

**Molekulare und strukturelle Untersuchungen zur Bildung von  
Magnetosomen und zur Assemblierung von Magnetosomenketten in  
*Magnetospirillum gryphiswaldense***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-

dem Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Bremen vorgelegt von

André Scheffel  
Bremen 2007

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Juni 2007 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

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

Tag des Promotionskolloquiums: 16. Juli 2007

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>Teil I - DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IM GESAMTZUSAMMENHANG</b>	
<b>1 - Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Magnetotaktische Bakterien	6
1.1.1 Der Modellorganismus <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	8
1.2 Magnetosomenbiomineralisation	10
1.3 Biophysikalische Betrachtungen der Magnetfeldorientierung bei magnetotaktischen Bakterien	12
1.4 Molekulare Analyse der Magnetosomenbiomineralisation	14
1.5 Zielsetzung	19
<b>2 – Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
<b>Teil A: Funktionelle Untersuchung der Proteine des <i>mamGFDC</i>-Operon</b>	<b>20</b>
2.1 Die Deletion von <i>mamC</i> hat einen geringen Effekt auf die Größe der Magnetosomenkristalle	22
2.2 Die Deletion des <i>mamGFDC</i> -Operon führt zur Bildung deutlich kleinerer Magnetitkristalle	24
2.3 Die MamGFDC-Proteine beeinflussen additiv die Größe der Magnetitkristalle	27
2.4 Der Verlust der MamGFDC-Proteine könnte durch andere Proteine kompensiert werden	29
<b>Teil B: Funktionelle Untersuchung des Magnetosomenmembranproteins MamJ</b>	<b>33</b>
2.5 MamJ ist gekennzeichnet durch eine saure, Prolin-reiche Tandemwiederholung variabler Länge	33
2.6 In einer $\Delta$ <i>mamJ</i> Mutante sind die Magnetosomen nicht in Ketten angeordnet	36
2.7 Die Agglomeration der Magnetosomen in $\Delta$ <i>mamJ</i> vermindert die Effizienz der Ausrichtung im Erdmagnetfeld	39
2.8 MamJ beeinflusst die Anordnung der Magnetosomen-Leervesikel in der Zelle	40

2.9	Das MamJ-Protein ist mit der Magnetosomenmembran assoziiert	42
2.10	MamJ-EGFP lokalisiert entlang einer filamentösen Struktur	43
2.11	Magnetosomenketten sind mit Magnetosomenfilamenten assoziiert	45
2.12	Die Lokalisierung von MamK ist unabhängig von MamJ	47
2.13	MamJ und MamK interagieren	50
2.14	Die charakteristische CAR-Domäne ist nicht essenziell für funktionales MamJ	52
2.15	Eine $\Delta mamK$ Mutante bildet keine Wildtyp-Magnetosomenketten	54
2.16	Modell zur Bildung der Magnetosomenketten	55
<b>3 - Ausblick</b>		<b>61</b>
<b>4 - Literaturverzeichnis</b>		<b>63</b>
<b>5 – Anhang</b>		<b>79</b>
5.1	Berechnungen	79
<b>Teil II – PUBLIKATIONEN</b>		
1	Publikationsliste mit Erläuterungen	82
2	Manuskript 1: “Magnetosomes in magnetotactic bacteria”	85
3	Manuskript 2: “An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria”	117
4	Manuskript 3: “The acidic repetitive domain of the <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly”	135
5	Manuskript 4: “Size of magnetite crystals is controlled by the cumulative action of MamGFDC proteins in <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> ”	165
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>193</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

[A]	Ampere, Einheit
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
CAR	<i>central acidic repetitive</i>
CDF3	<i>cation diffusion facilitator subfamily 3</i>
<i>egfp</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Genbezeichnung
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Proteinbezeichnung
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Proteinbezeichnung
[G]	Gauss, Einheit für magnetische Flussdichte
[J]	Joule, Einheit für Energie
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
MAI	Magnetosomeninsel
Mb	Millionen-Basenpaare
MM	Magnetosomenmembran
MMP	Magnetosomenmembranprotein
MTB	magnetotaktische Bakterien
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
[T]	Tesla, Einheit für magnetische Flussdichte
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPR	Tetratricopeptide repeat



## Zusammenfassung

Magnetotaktische Bakterien (MTB) bilden zur Magnetfeldorientierung Magnetosomen, worunter man subzelluläre Membranvesikel mit einem ferrimagnetischen Nanokristall als Kern versteht. Für eine effektive magnetische Ausrichtung magnetotaktischer Bakterien im Erdmagnetfeld werden die Magnetosomen in jeder Zelle in einer Kette angeordnet. Die molekularen Abläufe, die zur Bildung der Magnetosomen und zur Assemblierung der Magnetosomenketten führen, waren zu Beginn dieser Arbeit weitestgehend unbekannt. Jedoch war eine Reihe spezifischer Proteine in der Magnetosomenmembran identifiziert worden, für die anzunehmen ist, dass sie in die molekularen Prozesse der Magnetosomen und der Magnetosomenkettenbildung involviert sind. Die hier vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, die Funktion einiger ausgewählter Proteine der Magnetosomenmembran aufzuklären.

Die vier Proteine MamG, MamF, MamD und MamC des *mamGFDC*-Operon stellen zusammen ca. 35 % der Gesamtproteinfraktion der Magnetosomenmembran, weshalb vermutet wurde, dass sie eine wichtige Funktion im Rahmen der Magnetosomenbiomineralisation besitzen. Um die Funktion dieser vier Proteine zu erforschen, wurde der Einfluss ihres Fehlens auf die Magnetosomen- und Magnetosomenkettenbildung in einer *mamGFDC*-Deletionsmutante sowie einer *mamC*-Deletionsmutante von *M. gryphiswaldense* untersucht. Die Deletion des *mamGFDC*-Operons bewirkt eine signifikante Verkleinerung und Formveränderung der Magnetitkristalle während die Deletion von *mamC* nur einen geringen Einfluss auf die Kristallgröße hat. Im Rahmen der Komplementation der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante mit modifizierten Varianten des *mamGFDC*-Operons wurde gezeigt, dass die MamGFDC-Proteine additiv die Kristallgröße beeinflussen. Um herauszufinden, ob das Fehlen der MamGFDC-Proteine zu einer Verringerung der Magnetosomenvesikelgröße führt, wurden Dünnschnitte von Wildtyp und  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante elektronenmikroskopisch untersucht und die Magnetosomenvesikel vermessen. Dabei zeigte sich, dass die vier Proteine MamG, MamF, MamD und MamC keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Magnetosomenvesikel haben. Insofern ist der Mechanismus, über den die MamGFDC-Proteine die Kristallgröße steuern, noch unklar.

Das Magnetosomenmembranprotein MamJ ist gekennzeichnet durch eine repetitive Domäne mit hohem Anteil an sauren Aminosäuren, weshalb vermutet wurde, dass MamJ die Bildung der magnetischen Nanokristalle in den Magnetosomen involviert ist. Eine im Rahmen dieser Arbeit erstellte *mamJ*-Deletionsmutante offenbarte, dass MamJ nicht die Biomineralisation der Magnetitkristalle in *M. gryphiswaldense* beeinflusst, sondern essenziell für die strukturelle Integrität der Magnetosomenketten ist. Fehlt MamJ, werden die Magnetosomen nicht mehr in Ketten angeordnet, sondern agglomerieren. Mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie wurden in Wildtypzellen von *M. gryphiswaldense* bisher unbekannte Proteinfilamente entdeckt, die entlang der Magnetosomenketten verlaufen. Im Gegensatz dazu sind in Zellen der *mamJ*-Deletionsmutante die Magnetosomen nicht mit den neuartigen Proteinfilamenten assoziiert. Fluoreszenz-markiertes MamJ zeigt eine filamentartige Lokalisierung in Wildtypzellen, die, wie sich zeigte, von anderen MTB-spezifischen Proteinen abhängig ist. Entsprechend wurde vermutet, dass MamJ die Magnetosomen mit den neuartigen Proteinfilamenten verknüpft, wodurch die Magnetosomenketten nicht kollabieren können. Um diese Vermutung experimentell zu überprüfen, wurde mittels eines Zwei-Hybrid-Systems untersucht, ob MamJ mit dem Protein MamK interagiert, von welchem aufgrund seiner Sequenz vermutet wird, es bildet die mit den Magnetosomenketten assoziierten Proteinfilamente. In Zwei-Hybrid-Versuchen interagierte MamJ mit MamK, wobei gezeigt wurde, dass die Interaktions-vermittelnden Domänen im C- und N-terminalen Bereich von MamJ liegen. Beide Sequenzbereiche (C- und N-terminal) sind essenziell für funktionales MamJ-Protein, wie Komplementationsexperimente der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante aufzeigten. Zudem erbrachte die Lokalisierung funktionaler Domänen in MamJ, dass die repetitive und saure Domäne, welche ein charakteristisches Merkmal aller MamJ-Orthologe ist, keinen erkennbaren Einfluss auf die Funktion von MamJ hat. Aufbauend auf den Erkenntnissen zu MamJ konnte in dieser Arbeit erstmals ein Modell zur Bildung und Stabilisierung von Magnetosomenketten entwickelt werden, welches postuliert, dass die einzelnen Magnetosomen mittels MamJ an longitudinal verlaufenden MamK-Proteinfilamenten befestigt sind an denen die Magnetosomen sich entlang bewegen können, bis sie in einer Magnetosomenkette fixiert werden.

---

## Teil I

Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

---

## 1 Einleitung

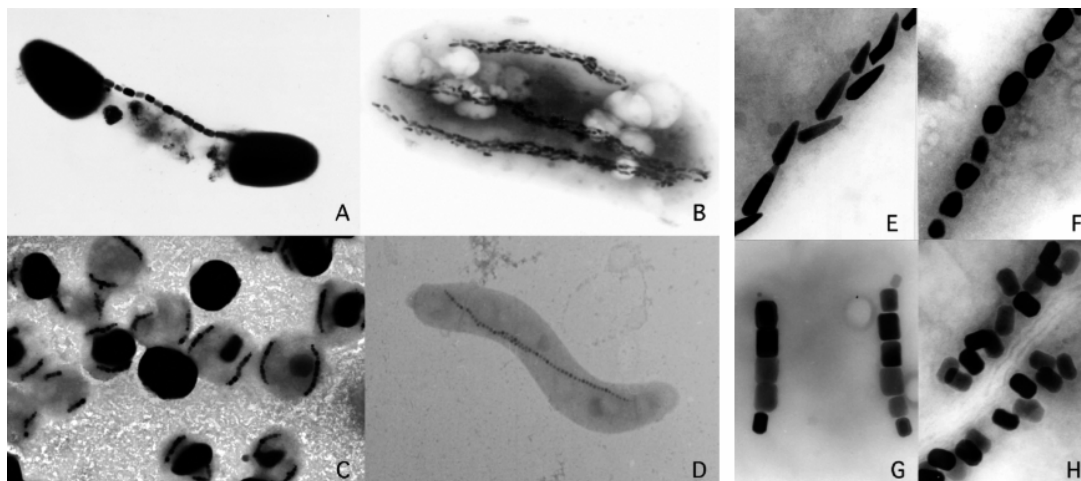
Mit der Entdeckung von Bakterien, die zur Orientierung in Magnetfeldern befähigt sind, bereicherte Richard Blakemore Mitte der 1970er Jahre die Mikrobiologie mit einem neuen, spannenden Forschungsobjekt (19). In den darauffolgenden Jahren offenbarte die Erforschung dieser so genannten „magnetotaktischen Bakterien“, dass eine Reihe von phylogenetisch, physiologisch und morphologisch heterogenen Bakterien zur Magnetfeldorientierung befähigt sind. Essenziell für die Orientierung magnetotaktischer Bakterien im Erdmagnetfeld sind die Magnetosomen. Als Magnetosomen werden subzelluläre Membranvesikel mit einem ferrimagnetischen Nanokristall als Kern bezeichnet, der in Abhängigkeit von der Art entweder aus Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oder aus Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) besteht (12). Die Magnetosomen einer Spezies haben definierte Größen und eine genetisch determinierte Kristallform (12). Die Vielfalt der von magnetotaktischen Bakterien gebildeten Kristallmorphologien sowie die Regelmäßigkeit der Kristallform eines Morphologietyps sind Merkmale, die bei abiotisch gebildeten Nanokristallen aus Magnetit oder Greigit nicht auftreten und derzeit auch nicht auf synthetischem Wege reproduziert werden können (39). Die molekularen Faktoren und Mechanismen, welche die Magnetosomenbiomineralisation steuern, sind weitgehend unbekannt. Ein Verständnis dieser Prozesse ist indes von interdisziplinärem Interesse. So sind die Faktoren, die zur Bildung von Magnetit in höheren Organismen führen, kaum untersucht. Beispiele für Organismen, in denen Magnetit gefunden wurde, sind Insekten (1, 51, 84), Fische (85, 142), Schildkröten (81) und Vögel (55, 140), in denen Magnetit mit ihrer Fähigkeit zur Erdmagnetfeldorientierung in Verbindung gebracht wird (31, 141, 146). In der Käferschnecke *Cryptochiton stelleri* härtet Magnetit die Zähne, wodurch deren Verschleiß verlangsamt wird (82). Magnetit kommt auch im menschlichen Gehirn vor, wo sein Auftreten mit einer Reihe von Krankheiten in Zusammenhang gebracht wird (59, 68). Interesse an einem Verständnis der molekularen Mechanismen der Magnetosomenbiomineralisation und das Ziel, die Eigenschaften der magnetischen Nanokristalle in den Magnetosomenvesikeln gezielt durch genetische Manipulation zu steuern, besteht auch von Seiten der Nano- und Biotechnologie (76, 87, 109). So weisen Magnetit-Magnetosomen Eigenschaften auf, die denen synthetischer Magnetit-

Nanopartikel überlegen sind und die für eine Reihe biotechnologischer Anwendungen von Vorteil sind. Darüber hinaus könnten Erkenntnisse zur genetischen Steuerung der Magnetitbiomineralisation auch für andere Biomineral bildende Systeme relevant sein, da die Mechanismen der Magnetitbiomineralisation zu einem frühen Zeitpunkt der biologischen Evolution entstanden und fundamentale Prinzipien vermutlich in später entstandenen Biomineral bildende Systemen wiederzufinden sind (67, 143). Neben der Magnetosomenbiomineralisation sind auch die molekularen Faktoren und Mechanismen, die zur Anordnung der Magnetosomen in Ketten führen, ungeklärt. Die Anordnung der Magnetosomen in Ketten ist fast bei allen Arten magnetotaktischen Bakterien zu finden und gewährleistet die optimale Ausrichtung der Zellen im Erdmagnetfeld. Magnetosomenketten sind eine der strukturiertesten Organisationsformen subzellulärer Kompartimente, die in prokaryotischen Zellen zu finden sind und erfordern aufgrund ihrer hohen magnetostatischen Energie bisher unbekannte Mechanismen zur Stabilisierung, da sie ansonsten spontan kollabieren würden.

Bedingt durch die schwierige experimentelle Zugänglichkeit magnetotaktischer Bakterien sowie durch das Fehlen geeigneter Labormodelle entzogen sich die genetischen Aspekte der Magnetosomenbiomineralisation und der Magnetosomenkettenbildung lange Zeit ihrer Erforschung. Heute, mehr als 30 Jahre nach ihrer Entdeckung, liegen einige magnetotaktische Bakterien in Reinkultur vor und lassen sich in hinreichendem Maßstab im Labor kultivieren. Zudem ist seit kurzem eine bescheidene Auswahl molekularer Techniken an einigen Vertretern der Gattung *Magnetospirillum* etabliert, wodurch die Möglichkeit besteht, die genetischen Aspekte der Magnetosomenbiomineralisation und der Magnetosomenkettenbildung zu erforschen. Die vorliegende Arbeit ist eine der Ersten, die experimentelle Ergebnisse zur Funktion einiger Proteine bei der Steuerung der Magnetosomenkettenbildung und der Magnetosomenbiomineralisation vorstellt. Darauf aufbauend wird hier die bisher plausibelste Modellvorstellung zum Ablauf beider Prozesse entwickelt.

## 1.1 Magnetotaktische Bakterien

Die Bezeichnung magnetotaktische Bakterien ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von phylogenetisch, physiologisch und morphologisch heterogenen Prokaryonten (Abbildung 1), die sich von anderen Bakterien durch die Bildung von Magnetosomen abgrenzen. Die Magnetosomen sind vesikuläre Membrankompartimente, die einen magnetischen Nanokristall enthalten. Dieser besteht entweder aus dem Eisenoxid Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oder aus dem Eisensulfid Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). Die einzelnen Spezies magnetotaktischer Bakterien produzieren Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie (Abbildung 1) und von hoher struktureller Perfektion (12).



**Abbildung 1:** Zell- und Kristallmorphologien bei magnetotaktischen Bakterien. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen magnetotaktische (**A**, **B**) Stäbchen, (**C**) Kokken und (**D**) Spirillen sowie eine Auswahl verschiedener Kristallmorphologien (**E-H**) die bei magnetotaktischen Bakterien zu finden sind. Entnommen aus Literatur (77).

Die Magnetosomen verleihen magnetotaktischen Bakterien ein zelluläres magnetisches Dipolmoment, welches groß genug ist, die Zelle passiv im Erdmagnetfeld auszurichten. Durch die parallele Ausrichtung der einzelnen Zellen zu den Feldlinien des Erdmagnetfeldes wird die Achse vorgegeben, an der sich die Zellen entlang bewegen (20, 44). Somit führt die Ausrichtung magnetotaktischer Bakterien im Erdmagnetfeld zu einer Reduktion ihrer Raumorientierung auf eine Dimension. Die Bewegungsrichtung magnetotaktischer Bakterien im Habitat wird durch die Konzentration an gelöstem Sauerstoff bestimmt. Die



Kopplung der magnetotaktischen Orientierung an die Sauerstoffkonzentration wird als „Magneto-Aerotaxis“ bezeichnet (43).

Magnetotaktische Bakterien sind bis in wenigen extremen Habitaten in aquatischen Lebensräumen ubiquitär verbreitet. Das bevorzugte Mikrohabitat magnetotaktischer Bakterien ist neutral bis leicht alkalisch und gekennzeichnet durch mikrooxische bis anoxische Bedingungen sowie durch die Verfügbarkeit von gelöstem Eisen (41, 127). Derartige Bedingungen herrschen in den oberen Sedimentschichten vieler limnischer und mariner Systeme, sind aber auch bei einigen Standorten in der Wassersäule zu finden (41, 127). Greigit-bildende magnetotaktische Bakterien sind zudem auf Sulfid angewiesen, das durch Sulfat-reduzierende Bakterien gebildet wird und sind daher in marinen Habitaten weit verbreitet (127).

Erkenntnisse zur Physiologie magnetotaktischer Bakterien stammen hauptsächlich von den bisher in Reinkultur vorliegenden Arten. In Abhängigkeit von der Art magnetotaktischer Bakterien und den Bedingungen im Habitat können Sauerstoff, Nitrat oder Sulfat als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden (10, 14). Organoheterotroph wachsende Spezies können verschiedene organische Säuren als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator verwenden, jedoch keine Kohlenhydrate (57, 122). Auch autotrophes Wachstum ist bei magnetotaktischen Bakterien zu finden (11, 14, 144).

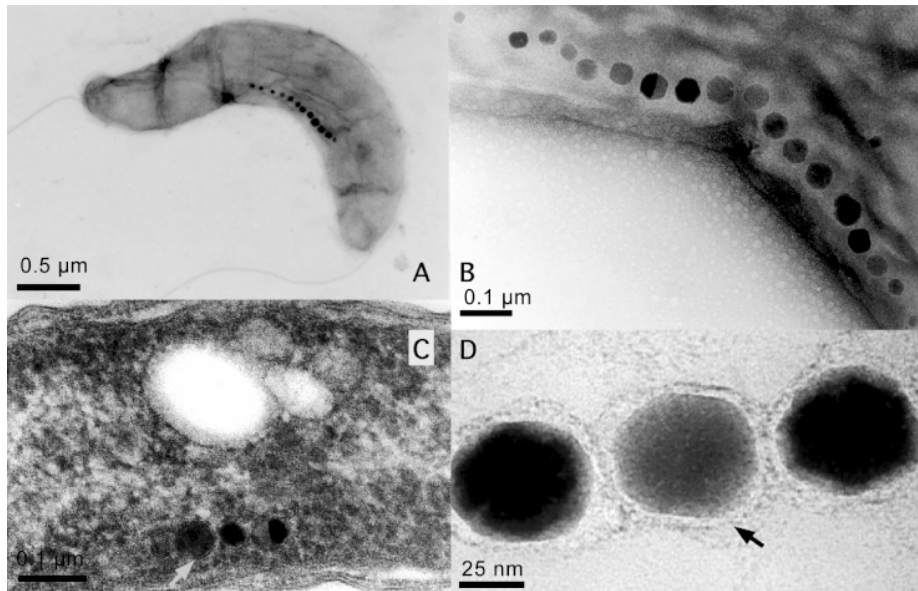
Die meisten bisher bekannten Arten magnetotaktischer Bakterien gehören zur Gruppe der Alphaproteobakterien und können ausschließlich Magnetit bilden. Außerhalb der Alphaproteobakterien sind Vertreter magnetotaktischer Bakterien innerhalb der Deltaproteobakterien, der Gammaproteobakterien und dem *Nitrospira* Phylum bekannt (3). Bisher am ausführlichsten charakterisiert sind die zu den Alphaproteobakterien zählenden Isolate der Gattung *Magnetospirillum* mit *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, *M. magneticum* AMB-1 und *M. magnetotacticum* MS-1. Die Genome aller drei Stämme wurden sequenziert und liegen als Komplet- bzw. vorläufige Komplettfassung vor (MS-1: <http://www.jgi.doe.gov>; AMB-1 und MSR-1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Zudem lassen sich alle drei Stämme in ausreichenden Mengen kultivieren und können genetisch verändert werden, wodurch sie für die molekulare Analyse der

Magnetosomenbiomineralisation und Magnetosomenkettenbildung prädestiniert sind (21, 64, 86, 110, 121). Außerhalb der Magnetospirillen gibt es ein Isolat eines marinen *Magnetococcus* (Stamm MC-1) (91) sowie eines marinen *Magnetovibrio* (Stamm MV-1) (13). Die Genomsequenz für Stamm MC-1 liegt bereits vor (<http://www.jgi.doe.gov>), während mit der Sequenzierung von Stamm MV-1 erst vor kurzem begonnen wurde. Obwohl genetische Techniken für Stamm MV-1 und Stamm MC-1 derzeit noch nicht etabliert sind, eröffnen ihre Genomsequenzen die Möglichkeit, den Einfluss genetischer Faktoren auf die Kristallmorphologie zu identifizieren, da sie anderes als die Magnetospirillen keine Kristalle mit Kuboktaeder-Morphologie bilden (48, 91).

