2008). The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* but regulate the size of magnetosome crystals. *J. Bacteriol.* **190**(1): 377-386.
- Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, J.M. Plitzko and D. Schüler** (2006). An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**(7080): 110-115.
- Scheffel, A. and D. Schüler** (2007). The acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly. *J. Bacteriol.* **189**(17): 6437-6446.
- Schleifer, K.H., D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig and M. Köhler** (1991). The genus *Magnetospirillum* *gen. nov.*, description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* *sp. nov.* and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* *comb. nov.*" *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 379-385.
- Schübbe, S.** (2005). Untersuchungen zur molekularen Organisation und regulation der *mam*-Gene in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Dissertation. Fachbereich Biologie/Chemie. Universität Bremen
- Schübbe, S., C. Würdemann, J. Peplies, U. Heyen, C. Wawer, F.O. Glöckner and D. Schüler** (2006). Transcriptional organization and regulation of magnetosome operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(9).

- Schübbe, S. M. K., A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdierks, M. Madkour, F. Mayer, R. Reinhardt and D. Schüler** (2003). Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* **185**(19): 5779-5790.
- Schüler, D.** (1999). Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1**(1): 79-86.
- Schüler, D.** (2002). The biomineralisation of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* **5**: 209-214.
- Schüler, D.** (2003). Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **11**: 11.
- Schüler, D.** (2004). Biochemical and genetic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In E. Baeuerlein (ed), *Biomineralization*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein** (1996). Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**: 301-307.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein** (1997a). The biomineralization of magnetite in magnetic bacteria. *Bioinorganic chemistry: Transition metals in biology and coordination chemistry/Deutsche Forschungsgemeinschaft*. Weinheim, Wiley-VCH: 24-36.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein** (1997b). Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Phys. IV* **7**(C1): 647-650.
- Schüler, D. and E. Baeuerlein** (1998). Dynamics of Iron Uptake and Fe₃O₄ Biomineralization during Aerobic and Microaerobic Growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**(1): 159-162.
- Schüler, D. and R. B. Frankel** (1999). Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 464-473.
- Schüler, D., R. Uhl and E. Baeuerlein** (1995). A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 139-145.
- Schultheiss, D.** (2004). Entwicklung eines gentischen Systems für die Untersuchung der Magnetitbiomineralisation des magnetischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Dissertation. Fachbereich Biologie/Chemie. Bremen, Universität Bremen: 175.
- Schultheiss, D., M. Kube and D. Schüler** (2004). A system for gene replacement in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: Inactivation of the flagellin gene *flaA* results in non-magnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(6): 3624-3631.
- Schultheiss, D. and D. Schüler** (2003). Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**: 89-94.
- Seddon, A. M., P. Curnow and P.J. Booth** (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**: 105-117.

- Seve, S., F. Chimienti, S. Devergnas and A. Favier** (2004). In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics* **5**(1).
- Short, K. and R. Blakemore** (1986). Iron respiration-driven proton translocation in aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **167**(2): 729-731.
- Simmons, S.L., S.M. Sievert, R.B. Frankel, D.A. Bazylinski and K.J. Edwards** (2004). Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(10): 6230-6239.
- Simon, R., U. Priefer and A. Puehler** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *BioTechnology* **1**: 784-791.
- Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen** (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**(1): 113-128.
- Southern, E.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**(3): 503-517.
- Spring, S. and D. Bazylinski** (2002). Magnetotactic Bacteria. *The Prokaryotes*.
- Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer, H. van Gernerden and N. Petersen** (1993). Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(8): 2397-2403.
- Stolz, J.F.** (1992). magnetotactic bacteria: biomineralization, ecology, sediment magnetism, environmental indicator. In H. C. W. Skinner (ed), *Biomineralization: processes of iron and manganese; modern and ancient environments*. Cremlingen-Destedt, Catena-Verlag. 133-145.
- Studier, F. and B. Moffatt** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**(1): 113-30.
- Suzuki, T., Y. Okamura, A. Arakaki, H. Takeyama and T. Matsunaga** (2007). Cytoplasmic ATPase involved in ferrous ion uptake from magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEBS Lett.* **581**(18): 3443-3448.
- Suzuki, T., Y. Okamura, R.J. Calugay, H. Takeyama and T. Matsunaga** (2006). Global gene expression analysis of iron-inducible genes in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Bacteriol.* **188**(6): 2275-2279.
- Tanaka, M., Y. Okamura, A. Arakaki, T. Tanaka, H. Takeyama and T. Matsunaga** (2006). Origin of magnetosome membrane: proteomic analysis of magnetosome membrane and comparison with cytoplasmic membrane. *Proteomics* **6**(19): 5234-5247.
- Terpe, K.** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**(5): 523-33.
- Terpe, K.** (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**(2): 211-222.