### 1.1.1 Der Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Das magnetotaktische Spirillum *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 wurde 1990 aus dem Sediment des Flusses Ryck in der Nähe von Greifswald isoliert (121). Die helikalen Zellen sind typischerweise 2 – 3 µm lang, 0.8 µm im Durchmesser und bipolar monotrich begeißelt (Abbildung 2). *M. gryphiswaldense* ist chemo-organoheterotroph und lässt sich auf verschiedenen organischen Säuren mit Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptor kultivieren (113). Die Magnetitbildung bei Stamm MSR-1 erfordert einen O<sub>2</sub>-Partialdruck unterhalb von 20 mbar (57). Die Menge an Magnetit, die pro Zelle gebildet wird, steigt mit abnehmendem O<sub>2</sub>-Partialdruck und erreicht bei 0.25 mbar ihr Maximum. Zur Bildung von Magnetit nimmt *M. gryphiswaldense* Fe(III) in einem energieabhängigen Prozess mit hoher Rate auf (120). Inwiefern hierbei Eisenchelatoren involviert sind, ist nicht abschließend geklärt, da bisher keine Siderophore gefunden wurden, jedoch der Kulturüberstand die Aufnahme von Fe(III) stimuliert (119). Die Aufnahme von Fe(II) erfolgt deutlich langsamer und in einem energieunabhängigen Prozess (119). Eisenkonzentrationen von mehr als 15 µM im Medium sind sättigend für die Magnetitbildung bei Stamm MSR-1 (120). Höhere Eisenkonzentrationen führen zu keiner Zunahme der gebildeten Magnetitmenge, sondern bewirken ein verringertes Wachstum, sofern sie oberhalb des tolerierten Konzentrationsbereiches liegen. Die Konzentration an Eisen, ab welcher das Wachstum von Stamm MSR-1 inhibiert wird, bedarf aufgrund widersprüchlicher Angaben einer Überprüfung. So waren Eisenkonzentrationen über

200  $\mu\text{M}$  vor zehn Jahren für Laborkulturen von Stamm MSR-1 letal (120), während bei heutigen Laborkulturen keine Wachstumsbeeinträchtigung bis 500  $\mu\text{M}$  Eisen auftritt.



**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Zelle von (A) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 und von (B-D) Zellausschnitten. Dargestellt sind (B) eine Kette aus Magnetosomen, (C) ein Dünnschnitt einer Zelle mit Magnetosomen und (D) isolierte Magnetosomen mit negativ kontrastierter Magnetosomenmembran (Pfeil). Entnommen aus Literatur (77).

Die von Stamm MSR-1 gebildeten Magnetitkristalle haben die Form eines Kuboktaeders. Pro Zelle können bis zu sechzig Kristalle gebildet werden, die in Ketten angeordnet werden (119). Die Kristallgröße nimmt von der Mitte der Kette zu beiden Enden hin ab. Die größten Kristalle haben einen Durchmesser von 51 nm, während an den Kettenenden meist Kristalle mit einem Durchmesser unterhalb von 20 nm liegen. Am häufigsten treten in den Ketten Kristalle mit einem Durchmesser zwischen 35 – 40 nm auf. Die meisten Zellen bilden nur eine Kette, welche vorwiegend in der Zellemitte liegt und entlang der konkaven Seite der helikal gewundenen Zelle verläuft (Abbildung 2A). Neben dieser Anordnung kommt es bei einzelnen Zellen zur Bildung zweier parallel verlaufender und versetzt angeordneter Magnetosomenketten.

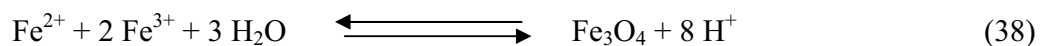
*M. gryphiswaldense* ist eines der wenigen magnetotaktischen Bakterien, die im größeren Maßstab kultiviert werden können (57) und dessen Genom in vorläufiger Komplettfassung vorliegt (110). Das Genom von Stamm MSR-1 hat eine Gesamtlänge von 4.26 Mb und trägt 4268 vorhergesagte offene Leserahmen (110). Für *M. gryphiswaldense* wurde ein genetisches System entwickelt, wodurch es für gezielte genetische Manipulationen zugänglich ist (123-125). Die etablierten genetischen Techniken gestatten die Erstellung chromosomaler Deletionen oder Insertionen sowie die Plasmid-vermittelte konstitutive Expression von Genen. All diese Gegebenheiten prädestinieren *M. gryphiswaldense* als Modellorganismus für die Untersuchung der molekularen Faktoren und Mechanismen der Magnetosomenbiomineralisation und Magnetosomenkettenbildung.

## 1.2 Magnetosomenbiomineralisation

Die Magnetosomenbiomineralisation ist ein komplexer Prozess, der die Bildung der Magnetosomenvesikel, die Aufnahme und den Transport von Eisen in die Magnetosomenvesikel und die Bildung der kristallinen Phase umfasst. Die kristalline Phase der Magnetosomen besteht entweder aus dem ferrimagnetischen Eisenoxid Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (45) oder dem ferrimagnetischen Eisensulfid Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (58, 103). Welches Mineral gebildet wird, ist vermutlich genetisch determiniert, da die bisher bekannten Arten, bis auf multizelluläre magnetotaktische Bakterien (65), ausschließlich eines der beiden Minerale bilden (12). So können Magnetit-bildende Magnetospirillen auch unter reduzierten Bedingungen in Gegenwart von Sulfid kein Greigit bilden (D. Faivre, unveröffentlichte Daten).

Für die Bildung von Magnetit kommen zwei Reaktionswege in Betracht. Einerseits kann Magnetit direkt aus der Co-Präzipitation von Fe(II) und Fe(III) entstehen und andererseits in einem zweistufigen Prozess über Ferrihydrit als Zwischenstufe gebildet werden (26, 45). Über welchen Prozess magnetotaktische Bakterien Magnetit bilden, wird derzeit diskutiert. Neueste Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen der Magnetitbildung bei *M. gryphiswaldense* lieferten keinen Hinweis auf die intermediäre Bildung von Ferrihydrit (38). Die Mößbauer-Untersuchungen zeigten, dass Eisen in Form von Magnetit, eisenbeladenem Ferritin und Fe(II) in den Zellen auftritt. Eisenbeladenes

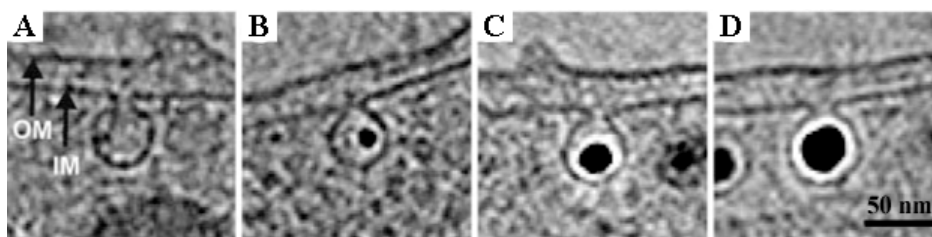
Ferritin wurde in annähernd gleicher Menge in der Membranfraktion als auch im Pool löslicher Bestandteile fraktionierter *M. gryphiswaldense* Zellen detektiert, während Fe(II) hauptsächlich Membran assoziiert vorliegt (38). Das von Faivre et al. (2007) postulierte Modell zur Bildung von Magnetitkristallen geht davon aus, dass Fe(II) sowie Fe(III) in den Magnetosomenvesikeln angereichert werden, wo die Co-Präzipitation von Fe(II) und Fe(III) zur Bildung von Magnetit führt.



Die einzelnen Gattungen magnetotaktischer Bakterien produzieren Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie und Größenverteilung (12). Die Größenverteilung aller Kristalle in einer Population verläuft asymmetrisch mit exponentiellem Anstieg bis zum Verteilungsmaximum und fällt danach innerhalb eines engen Größenbereiches wieder auf Null. Der Wert des Verteilungsmaximums liegt je nach Spezies zwischen 35 nm und 120 nm (5, 29, 80, 93). Kristalle in diesem Größenbereich haben nur eine magnetische Domäne und sind daher für die Magnetfeldorientierung optimiert. Oberhalb von 120 nm erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Bildung mehrerer magnetischer Domänen mit antiparalleler Orientierung des magnetischen Momentes sprunghaft, wodurch die magnetostatische Energie des gesamten Kristalls reduziert wird (88). Neben Kristallen mit stabilem magnetischem Moment kommen in den Zellen auch superparamagnetische Kristalle vor, deren Größe für die Erhaltung eines richtungsstabilen, magnetischen Moments bei Raumtemperatur nicht ausreicht. Die kritische Größe ist insbesondere vom Verhältnis von Breite zu Länge eines Kristalls abhängig und liegt für Kristalle mit isotroper Morphologie bei einem Durchmesser um die 25 nm (39, 61, 132).

Entscheidend für die biologische Steuerung der Kristallnukleation und des Kristallwachstums ist die räumliche Begrenzung der Mineralbildung auf die Magnetosomenvesikel. Diese gehen aus der Zytoplasmamembran hervor (Abbildung 3), weshalb die Vesikelmembran eine Lipid-Doppelschicht ist (49, 71). Die Bildung der Magnetosomenvesikel ist von der Mineralbildung entkoppelt. So wurden Magnetosomenvesikel auch in Zellen einer Mutante gefunden, die aufgrund der gezielten Deletion der Gene für den Magnetosomen-spezifischen Eisentransport kein Magnetit bilden

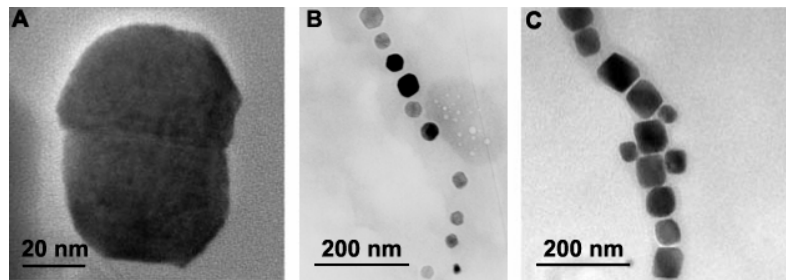
kann (K. Junge, unveröffentlichte Daten). Zudem bildet *M. gryphiswaldense* mehr Magnetosomenvesikel als letztendlich an magnetitgefüllten Magnetosomenvesikeln in den Zellen vorliegen, was darauf hindeutet, dass Magnetosomenvesikel für die Mineralbildung aktiviert werden können (71, 112). Die molekularen Faktoren die zur Entstehung von Magnetosomenvesikel durch Invaginationen der Zytoplasmamembran führen sind bisher unbekannt, da magnetotaktische Bakterien keine Sequenzhomologe zu bekannten Proteinen besitzen, die an der Vesikelbildung in Eukaryoten beteiligt sind (90).



**Abbildung 3:** In den Magnetosomenvesikelknospen nukleieren die Magnetitkristalle und können bis zur vollen Größe auswachsen. Die Bilder (A-D) sind XY-Projektionen aus Tomogrammen mehrerer *M. magneticum* AMB-1 Zellen, welche mittels Kryo-Elektronentomographie untersucht wurden. OM: äußere Membran, IM: Zytoplasmamembran. Entnommen aus Literatur (71).

### 1.3 Biophysikalische Betrachtung der Magnetfeldorientierung bei magnetotaktischen Bakterien

Für die Ausrichtung magnetotaktischer Bakterien im Erdmagnetfeld ist die Anordnung der Magnetosomen in einer Kette optimal. In ihrer energetisch günstigsten Konformation verlaufen die magnetischen Momente aller Kristalle einer Magnetosomenkette parallel zur Längsachse der Kette in dieselbe Richtung. Die magnetische Mikrostruktur einer Magnetosomenkette weicht jedoch im Allgemeinen von der einer idealen Kette magnetischer Dipole ab. Gründe dafür liegen im Auftreten von Magnetosomen mit Kristalldefekten und Abweichungen von der linearen Anordnung innerhalb der Kette oder den Kettenenden (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** (A) Kristallzwillinge und Abweichungen von der idealen Kettenanordnung der Magnetosomen an (B) den Kettenenden oder (C) innerhalb der Kette. Entnommen aus Literatur (39) und modifiziert.

Das magnetische Moment einer Kette magnetischer Dipole ist die Summe der magnetischen Einzelmomente. Im magnetischen Feld wirkt ein Drehmoment auf die Magnetosomenkette, welches aufgrund ihrer intrazellulären Fixierung auf die Zelle übertragen wird. Sofern das wirkende Drehmoment stark genug ist, kommt es zur passiven Ausrichtung der Zelle im Magnetfeld, wodurch die magnetischen Feldlinien die Achse der zellulären Bewegung vorgeben. Allerdings wirkt der Ausrichtung einer Zelle im Magnetfeld die thermische Energie ( $k_B T$ ) entgegen, weshalb für die passive Ausrichtung einer Zelle die Energie ihres zellulären magnetischen Momentes größer als  $k_B T$  sein muss. Das mittlere zelluläre, magnetische Moment ( $M$ ) wurde für eine Reihe magnetotaktischer Bakterien bestimmt und liegt zwischen  $3.2 \times 10^{-14} \text{ A m}^2$  und  $6.1 \times 10^{-16} \text{ A m}^2$  (46, 104). Diese magnetischen Momente entsprechen im Erdmagnetfeld ( $50 \mu\text{T}$ ) magnetischen Energien ( $E_m$ ) zwischen  $1.6 \times 10^{-18} \text{ J}$  und  $3.05 \times 10^{-20} \text{ J}$ . Die thermische Energie beträgt bei Raumtemperatur  $4.1 \times 10^{-21} \text{ J}$  und liegt damit deutlich unter dem kleinsten  $E_m$ -Wert, der für magnetotaktische Bakterien bestimmt wurde (42). Die über die Zeit gemittelte Ausrichtung einer schwimmenden Zelle im Erdmagnetfeld lässt sich anhand der Langevin Funktion ( $L(x)$ ) ermitteln, wobei  $x$  das Verhältnis der magnetischen Energie zur thermischen Energie darstellt.

$$L(x) = \coth(x) - 1/x = \cosh(x)/\sinh(x) - 1/x; \quad x = E_m / k_B T \quad (42)$$

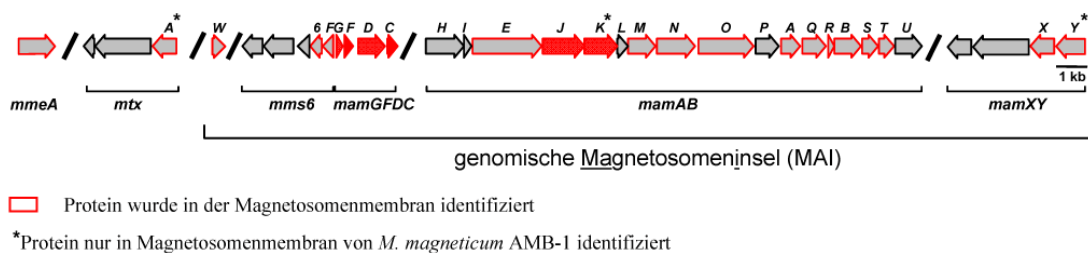
Für Zellen von *M. magnetotacticum* MS-1, welches Magnetitkristalle annähernd gleicher Größe und Morphologie wie *M. gryphiswaldense* MSR-1 bildet, wurde ein zelluläres magnetisches Moment von  $M = 5 \times 10^{-16} \text{ A m}^2$  (22 Kristalle je 45 nm im Durchmesser) gemessen (34), woraus sich  $L(x) = 0.84$  errechnet (siehe Anhang). Dies bedeutet, dass die Zellen von *M. magnetotacticum* MS-1 während des Schwimmens zu 84 % der Bewegungszeit parallel zu den Erdfeldlinien ausgerichtet sind (46). Anhand der Langevin-Funktion kann zudem die Anzahl der Kristalle errechnet werden, die für eine gerichtete Bewegung erforderlich sind. Eine Bewegung kann als gerichtet betrachtet werden, wenn die Richtung der Bewegungsachse zu >50 % der Bewegungszeit konstant ist. Für Kristalle mit sphärischer Morphologie errechnet sich unter der Annahme eines durchschnittlichen Kristalldurchmessers von 40 nm, wie für Stamm MSR-1 typisch, und  $L(x) = 0.501$  ( $x = 1.8$ ) eine minimale Anzahl von 10 Kristallen, die in einer Zelle vorliegen müssen (siehe Anhang). Sofern diese 10 Kristalle in einer Kette angeordnet sind, ist die zelluläre Bewegung entlang der Feldlinien des Erdmagnetfeldes im zeitlichen Mittel länger als die ungerichtete Bewegung. Magnetosomenketten müssen aus energetischen Gründen stabilisiert werden. Ohne Stabilisierung würde eine Magnetosomenkette spontan zu einer Anordnung mit niedrigerer magnetostatischer Energie zusammenfallen (66, 69, 100). Der Mechanismus der Assemblierung und der Stabilisierung einer Magnetosomenkette sowie die beteiligten molekularen bzw. strukturellen Komponenten sind bislang unbekannt.

#### 1.4 Molekulare Analyse der Magnetosomenbiomineralisation

Mit der proteomischen Analyse der Magnetosomenmembran (MM) bei Magnetospirillen begann die Ära der molekularen Analyse der Magnetosomenbiomineralisation (49). Verschiedene Arbeitsgruppen identifizierten eine variable Anzahl an Proteinen in der Membran isolierter Magnetosomen der Stämme *M. gryphiswaldense* MSR-1, *M. magneticum* AMB-1 und *M. magnetotacticum* MS-1 (4, 49, 53, 54, 96, 97, 130). Den wesentlichsten Beitrag lieferten die Arbeiten von Grünberg und Mitarbeitern (53, 54, 110), die bisher zwanzig spezifisch Proteine in der Magnetosomenmembran bei *M. gryphiswaldense* MSR-1 identifizieren konnten, welche zum großen Teil auch in der MM von *M. magneticum* AMB-1 und *M. magnetotacticum* MS-1 wiedergefunden wurden



(130, 131). Die proteomischen Studien an Magnetosomen von Stamm AMB-1 lieferten darüber hinaus weitere Proteine, die zum Magnetosomen-spezifischen Pool an Proteinen gezählt werden, so das bisher insgesamt dreiundzwanzig spezifische mit der MM assoziierten Proteine nachgewiesen wurden (110, 130). Die als Magnetosomenmembranproteine (MMP) bezeichneten Proteine tragen eine der folgenden Bezeichnungen: Mam (*magnetosome membran*, (54)), Mms (*magnetosome membran specific* (96)), Mme (*magnetsome membran associated* (110)) oder Mtx (*magnetotaxis* (110)). Die Gene der aus der proteomischen Analyse hervorgegangenen MMP sind zusammen mit weiteren offenen Leserahmen, die ebenfalls als *mam*-, *mms*- oder *mtx*-Gene bezeichnet werden, aber deren Translationsprodukte bisher nicht identifiziert wurden, in mehreren Genclustern organisiert (110, 134) (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Genomische Organisation der Gene der Magnetosomenmembranproteine bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Das größte Gencluster ist das *mamAB*-Operon und trägt die Gene *mamHIEJKLMNOPAQRBSTU*. Nur wenige kb stromaufwärts liegt das *mamGFDC*-Gencluster, das die gleichnamigen Gene umfasst. Nur wenige hundert Basenpaare stromaufwärts vom *mamGFDC*-Gencluster liegt das *mms6*-Gencluster mit sechs offenen Leserahmen. Stromabwärts des *mamAB*-Operon liegt das *mamXY*-Operon, welches vier Gene umfasst. Alle vier Gencluster liegen zusammen mit *mamW* innerhalb einer 130 kb langen Sequenzregion, die als Magnetosomeninsel (MAI) bezeichnet wird (134). Außerhalb der MAI liegen die Gene von MmeA und MtxA wobei letzteres im *mtx*-Operon mit zwei weiteren Genen codiert ist. Die Funktionen der Produkte der rot-markierten Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Nur wenige der identifizierten MMP weisen signifikante Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf oder enthalten konservierte und charakterisierte Sequenzdomänen, anhand derer auf eine Funktion geschlossen werden kann. Für das MMP MtxA wird eine Rolle im Rahmen der Magnetfeldorientierung magnetotaktischer Bakterien vermutet, da es im *mtx*-Operon zusammen mit einer möglichen Sensor kinase angeordnet ist (110). Die Funktion des MMP MmeA ist ebenfalls unklar. Interessanterweise gibt es im Genom des

nächsten Verwandten der Magnetospirillen dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospirillum rubrum* ein *mmeA*-Homolog. Naheliegenderweise wurde daher vermutet, dass MmeA in Membran-assoziierten Prozesse involviert ist, die sowohl in Magnetospirillen als auch in *R. rubrum* ablaufen, wie z. B. Prozesse, die zur Invagination der Zytoplasmamembran führen (110). Über die Funktionen der MMP MamX und MamY, die durch das *mamXY*-Operon codiert werden, liegen bisher keine Erkenntnisse vor (110). Jedoch weisen MamX und MamY partielle Sequenzähnlichkeit zu anderen im *mamAB*-Operon codierten MMP auf (MamX zu MamE und MamS, MamY zu MamH).

Die MMP, die durch das *mamGFDC*-Operon (Abbildung 5) codiert werden, stellen mit einem Anteil von 35 % die am häufigsten auftretenden Proteine der MM dar (53). Aufgrund fehlender Sequenzähnlichkeit der vier Proteine zu bekannten Proteinen in den Datenbanken, konnte für keines eine Funktion postuliert werden. Lediglich ein bei MamD und MamG auftretendes hydrophobes Sequenzmotiv in dem mehrfach Leucin (L) gepaart mit Glycin (G) auftritt, lässt erahnen, in welchem Rahmen MamD und MamG agieren könnten. So sind Proteine mit LG-Dipeptid-Wiederholungen in anderen Biomineralisationssystemen als Strukturproteine identifiziert worden (22, 129), weshalb MamD und MamG eine strukturelle Rolle im Rahmen der Magnetosomenbiomineralisation haben könnten. Die genauen Funktionen der Proteine MamG, MamF, MamD und MamC wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Von den sechs offenen Leserahmen des *mms6*-Gencluster sind bisher nur die Translationsprodukte von *mms6* und *mmsF* in der Magnetosomemembran identifiziert worden (Abbildung 5). Die *in vivo* Funktion von Mms6 ist bisher ungeklärt. *In vitro* Experimente zeigten, dass Mms6 Eisenionen bindet und die Morphologie sich bildender Magnetitkristalle beeinflusst (4). Es wird daher vermutet, dass Mms6 *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Nukleation der Magnetitkristalle in den Magnetosomen einnimmt (77). Interessanterweise beinhaltet Mms6 das gleiche LG-reiche Motiv wie MamD und MamG, was auf einen gemeinsamen Interaktionspartner dieser Proteine hindeuten könnte. Für MmsF liegen keine experimentellen Befunde vor. Allerdings ist die Sequenz von MmsF zu der von MamF zu 62 % identisch, weshalb MmsF eine ähnliche Funktion wie MamF haben könnte (110).

Der Großteil der identifizierten MMP sind im *mamAB*-Operon codiert (Abbildung 5). Einige dieser MMP konnten aufgrund ihrer Primärsequenz verschiedenen Proteinfamilien zugeordnet werden. So gehört das MMP MamA zur Familie der *Tetratricopeptid repeat* (TPR) Proteine. TPR-Motive sind in einer Vielzahl von Proteinen mit verschiedensten Funktionen enthalten, wobei die TPR-Motive im allgemeinen Protein-Protein Interaktionen vermitteln (28). Ursprünglich wurde für MamA eine wichtige Rolle bei der Bildung der Magnetosomenvesikel vermutet (97, 98). Experimentelle Befunde zu MamA unterstützen diese Vermutung indes nicht, da eine *mamA*-Deletionsmutante von *M. magneticum* AMB-1 weiterhin Magnetosomenvesikel bildet (72). Jedoch zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass  $\Delta$ *mamA*-Zellen nur halb so viele magnetitgefüllte Magnetosomen wie Wildtypzellen aufwiesen. Die Ursache dafür ist bisher ungeklärt, es liegt aber die Vermutung nahe, dass MamA regulatorisch in den Prozess der Magnetosomenbiomineralisation eingreift (72). Die MMP MamB und MamM gehören zur CDF3-Familie von Metalltransportern und sind höchstwahrscheinlich in den Magnetosomen-gerichteten Eisentransport involviert. Die Deletion von *mamM* oder *mamB* in *M. gryphiswaldense* führt zu Magnetit-freien Zellen obwohl weiterhin Magnetosomenvesikel gebildet werden (K. Junge, unveröffentlichte Daten). Die Proteine MamE und MamO haben Sequenzähnlichkeit zu HtrA-ähnlichen Serinproteasen und enthalten PDZ-Domänen, die in einer Vielzahl von Membran-assoziierten Proteinen zu finden sind und die Bindung verschiedenster Liganden vermitteln (102). Die Rolle von MamE und MamO bei der Magnetosomenbildung wurde bisher noch nicht untersucht. Das MMP MamN besitzt Sequenzähnlichkeit zu einer Gruppe von Proteinen, die in den Transport von Ionen involviert sind, worunter auch Protonentransporter sind. Dementsprechend könnte MamN am Transport von Protonen durch die MM beteiligt sein, die bei der Bildung von Magnetit entstehen (62). Für die im *mamAB*-Operon codierten MMP MamQ, MamR, MamS und MamT gibt es bisher keine Hinweise auf eine Funktion, da sie weder auffällige oder bekannte Sequenzmotive beinhalten noch signifikante Sequenzähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinen haben.

Eines der wenigen MMP mit Sequenzähnlichkeit zu Proteinen mit bekannter Funktion ist MamK. MamK zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu MreB, einem Mitglied der Aktin-Superfamilie der ATPasen (36, 114, 118). Das bei Bakterien vorkommende MreB ist ein

strukturelles und funktionelles Pendant des eukaryotischen Zytoskelettproteins Aktin und bildet filamentöse Strukturen, die spiralförmig unterhalb der Zytoplasmamembran Membran durch die Zelle verlaufen (63). Neben MreB und Aktin zählen zur Aktin-Superfamilie der ATPasen auch Proteine, die in keinem Bezug zum Zytoskelett stehen wie Hitzeschockproteine (Hsp70/DnaK) und Hexokinasen (23). Für das bei magnetotaktischen Bakterien konservierte MamK Protein wurde aufgrund seiner Homologie zu MreB vermutet, dass es ein strukturelles Element der Magnetosomenketten ist, welches womöglich deren Bildung und Segregation steuert (117). Experimentelle Befunde zu MamK wurden erst im Verlauf dieser Arbeit verfügbar und stehen mit den hier präsentierten Ergebnissen zu molekularen Mechanismen der Bildung von Magnetosomenketten in Zusammenhang, weshalb MamK im Ergebnisteil dieser Arbeit abgehandelt wird. Stromaufwärts von *mamK* liegt das Gen des MMP MamJ, dessen Sequenz auffällige repetitive Sequenzbereiche beinhaltet. Die repetitiven Bereiche erstrecken sich über die Hälfte des MamJ-Proteins und tragen auffällig viele Glutaminsäure-Reste, die häufig gepaart mit Prolin auftreten (112). Da saure, repetitive Domänen auch in Proteinen auftraten, die in die Mineralbildung in anderen Biomineralisationsystemen involviert sind (50, 60, 73, 108, 139), wurde für MamJ vermutet, dass seine sauren Aminosäurereste Eisen-Ionen komplexieren und es dadurch die Bildung von Magnetit beeinflusst (118). Repetitive Prolin-reiche Motive sind allerdings auch charakteristisch für einigen Strukturproteine (60, 137, 145), weshalb für MamJ ursprünglich auch eine strukturelle Rolle im Rahmen der Magnetosomenbiomineralisation und Magnetosomenkettenbildung in Betracht gezogen wurde.

## 1.5 Zielsetzung

Obwohl einige der molekularen Faktoren der Magnetosomenbiomineralisation zu Beginn dieser Arbeit schon identifiziert waren, blieben die molekularen Mechanismen der Magnetosomenbildung, der Assemblierung von Magnetosomenketten sowie deren Stabilisierung unverstanden, da von der Sequenz der meisten Magnetosomenmembranproteine auf keine Funktion geschlossen werden kann. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Magnetosomenbildung und Magnetosomenkettenbildung beitragen, indem die Funktion ausgewählter Proteine der Magnetosomenmembran erforscht wurde. Dazu galt es, durch gezielte Deletionsmutagenese die entsprechenden Gene in *Magnetospirillum gryphiswaldense* zu deletieren und die entstandenen Mutanten ausführlich zu untersuchen.

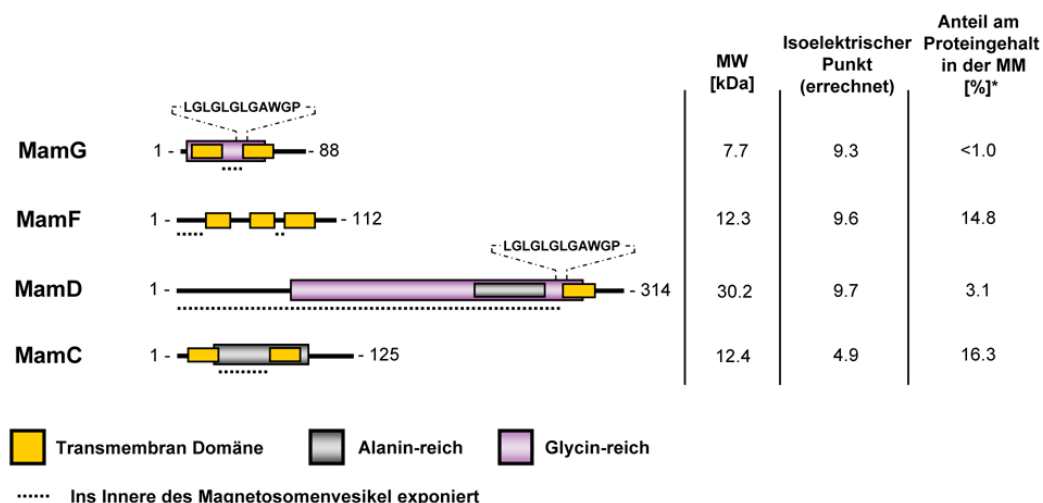
Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Charakterisierung der Proteine MamGFDC, die zusammen in einem Operon codiert liegen und die die Hauptproteinkomponenten der Magnetosomenmembran darstellen. Dazu galt es, eine *mamC*-Deletionsmutante zu generieren und auf Veränderungen der Magnetosomen zu untersuchen. Zudem sollte mittels Komplementationsanalyse in einer *mamGFDC*-Deletionsmutante die spezifische Rolle der einzelnen MamGFDC-Proteine untersucht werden.

Der andere Teil dieser Arbeit widmete sich dem Protein MamJ, für welches aufgrund auffälliger Sequenzmotive eine wichtige Rolle im Rahmen der Magnetosomenbiomineralisation und Magnetosomenkettenbildung postuliert wurde. Um Hinweise auf die Funktion von MamJ zu erhalten, sollte eine *mamJ*-Deletionsmutante erstellt und analysiert werden. Um die Wirkweise von MamJ detaillierter zu verstehen, galt es herauszufinden, inwiefern und auf welche Art und Weise die strukturellen Besonderheiten zur Funktion von MamJ beitragen.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### Teil A: Funktionelle Untersuchung der Proteine des *mamGFDC*-Operon

Die Proteine MamG, MamF, MamD und MamC werden bei den bisher sequenzierten Vertretern der Gattung *Magnetospirillum* durch das *mamGFDC*-Operon codiert und sind in der Magnetosomenmembran lokalisiert. Bei *M. gryphiswaldense* MSR-1 haben die MamGFDC-Proteine zusammen einen Anteil von ca. 35 % an der Gesamtproteinfaktion der Magnetosomenmembran, wobei MamC mit einer Abundanz von ca. 16 % das häufigste Magnetosomenmembranprotein (MMP) ist, gefolgt von MamF, MamD und MamG (53). Die MamGFDC-Proteine besitzen weder signifikante Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen noch enthalten sie konservierte Sequenzdomänen, die auch in anderen Proteinen zu finden sind. Auffällig sind lediglich Regionen mit unausgewogener Aminosäurezusammensetzung in MamG, MamD und MamC, die entweder einen hohen Anteil an Alanin (Häufigkeit von Alanin in Alanin-reicher Domäne von MamD 33.3 % und bei MamC 32.8 %) oder an Glycin (bei MamG 33.3 % und bei MamD 20.5 %) aufweisen (Abbildung 6). Alle vier Proteine beinhalten vorhergesagte Transmembrandomänen zur Verankerung in der Magnetosomenmembran. Zudem besitzt sowohl MamG als auch MamD ein auffälliges Sequenzmotiv (LGLGLGLGAWGP) mit kurzer Leucin-Glycin-Dipeptid-Wiederholung (LG-Repeat).



**Abbildung 6:** Charakteristika der MamGFDC-Proteine von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 und Eigenschaften die von der Sequenz abgeleitet wurden. \*Daten entnommen aus Literatur (53).

Sowohl die Primärstruktur der einzelnen MamGFDC-Proteine als auch die gemeinsame Organisation der codierenden Gene in einem Operon sind innerhalb der Gattung *Magnetospirillum* stark konserviert. Das am stärksten konservierte Protein des *mamGFDC*-Operon ist MamF (83 % Sequenzidentität), gefolgt von MamD (81 %), MamC (80 %) und MamG (64 %). In magnetotaktischen Bakterien, die nicht zur Gattung *Magnetospirillum* gehören, sind bisher auf genomischer Ebene nur Orthologe zu MamF, MamD und MamC gefunden worden (62, 110). So gibt es im Genom von *Magnetococcus* Stamm MC-1 ein Gen für MamF (in der Annotation bezeichnet als Mmc1\_2274), MamD (Mmc1\_2237) und MamC (Mmc1\_2265), aber keines für MamG. Ein Sequenzvergleich mit MamFDC der Magnetospirillen zeigt, dass MamC am stärksten konserviert ist, während MamD die höchste Sequenzdivergenz aufweist. Bisher unpubliziert sind Genomfragmente von *Magnetovibrio* Stamm MV-1 und ein aus einer Metagenom-Bank stammendes Sequenzfragment eines unbekanntes magnetotaktischen Bakteriums. Beide Organismen besitzen ein Homolog zu *mamF* sowie Homologe zu Genen des *mamAB* Clusters der Magnetospirillen (C. Jogler, unveröffentlichte Daten). Ein Homolog für *mamG*, *mamD* und *mamC* ist in den bisher sequenzierten DNA-Fragmenten dieser beiden magnetotaktischen Bakterien nicht gefunden worden.

Das Fehlen homologer Proteine zu MamGFDC außerhalb der Gruppe magnetotaktischer Bakterien, die anscheinend weite Verbreitung der MamGFDC-Proteine bei magnetotaktischen Bakterien sowie ihre hohe Abundanz in der Magnetosomenmembran gab Anlass zur Annahme, dass die MamGFDC-Proteine eine wichtige Rolle im Rahmen der Magnetosomenbiomineralisation besitzen. Um diese Vermutung für das häufigste Magnetosomenmembranprotein (MamC) zu überprüfen, erzeugte A. Gärdes unter Mitarbeit und Anleitung von A. Scheffel während ihrer Diplomarbeit eine *mamC*-Deletionsmutante von *M. gryphiswaldense* MSR-1, die im Rahmen der Arbeit von A. Gärdes nicht mehr umfassend charakterisiert werden konnte (47). Um außerdem die bestehenden Methoden zur Deletionsmutagenese bei *M. gryphiswaldense* zu erweitern, wurde zur Deletion von *mamC* ein von Marx und Lidstrom (2004) entwickeltes Vektorsystem an *M. gryphiswaldense* etabliert, welches die Komponenten des Cre-*loxP* Systems codiert. Das Cre-*loxP* System ermöglicht die spezifische Deletion *loxP*-flankierter Sequenzabschnitte mittels Cre Rekombinase, wobei eine *loxP*-Sequenz an der Stelle des deletierten Bereiches

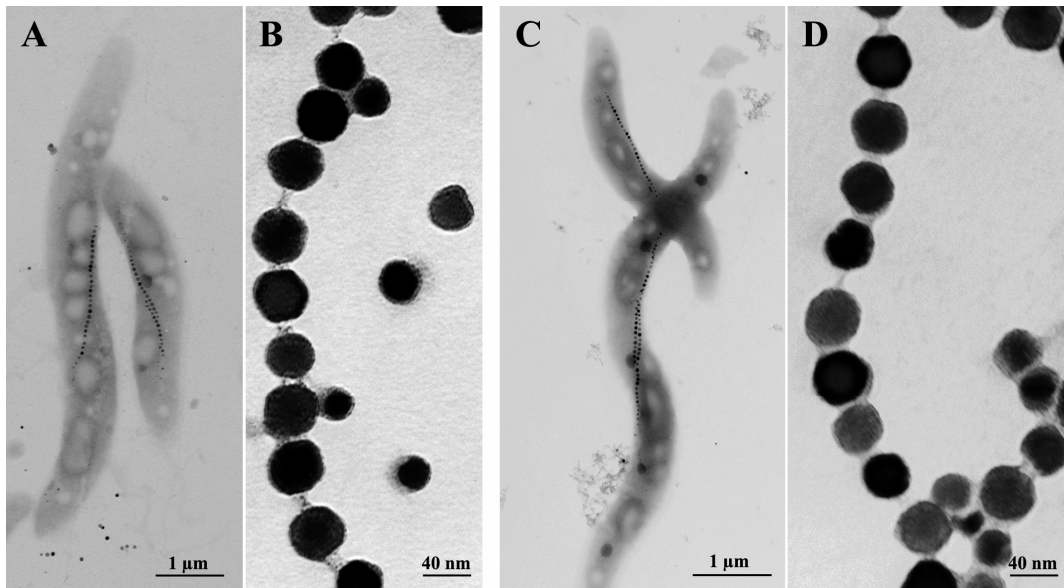
im Chromosom verbleibt (99). Obwohl eine *loxP*-Sequenz an Stelle von *mamC* im *mamGFDC*-Operon verbleibt, lassen sich polare Effekte auf die anderen Gene des Operons ausschließen, da *mamC* im *mamGFDC*-Gencluster endständig positioniert ist. Parallel zur Deletionsmutagenese von *mamC* generierte K. Grünberg im Rahmen ihrer Dissertation eine unmarkierte *mamGFDC*-Deletionsmutante von *M. gryphiswaldense* MSR-1, um zusätzlich Hinweise auf die Funktion aller Gene des *mamGFDC*-Operon zu erhalten (114). Die Erstellung einer Deletionsmutante von *M. gryphiswaldense* ist aufgrund der geringen Rekombinationseffizienz im Allgemeinen ein langwieriger Prozess. Daher konnte die  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante im Rahmen der Dissertation von K. Grünberg nur eingeschränkt charakterisiert werden. So blieb zu klären, ob der im Vergleich zum Wildtyp veränderte Phänotyp der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante durch Komplementation mit dem *mamGFDC*-Operon wiederhergestellt werden kann, wodurch der Zusammenhang zwischen Deletion und Phänotyp erst bewiesen wäre. Die Komplementationanalyse sowie die umfassende Charakterisierung der Mutanten  $\Delta$ *mamC* und  $\Delta$ *mamGFDC* wurde daher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um detaillierte Hinweise auf die Funktion und den Funktionsmechanismus der MamGFDC-Proteine zu erhalten.

## **2.1 Die Deletion von *mamC* hat einen geringen Effekt auf die Größe der Magnetosomenkristalle**

Überraschenderweise hatte die Deletion von *mamC* nur einen geringen Einfluss auf die Magnetosomenbiomineralisation in *M. gryphiswaldense*. Weder die Form der gebildeten Kristalle noch die Anordnung und Anzahl der Magnetosomen in den Magnetosomenketten unterscheidet sich augenscheinlich zwischen den Zellen der  $\Delta$ *mamC*-Mutante und denen des Wildtyps (Abbildung 7). Um zu überprüfen, ob die Deletion von *mamC* auf die Kristallgröße Einfluss hat, wurden die Kristalle in Zellen stationärer Kulturen vermessen. Die Vermessung eines Kristalls erfolgte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Auf diesen ist jeder Kristall eine zwei-dimensionale Projektion in Richtung des einfallenden Elektronenstrahls. Daher bestimmt der Neigungswinkel eines Kristalls gegenüber dem einfallenden Elektronenstrahl die Größe seiner zwei-dimensionalen Projektion. Die Projektion eines Kristalls mit Formanisotropie kann daher eine ovale Form aufweisen, deren Breite und Länge nicht den realen Abmaßen des drei-dimensionalen Kristalls



entspricht. Daher wird neben dem Kristalldurchmesser (längster Durchmesser, wenn Projektion oval-förmig) auch das Breiten-Längen-Verhältnis (Formfaktor) des projizierten Kristalls angegeben. Für die meisten der kubooktaedrischen Kristalle des Wildtyps ist der Formfaktor  $>0.9$ .



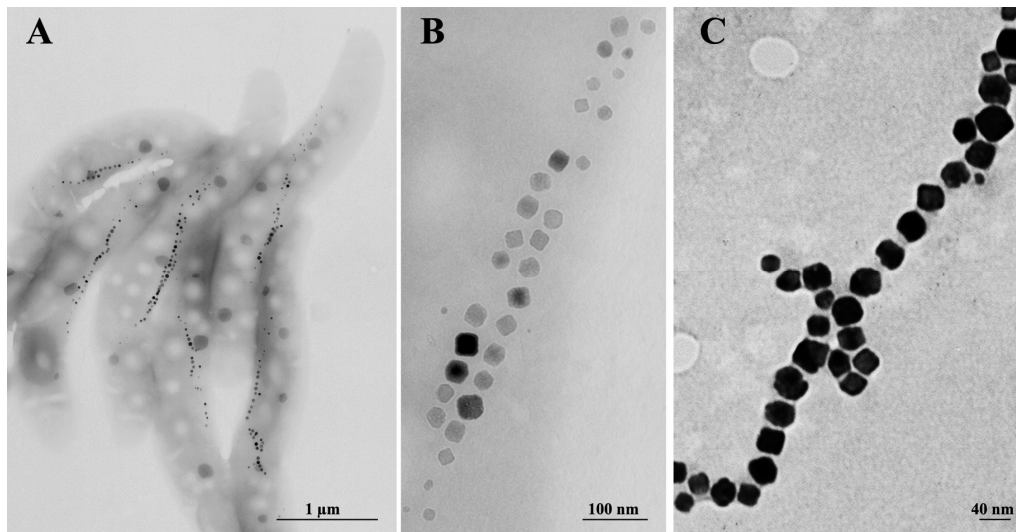
**Abbildung 7:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) Zellen und (B) isolierter Magnetosomen des Wildtyps sowie von (C) Zellen und (D) isolierter Magnetosomen der  $\Delta mamC$ -Mutante von *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Magnetosomen wurden isoliert wie bei Grünberg et al. (2004) beschrieben und mit Uranylacetat kontrastiert

Die Vermessung von über zweihundert Magnetitkristallen zeigte, dass die gebildeten Kristalle in  $\Delta mamC$ -Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen von geringfügig kleinerem Durchmesser sind (Manuskript 4, Abbildung 2, Tabelle 1). Der statistische Vergleich der ermittelten Kristalldurchmesser aus Wildtyp und  $\Delta mamC$ -Mutante bestätigt, dass beide Größenverteilungen sich signifikant ( $P < 0.001$ ) unterscheiden (Manuskript 4, Tabelle 2). Die *in trans* Expression von *mamC* in der  $\Delta mamC$ -Mutante stellt die Bildung von Kristallen mit Wildtypdurchmesser wieder her (Manuskript 4, Tabelle 2). Die Formfaktorverteilung für Kristalle der  $\Delta mamC$ -Mutante sowie die der komplementierten Mutante zeigen gegenüber der Formfaktorverteilung der Wildtyp-Kristalle keine signifikante Veränderung ( $P > 0.05$ ), was verdeutlicht, dass das Fehlen von MamC das

Kristallwachstum gleichermaßen in alle Richtungen beeinflusst und nicht entlang einer spezifischen Kristallachse.

## 2.2 Die Deletion des *mamGFDC*-Operon führt zur Bildung deutlich kleinerer Magnetitkristalle

Im Gegensatz zur Deletion von *mamC* führt die Deletion des *mamGFDC*-Operons zu einer deutlichen Abnahme der Kristallgröße. Zudem entspricht die Projektionsform vieler  $\Delta$ *mamGFDC*-Kristalle in TEM-Aufnahmen nicht der typischen Form der Wildtyp-Kristalle (Abbildung 8). Auffällig ist zudem, dass  $\Delta$ *mamGFDC*-Zellen keine perfekten Wildtyp-Magnetosomenketten mehr bilden. In den Magnetosomenketten der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante treten häufig Lücken auf, in denen ein oder mehrere Magnetitkristalle in Folge fehlen, wodurch die Kette eine diskontinuierliche Struktur aufweist (Abbildung 8A). Insbesondere an den Enden der Magnetosomenkette sind die Abstände zwischen den einzelnen Magnetosomen deutlich größer als bei Wildtyp-Ketten. Das Fehlen der MamGFDC-Proteine hat daher beträchtliche Konsequenzen für die magnetische Ausrichtung der  $\Delta$ *mamGFDC*-Zellen. Im Vergleich zu Wildtypzellen mit gleicher Kristallanzahl bedingen die kleineren Kristalle sowie die unvollkommenen Magnetosomenketten ein deutlich geringeres magnetischen Moment bei Zellen der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante. So zeigen Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit, dass bei Verringerung des Kristalldurchmessers von 40 nm auf 30 nm, die für eine gerichtete Bewegung ( $L(\alpha) > 0.5$ ) nötige Kristallanzahl von zehn (bei 40 nm) auf zweiundzwanzig Kristalle bei 30 nm Durchmesser steigt (siehe Anhang). Da die Kristallgröße von der Mitte der Magnetosomenkette zu beiden Enden hin abnimmt, wird vermutlich nur eine geringe Anzahl von  $\Delta$ *mamGFDC*-Zellen zweiundzwanzig Kristalle mit einem Durchmesser von 30 nm aufweisen, weshalb das magnetische Moment der meisten Zellen einer  $\Delta$ *mamGFDC*-Population vermutlich nicht für eine gerichtete Bewegung im Erdmagnetfeld ausreicht.