- Tottey, S., S. Rondet, G.M.P. Borelly, P.J. Robinson, P.R. Rich and N.J. Robinson** (2002). A Copper Metallochaperone for Photosynthesis and Respiration Reveals Metal-specific Targets, Interaction with an Importer, and Alternative Sites for Copper Acquisition. *J. Biol. Chem.* **277**(7): 5490-5497.
- Touati, D.** (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**:1-6.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**(9): 4350-4354.
- Ullrich, S., M. Kube, S. Schübbe, R. Reinhardt and D. Schüler** (2005). A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *J. Bacteriol.* **187**(21): 7176-7184.
- Valentine, R.A., K.A. Jackson, G.R. Christie, J.C. Mathers, P.M. Taylor and D. Ford** (2007). ZnT5 variant B is a bidirectional zinc transporter and mediates zinc uptake in human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **282**(19): 14389-14393.
- van der Geize, R., G.I. Hessels, R. van Gerwen, P. van der Meijden and L. Dijkhuizen** (2001). Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**(2): 197-202.
- Wahyudi, A.T., H. Takeyama, Y. Okamura, Y. Fukuda and T. Matsunaga** (2003). Characterization of aldehyde ferredoxin oxidoreductase gene defective mutant in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**(1): 223-229.
- Wandersman, C. and P. Delepelaire** (2004). Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Ann. Rev. Microbiol.* **58**: 611-647.
- Wei, Y. and D. Fu** (2006). Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J. Biol. Chem.* **281**(33): 23492-23502.
- Wei, Y., H. Li and D. Fu** (2004). Oligomeric state of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J. Biol. Chem.* **279**(38): 39251-39259.
- Weltrowski, A.** (2006). Die Struktur und Funktion des CDF-Proteins CzcD aus *Cupriavidus metallidurans*. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Martin-Luther-Universität Halle/Saale
- Widdel, F. and F. Bak** (1992). Gram-negative mesophilic sulphate-reducing bacteria. The Prokaryotes. New York, Springer Verlag. **4**: 3352-3378.
- Xia, M., J. Wei, Y. Lei and L. Ying** (2007). A novel ferric reductase purified from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Curr. Microbiol.* **55**(1): 71-75.
- Yijun, H., Z. Weija, J. Wei, R. Chengbo and L Ying** (2007). Disruption of a *fur*-like gene inhibits magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Biochemistry (Moscow)* **72**(11): 1247-1253.
- Yoder, J.H., H. Chong, K. Guan and M. Han** (2004). Modulation of KSR activity in *Caenorhabditis elegans* by Zn ions, PAR-1 kinase and PP2A phosphatase. *EMBO J.* **23**(1): 111-119.

Yoshino, T. and T. Matsunaga (2006). Efficient and stable display of functional proteins on bacterial magnetic particles Using Mms13 as a novel anchor molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(1): 465-471.

Zhou, Y., F.W. Lau, S Nauli, D. Yang and J.U. Bowie (2008). Inactivation mechanism of the membrane protein diacylglycerol kinase in detergent solution. *Protein Sci.* **10**: 378-383.