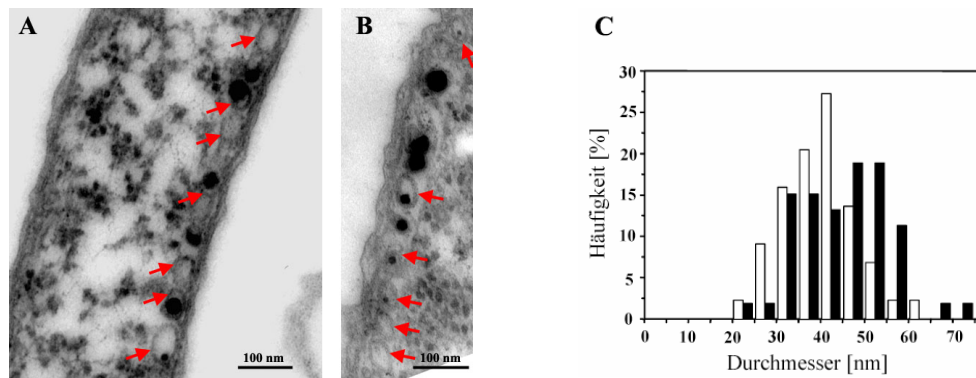


**Abbildung 8:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) Zellen der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante, (B) Ausschnitt einer  $\Delta mamGFDC$ -Zelle und von (C) isolierten Magnetosomen der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante.

Die Kristalle der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante sind durchschnittlich ca. 25 % kleiner als die des Wildtyps (Manuskript 4, Abbildung 2 & Tabelle 1). In stationären Zellen des Wildtyps treten am häufigsten Kristalle mit einem Durchmesser zwischen 35 - 40 nm auf, während in stationären  $\Delta mamGFDC$ -Zellen Kristalldurchmesser zwischen 25 - 30 nm am häufigsten sind (Manuskript 4, Tabelle 1). Signifikant ist auch der Unterschied zwischen den Formfaktorverteilungen beider Stämme ( $P < 0.001$ ), wobei die Formanisotropie vieler  $\Delta mamGFDC$ -Kristalle deutlich höher ist als die der Wildtyp-Kristalle (Manuskript 4, Abbildung 2). Inwiefern die Zunahme der Formanisotropie bei  $\Delta mamGFDC$ -Kristallen eine Konsequenz der verringerten Kristallgröße ist, lässt sich aufgrund der Datenlage nicht eindeutig sagen. So sind die Projektionsformen insbesondere größerer  $\Delta mamGFDC$ -Kristalle ( $> 35$  nm) häufig denen der Wildtyp-Kristalle ähnlich. In Wildtypzellen treten zudem vereinzelt Kristalle ( $< 30$  nm) auf, deren Projektionsform der für  $\Delta mamGFDC$ -Kristalle typischen entspricht. Die typische Projektionsform kleiner  $\Delta mamGFDC$ -Kristalle weicht jedoch im Allgemeinen deutlich von der gleichgroßer Wildtyp-Kristalle ab, was andeutet, dass die MamGFDC-Proteine vermutlich den Kristallisationsprozess beeinflussen.

Um herauszufinden, ob das Fehlen der häufigsten Magnetosomenmembranproteine mit einem Verlust der Integrität der Magnetosomenmembran einhergeht, wurden Magnetosomen von Wildtyp und  $\Delta mamGFDC$ -Mutante isoliert und elektronenmikroskopisch analysiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen offenbarten keinen erkennbaren Unterschied zwischen der Membran isolierter Wildtyp- und  $\Delta mamGFDC$ -Magnetosomen, weshalb die MamGFDC-Proteine vermutlich kaum Einfluss auf die Integrität der Magnetosomenmembran haben (Manuskript 4, Abbildung 1b).

Da das Fehlen der MamGFDC-Proteine keinen erkennbaren Einfluss auf die Bildung von Magnetosomenvesikeln hat, aber einen deutlichen Einfluss auf die Kristallgröße und Kristallform, lag die Vermutung nahe, dass die Deletion des *mamGFDC*-Operon zur Bildung kleiner Magnetosomenvesikel führt. Um dies zu untersuchen, wurden Dünnschnitte der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante und des Wildtyps in Kooperation mit B. Wanner (Ludwig Maximilians-Universität München) angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 9). Für die Vermutung, dass die Magnetosomenvesikel ohne MamGFDC-Proteine deutlich kleiner sind als Wildtypvesikel und dadurch die Kristalle der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante durchschnittlich nur 75 % des Durchmessers der Wildtypkristalle erreichen, wurden keine Hinweise gefunden. Obwohl einzelne Magnetosomenvesikel in Wildtypzellen einen deutlich größeren Durchmesser aufwiesen als alle  $\Delta mamGFDC$ -Magnetosomenvesikel, war der Unterschied zwischen den Größenverteilungen der Vesikel beider Stämme nicht signifikant ( $P > 0.01$ ).



**Abbildung 9:** Die Durchmesser der Magnetosomenvesikel von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 und der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante unterscheiden sich statistisch nur geringfügig ( $P > 0.01$ ). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten (A) von Stamm MSR-1 und (B) von der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante. Pfeile zeigen auf die Magnetosomenvesikel. (C) Größenverteilung der vermessenen Vesikel des Wildtyps (■) und der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante (□). Es wurden dreiundfünfzig Wildtyp- und dreiundvierzig  $\Delta mamGFDC$ -Magnetosomenvesikel vermessen. Die Durchmesser der Wildtyp- und  $\Delta mamGFDC$ -Vesikel, liegen zum Teil über dem Durchmesser ausgewachsener Kristalle in ungeschnittenen Zellen. Dies ist vermutlich ein methodischer Artefakt, da auch einige ausgewachsene Kristalle in den Dünnschnitten größer sind als in ungeschnittenen Zellen. Um die Detektion der Leeresikel zu erleichtern, wurden beide Stämme in Eisen-armen Medium ( $< 1 \mu\text{M}$  Eisen) angezogen, da sie unter diesen Bedingungen nur wenige Kristalle mit geringer Größe bilden. Aufnahmen wurden von G. Wanner (Ludwig Maximilians-Universität, München) erstellt.

### 2.3 Die MamGFDC-Proteine beeinflussen additiv die Größe der Magnetitkristalle

Um detaillierter zu untersuchen, inwiefern die MamGFDC-Proteine die Kristallgröße und die Kristallform beeinflussen, wurden sowohl das komplette *mamGFDC*-Operon als auch dreizehn Varianten des Operons in der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante exprimiert (Manuskript 4, Abbildung 5). Die *in trans* Expression des kompletten *mamGFDC*-Operons in der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante führte zu einer signifikanten Erhöhung der Größe ausgewachsener Kristalle und stellte die Bildung perfekter Magnetosomenketten wieder her (Manuskript 4, Tabelle 2). Interessanterweise erreichen einige Kristalle sowohl in *mamC*-komplementierten  $\Delta mamC$ -Zellen (Maximum 56 nm) als auch in *mamGFDC*-komplementierten  $\Delta mamGFDC$ -Zellen (Maximum 57.8 nm) deutlich größere maximale Durchmesser als in Zellen des Wildtyps (Maximum 50.4 nm) auftreten. Eine

Ursache dafür könnte ein Gen-Dosis-Effekt sein, zumal auch Wildtypzellen, die zusätzlich zur chromosomalen Expression das komplette *mamGFDC*-Operon *in trans* exprimieren, größere Kristalle (Maximum 56.6 nm) bilden.

Die einzelnen Varianten des *mamGFDC*-Operons, welche in der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante exprimiert wurden, codierten entweder ein (*mamG*, *mamF*, *mamD* oder *mamC*), zwei (*mamGD*, *mamGC*, *mamFD*, *mamFC* oder *mamDC*) oder drei Gene (*mamGFD*, *mamGFC*, *mamGDC* oder *mamFDC*) des Operons. Jede Operon-Variante wurde aus einer modifizierten Version des *mamGFDC*-Operon erstellt, in welcher die Gene *mamGFD* am 5' und am 3' Ende eine für das gesamte Konstrukt einmalige *blunt-end* Restriktionsschnittstelle tragen. Um Konstrukte ohne *mamC* zu erstellen, welches an letzter Position im Operon liegt, wurde zwischen *mamD* und *mamC* eine *EcoRI*-Schnittstelle generiert (Manuskript 4, Abbildung 5). Alle Restriktionsschnittstellen wurden durch gerichtete Mutagenese generiert, wobei nur die *Wobble*-Position des Tripletts verändert wurde, so dass die Aminosäuresequenz an dieser Stelle unverändert bleibt. Die generierten Restriktionsschnittstellen innerhalb eines Gens liegen *in frame*, weshalb nach dem Schneiden mit zwei Enzymen und Ligation der beiden Enden die Translation dieses intern verkürzten Gens ein funktionsloses *nonsense*-Polypeptid hervorbringt, welches aus 6 - 10 Aminosäuren des N-Terminus und 4 – 8 Aminosäuren des C-Terminus (bei *mamD* 84 Aminosäuren) des ursprünglichen Proteins zusammengesetzt ist. Die Deletion einzelner oder mehrere Gene in der modifizierten Version des *mamGFDC*-Operon führte nicht zum Abbruch der Transkription im Operon verbliebener stromabwärts gelegener Gene, wie mittels reverser Transkriptase-PCR nachgewiesen wurde (nicht dargestellt).

Die *in trans* Expression der dreizehn Varianten des *mamGFDC*-Operon offenbarte einen additiven Einfluss der MamGFDC-Proteine auf die Kristallgröße. Obwohl der relative Beitrag jedes einzelnen Proteins nicht genau aufgeschlüsselt werden kann, da die Kristallgrößenverteilung für einige der komplementierten Stämme nicht mit denen der anderen komplementierten Stämme vereinbar ist, zeigen die Ergebnisse dennoch bemerkenswerte Tendenzen auf. So wird deutlich, dass weder MamG, MamF, MamD noch MamC allein für die Wiederherstellung der maximalen Wildtyp-Kristallgröße in der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante ausreichend sind (Manuskript 4, Tabelle 1). Auch  $\Delta$ *mamGFDC*-Stämme, die mit zwei beliebigen Genen des *mamGFDC*-Operon

komplementiert wurden, produzieren Kristalle mit kleinerer Größe als der Wildtyp, aber größerem Durchmesser als in den Zellen der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante auftreten. Bei Komplementation der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante mit drei Genen des *mamGFDC*-Operon ist der Unterschied zwischen der Kristallgrößenverteilung dieser Stämme und der des Wildtyps nicht mehr signifikant, und auch die maximale Kristallgröße ist annähernd gleich dem der Kristalle des Wildtyps. Anders als bei der Kristallgröße ließen die Formfaktorverteilungen der dreizehn unterschiedlich komplementierten  $\Delta mamGFDC$ -Stämme keine Tendenz erkennen. Schon die Komplementation mit einem der vier *mamGFDC*-Gene verringerte die Formanisotropie der meisten Kristalle.

#### **2.4 Der Verlust der MamGFDC-Proteine könnte durch andere Proteine kompensiert werden**

Unerwarteterweise ist das *mamGFDC*-Operon nicht essenziell für die Magnetosomenbiomineralisation in *M. gryphiswaldense*. Es ist jedoch nicht geklärt, ob das Fehlen der MamGFDC-Proteine in Stamm MSR-1 nicht durch andere Proteine kompensiert wird. So ist das MmsF Protein, welches durch das *mms6*-Operon codiert wird, dem MMP MamF zu 62 % identisch (110). Im Genom von *M. magneticum* AMB-1 existieren sogar drei Sequenzhomologe zu *mamF*. Insofern lässt sich die Funktion von MamF nicht aufklären, ohne auch die anderen MamF Homologe zu deletieren, weshalb künftige Analysen die Mutagenese von *mmsF* einschließen sollten. Auf welche Weise die MamGFDC-Proteine mit dem Kristallwachstum interferieren, konnte nicht abschließend geklärt werden, jedoch sind einige der theoretisch möglichen Mechanismen, die eine Veränderung der Kristallgröße bewirken könnten, recht unwahrscheinlich.

So wurden für die Vermutung, die MamGFDC-Proteine könnten die Größe der Magnetosomenvesikel negativ beeinflussen, keine Hinweise gefunden, da die ausgemessenen Vesikel des Wildtyps und der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante - anders als die Kristalle - nur minimale Größenunterschiede aufweisen. Die geringe Zunahme des maximalen Durchmessers der Kristalle bei Expression des *mamGFDC*-Operon in der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante und im Wildtyp sowie bei Expression von *mamC* in  $\Delta mamC$  könnte durch eine erhöhte Abundanz der MamGFDC-Proteine in der Magnetosomenmembran

verursacht werden, wodurch der Vesikeldurchmesser um wenige Nanometer zunimmt und somit auch die Kristalle.

Eine weitere Möglichkeit, das Kristallwachstum zu beeinflussen, besteht darin, den Reaktionsraum im Inneren des Vesikels zu begrenzen. So könnten Strukturproteine den Vesikelinnenraum in kleinere Bereiche unterteilen, wodurch das räumliche Wachstum des Kristalles begrenzt wird. Dass die MamGFDC-Proteine den Reaktionsraum im Inneren des Vesikels begrenzen, ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da dies theoretisch zu größeren Kristallen bei Abwesenheit der MamGFDC-Proteine führen müsste und nicht wie beobachtet zu kleineren.

Das Wachstum eines Magnetitkristalls ist abhängig von der Verfügbarkeit an freien Eisenionen im Vesikel. Insofern ist es durch Beeinflussung des Eisentransportes in die Vesikel möglich, die Kristallgröße zu steuern. Da die MamGFDC-Proteine jedoch keine Sequenzähnlichkeit zu Ionentransportproteinen haben, ist unwahrscheinlich, dass sie Eisen in die Magnetosomenvesikel transportieren und auf diese Weise Einfluss auf die Kristallgröße nehmen.

Eine weitere Möglichkeit das Kristallwachstum zu beeinflussen, besteht darin, den pH-Wert im Inneren des Vesikels zu verändern. So begünstigt ein basisches Milieu die Präzipitation von Magnetit, während bei niedrigem pH-Wert kein Magnetit gebildet wird (37). Bei der Bildung von Magnetit entstehen Protonen, die den pH-Wert im Vesikelinneren erhöhen, wodurch es zum Abbruch des Wachstums der Magnetitkristalle kommen kann. Da pro mol Magnetit, acht mol Protonen entstehen (38), müssen Transportmechanismen existieren, die die Protonen aus dem Vesikel schaffen und somit zur Stabilisierung des pH-Wert beitragen (62). Zusätzlich könnten stark basische Proteine den pH-Wert im Vesikelinneren kurzzeitig puffern, indem ihre basischen Aminosäuren die entstehenden Protonen aufnehmen. Aufgrund der hohen pI-Werte der Proteine MamGFD lag daher die Vermutung nahe, dass dies eine Funktion der MamGFDC-Proteine sein könnte. Damit eine möglichst große Menge an Protonen durch die Proteine aufgenommen werden kann, sollte der pH-Wert im Inneren des Vesikel stark alkalisch sein, damit alle basischen Aminosäuren in ihrer deprotonierten Form vorliegen. Der pH-Wert im Inneren der Magnetosomenvesikel ist bisher nicht untersucht worden, weshalb nicht geklärt ist, ob



die basischen Aminosäuren im Vesikel überhaupt deprotoniert sind und somit Protonen aufnehmen können. Weiterhin müssen die basischen Aminosäuren in Sequenzbereichen liegen, die ins Innere des Vesikels gerichtet sind. Durch die Invagination der Zytoplasmamembran sind Sequenzabschnitte der MMP, die als periplasmatisch lokalisiert vorhergesagt werden, später im Inneren des Magnetosomenvesikels lokalisiert. Anhand von der Vorhersage der Membrantopologie (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) lassen sich diese Bereiche in jedem der MamGFDC-Proteine ermitteln. Die Vorhersagen erbrachten, dass die Kristall-exponierten Sequenzregionen von MamD sechzehn, von MamC fünf, von MamF zwei und von MamG eine basische Aminosäure enthalten. Überschlagsrechnungen, bei denen davon ausgegangen wurde, dass MamD den kompletten Platz in der Vesikelmembran einnimmt, ergaben, dass die basischen Reste im Inneren des Vesikels maximal 4 % der Protonen aufnehmen könnten, die bei der Bildung eines 40 nm Kristalls entstehen (Annahmen: Vesikel und Kristall sind Kugel mit einem Durchmesser von 40 nm, Platz den ein MamD Protein in Membran benötigt ist 0.5 nm, im Vesikel hat jedes MamD-Protein sechzehn basische Aminosäuren die alle deprotoniert vorliegen). Aufgrund der hier getätigten Annahme, dass die Vesikelmembran vollständig mit MamD gefüllt ist, was der Wirklichkeit nicht entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die MamGFDC-Proteine nur einen sehr geringen Anteil der entstehenden Protonen aufnehmen können. Ob dies zu einem bestimmten Moment entscheidend ist, damit der pH-Wert nicht unter den Schwellenwert fällt, der zum Abbruch des Wachstums der Magnetitkristalle führt, verbleibt jedoch ungeklärt.

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung von Kristallgröße und Kristallform besteht darin, dass Makromoleküle spezifisch an die Kristalloberfläche binden und dadurch das Kristallwachstum inhibieren (2). So wird für die Proteine MamF und MamC vermutet, dass sie mit der Kristalloberfläche interagieren, da sie sich mit schwachen Detergenzien nicht aus der Magnetosomenmembran herauslösen lassen, sondern äußerst stabil verankert sind (53). Die Interaktion mit der negativ-geladenen Oberfläche der Magnetitkristalle (35) könnten basische Aminosäuren vermitteln. Trotz einer möglichen Interaktion zwischen MamF und MamC mit dem Magnetitkristall ist es ziemlich unwahrscheinlich, dass die MamGFDC-Proteine auf diese Weise das Kristallwachstum beeinflussen, da theoretisch der

Verlust der MamGFDC-Proteine zu größeren Kristalldurchmessern oder zur Abnahme der Formanisotropie hätte führen müssen, aber nicht zu den hier gefundenen kleineren Größen.

Nicht ausschließen lässt sich indes, dass die reduzierte Größe und Formveränderung der Kristalle in  $\Delta mamGFDC$ -Zellen durch andere Proteine verursacht wird, deren Lokalisierung an den Magnetosomen durch die MamGFDC-Proteine determiniert ist. Insofern würde das Fehlen der MamGFDC-Proteine dazu, dass die spezifische Lokalisierung der MamGFDC-Interaktionspartner gestört ist, wodurch diese nicht zum Wachstum des Kristalls beitragen können. Ein möglicher Interaktionspartner der MamGFDC-Proteine für den zumindest *in vitro* gezeigt wurde, dass er die Kristallisation von Magnetit steuern kann, ist das Magnetosomenmembranprotein Mms6 (4, 62, 107). Interessanterweise beinhaltet die Sequenz von Mms6 das gleiche LG-Dipeptid-reiche Motiv wie MamD und MamG. Zudem ist Mms6 wie auch MamC und MamF äußerst stabil in der Magnetosomenmembran verankert und lässt sich nicht mit milden Detergenzien von den Magnetosomen ablösen (110). Dies könnte darauf hinweisen, dass Mms6 möglicherweise mit den Proteinen des *mamGFDC*-Operon interagiert und der Verlust der MamGFDC-Proteine die spezifische Lokalisierung von Mms6 unterbindet. Im Genom von Stamm MSR-1 gibt es zudem noch einen weiteren offenen Leserahmen (benannt MGR\_4029 siehe NCBI-Genomdatenbank, Zugriffsnummer CU459003), dessen Translationsprodukt das gleiche auffällige LG-Dipeptid-reiche Motiv trägt wie MamD, MamG und Mms6. Sofern die LG-Dipeptid-reichen Motive Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, wäre MGR\_4029, dessen Funktion unbekannt ist, ein weiterer möglicher Interaktionspartner der MamGFDC-Proteine, der Einfluss auf das Kristallwachstum haben könnte. Auch im Genom von *M. magneticum* AMB-1 und *Magnetococcus* Stamm MC-1 gibt es weitere offenen Leserahmen, deren Produkte das LG-Dipeptid-reiche Sequenzmotiv beinhalten (bei AMB-1: Amb1027 und Amb0400 bei Stamm MC-1: Mmc1\_2240 und Mmc1\_2275). Interessanterweise trägt keines der Proteine des nahe verwandten, aber nicht-magnetotaktischen Bakteriums *R. rubrum* das auffällige LG-Dipeptid-reiche Motiv. Insofern scheint es, dass dieses Sequenzmotiv ein spezifisches Merkmal von Proteinen sein, die in die Magnetosomenbiomineralisation involviert sind.

## **Teil B: Funktionelle Untersuchung des Magnetosomenmembranproteins MamJ**

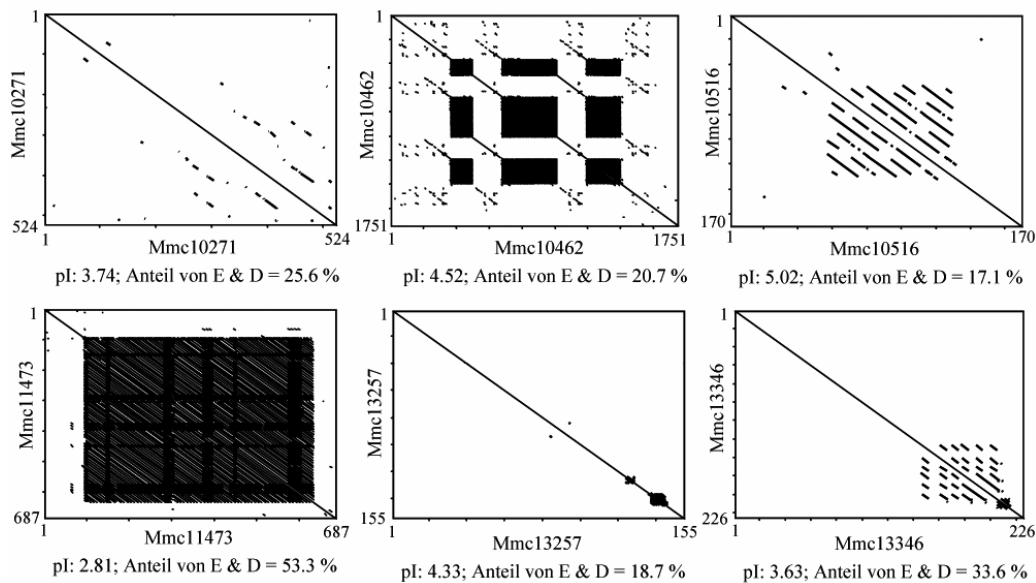
Im Gegensatz zu den meisten anderen Magnetosomenmembranproteinen enthält MamJ ein auffälliges Sequenzmotiv, welches Spekulationen über seine mögliche Funktion zuließ. Das auffällige Sequenzmotiv erstreckt sich über die Hälfte des Proteins und ist gekennzeichnet durch repetitive Abschnitte, die einen hohen Anteil saurer Aminosäuren beinhalten. Auch in anderen Biomineralisations-Systemen sind Proteine mit repetitivem Charakter und hohem Anteil an geladenen Aminosäuren zu finden, wo sie durch Ionen-Komplexierung die selektive Aufkonzentrierung einer Ionen-Spezies vermitteln und somit die Nukleation von Kristallen herbeiführen (118). Daher galt MamJ vor Beginn dieser Arbeit als ein potenzieller Kandidat für die Steuerung der Magnetitbildung durch Komplexierung von Eisenionen (53).

### **2.5 MamJ ist gekennzeichnet durch eine saure, Prolin-reiche Tandemwiederholung variabler Länge**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden MamJ-Orthologe in fünf weiteren Stämmen der Gattung *Magnetospirillum* identifiziert. Zwei MamJ-Orthologe wurden im Zuge der Sequenzierung von *M. magneticum* AMB-1 (MamJ\_AMB-1) und *M. magnetotacticum* MS-1 (MamJ\_MS-1) bekannt. Drei MamJ-Orthologe wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR amplifiziert, wobei zwei Orthologe aus magnetotaktischen Spirillen, die phylogenetisch *Magnetospirillum* sp. MSM-6 zugeordnet werden (MamJ\_CF-2 und MamJ\_CF-3), und ein Ortholog aus *Magnetospirillum* sp. MSM-1 (MamJ\_MSM-1) stammen. Die Amplifikation von *mamJ* aus Laborkulturen von *M. gryphiswaldense* MSR-1 sowie aus der *M. gryphiswaldense* MSR-1 (DSMZ-Stammkultur) erbrachte ausnahmslos ein 1281 bp langes PCR-Produkt, welches für ein aus 426 Aminosäuren bestehendes MamJ-Protein codiert (als Wildtyp-Variante bezeichnet). Überraschenderweise war die Länge des amplifizierten *mamJ* Gens kürzer als erwartet, da die zu Beginn dieser Arbeit bekannte *mamJ* Sequenz aus Stamm MSR-1 1401 bp umfasste (114). Die 1401 bp Archetyp-Sequenz von *mamJ* stammt von einem Klon aus der BAC-Bibliothek des Genoms von *M. gryphiswaldense* MSR-1 (DSMZ-Stammkultur), auf dem fast alle

Magnetosomengene codiert liegen (62). Der Sequenzvergleich beider MamJ-Varianten offenbarte, dass der Wildtyp-Variante 40 Aminosäuren innerhalb des auffälligen repetitiven Sequenzabschnittes fehlen. Ungeklärt ist, ob die Wildtyp-Variante durch Deletion zweier Repeat-Motive aufgrund homologer Rekombination innerhalb des repetitiven Sequenzabschnittes aus der Archetyp-Variante entstanden ist, oder ob die Duplikation eines repetitiven Sequenzabschnitts im Rahmen der Generierung der BAC-Bibliothek zur Entstehung der Archetyp-Variante führte.

Bei magnetotaktischen Bakterien, die nicht zur Gattung *Magnetospirillum* gehören, konnte bisher kein Homolog zu MamJ identifiziert werden (111). Die Suche nach sauren repetitiven Proteinen in der Genomannotation von *Magnetococcus* Stamm MC-1, erbrachte eine Reihe von hypothetischen Proteinen (Abbildung 11), von denen jedoch keines signifikante Sequenzhomologie zu MamJ aufweist. Um zu überprüfen, ob im Genom von *Magnetococcus* Stamm MC-1 Proteine codiert sind, die nur partiell Sequenzähnlichkeit zu MamJ aus Stamm MSR-1 aufweisen, wurden eine Tblastn Suche mit den nicht-repetitiven Sequenzabschnitten (N-Terminus: Aminosäuren 1 - 80 und C-Terminus: Aminosäuren 295 - 426) von MamJ (Wildtyp-Variante) durchgeführt. Diese Suche erbrachte jedoch keinerlei Treffer mit signifikanter Sequenzähnlichkeit zu MamJ. Das Fehlen eines zu MamJ homologen Proteins in *Magnetococcus* Stamm MC-1 sowie der Umstand, dass alle magnetotaktischen Bakterien, von denen bisher Sequenzinformationen vorliegen, Homologe zu *mamEKMNOPAQBS* besitzen, deren genomische Organisation großteils der Anordnung im *mamAB*-Operon entspricht, aber ein *mamJ*-Homolog fehlt, deutet an, dass MamJ spezifisch für Vertreter der Gattung *Magnetospirillum* ist.



**Abbildung 11:** Dotplot-Darstellung möglicher funktioneller MamJ-Homologe mit MamJ-ähnlichen Sequenzcharakteristika (stark sauer und repetitive Sequenzabschnitte), die in der Annotation von *Magnetococcus* Stamm MC-1 gefunden wurden. Linien parallel zur Diagonale zeigen repetitive Sequenzabschnitte auf.

Die Sequenz aller bekannten MamJ-Orthologe beinhaltet folgende charakteristischen Sequenzbereiche (Manuskript 3, Abbildung 3a): (i) eine saure Domäne (benannt als CAR-Domäne von „central acidic repetitive domain“) im zentralen Bereich des Proteins, die ca. 50 % des Proteins ausmacht, (ii) mehrere Tandemwiederholungen eines stark sauren Motivs (Asparaginsäure und Glutaminsäure >33 %) innerhalb der CAR-Domäne, (iii) eine Alanin-reiche Domäne im direkten Anschluss an die CAR-Domäne sowie (iv) eine Glycin-reiche Domäne nahe des C-Terminus von MamJ (Manuskript 3, Abbildung 3).

Im Vergleich zum konservierten, modularen Aufbau besteht nur moderate Sequenzidentität zwischen MamJ aus *M. gryphiswaldense* MSR-1 und den MamJ-Orthologen aus anderen Magnetospirillen. Anhand des Grads der Sequenzkonservierung lassen sich die MamJ-Orthologe zwei Gruppen zuordnen, wobei die Sequenzidentität innerhalb einer Gruppe bei mehr als 95 % liegt (Manuskript 3, Abbildung 3b). Die Sequenzidentität der abgeleiteten Consensussequenz beider Gruppen ist begrenzt auf die N-terminale (145 Aminosäuren) und die C-terminale Region (80 Aminosäuren) des Proteins. Eine gemeinsame Gruppe bilden MamJ\_MSR-1 (Archetyp und Wildtyp) und

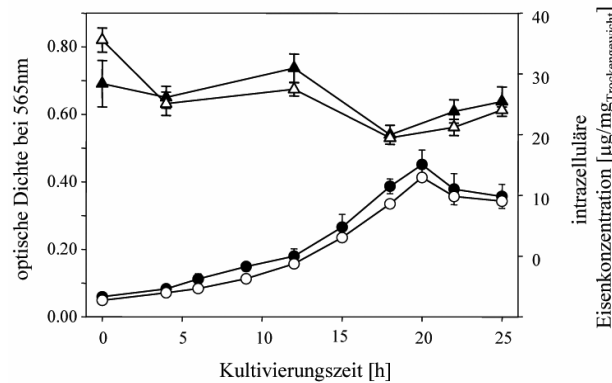
MamJ\_MSM-1, welches 100-%ige Identität zur Wildtyp Variante aufweist. Zur zweiten Gruppe gehören MamJ\_AMB-1, MamJ\_MS-1, MamJ\_CF-2 und MamJ\_CF-3, die untereinander nur wenige Aminosäureaustausche aufweisen. Der Hauptunterschied zwischen beiden Gruppen beruht auf dem modularen Aufbau und der Sequenz der CAR-Domäne. Innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich die einzelnen Orthologe hauptsächlich durch die Länge der CAR-Domäne, welche durch die Anzahl der Wiederholung des stark sauren Motivs bestimmt wird. Die CAR-Domäne bei MamJ aus *M. gryphiswaldense* und MamJ\_MSM-1 besteht zum größten Teil aus der Tandemwiederholung eines Sequenzmotivs aus 88 Aminosäuren und beinhaltet zudem mehrere Kopien ( $n = 2.8 - 4.8$ ) eines stark sauren Motivs von 20 Aminosäuren Länge. Die CAR-Domäne der anderen MamJ-Orthologe beinhaltet die mehrfache Tandemwiederholung eines stark sauren Motivs aus 24 Aminosäuren (Manuskript 3, Abbildung 3a)

## **2.6 In einer $\Delta mamJ$ -Mutante sind die Magnetosomen nicht in Ketten angeordnet**

Um die Funktion des MamJ-Protein aufzuklären, wurde eine unmarkierte *mamJ*-Deletionsmutante von *M. gryphiswaldense* generiert. Zur Erstellung des *mamJ*-Deletionskonstruktes wurden 1391 bp des 5'- und 1433 bp des 3'-flankierenden Sequenzbereiches von *mamJ* amplifiziert und in den in *M. gryphiswaldense* nicht-replizierbaren Vektor pK19*mobsacB* (111, 123, 124) kloniert. Der *mamJ*-Deletionsvektor wurde mittels Konjugation in *M. gryphiswaldense* MSR-1 übertragen, wo er durch homologe Rekombination entweder in den 3'- oder in den 5'-flankierenden Sequenzbereich von *mamJ* integrierte. Die aus einem einfachen homologen Rekombinationsereignis hervorgegangenen Transkonjuganten waren unbeweglich und unmagnetisch. Dass Sequenzinsertionen von mehreren Kilobasen Länge in der 5'-Region des *mamAB*-Operon zu unbeweglichen Mutanten führen, die zudem häufig kein Magnetit bilden können, wurde auch bei Deletionsmutangese anderer Gene des *mamAB*-Operon beobachtet (E. Katzmann, unveröffentlichte Daten). Vermutlich führt die Insertion von DANN-Fragmenten dieser Länge zum frühzeitigen Abbruch der Transkription des

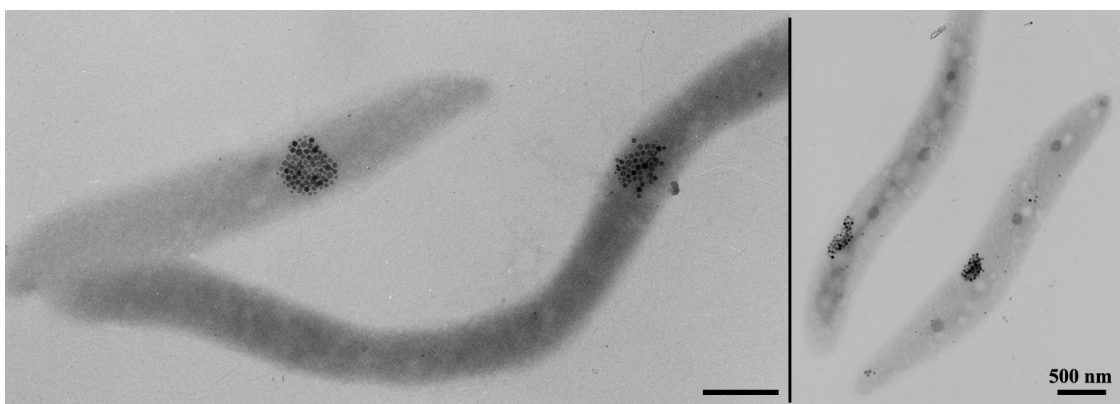
ansonsten polycistronisch transkribierten *mamAB*-Operon, wodurch die Gene in der 3'-Region nicht abgelesen werden (Abbildung 5). Zu den Genen der 3'-Region des *mamAB*-Operon gehört unter anderem *mamB*, welches ein Magnetosomen-spezifisches Eisentransportprotein codiert und dessen Deletion in *M. gryphiswaldense* zu unmagnetischen Zellen führt (K. Junge, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu Transkonjuganten, die aus einem einfachen homologen Rekombinationsereignis hervorgehen, sind Mutanten, bei denen ein zweites homologes Rekombinationsereignis zur Deletion der integrierte Vektorsequenz als auch der Deletion des *mamJ* Gens führt, beweglich und bilden Magnetit. Die Deletion von *mamJ* innerhalb des *mamAB*-Operon führte nicht zum Abbruch der Transkription innerhalb des Operons, wie an einzelnen Genen mittels reverser Transkriptase-PCR nachgewiesen wurde (nicht dargestellt). Insbesondere die Expression des stromabwärts von *mamJ* codierten *mamK*-Gens wurde genauer untersucht. So wurde mittels Anti-MamK Antikörper die Präsenz von MamK in den Proteinextrakten der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante überprüft und mittels 2D-differentieller Gelelektrophorese (in Kooperation mit B.Voigt Universität Greifswald) untersucht, ob die Konzentration von MamK in der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante sich vom Wildtyp unterscheidet. Dabei wurde keine signifikante Veränderung der MamK Konzentration in der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante festgestellt, weshalb angenommen wird, dass die Deletion von *mamJ* im *mamAB*-Operon nur unwesentliche polaren Effekten verursacht, die keinen Einfluss auf den Phänotyp  $\Delta$ *mamJ*-Mutante haben.

Die phänotypische Charakterisierung der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante erbrachte keinen Hinweis für eine signifikante Veränderung des Wachstums (Abbildung 12) und der Eisenaufnahme. Entgegen allen Erwartungen war die Bildung von Magnetit in der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unverändert.



**Abbildung 12:** Wachstumsverlauf (●) und Eisenaufnahmen (▲) von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (schwarz gefüllt) und der  $\Delta mamJ$ -Mutante (ungefüllt).

Überraschenderweise jedoch zeigen die Zellen der Mutante eine deutlich verringerte magnetotaktische Reaktion in Gegenwart eines Stabmagneten. So richteten sich unterem Mikroskop nur ca. 20 % der Mutantenzellen einer Kultur parallel zu den magnetischen Feldlinien aus, während sich in Wildtypkulturen ca. 90 % der Zellen ausrichten. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der  $\Delta mamJ$ -Mutante lieferte die Erklärung für das Ausbleiben der magnetotaktischen Reaktion bei den meisten Mutantenzellen. So liegen die Magnetosomen in  $\Delta mamJ$ -Zellen nicht mehr in Ketten angeordnet vor, sondern bilden zumeist drei-dimensionale Agglomerate, deren Form, Größe und Position in jeder Zelle verschieden ist (Abbildung 13; Manuskript 2, Abbildung 1; Manuskript 3, Abbildung 2a). Deutlich seltener sind die Magnetosomen in Ringen oder kurzen Ketten aus weniger als zehn Kristallen in  $\Delta mamJ$ -Zellen angeordnet (Manuskript 3, Abbildung 2a).



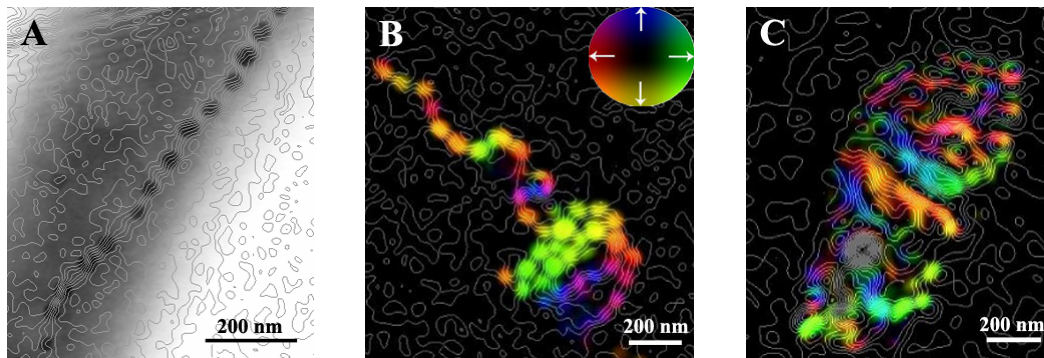
**Abbildung 13:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Magnetospirillum gryphiswaldense*  $\Delta mamJ$ .



Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten zudem auf, dass in  $\Delta mamJ$ -Kulturen vermehrt Zellen ohne Kristalle auftreten, aber auch eine hohe Anzahl von Zellen mehr als sechzig Magnetitkristalle aufweisen, wohingegen in Wildtypzellen mehr als sechzig Kristalle eine Seltenheit sind (Manuskript 3, Abbildung 2b). Beide Extreme sind eine Folge des Auftretens der Magnetosomen-Agglomerate, da diese bei der Zellteilung nicht paritätisch weitergegeben werden. So kann es dazu kommen, dass eine Tochterzelle alle Kristalle der Mutterzelle bezieht, während die andere Tochterzelle keine Kristalle erhält. Die Häufigkeit, mit der Kristall-freie Zellen  $\Delta mamJ$ -Kulturen auftreten, bleibt auch nach wiederholtem Überimpfen von  $\Delta mamJ$  auf annähernd gleichem Niveau. Dies macht deutlich, dass die Deletion von *mamJ* keinen Einfluss auf die Magnetosomenbiomineralisation hat, da unmagnetische  $\Delta mamJ$ -Zellen neue Magnetosomen bilden können, weshalb ihre Häufigkeit in  $\Delta mamJ$ -Kulturen über die Zeit nicht zunimmt.

## **2.7 Die Agglomeration der Magnetosomen in $\Delta mamJ$ vermindert die Effizienz der Ausrichtung im Erdmagnetfeld**

Die von der Kettenform abweichende Anordnung der Magnetosomen vermindert die Effizienz der magnetischen Ausrichtung von  $\Delta mamJ$ -Zellen. Zellen mit agglomerierten Magnetosomen besitzen ein geringeres magnetisches Gesamtmoment im Vergleich zu Wildtypzellen. Dies liegt daran, dass sich in Magnetosomen-Agglomeraten die magnetischen Momente der einzelnen Kristalle aufgrund der Ausbildung magnetischer Wirbel teilweise kompensieren (Abbildung 14). Das magnetische Gesamtmoment eines Magnetosomen-Agglomerates ist daher abhängig von seiner Form und kann im Einzelfall kleiner als  $1.5 \times 10^{-16} \text{ A m}^2$  sein. Sofern das zelluläre magnetische Moment unterhalb  $1.5 \times 10^{-16} \text{ A m}^2$  liegt, ist die Bewegung der Zelle im Erdmagnetfeld ungerichtet. Im Gegensatz zu Zellen mit agglomerierten Magnetosomen, die sich gerichtet bewegen, sofern ihr zelluläres magnetisches Moment ausreichend hoch ist, besitzt ein Teil der Zellen einer  $\Delta mamJ$ -Population in Folge der teilweise einseitigen Aufteilung der Magnetosomen-Agglomerate kein zelluläres magnetisches Moment, weshalb die Bewegung dieser Zellen ungerichtet ist.



**Abbildung 14:** Magnetische Mikrostruktur (graue Linien) (A) einer Magnetosomenkette, (B) eines Magnetosomen-Agglomerates mit magnetischem Netto-Moment und (C) eines Magnetosomen-Agglomerates ohne magnetischem Netto-Moment ermittelt durch Elektronenholographie. Die Farbcodierung zeigt die Richtung des magnetischen Momentes der einzelnen Kristalle an. Aufnahmen wurden von E. Simpson und R. Dunin-Brokowski (Universität Cambridge, UK) erstellt.

## 2.8 MamJ beeinflusst die Anordnung der Magnetosomen-Leervesikel in der Zelle

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen ultradünn geschnittener Eisen-gehungelter magnetotaktischer Spirillen war belegt, dass nicht nur Magnetosomen, sondern schon die Magnetosomen-Leervesikel in Ketten angeordnet sind (49, 72). Es stellte sich nunmehr die Frage, ob in  $\Delta mamJ$ -Zellen bereits die Leervesikel Agglomerate bilden oder erst die Magnetosomen. Neben der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Dünnschnitten, deren Präparation anfällig für das Entstehen struktureller Artefakte ist, bietet die Kryo-Elektronentomographie die Möglichkeit, intrazelluläre Strukturen in intakten Zellen artefaktfrei im Transmissionselektronenmikroskop zu untersuchen (8, 9, 89, 101). Die Kryo-Elektronentomographie ist ein noch junges Bild-gebendes Verfahren, welches es ermöglicht, sowohl die räumliche Anordnung als auch die Struktur intrazellulärer Membrankompartimente aber auch Proteinkomplexe in ihrem nativen Zustand innerhalb der Zelle im Dreidimensionalen zu untersuchen (16, 27, 75, 83, 95, 135). Das Prinzip der Elektronentomographie basiert auf der Aufnahme einer Reihe von zweidimensionaler Projektionen des zu untersuchenden Objektes, die von unterschiedlichen Richtungen aufgenommen werden. Dazu wird das Untersuchungsobjekt (z. B. Zelle) in kleinen Winkelschritten durch den senkrecht einfallenden Elektronenstrahl gedreht und ein Bild für jeden Kippwinkel aufgenommen. Um den nativen Zustand der Zelle zu erhalten, wird sie

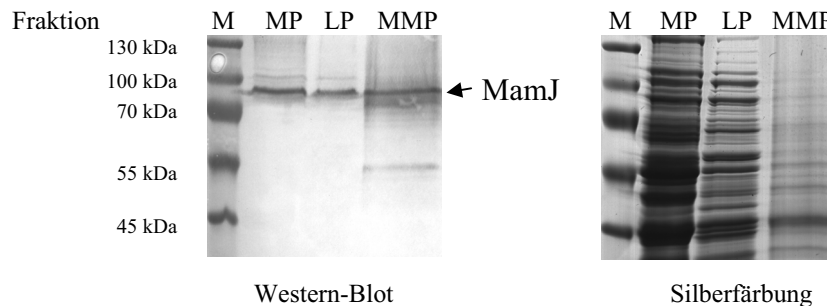
vor dem Einschleusen ins Elektronenmikroskop schockgefroren (vitrifiziert). Für die Computer-gestützte Rekonstruktion der dreidimensionalen-Abbildung (Tomogramm) der Zelle werden die einzelnen Projektionen aneinander ausgerichtet, gewichtet und in ein gemeinsames Volumen rückprojiziert. Das rekonstruierte dreidimensionale-Abbild der Zelle lässt sich aus beliebigen Richtungen betrachten, wodurch die räumliche Anordnung intrazellulärer Strukturen sichtbar wird.

Um den Einfluss der Deletion von *mamJ* auf die Anordnung von Magnetosomen-Leervesikeln aufzuklären, wurden in Zusammenarbeit mit M. Gruska und J.M. Plitzko (MPI für Biochemie, Martinsried) Wildtyp- und  $\Delta$ *mamJ*-Zellen von *M. gryphiswaldense* mittels Kryo-Elektronentomographie untersucht. Wie aus Dünnschnitten bekannt, zeigten die Tomogramme Eisen-gehungerter Wildtypzellen Ketten von Magnetosomen-Leervesikeln, deren Anordnung und Position den Ketten reifer Magnetosomen entspricht (Manuskript 2, Abbildung 2a-f). Vereinzelt waren isolierte Magnetosomen-Leervesikel sichtbar, die in unmittelbarer Nähe der Zytoplasmamembran befanden. Die Tomogramme von Wildtypzellen offenbarten zudem, dass die Magnetosomenketten kurz unterhalb der Zytoplasmamembran verlaufen (Manuskript 2, Supplementary Abbildung 3), wodurch das magnetische Drehmoment, welches auf eine Kette reifer Magnetosomen im Erdmagnetfeld wirkt, womöglich unmittelbar auf Elemente des Zytoskeletts übertragen werden kann. Im Gegensatz zur Anordnung im Wildtyp zeigten die tomographischen Aufnahmen der  $\Delta$ *mamJ*-Mutante eine scheinbar zufällige Verteilung der Magnetosomen-Leervesikel im Zytoplasma von *M. gryphiswaldense* (Manuskript 2, Abbildung 2g-j). Leervesikel-Agglomerate ähnlich denen reifer Magnetosomen wurden in  $\Delta$ *mamJ*-Zellen ebensowenig gefunden wie Leervesikel-Ketten. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Fehlen von MamJ einen Einfluss auf die Position Magnetit-gefüllter und ungefüllter Magnetosomenvesikel in der Zelle hat, wobei es zur Agglomeration der Magnetosomen offensichtlich erst nach Bildung der kristallinen Phase kommt.