F Anhang

Tabelle 10. Auflistung der zur Dendrogrammerstellung (C.4.3) verwendeten Proteinsequenzen. Die gelb unterlegten Sequenzen sind nicht in einer Datenbank hinterlegt und wurden mittels BlastP-Analysen in den betreffenden Sequenzen gefunden (JCoast Blast-Server für die Genomsequenz von MS-1 und BlastP von Accelrys DSGene für die Fosmidsequenz des Umweltklons).

Domäne	Organismus	Proteinname	Accession number	
Archaea				
Euryarchaeota	<i>Methanosarcina acetivorans</i>		AAM04061 AAM03993	
Crenarchaeota	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	CzcD	AAK42415	
Eubacteria				
Proteobacteria	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	MamB MamM MamV Mms2856 Mms0003 Mms2852 Mms2899 Mms2116 Mms4476 Mms2067		
	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	MamB MamM MamV Amb1007 Amb885 Amb1205 Amb1013 Amb1234	YP_420337 YP_420330 YP_420341 YP_420370 YP_420248 YP_420568 YP_420376 YP_420597	
	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	MamB MamM Mgr2883 Mgr0906 Mgr3242	CAM78034 CAM78027 CAM77453 CAM76906 CAM76090	
	<i>Magnetischer Vibrio MV-1</i>	MamB MamM		
	<i>Magnetischer Kokkus MC-1</i>	MamB MamM Mmc1_3150 Mmc1_3400	YP_866157 YP_866163 YP_867046 YP_867292	
	<i>Cupriavidus metallidurans CH34</i>	FieF DmeF CzcD	ZP_00593836 ZP_00594243 P13512	
	<i>Escherichia coli</i>	FieF ZitB	P69380 P75757	
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>		AAR35985 AAR33819	
	<i>Pectobacterium atrospecticum</i>	ZitB	Q6D7E5	
	Deinococcus	<i>Thermus thermophilus</i>		CAC83722

Tabelle 10. Fortsetzung

Domäne	Organismus	Proteinname	Accession number
Cyanobacteria	<i>Synechococcus elongatus</i>		YP_401006
	<i>Synechococcus ssp.</i>		YP_381353
Firmicutes	<i>Staphylococcus aureus</i>	CzcD	BAA36686
	<i>Bacillus subtilis</i>	YdfM	CAB12354
		YeaB	P46348
		CzcD	NP_390542
Eukaryota			
Viridiplanta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMTP6	NP182304
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MMT1p Cot1	NP_013902 CAA99636
Metazoa	<i>Homo sapiens</i>	ZnT7	AAM21969
Umweltklone	Fosmidklon Warmsdorf 4	MamM MamB	

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dirk Schüler, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit überließ und durch seine Betreuung maßgeblich am Erfolg teil hatte. Des Weiteren möchte ich mich für die Übernahme des Zeitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Friedrich Widdel gilt mein Dank für die Erstellung des Erstgutachtens und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am MPI für marine Mikrobiologie.

Frau Prof. Friederike König und Herrn Prof. Ludger Rensing waren Mitglieder meiner Prüfungskommission, hierfür herzlichen Dank!

Bei der AG Schüler und der Abteilung Mikrobiologie des MPI Bremens möchte ich mich für die Zeit während, zwischen und nach der Arbeit bedanken. Mit Euch hat Arbeiten Spaß gemacht und durch Euch wurde einiges leichter! Auch danke ich Euch für die Unterstützung!

E. Schmidt, C. Stumpf und R. Sonntag möchte ich danke sagen für den Luxus, den sich unsere AG hinsichtlich der Medienvorbereitung geleistet hat.

Danke Hoa, Lars und Thomas! Ihr wart das tollste Büro, das man sich vorstellen kann!

Danke Insa, Nadine, Tini und Astrid! Danke Tanja!

Ein besonderer Dank gilt Olav, dem Menschen mit einem undenkbar großen Beschützerinstinkt! Ja, auch wir werden erwachsen und verlassen das Nest! Danke, dass es Dich gibt!

Danke Knut!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren grenzenlosen Optimismus und immerwährende Unterstützung diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.