## 2.9 Das MamJ-Protein ist mit der Magnetosomenmembran assoziiert

Hinweise auf den Mechanismus, durch den MamJ die Magnetosomenketten stabilisiert, wurden von der Untersuchung seiner Lokalisation erhofft. So war unbekannt, ob die Lokalisierung von MamJ auf die Magnetosomenmembran beschränkt ist, wo es ursprünglich identifiziert wurde (53, 130). Zudem war unbekannt, ob MamJ ein membranständiges oder ein Transmembranprotein ist. Zur Vorhersage von Transmembrandomänen in MamJ wurde eine Reihe von Computerprogrammen eingesetzt, die jedoch widersprüchliche Ergebnisse lieferten. So sagten die Programme SAPS (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/saps-simple.html>), TMAP, Topred und TMPred (<http://ca.expasy.org/tools/>) in der glycinreichen Domäne von MamJ eine Transmembrandomäne voraus, während das Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) keine Transmembrandomäne in MamJ postulierte. Sofern MamJ ein integrales Membranprotein ist, ist es nicht unwahrscheinlich, dass es sowohl in der Proteinfraction der Magnetosomenmembran als auch in der Proteinfraction der äußeren und der Zytoplasmamembran zu finden ist, aus der die Magnetosomenmembran hervorgeht. Sofern MamJ kein integrales Membranprotein ist, sondern über z. B. elektrostatische Interaktion mit anderen Membrankomponenten mit der Magnetosomenmembran assoziiert ist, wurde erhofft, es durch stringentes Waschen abgelösen zu können. In diesem Falle wäre zu erwarten, dass MamJ hauptsächlich in der löslichen Proteinfraction zu finden ist. Um MamJ detektieren zu können, wurde die Herstellung eines polyklonalen Anti-MamJ-Antiserums in Auftrag gegeben (<http://www.pineda-abservice.de/>). Die Immundetektion von MamJ lieferte ein Signal in allen Proteinfractionen (Abbildung 15). Kein Signal lieferten, wie erwartet, die Gesamtproteinextrakte der  $\Delta mamJ$ -Mutante und der spontanen unmagnetischen Mutante MSR-1B, die zum Nachweis der Spezifität des Anti-MamJ-Antiserum als Negativkontrolle verwendet wurden. Der Mutante MSR-1B fehlt eine 80 kb große Sequenzregion in der genomischen Magnetosomeninsel, weshalb ihr die meisten Magnetosomenmembranproteine inklusive MamJ fehlen (115). Für das Auftreten von MamJ in allen drei Proteinfractionen des Wildtyps gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnte MamJ bei der Fraktionierung aus der Magnetosomenmembran gelöst worden sein. Andererseits lässt sich eine unvollständige

Fraktionierung nicht ausschließen. Möglich wäre auch, dass z.B. falsch gefaltetes MamJ nur langsam abgebaut wird, weshalb es auch in der löslichen Proteinfraction vorkommt. Es bleibt daher weiterhin ungeklärt, ob MamJ in die Magnetosomenmembran integriert oder ob es über Interaktion mit Membrankomponenten mit der Magnetosomenmembran assoziiert ist



**Abbildung 15:** Nachweis von MamJ in Proteinextrakten fraktionierter Zellen von *Magnetospirillum gryphiswaldense*. MamJ läuft bei ca. 91 kDa im 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die einzelnen Proteinfractionen wurden in zwei parallel laufenden Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde den Immunnachweis von MamJ eingesetzt und das andere mit Silbernitrat gefärbt. Nach Aufschluss der Wildtypzellen wurden deren Bestandteile nach der Methode von K. Grünberg fraktioniert (52). M: Marker, MP: Membran-assoziierte Proteine, LP: lösliche Proteine, MMP: Magnetosomenmembran-assoziierte Proteine

## 2.10 MamJ-EGFP lokalisiert entlang einer filamentösen Struktur

Um detailliertere Informationen zur Lokalisierung von MamJ zu erhalten, wurde es genetisch mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) markiert und in Zellen des Wildtyps, der MSR-1B Mutante und der  $\Delta mamJ$ -Mutante fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert. EGFP ist eine Variante des aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden *green fluorescent protein* (GFP), die eine ca. 35fach stärkere Fluoreszenz als GFP aufweist (133). Die fluorophore Gruppe des GFP bildet ein im Innenraum des Proteins eingebettetes zyklisches Tripeptid aus den Aminosäuren Serin(Position 64)-Tyrosin(65)-Glycin(66). Die erhöhte Fluoreszenz des EGFP beruht auf dem Austausch von Tyrosin durch Serin in der fluorophoren Gruppe des GFP-Proteins (133). Die Ausbildung des Fluorophors benötigt Sauerstoff, fluoresziert dann aber unabhängig von weiteren Faktoren (148).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei C-terminale (MamJ-EGFP, MamJ-LQSTVPRARDPPVAT-EGFP und MamJ-78AS-EGFP, wobei letzterer Fusion 78 Aminosäuren des C-terminalen Endes von MamJ fehlen) und eine N-terminale Fusion (EGFP-MamJ) von MamJ mit EGFP erstellt. Die beiden C-terminalen Fusionen mit vollständigem MamJ zeigten ein identisches Fluoreszenzmuster und stellten die Bildung von Magnetosomenketten in  $\Delta mamJ$ -Zellen wieder her. In Zellen des Wildtyps und der  $\Delta mamJ$ -Mutante lokalisierten beide MamJ-EGFP Varianten in einer filamentösen Struktur, die longitudinal durch die gesamte Zelle verläuft (Manuskript 2, Abbildung 1b). Hingegen zeigte MamJ-EGFP in *Escherichia coli* und der unmagnetischen Mutante MSR-1B eine zytoplasmatische Lokalisierung auf. Letzterer Befund deutet darauf hin, dass weitere unbekannte Proteine, deren Gene auf dem in MSR-1B deletierten 80 kb Teilstück der genomischen Magnetosomeninsel liegen (115), vermutlich für die filamentartige Lokalisierung von MamJ-EGFP erforderlich sind. Die filamentartige Lokalisierung von MamJ entspricht dem Verlauf der Magnetosomenkette in Wildtypzellen, erstreckt sich jedoch von Zellpol-zu-Zellpol. Um zu untersuchen, inwiefern die beobachtete filamentartige Lokalisierung von MamJ an seine Funktionalität gebunden ist, wurde ein nicht funktionales EGFP-Fusionsprotein konstruiert (MamJ-78AS-EGFP). Die C-terminale Deletion von mehr als 40 Aminosäuren bewirkt den Verlust der Funktionalität bei MamJ, wie Untersuchungen zur Rekonstitution der Kettenbildung in  $\Delta mamJ$ -Mutante belegen (Manuskript 3, Abbildung 4). Das Fusionsprotein MamJ-78AS-EGFP zeigte keine filamentartige Lokalisierung, sondern verteilte sich homogen im Zytosol sowohl in Wildtyp- als auch in  $\Delta mamJ$ -Zellen. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass Lokalisierung und Funktionalität von MamJ einander bedingen. Die N-terminale EGFP-MamJ-Fusion fluoreszierte nicht, vermutlich aufgrund fehlerhafter Faltung des EGFP-Proteins.

### 2.11 Magnetosomenketten sind mit Magnetosomenfilamenten assoziiert

In den tomographischen Aufnahmen von Wildtyp- und  $\Delta mamJ$ -Zellen sind überraschenderweise filamentöse Strukturen zu sehen (im Folgenden Magnetosomenfilamente genannt), welche in Wildtypzellen dicht neben der Magnetosomenkette verlaufen. Diese bis dato unbekanntes Magnetosomenfilamente haben in Stamm MSR-1 einen Durchmesser von ca. 3 – 4 nm und verlaufen bis zu den Zellpolen (Abbildung 16). Im Gegensatz zum Wildtyp, sind in der  $\Delta mamJ$ -Mutante die Magnetosomen-Leervesikel nicht mit den Magnetosomenfilamenten assoziiert (Manuskript 2, Abbildung 2i-j). Obwohl das Fluoreszenzmuster von MamJ-EGFP in Wildtyp- und  $\Delta mamJ$ -Zellen mit dem Verlauf der Magnetosomenfilamente übereinstimmt, kann ausgeschlossen werden, dass die Magnetosomenfilamente aus MamJ aufgebaut sind, da sie auch in der *mamJ*-Deletionsmutante zu finden sind. Allerdings war lange Zeit unklar, ob auch  $\Delta mamJ$ -Zellen die Magnetosomenfilamente bilden, da sechs  $\Delta mamJ$ -Tomogramme aufgenommen werden mussten, bevor ein Tomogramm vorlag, in dem die Magnetosomenfilamente bei  $\Delta mamJ$  zu sehen waren. Der Umstand, dass in den Tomogrammen von fünf  $\Delta mamJ$ -Zellen die Magnetosomenfilamente nicht sichtbar sind, bedeutet jedoch nicht, dass die Zellen keine Magnetosomenfilamente aufweisen. Vielmehr hat die Vergrößerung bei der die Tomogramme aufgenommen werden und die Lage der Filamente zur Kippachse einen entscheidenden Einfluss darauf, ob sie im Tomogramm sichtbar sind (J.M. Plitzko, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse der tomographischen Untersuchung von *M. gryphiswaldense* wurden zeitgleich zu tomographischen Aufnahmen von *M. magneticum* AMB-1 veröffentlicht (71). Wie auch bei *M. gryphiswaldense* MSR-1 zeigen die tomographischen Aufnahmen in Stamm AMB-1 Zellen Proteinfilamente (Durchmesser ca. 6 nm), die dicht neben den Magnetosomenketten bzw. Magnetosomen-Leervesikel-Ketten verlaufen (71). Im Gegensatz zu den Magnetosomenfilamenten in Stamm MSR-1, die bis zu den Zellpolen reichen, zeigen die Aufnahmen von Stamm AMB-1 nur Proteinfilamente von der Länge der Magnetosomenkette (71). Warum die Proteinfilamente bei Stamm AMB-1 nicht bis zu den Zellpolen reichen, ist ungeklärt.

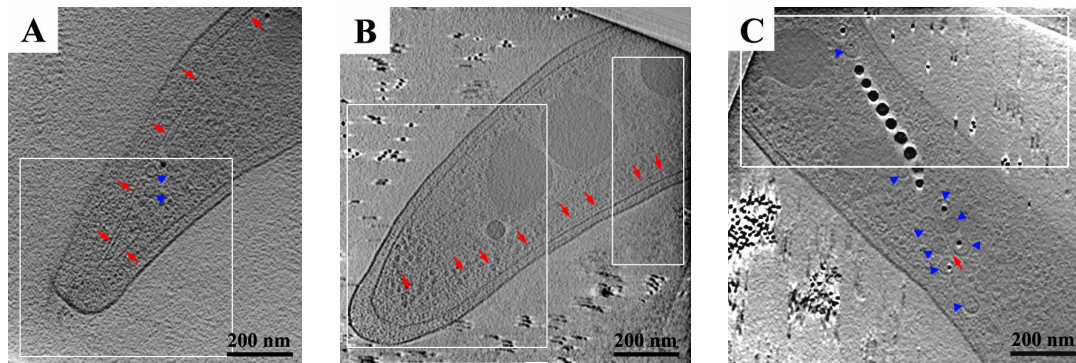


Abbildung 16: (A-C) Schnitte aus den Tomogrammen dreier Zellen von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. (A, B) Die Magnetosomenfilamente (Verlauf durch rote Pfeile gekennzeichnet) reichen bis zu den Zellpolen und verlaufen entlang der Innenseite der Zytoplasmamembran. (C) Entlang der Magnetosomenfilamente sind sowohl die Magnetosomen als auch die Magnetosomen-Leervesikel (blaue Pfeile) in Ketten angeordnet. Tomogramme wurden von M. Gruska und J.M. Plitzko (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) aufgenommen.

Bis vor fünfzehn Jahren waren zytoskelettale Strukturen in Bakterien unbekannt, da ihre Genomen keine Gene enthalten, die signifikante Sequenzähnlichkeit zu Bestandteilen des eukaryotischen Zytoskeletts aufweisen, welches aus Mikrofilamenten (Aktin), Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (Tubulin) besteht (25). Inzwischen jedoch ist für jede Klasse eukaryotischer Zytoskelettfilamente ein strukturelles bzw. funktionelles Pendant in Prokaryoten identifiziert worden. Das zuerst identifizierte zytoskelettale Protein in Bakterien ist das dem Tubulin ähnliche FtsZ, welches ubiquitär unter Eubakterien verbreitet ist (15, 18). FtsZ ist von essenzieller Bedeutung bei der Zellteilung, indem es eine ringartige Struktur in der Zellmitte ausbildet, zu der weitere an der Zellteilung beteiligte Proteine rekrutiert werden (30). Fehlt FtsZ bilden *E. coli* Zellen aufgrund des weiteren Längewachstums und der mit der Zellteilung einhergehenden Duplikation des Chromosoms filamentöse Zellen mit mehreren Zellkernen (7). FtsZ Protofilamente sind zwischen 4 – 5 nm dick und können sich zu tubulären Strukturen von 23 nm Durchmesser zusammenlagern. Aufgrund der ringartigen Struktur, die FtsZ bildet, kann davon ausgegangen werden, dass die entdeckten Magnetosomenfilamente nicht aus einem FtsZ-Homolog aufgebaut sind. Ein bakterielles Pendant zu Intermediärfilamenten stellt das Protein Crescentin, welches in *Caulobacter crescentus* entdeckt wurde, dar (6). Crescentin bildet eine helikale Struktur von 10 nm Durchmesser unterhalb der Zytoplasmamembran. In



Analogie zur Funktion der Intermediärfilamente in eukaryotischen Zellen bestimmt Crescentin die Zellmorphologie von *C. crescentus* (17, 25). Fehlt Crescentin nehmen die Zellen, die normalerweise je nach Wachstumsphase eine gekrümmte oder helikale Zellform aufweisen, eine stäbchenförmige Morphologie an. Da *M. gryphiswaldense* kein Homolog zu Crescentin besitzt, kann ausgeschlossen werden, dass die Magnetosomenfilamente aus Crescentin bestehen. Funktionelle Homologe zu eukaryotischen Aktin sind inzwischen mehrere bekannt (MreB, ParM, AlfA) (17, 25, 32, 63). Die Proteine ParM und AlfA haben spezielle Funktionen, weswegen sie nur bei bestimmten Arten von Bakterien zu finden sind. ParM Filamente sorgen bei *E. coli* für die Segregation des *low-copy* Plasmids R1 während der Zellteilung (92, 128). In Analogie dazu benötigt *B. subtilis* das Protein AlfA zur Segregation des Plasmids pBET131 während der Sporulation sowie der Zellteilung (17). Im Gegensatz dazu ist MreB ein bei Bakterien mit stäbchenförmiger, filamentartiger oder helikaler Morphologie weit verbreitetes Protein, welches zur Stabilisierung der Zellform benötigt wird (32, 63). So bilden MreB-Deletionsmutanten von *B. subtilis* oder *E. coli* sphärische Zellen, die nicht weiter lebensfähig sind. MreB bildet unterhalb der Zytoplasmamembran eine spiralförmige Struktur aus, die entlang der Longitudinalachse der Zelle verläuft. Aufgereinigtes MreB aus *Thermotoga maritima* bildet *in vitro* Protofilamente von 4 nm Durchmesser (136). Interessanterweise zeigt das spezifisch bei magnetotaktischer Bakterien vorkommende Protein MamK signifikante Sequenzähnlichkeit zu MreB (71, 112, 114, 118). In Magnetospirillen wird das Gen für *mamK* mit *mamJ* co-transkribiert, da es im *mamAB* Cluster *downstream* an *mamJ* grenzt (114, 116). MamK ist zudem bei *M. gryphiswaldense* MSR-1 im Zytoplasma lokalisiert und nicht in der Magnetosomenmembran (114), weshalb die Vermutung geäußert wurde, die Magnetosomenfilamente könnten aus MamK aufgebaut sein und möglicherweise zusammen mit MamJ die Stabilisierung der Magnetosomenketten bewirken (112).

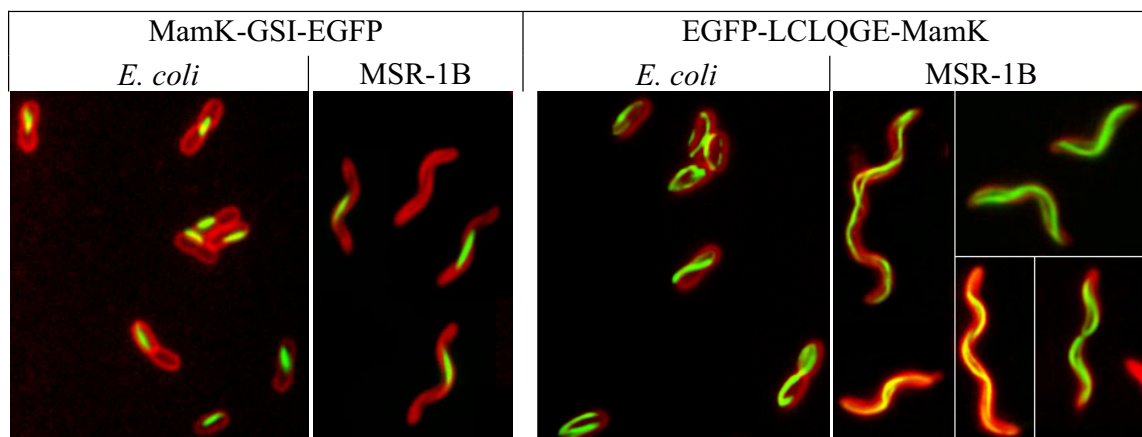
## 2.12 Die Lokalisierung von MamK ist unabhängig von MamJ

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde die Lokalisation von MamK fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Entsprechend dem Verlauf der Magnetosomenfilamente wurde für ein MamK-EGFP-Fusionsprotein eine filamentartige

Lokalisierung erwartet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei N-terminale (EGFP-LCLQGE-MamK und EGFP-SAI-MamK) und eine C-terminale Fusion (MamK-GSI-EGFP) von MamK mit EGFP erstellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Lokalisierung von MamK unabhängig von magnetosomenspezifischen Faktoren ist, da die Fluoreszenzmuster bei Expression in *M. gryphiswaldense* MSR-1, *M. gryphiswaldense*Δ*mamJ*, *M. gryphiswaldense* MSR-1B und *E. coli* übereinstimmen. Interessanterweise wurden zwei verschiedene Fluoreszenzmuster beobachtet. Während die Fusionen MamK-GSI-EGFP und EGFP-SAI-MamK jeweils ein kurzes Filament von ungefähr der halben Länge der Zelle bilden, lokalisiert EGFP-LCLQGE-MamK entlang der Zellperipherie bis zu den Zellpolen (Abbildung 17). Da sich die drei Fusionen lediglich in den Aminosäuren zwischen MamK und EGFP unterscheiden, hat die Sequenz dieses Linkerpeptides einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisierung und vermutlich auch auf die Funktionalität der EGFP-markiertem MamK-Proteins. Die Bildung kurzer Filamente durch MamK-GSI-EGFP und EGFP-SAI-MamK steht im Widerspruch zum beobachteten Pol-zu-Pol Verlauf der Magnetosomenfilamente in *M. gryphiswaldense*. Interessanterweise deckt sich die hier beobachtete Lokalisierung von MamK-GSI-EGFP und EGFP-SAI-MamK mit der zweier C-terminaler GFP-Fusionen von MamK aus *M. magneticum* AMB-1, deren Lokalisation in *M. magneticum* und in *E. coli* untersucht wurde (71, 106). Die Lokalisierung von MamK<sub>AMB-1</sub>-GFP sowie von MamK-GSI-EGFP und EGFP-SAI-MamK entspricht in Länge und Position den Proteinfilamenten, die in den tomographischen Aufnahmen von *M. magneticum* AMB-1 Zellen sichtbar sind, jedoch nicht dem Verlauf der Magnetosomenfilamente in Stamm MSR-1. Stattdessen erinnert das deutlich komplexere Lokalisierungsmuster des Fusionsproteins EGFP-LCLQGE-MamK eher an den Verlauf der Magnetosomenfilamente. Dies lässt folgende Interpretationen zu: (i) die Fusionsproteine MamK<sub>AMB-1</sub>-GFP, MamK-GSI-EGFP und EGFP-SAI-MamK geben nicht die wahre Lokalisierung von MamK wieder. In diesem Falle würden die in tomographischen Aufnahmen sichtbaren Proteinfilamente (in *M. gryphiswaldense* MSR-1 als Magnetosomenfilamente bezeichnet), sofern sie aus MamK bestehen, auch in *M. magneticum* AMB-1 Zellen bis zu den Zellpolen reichen, obwohl dies auf den bisher Aufnahmen nicht ersichtlich ist. (ii) Obwohl MamK in einer filamentösen Struktur

angeordnet wird, bestehen die in den tomographischen Aufnahmen sichtbaren Proteinfilamente bestehen nicht aus MamK, sondern einem anderen Protein. So könnten die Proteinfilamente aus MreB bestehen, von dem drei Paraloge im Genom von Stamm AMB-1 sowie von Stamm MSR-1 zu finden sind (114). Um zu überprüfen ob möglicherweise MamK in Stamm AMB-1 anders lokalisiert als in Stamm MSR-1, sollte daher die Lokalisierung von EGFP-LCLQGE-MamK auch in Stamm AMB-1 untersucht werden. Widersprüchliche Ergebnisse zur Lokalisierung von MamK kommen auch aus Arbeiten der proteomischen Untersuchung der Magnetosomenmembran. Während in *M. gryphiswaldense* MSR-1 das MamK Protein in der zytosolischen Proteinfraction zu finden ist, aber nicht in der Magnetosomenmembran (53, 114), ist es in *M. magneticum* AMB-1 ein Bestandteil des Magnetosomenmembran-Subproteoms (130). Das Vorkommen von MamK in der Proteinfraction der Magnetosomenmembran bei Stamm AMB-1 deutet darauf hin, dass MamK mit dieser assoziiert ist, womöglich aufgrund von spezifischer Interaktion mit Komponenten der Magnetosomenmembran.

Die beiden beobachteten Fluoreszenzmuster der EGFP-Fusionen von MamK unterscheiden sich deutlich von der Lokalisierung von MamJ-EGFP. Da bisher die Lokalisierung von MamJ-EGFP in einer  $\Delta mamK$ -Mutante nicht untersucht wurde, ist unklar, ob MamK die filamentartige Lokalisierung von MamJ bedingt.

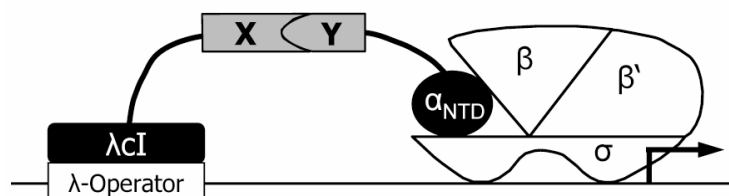


**Abbildung 17:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisierung zweier EGFP-Fusionen von MamK (grün) in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  und im unmagnetischen Stamm *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1B. Die Zellenmembran wurde mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff FM4-64 gefärbt.

### 2.13 MamJ und MamK interagieren

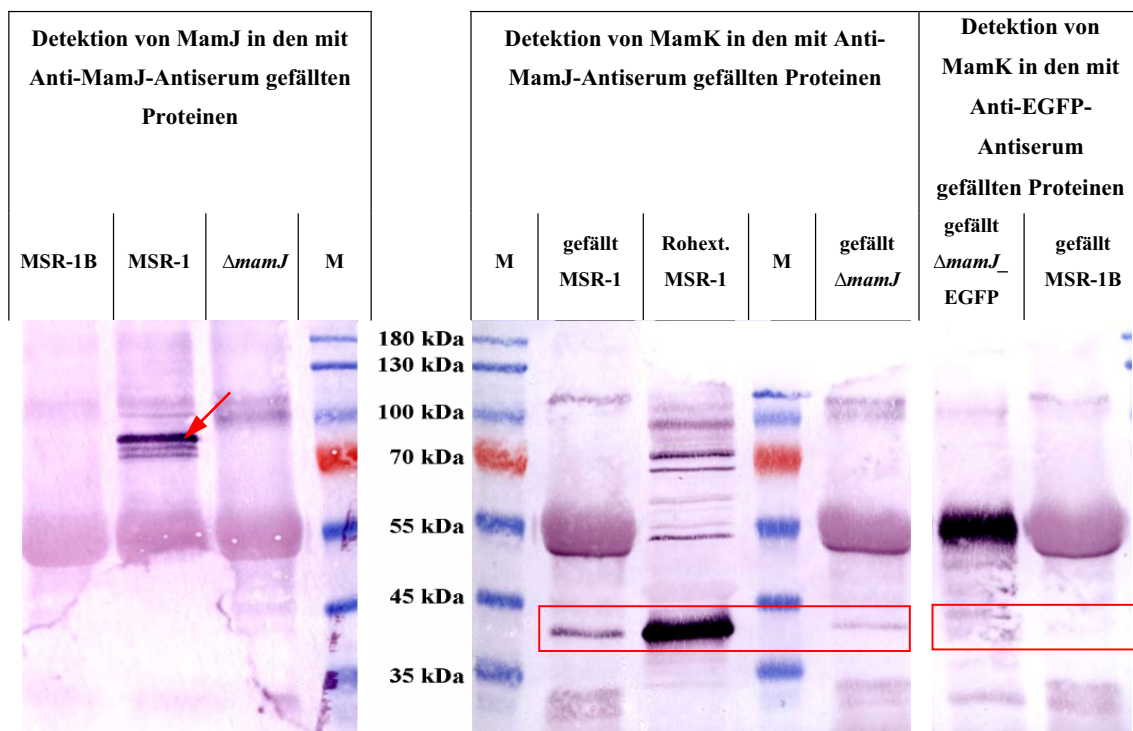
Die Untersuchungen zur Lokalisation von MamJ-EGFP erbrachten Anhaltspunkte für eine Interaktion zwischen MamJ und anderen Proteinen, die auf der Magnetosomeninsel codiert sind. Obwohl die Lokalisierung von MamK nicht abschließend geklärt ist, war MamK, aufgrund seiner Fähigkeit, Proteinfilamente zu bilden, der vielversprechendste Interaktionspartner für MamJ. Um zu prüfen ob MamK die Lokalisation von MamJ bedingen könnte, wurde mittels eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems untersucht, ob beide Proteine interagieren.

Die Zwei-Hybrid-Methode, welche von S. Fields und O.K. Song entwickelte wurde, ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf genetischer Ebene (40). Das Grundprinzip aller Zwei-Hybrid-Systeme beruht auf der Aktivierung der Transkription eines Reportergens - vermittelt durch die Interaktion der zu testenden Proteine X und Y, von denen das eine mit einer Transkriptions-aktivierenden Domäne, das andere mit einer DNA-bindenden Domäne fusioniert ist. Das in dieser Arbeit verwendete Zwei-Hybrid-System wurde zur Anwendung in *E. coli* entwickelt und basiert auf dem  $\lambda$ cI-Protein ( $\lambda$ cI) des Bakteriophagen  $\lambda$  und der alpha-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase ( $\alpha$ RNAP) (33). Die N-terminale Region des  $\lambda$ cI-Proteins fungiert als DNA-bindende Domäne und wird N-terminal mit Protein X fusioniert. Protein Y wird hingegen mit der N-terminalen Domäne ( $\alpha$ NTD) der  $\alpha$ RNAP fusioniert, welche die Assemblierung des RNA-Polymerase-Enzymkomplexes vermittelt (24). Eine Interaktion zwischen den Proteinen X und Y fixiert die  $\alpha$ NTD stromaufwärts des Reportergens und unterstützt die Bildung des kompletten RNA-Polymerase-Enzymkomplexes an dieser Stelle, wodurch die Transkription eines downstream gelegenen Reportergens aktiviert wird (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Prinzip des prokaryotischen Zwei-Hybrid Systems von Dove et. al (1997).

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien zeigen, dass MamJ sowohl mit MamK interagieren als auch oligomerisieren kann (Manuskript 3, Abbildung 6a-c). Interessanterweise interagieren sowohl MamK als auch MamJ mit MamO, dessen Funktion bisher ungeklärt ist, von welchem aber angenommen wird, es hilft bei der Faltung bzw. der Insertion von Proteinen in die Magnetosomenmembran (118). Keine Interaktion zeigt MamJ mit MamP, MamE und MamA. Zur Überprüfung der Zwei-Hybrid-Ergebnisse wurde die Methode der Co-Immunpräzipitation gewählt. Durch die Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein inklusive seines Interaktionspartners aus der Vielzahl der Proteine und Protein-Protein-Komplexe eines Zellysats isoliert werden.



**Abbildung 19:** Ergebnisse der Immunpräzipitation. Durch Anti-MamJ Antikörper wird MamJ (roter Pfeil) sowie mögliche Interaktionspartner in Proteinrohextrakt von *Magnetospirillum grypsiwaldense* MSR-1 gefällt. Durch unspezifisch reagierende Antikörper des Anti-MamJ-Antiserums werden weitere Proteine in den Proteinrohextrakten von Stamm MSR-1 sowie von Stämmen, denen das Gen für MamJ fehlt (MSR-1B und der  $\Delta mamJ$ ), gefällt (linke Abbildung). Das MamK Protein (ca. 39 kDa) wurde im Proteinrohextrakt und in den gefällten Proteinen von Stamm MSR-1, sowie in den gefällten Proteinen der  $\Delta mamJ$ -Mutante detektiert (mittlere Abbildung). Bei Verwendung eines polyklonalen Anti-EGFP-Antiserums zur Immunfällung von MamJ-EGFP aus Proteinrohextrakten eines  $\Delta mamJ$  Stammes, der *mamJ-egfp* *in trans* exprimiert, konnte MamK nicht gefällt werden (rechte Abbildung).

Unter Verwendung von Anti-MamJ-Antiserum wurden MamJ-Proteinkomplexe mittels Protein-G-Sepharose aus Proteinrohextrakt von *M. gryphiswaldense* präzipitiert. Um mögliche MamJ-Interaktionspartner von Proteinen unterscheiden zu können, die durch kreuzreagierende Antikörper des Anti-MamJ-Antiserum ebenfalls präzipitiert werden, wurde als Negativkontrolle Proteinrohextrakt der  $\Delta mamJ$  und der MSR-1B Mutante mit Anti-MamJ-Antiserum versetzt und die Präzipitat analysiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Anti-MamK-Antiserum beprobt. Dabei wurde MamK sowohl in den gefällten Proteinen des Wildtyps als auch der  $\Delta mamJ$ -Mutante detektiert (Abbildung 19). Die unspezifische Immunfällung von MamK aus Proteinrohextrakten die kein MamJ enthielten (Proteinrohextrakt von  $\Delta mamJ$ ), beruht somit vermutlich auf unspezifisch reagierenden Antikörpern im Anti-MamJ-Antiserum. Um auf das Anti-MamJ-Antiserum verzichten zu können, wurde MamJ-EGFP in der  $\Delta mamJ$ -Mutante exprimiert und mit Hilfe eines polyklonalen Anti-GFP-Antiserums präzipitiert. Jedoch konnte MamK in den gefällten Proteinen nicht nachgewiesen werden. Obgleich Co-Immunpräzipitation eine weit verbreitete Methode zur Identifikation unbekannter Interaktionspartner eines ausgewählten Proteins ist, besitzen Negativergebnisse nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Der Grund dafür liegt im Prinzip der Methode, da schwache oder transiente Interaktionspartner der Fällung entgehen können.

#### **2.14 Die charakteristische CAR-Domäne ist nicht essenziell für funktionales MamJ**

Die Konservierung der Primärstruktur von MamJ in Form von CAR-Domäne, Alanin- und Glycin-reicher Domäne lässt einen wichtigen Beitrag dieser Sequenzbereiche zur Funktionalität des Gesamtproteins vermuten. Um die Bedeutung dieser Sequenzbereiche festzustellen, wurden MamJ-Varianten mit Sequenzdeletionen konstruiert und deren Fähigkeit geprüft, die Bildung von Magnetosomenketten in  $\Delta mamJ$ -Mutante wiederherzustellen. Zudem wurde aufgrund der Interaktion von MamJ und MamK in Zwei-Hybrid-Versuchen untersucht, welche Sequenzbereiche von MamJ die beobachtete Interaktion zwischen beiden Proteinen vermittelt. Dazu wurden mittels

Zwei-Hybrid-System MamJ-Sequenzbereiche auf ihre Fähigkeit, an MamK bzw. MamJ zu binden, analysiert. Die Expression der MamJ-Varianten in  $\Delta mamJ$  zeigte, dass sowohl die CAR-Domäne als auch die nachfolgende alaninreiche Domäne überraschenderweise nicht essenziell für ein funktionales MamJ-Protein sind (Manuskript 3, Abbildung 4a-c). Die Funktionalität der MamJ-Varianten mit fehlender CAR- oder Alanin-reicher-Domäne war unerwartet, wenngleich der Repeatlängen-Polymorphismus der CAR-Domäne eine gewisse Sequenzredundanz andeutete. Ein prominentes Beispiel für die scheinbare Redundanz repetitiver Sequenzbereiche stellen die prolinreichen Repeats des Proteins TonB dar, welches essenziell für energieabhängige Transportprozesse durch die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist (78, 79). Unter Standardwachstumsbedingungen führte die Deletion dieser Repeats in TonB zu keiner erkennbaren Beeinträchtigung des energiegekoppelten Transports bei *E. coli*. Unter osmotischen Bedingungen, die zu einer Verbreiterung des periplasmatischen Raumes führen, sind die prolinreichen Repeats allerdings für die Funktionalität von TonB essenziell (79, 105). Über die Gründe der Erhaltung der scheinbar funktionslosen CAR-Domäne in MamJ im Verlaufe der Evolution lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise trägt die CAR-Domäne eine Funktion, die nicht unmittelbar mit der Kettenbildung zusammenhängt. Es ist aber auch vorstellbar, dass die Basensequenz der CAR-Domäne einen wichtigen Beitrag zur Stabilität des Transkripts leistet oder aufgrund ihrer Monotonie die Translationsgeschwindigkeit von MamJ reguliert. Der Zweck einer solchen Funktion erschließt sich momentan jedoch nicht, da die Magnetosomen und Magnetosomenketten in  $\Delta mamJ$ -Zellen, welche eine Variante von MamJ ohne CAR-Domäne exprimieren, keinen Unterschied zu denen des Wildtyps aufweisen. Dass repetitive Sequenzbereiche die Translationsgeschwindigkeit eines Gens regulieren können, ist z. B. für das Gen des Glutamat-Rezeptors 2 (GluR2) aus Säugerzellen bekannt, dessen untranslatierte 5'-Region einen 34 – 40 bp GU-Repeat trägt, welcher die Translation von GluR2 reguliert (94).

Sequenzbereiche, die essenziell für die Funktionalität von MamJ sind, liegen in seiner N-terminalen und der C-terminalen Sequenzregion. Wie die Ergebnisse der Zwei-Hybrid-Versuche zeigen, vermitteln diese Sequenzbereiche einerseits die Interaktion mit MamK und andererseits die Oligomerisierung von MamJ. Eine Überprüfung dieser spezifischen Interaktion durch andere Methoden steht allerdings noch aus. Es kann daher

nicht mit letzter Bestimmtheit gesagt werden, ob diese Sequenzbereiche auch in nativ gefaltetem MamJ Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, da sie möglicherweise nicht an der Oberfläche von MamJ liegen.

## 2.15 Eine $\Delta mamK$ -Mutante bildet keine Wildtyp-Magnetosomenketten

Im Zusammenhang mit der tomographischen Untersuchung von *M. magneticum* AMB-1 wurde eine  $\Delta mamK$ -Mutante von *M. magneticum* analysiert, die bisher jedoch nur unzureichend beschrieben ist (71). Im Gegensatz zum Wildtyp sind in den Tomogrammen von *M. magneticum* $\Delta mamK$  Zellen keine Proteinfilamente sichtbar (71). Dies entsprach den allgemeinen Erwartungen, da die Sequenzhomologie von MamK zum filamentbildenden Protein MreB vermuten ließ, dass die Filamente aus MamK aufgebaut sind (71, 106, 112). Das Fehlen der Proteinfilamente in den Zellen von *M. magneticum* $\Delta mamK$  ist jedoch nicht zweifelsfrei belegt, da auch in den Tomogrammen von *M. gryphiswaldense* $\Delta mamJ$  zumeist keine Magnetosomenfilamente sichtbar sind. Im Falle der  $\Delta mamJ$ -Mutante bedeutete dies jedoch nicht, dass keine Magnetosomenfilamente gebildet werden. Da die Anzahl der tomographierten Zellen von *M. magneticum* $\Delta mamK$  nicht angegeben wurde, ist unklar, ob die im Artikel geäußerte Vermutung, dass die Magnetosomenfilamente wahrscheinlich aus MamK gebildet werden (71), durch Untersuchung einer ausreichend großen Anzahl von Zellen statistisch abgesichert ist. Die Beschreibung des Phänotyps von *M. magneticum* $\Delta mamK$  ist ebenfalls wenig ausführlich. In den gezeigten Aufnahmen ist ersichtlich, dass die Deletion von *mamK* zum Verlust der Anordnung der Magnetosomen in Ketten führt. So sind in den Zellen der  $\Delta mamK$ -Mutante von *M. magneticum* die Magnetosomen zumeist in Paaren oder Dreiergruppen organisiert (71). Die einzelnen Paare bzw. Gruppen sind mit deutlichen Abstand zueinander auf einer gemeinsamen Achse angeordnet, deren Verlauf mit dem der Magnetosomenketten in Wildtypzellen übereinstimmt. Um zu überprüfen, ob auch in *M. gryphiswaldense* die Deletion von *mamK* zu einem Verlust der Kettenanordnung der Magnetosomen führt, generierte E. Katzmann unter Mitarbeit und Anleitung von A. Scheffel während seiner Diplomarbeit eine *mamK*-Deletionsmutante. Eine detaillierte Auswertung der Daten zur *M. gryphiswaldense* $\Delta mamK$ -Mutante steht momentan noch aus. Jedoch zeigen erste



elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass auch *M. gryphiswaldense*  $\Delta$ *mamK*-Zellen keine Wildtyp-Magnetosomenketten bilden (E. Katzmann, unveröffentlichte Daten). Überraschenderweise zeigen auch nur wenige  $\Delta$ *mamK*-Zellen von *M. gryphiswaldense* eine ähnliche Anordnung der Magnetosomen, wie sie für die  $\Delta$ *mamK*-Mutante von *M. magneticum* beschrieben ist. Stattdessen sind in  $\Delta$ *mamK*-Zellen von *M. gryphiswaldense* häufig zwei bis drei kurze Magnetosomenketten zu finden, die zumeist aus weniger als siebzehn Magnetosomen bestehen und die auf einer gemeinsamen Achse liegen (E. Katzmann, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu MamJ, welches essenziell für die Erhaltung der Kettenstruktur ist und dessen Verlust zu Magnetosomenagglomeraten führt, scheint der Verlust von MamK, keinen destabilisierenden Einfluss auf die strukturelle Integrität zumindest kurzer Magnetosomenketten zu haben. Die genaue Funktion von MamK und somit die Ursache für das Auftreten mehrerer kurzer Magnetosomenketten in  $\Delta$ *mamK*-Zellen von *M. gryphiswaldense* ist bisher unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 2.16 Modell zur Bildung der Magnetosomenketten

Die aus energetischer Sicht unvorteilhafte Anordnung der Magnetosomen in Ketten erfordert einen Mechanismus, der die strukturelle Integrität der Kette erhält (66, 69, 100). Obwohl die vorliegende Arbeit aufzeigt, dass das MamJ-Protein essenziell für die Stabilität von Magnetosomenketten ist, konnte der Mechanismus, über den MamJ die Kettenstruktur erhält, nicht abschließend geklärt werden. Im Folgenden wird eine Modellvorstellung zur Bildung von Magnetosomenketten diskutiert, welche davon ausgeht, dass die Magnetosomenkette durch Proteinfilamente stabilisiert wird, mit denen die einzelnen Magnetosomen durch das Protein MamJ verbunden sind (Abbildung 20). Die Bildung einer Magnetosomenkette verläuft folgendermaßen: Aus Invaginationen der Zytoplasmamembran schnüren sich die Magnetosomen-Leervesikel ab. Unterhalb der Zytoplasmamembran verlaufen die Magnetosomenfilamente, die analog zu Zytoskelettelementen in eukaryotischen Zellen (90) an der Invagination der Zytoplasmamembran beteiligt sein könnten. MamJ, welches fest mit der Magnetosomenmembran assoziiert ist, bindet an die Magnetosomenfilamente. Dadurch

werden die Magnetosomen mit den Filamenten verknüpft, an denen entlang sie sich bewegen können. Sofern der Abstand zweier magnetitgefüllter Magnetosomen (abhängig von ihrer Größe) eine gewisse Distanz unterschreitet, bewirken magnetische Kräfte die Koppelung beider Magnetosomen aneinander. Aufgrund der eingeschränkten Bewegungsrichtung entlang der Proteinfilamente kommt es zu einer Reihung der Magnetosomen in Zellen des Wildtyps. Sofern die gegenseitige Annäherung magnetitgefüllter Magnetosomen nicht auf eine Raumrichtung eingeschränkt ist, wie z. B. bedingt durch den Verlust von MamJ, kommt es zur Bildung von Agglomeraten. Die Gültigkeit dieses Modells ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt und erfordert weitere Untersuchungen. Zudem ist es aufgrund der vielen offenen Fragen zu undifferenziert, um sowohl die Anordnung der Magnetosomen in der  $\Delta mamJ$ -Mutante als auch der in  $\Delta mamK$ -Mutante erklären zu können.

Eine der Annahmen, auf denen das Modell beruht, ist, dass die Magnetosomenfilamente essenziell für die strukturelle Integrität der Magnetosomenkette sowie für deren Bildung sind. Die Existenz der Magnetosomenfilamente ist durch tomographische Aufnahmen von *M. gryphiswaldense* MSR-1 und *M. magneticum* AMB-1 belegt (71, 112). Die Natur der Magnetosomenfilamente ist jedoch nicht geklärt. Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung wurde vermutet, dass die Magnetosomenfilamente möglicherweise aus MamK aufgebaut sind (112, 118). Später unterstützen tomographische Aufnahmen einer  $\Delta mamK$ -Mutante von *M. magneticum* diese Vermutung, da keine Magnetosomenfilamente in den Tomogrammen dieser Mutante sichtbar sind. Jedoch ist das Fehlen der Magnetosomenfilamente in  $\Delta mamK$ -Zellen aufgrund der generellen Schwierigkeiten im Zusammenhang mit ihrer Detektion nicht zweifelsfrei bewiesen (71). Sofern die Magnetosomenfilamente aus MamK bestehen und MamJ die Magnetosomen an den Filamenten fixiert, wäre nach dem vorgeschlagenen Modell zu erwarten, dass der Verlust von MamK zu einer ähnlichen Anordnung der Magnetosomen führen würde wie in der  $\Delta mamJ$ -Mutante. Die Magnetosomenketten aus bis zu dreißig Magnetosomen in einer  $\Delta mamK$ -Mutante von *M. gryphiswaldense* belegen jedoch (E Katzmann, unveröffentlichte Daten), dass der Verlust von MamK nicht zur Agglomeration der Magnetosomen führt. Insofern lässt der Phänotyp der  $\Delta mamK$ -Mutante vermuten, dass weitere Mechanismen zur Stabilisierung der Magnetosomenkette existieren, insbesondere weil die Kettenanordnung

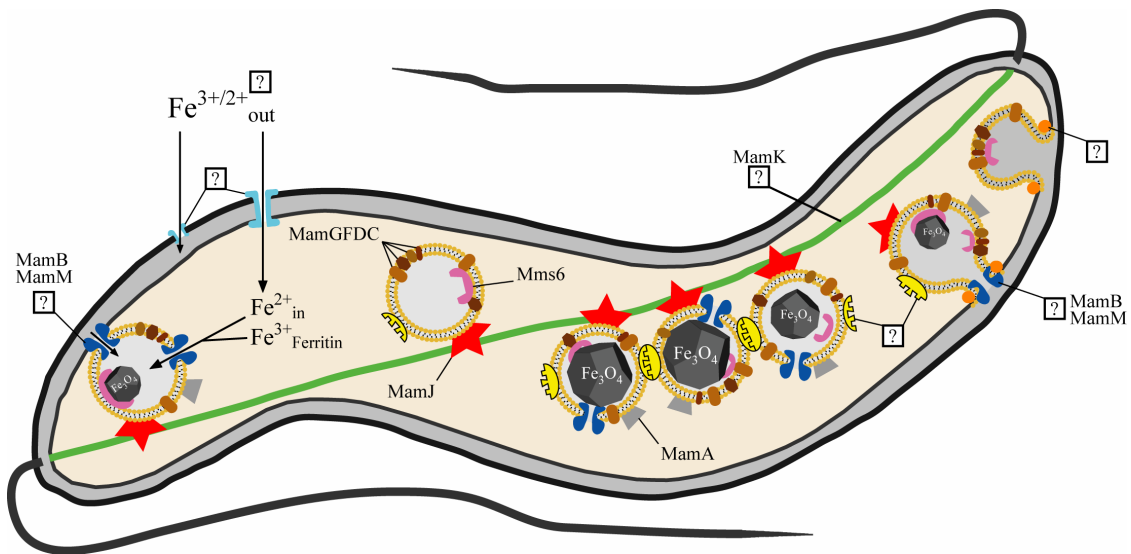
von enormer Bedeutung für eine effektive magnetische Ausrichtung der Zelle im Erdmagnetfeld ist. So könnte der Verlust von MamK bedingen, dass die Magnetosomenvesikelknospen sich nicht von der Zytoplasmamembran ablösen können, da die spezifische Lokalisierung der am Ablösungsprozess beteiligten Proteine MamK erfordert. Das Ablösen von der Zytoplasmamembran hat vermutlich Einfluss auf die Segregation der Magnetosomen bei der Zellteilung, weshalb in  $\Delta mamK$ -Zellen häufig mehrere kurze Magnetosomenketten auftreten, die entlang der Longitudinalachse der Zelle angeordnet sind. Allerdings ist strittig, ob sich die Magnetosomenmembran überhaupt von der Zytoplasmamembran ablöst oder beide stets ein Kontinuum bilden. Letzteres wurde von Komeili et al. (2006) vermutet, da in tomographischen Aufnahmen von *M. magneticum* AMB-1 ungefähr 30 % der gefundenen Magnetosomen eine Verbindung zur Zytoplasmamembran aufwiesen. Hingegen sind in tomographischen Aufnahmen von *M. gryphiswaldense* MSR-1 keine knospenden Magnetosomenvesikel sowie keine Übergänge zwischen der Membran „abgelöster“ Magnetosomenvesikel und der Zytoplasmamembran zu sehen, obwohl die Magnetosomen in Ketten entlang der Innenseite der Zytoplasmamembran angeordnet sind (112). Dies lässt vermuten, dass die Zytoplasmamembran und die Magnetosomenmembran nur während der Bildung der Magnetosomen ein Kontinuum bilden, die reifen Magnetosomenvesikel aber nicht mit der Zytoplasmamembran verbunden sind. Da der Aufbau der Magnetosomenfilamente bisher nicht zweifelsfrei geklärt ist, könnten die Magnetosomenfilamente auch aus einem der drei MreB-Paraloge bestehen, die sowohl im Genom von *M. gryphiswaldense* MSR-1 als auch in *M. magneticum* AMB-1 zu finden sind (114). In diesem Fall könnte MamK eine andere Funktion im Rahmen der Bildung der Magnetosomenketten wahrnehmen, die nicht unmittelbar mit der Stabilisierung der Kette in Verbindung steht. So wäre, wie für einige Proteine der Aktin-Superfamilie der ATPasen bekannt ist, eine chaperonähnliche Funktion für MamK denkbar. Der Verlust von MamK würde bedingen, dass einige Proteine, die womöglich eine Funktion im Rahmen der Segregation bzw. Positionierung der Magnetosomenketten ausüben, nicht korrekt gefaltet werden und somit nicht funktional sind. Möglich ist aber auch eine Funktion für MamK, die kein anderer Vertreter der Aktin-Superfamilie der ATPasen aufweist.

Die zweite Annahme, auf der das Modell zur Bildung von Magnetosomenketten beruht, ist, dass MamJ die Magnetosomen mit den Magnetosomenfilamenten verbindet. Diese Annahme beruht auf den Beobachtungen, dass  $\Delta mamJ$ -Zellen keine Magnetosomenketten bilden, und dass in Zellen der  $\Delta mamJ$ -Mutante die Magnetosomen nicht mehr mit den Magnetosomenfilamenten assoziiert sind (112). Letzteres wird gestützt durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisierung von MamJ-EGFP. Diese zeigen, dass MamJ-EGFP entlang einer filamentösen Struktur lokalisiert, die deutlich länger als die Magnetosomenkette ist. Die Beobachtung, dass MamJ-Moleküle nicht zu Filamenten polymerisieren können, impliziert, dass MamJ an eine filamentöse Struktur bindet.

Weshalb die Magnetosomen bei Deletion von *mamJ* agglomerieren ist nicht endgültig geklärt. Möglicherweise führt nicht allein der Verlust der MamJ-vermittelten Assoziation der Magnetosomen mit den Magnetosomenfilamenten zu ihrer Agglomeration in  $\Delta mamJ$ , sondern andere Faktoren, die mit der Präsenz von MamJ an den Magnetosomen im Zusammenhang stehen. Faktoren mit Einfluss auf das Agglomerationsverhalten kolloidaler magnetischer Nanopartikel in Suspension wurden ausgiebig untersucht (56, 126, 138). So besteht eine Möglichkeit, die Agglomeration von magnetischen Nanopartikeln zu beeinflussen auf der Adsorption sterisch anspruchsvoller Moleküle an ihrer Oberfläche. Infolgedessen ist die Annäherung zweier Partikel auf eine gewisse Distanz beschränkt, wodurch die über magnetische Kräfte vermittelte Agglomeration abgeschwächt wird. In Analogie dazu könnte MamJ die einzelnen Magnetosomen auf Distanz halten. Diese Funktion könnte die CAR-Domäne übernehmen, die aufgrund des hohen Anteils an Prolin vermutlich eine offene Konformation annimmt (145). Da jedoch die N- und C-terminale Sequenzregion von MamJ vermutlich die Interaktion mit den Magnetosomenfilamenten vermitteln, ist diese Funktion der CAR-Domäne bei der Komplementationsanalyse der  $\Delta mamJ$ -Mutante nicht offensichtlich geworden. Ein weiterer Faktor, der die Agglomeration magnetischer Nanopartikel in Ferrofluiden beeinflusst, ist die Oberflächenladung der Partikel. Eine Erhöhung der Oberflächenladung bewirkt eine Verstärkung der interpartikulären Abstoßungskräfte, wodurch die Agglomerationsneigung vermindert wird. Eine relative Messgröße für das Oberflächenpotential und somit für die Ladung von Partikeln stellt das Zetapotenzial dar. Vorläufige Ergebnisse zum Zetapotenzial von

Magnetosomen zeigen, dass Wildtyp-Magnetosomen ( $\zeta = -36.8 \pm 0.6$  mV) stärker negativ geladen sind als  $\Delta mamJ$ -Magnetosomen ( $\zeta = -33.1 \pm 1.8$  mV) (Zetapotentialmessungen wurde mit dem Zetasizer Nano von Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland im Labor von Prof. M. Winterhalter an der Jacobs Universität Bremen durchgeführt). Der Unterschied in der Ladung von Wildtyp- und  $\Delta mamJ$ -Magnetosomen beruht vermutlich auf MamJ, welches reich an sauren Aminosäuren ist.

Eine weitere Annahme des hier vorgeschlagenen Modells ist, dass die Bildung von Magnetosomenketten ein dynamischer Prozess ist. Diese Annahme wird durch Beobachtungen zum Verlauf der Kettenbildung nach Induktion der Magnetitbildung in unmagnetischen Zellen von *M. gryphiswaldense* gestützt, die vermuten lassen, dass die intrazelluläre Position der Magnetosomen variabel ist, sofern sie nicht in einer Kette fixiert sind. So bilden sich in unmagnetischen Zellen nach Induktion der Magnetitbildung erste Kristalle an scheinbar zufälligen Orten und erst nach ca. 2 h liegen mehrere Kristalle in einer Kette in der Zellemitte angeordnet vor (Manuskript 2, Abbildung 3). Die dynamische Lokalisation der Magnetosomen wird momentan noch kontrovers diskutiert. So wurde für *M. magneticum* AMB-1 vorgeschlagen, dass die Kettenbildung kein dynamischer Prozess ist (70). Das Modell zur Kettenbildung bei *M. magneticum* AMB-1 geht davon aus, dass die Bildung von Magnetosomenvesikeln nur entlang einer linearen Struktur an einer Seite der Zelle erfolgt. Folglich entsteht eine Kette von Leervesikeln, die alle mit Magnetit gefüllt werden. Die einzelnen Magnetosomen sind mit MamK-Proteinfilamenten assoziiert, wodurch das magnetischen Drehmoment auf die gesamte Zelle übertragen werden kann. Versuche zur Induktion der Magnetitbildung in unmagnetischen Zellen von Stamm AMB-1 durch D. Faivre (unveröffentlichte Daten) offenbarten indes, dass auch in *M. magneticum* AMB-1 die Kristallbildung an gleichzeitig an verschiedenen Stellen der Zelle einsetzt und sich die Kristalle erst später zu einer Kette zusammenfinden.



**Abbildung 20:** Modell für die Magnetosomen- und Magnetosomenkettenbildung. Die Bindung bislang unbekannter Proteine (**orange**) an die Oberfläche der Zytoplasmamembran führt zur Knospung und Abschnürung der Magnetosomenvesikel. Mittels eines bisher unbekanntes Transportsystems (**türkis**) wird in einem energieabhängigen Transportprozess Eisen in die Zelle aufgenommen. Zur Bildung von Magnetit werden  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  bis zur Übersättigung in die knospenden aber auch in die abgeschnürten Magnetosomenvesikeln transportiert. Der Eisentransport in die Magnetosomenvesikeln kann entweder aus dem Zytoplasma oder dem Periplasma heraus mittels der Transportproteine MamB/MamM (**blau**) erfolgen (K. Junge, unveröffentlichte Daten). Die Nukleation und das Wachstum der Magnetitkristalle wird durch das Mms6 Protein (**rosa**) beeinflusst (4) und findet sowohl in knospenden als auch in abgeschnürten Magnetosomenvesikeln statt (71). Neben Mms6 haben weitere bislang unbekannte Proteine Einfluss auf das Wachstum der Kristalle, deren spezifische Lokalisierung durch die MamGFDC-Proteine (**verschiedene Brauntöne**) vermittelt wird (Manuskript 4). Zuvor müssen die Magnetosomenvesikel jedoch durch MamA (**grau**) für die Kristallbildung aktiviert werden, wobei momentan der Ablauf und der Mechanismus der Aktivierung unklar ist (72). Abgeschnürte Magnetosomenvesikel werden durch MamJ (**rot**) mit den Magnetosomenfilamenten (**grün**) verknüpft und können sich an diesen entlang bewegen. Magnetosomen und Magnetosomen-Leeresikel werden letztendlich kettenförmig in der Zelle angeordnet, wobei die Magnetosomenfilamente (möglicherweise MamK) über einen unbekanntes Mechanismus zur Positionierung der Magnetosomenkette in der Zellmitte beitragen (Manuskripte 2 und 3). Sofern die Magnetosomenvesikel in einer Kette in unmittelbarem Kontakt zueinander kommen, werden sie über eine bislang unbekanntes Komponente der Magnetosomenmembran (**gelb**) fest miteinander verbunden.

### 3 Ausblick

Das in dieser Arbeit entworfene Modell zum molekularen Ablauf der Magnetosomen- und der Magnetosomenkettenbildung beinhaltet eine Reihe hypothetischer Elemente, die Ausgangspunkte für weitere experimentelle Arbeiten darstellen. Eines dieser spekulativen Elemente ist die Vermutung, dass die MamGFDC-Proteine nur indirekt die Kristallgröße beeinflussen, indem sie die spezifische Lokalisierung bzw. die stabile Verankerung anderer Proteine, die eine aktive Rolle bei der Biomineralisation von Magnetit spielen, an den Magnetosomen ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre es wichtig herauszufinden, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen den MamGFDC-Proteinen und dem MamF-Homolog MmsF besteht (Lokalisation von MmsF untersuchen, *mmsF*-Deletionsmutante von Wildtyp und von  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante erstellen), welches möglicherweise den Verlust der MamGFDC-Proteine in der  $\Delta$ *mamGFDC*-Mutante auf funktionaler Ebene kompensiert und somit die exakte Funktion der MamGFDC-Proteine kaschiert. Ein weiterer Schritt die postulierte Funktion für die MamGFDC-Proteine zu prüfen, bestünde darin, ihre Interaktionspartner zu identifizieren (mittels Zwei-Hybrid-System) und deren Funktion aufzuklären. Ein mutmaßlicher Interaktionspartner der MamGFDC-Proteine, könnte das die Magnetitbildung beeinflussende Mms6 Protein sein (4, 107), welches das gleiche auffällige LG-reiche Sequenzmotiv wie MamD und MamG trägt. Insofern sollte einerseits geprüft werden, ob die Lokalisierung von Mms6 abhängig von MamGFDC ist und ob das LG-reiche Sequenzmotiv Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann.

Weitere Hypothesen, die es zu prüfen gilt, betreffen die Rolle der Proteine MamJ und MamK bei der Bildung von Magnetosomenketten. So ist derzeit nicht eindeutig belegt, dass die in den tomographischen Aufnahmen sichtbaren Magnetosomenfilamente aus MamK aufgebaut ist. Die Natur der neuartigen Magnetosomenfilamente nachzuweisen, ist von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung der Mechanismen der Magnetosomenkettenbildung und der Kettenstabilisierung. Um zweifelfrei die Natur der entdeckten Magnetosomenfilamente zu klären, bedarf es ihrer Isolation und Sequenzierung. Die Isolation der Magnetosomenfilamente könnte mit derselben Methode erfolgen, welche erfolgreich zur Aufreinigung der Fibril-Proteinfilamente aus *Spiroplasma melliferum*

eingesetzt wurde (74). Sofern die Natur der Magnetosomenfilamente geklärt ist, lassen sich Protein-Interaktionspartner mittels Zwei-Hybrid-Analyse identifizieren. So postuliert das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell zur Magnetosomenkettenbildung, dass neben MamJ auch Proteine mit den Magnetosomenfilamenten assoziiert sind, welche die Ablösung der Magnetosomen-Invaginationen von der Zytoplasmamembran vermitteln, wodurch die „freien“ Magnetosomenvesikel einzig durch MamJ an den Magnetosomenfilamenten hängen. Weiterhin empfiehlt es sich, die in den Zwei-Hybrid-Versuchen gefundene Interaktion zwischen MamJ und MamK und zwischen MamO und MamJ/MamK mit anderen Methoden zu überprüfen. Hierzu würden sich *Pull-down*-Assays, chemisches-*Crosslinking* oder Interaktionsanalyse mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer oder CD-Spektroskopie anbieten. Sofern die Magnetosomenfilamente nicht aus MamK bestehen, wäre zu untersuchen, ob MamJ an die identifizierten Filamente binden kann. Die Komplementationsanalyse offenbarte, dass die CAR-Domäne nicht essenziell für ein funktionales MamJ-Protein ist. Dennoch könnte die CAR-Domäne möglicherweise die Aggregationsneigung der  $\Delta mamJ$ -Magnetosomen vermindern. Es sollte daher untersucht werden, ob Fusionen anderer Magnetosomenmembranproteine mit der CAR-Domäne die Fähigkeit besitzen, die Kettenbildung der Magnetosomen in der  $\Delta mamJ$ -Mutante wiederherzustellen.

Weiterhin ungeklärt ist zudem der Mechanismus, über den MamJ mit der Magnetosomenmembran assoziiert ist. So wird vermutet, dass die hydrophobe, glycinreiche Domäne von MamJ essenziell für seine Verankerung in der Magnetosomenmembran ist. Daher bietet sich an, die glycinreiche Domäne gezielt zu mutagenisieren und zu untersuchen, ob die entsprechenden MamJ-Varianten weiterhin mit der Magnetosomenmembran assoziiert sind.



## 4 Literaturverzeichnis

1. **Abracado, L. G., D. M. S. Esquivel, O. C. Alves, and E. Wajnberg.** 2005. Magnetic material in head, thorax, and abdomen of *Solenopsis substituta* ants: A ferromagnetic resonance study. *J. Magn. Reson.* **175**:309-316.
2. **Addadi, L., and M. Geva.** 2003. Molecular recognition at the interface between crystals and biology: Generation, manifestation and detection of chirality at crystal surfaces. *CrystEngComm* **5**:140-146.
3. **Amann, R., J. Peplies, and D. Schüler.** 2006. Diversity and taxonomy of magnetotactic bacteria, p. 25-36. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
4. **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**:8745-8750.
5. **Arató, B., Z. Szanyi, C. B. Flies, D. Schüler, R. B. Frankel, P. R. Buseck, and M. Pósfai.** 2005. Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *Am. Mineral.* **90**:1233-1241.
6. **Ausmees, N.** 2006. Intermediate filament-like cytoskeleton of *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **11**:152-158.
7. **Ausmees, N., J. R. Kuhn, and C. Jacobs-Wagner.** 2003. The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**:705-713.
8. **Baumeister, W.** 2002. Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:679-684.
9. **Baumeister, W., R. Grimm, and J. Walz.** 1999. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol.* **9**:81-85.
10. **Bazyliński, D., and B. RP.** 1983. Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1118-1124.

11. **Bazyliński, D. A., A. J. Dean, T. J. Williams, L. K. Long, S. L. Middleton, and B. L. Dubbels.** 2004. Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. *Arch. Microbiol.* **182**:373-387.
12. **Bazyliński, D. A., and R. B. Frankel.** 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:217-230.
13. **Bazyliński, D. A., R. B. Frankel, and H. W. Jannasch.** 1988. Anaerobic magnetite production by a marine magnetotactic bacterium. *Nature* **334**:518-519.
14. **Bazyliński, D. A., and T. J. Williams.** 2006. Ecophysiology of magnetotactic bacteria, p. 37-75. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
15. **Beall, B., and J. Lutkenhaus.** 1991. FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. *Genes Dev.* **5**:447-455.
16. **Beck, M., F. Forster, M. Ecke, J. M. Plitzko, F. Melchior, G. Gerisch, W. Baumeister, and O. Medalia.** 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**:1387-1390.
17. **Becker, E., N. C. Herrera, F. Q. Gunderson, A. I. Derman, A. L. Dance, J. Sims, R. A. Larsen, and J. Pogliano.** 2006. DNA segregation by the bacterial actin AlfA during *Bacillus subtilis* growth and development. *EMBO J.* **25**:5919-5931.
18. **Bi, E., and J. Lutkenhaus.** 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**:161-164.
19. **Blakemore, R. P.** 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* **190**:377-379.
20. **Blakemore, R. P., and R. B. Frankel.** 1981. Magnetic navigation in bacteria. *Sci. Am.* **245**:42-49.
21. **Blakemore, R. P., D. Maratea, and R. S. Wolfe.** 1979. Isolation and pure culture of freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **140**:720-729.

22. **Bochicchio, B., A. Pepe, and A. M. Tamburro.** 2001. On (GGLGY) synthetic repeating sequences of lamprin and analogous sequences. *Matrix Biol.* **20**:243-250.
23. **Bork, P., C. Sander, and A. Valencia.** 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:7290-7294.
24. **Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal-transduction through the Gram-negative outer-membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:295-307.
25. **Carballido-Lopez, R.** 2006. The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:888-909.
26. **Cornell, R. M., and U. Schwertmann.** 2003. The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses. Wiley-VCH, Weinheim.
27. **Cyrklaff, M., C. Risco, J. J. Fernandez, M. V. Jimenez, M. Esteban, W. Baumeister, and J. L. Carrascosa.** 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:2772-2777.
28. **D'Andrea, L. D., and L. Regan.** 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* **28**:655-662.
29. **Denham, C. R., R. P. Blakemore, and R. B. Frankel.** 1980. Bulk magnetic properties and magnetotactic bacteria. *IEEE Trans. Magn.*:1006-1007.
30. **DePedro, M. A., J. C. Quintela, J. V. Holtje, and H. Schwarz.** 1997. Murein segregation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:2823-2834.
31. **Diebel, C. E., R. Proksch, C. R. Green, P. Nellson, and M. M. Walker.** 2000. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* **406**:299-302.
32. **Doi, M., M. Wachi, F. Ishino, S. Tomioka, M. Ito, Y. Sakagami, A. Suzuki, and M. Matsubashi.** 1988. Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the Mre-region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **170**:4619-4624.

33. **Dove, S. L., J. K. Joung, and A. Hochschild.** 1997. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**:627-630.
34. **Dunin-Borkowski, R. E., M. R. McCartney, M. Posfai, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, and P. R. Buseck.** 2001. Off-axis electron holography of magnetotactic bacteria: magnetic microstructure of strains MV-1 and MS-1. *Eur. J. Min.* **13**:671-684.
35. **Erdemoglu, M., and M. Sarlkaya.** 2006. Effects of heavy metals and oxalate on the zeta potential of magnetite. *J. Col. Interf. Sci.* **300**:795-804.
36. **Errington, J.** 2003. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell. Biol.* **5**:175- 178.
37. **Faivre, D., P. Agrinier, N. Menguy, P. Zuddas, K. Pachana, A. Gloter, J.-Y. Laval, and F. Guyot.** 2004. Mineralogical and isotopic properties of inorganic nanocrystalline magnetites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**:4395-4403.
38. **Faivre, D., L. Boettger, B. Matzanke, and D. Schüler.** 2007. Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds via a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and ferrous iron species. *Angew. Chem. Int. Ed.* in press.
39. **Faivre, D., and P. Zuddas.** 2006. Mineralogical and isotopic properties of biogenic nanocrystalline magnetites, p. 175-196. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer, Heidelberg.
40. **Fields, S., and O. K. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
41. **Flies, C. B., 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.
42. **Frankel, R. B.** 1984. Magnetic guidance of organisms. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**:85-103.
43. **Frankel, R. B., D. A. Bazylinski, M. S. Johnson, and B. L. Taylor.** 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophy. J.* **73**:994-1000.

44. **Frankel, R. B., and R. P. Blakemore.** 1980. Navigational compass in magnetic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* **15-18**:1562-1564.
45. **Frankel, R. B., G. C. Papaefthymiou, R. P. Blakemore, and W. O'Brian.** 1983. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **763**:147-159.
46. **Frankel, R. B., T. J. Williams, and D. A. Bazylinski.** 2006. Magneto-Aerotaxis, p. 1-24. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
47. **Gärdes, A.** 2004. Deletionsmutagenese eines Magnetosomenproteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense* unter Etablierung des Cre-loxP-Systems. Diploma Thesis. Fachhochschule Emden.
48. **Golden, D. C., D. W. Ming, R. V. Morris, A. J. Brearley, H. V. Lauer Jr., A. H. Treiman, M. E. Zolensky, C. S. Schwandt, G. E. Lofgren, and G. A. McKay.** 2004. Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001. *Am. Mineral.* **89**:681-695.
49. **Gorby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. Blakemore.** 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**:834-841.
50. **Gotliv, B. A., L. Addadi, and S. Weiner.** 2003. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chembiochem.* **4**:522-529.
51. **Gould, J. L., and J. L. Kirschvink.** 1978. Bees have magnetic remanance. *Science* **201**:1026-1028.
52. **Grünberg, K.** 2005. Biochemische und molekularbiologische Untersuchung der Magnetosomenmembran von *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Dissertation. Universität Bremen.
53. **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**:1040-1050.

- 
54. **Grünberg, K., C. Wawer, Tebo B. M., and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4573-4582.
  55. **Hanzlik, M., C. Heunemann, E. Holtkamp-Rotzler, M. Winklhofer, N. Petersen, and G. Fleissner.** 2000. Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *Biometals* **13**:325-331.
  56. **Harris, L. A., J. D. Goff, A. Y. Carmichael, J. S. Riffle, J. J. Harburn, T. G. Pierre, and M. Saunders.** 2003. Magnetite nanoparticle dispersions stabilized with triblock copolymers. *Chem. Mater.* **15**:1367-1377.
  57. **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.
  58. **Heywood, B. R., D. A. Bazylinski, A. Garratt Reed, S. Mann, and R. B. Frankel.** 1990. Controlled biosynthesis of greigite in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften* **77**:536-538.
  59. **Hirt, A. M., F. Brem, M. Hanzlik, and D. Faivre.** 2006. Anomalous magnetic properties of brain tissue at low temperature: The 50 K anomaly. *J. Geophys. Res.* **111**:1-10.
  60. **Illies, M. R., M. T. Peeler, A. M. Dechtiaruk, and C. A. Ettensohn.** 2002. Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Genes Evol.* **212**:419-431.
  61. **Isambert, A., N. Menguy, E. Larquet, F. Guyot, and J.-P. Valet.** 2007. Transmission electron microscopy study of magnetites in a freshwater population of magnetotactic bacteria. *Am. Mineral.* **92**:621-630.
  62. **Jogler, C., and D. Schüler.** 2006. Genetic analysis of magnetosome biomineralization, p. 133-161. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer, Heidelberg.
  63. **Jones, L. J., R. Carballido-Lopez, and J. Errington.** 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**:913-922.

64. **Kawaguchi, R., J. G. Burgess, and T. Matsunaga.** 1992. Phylogeny and 16S rRNA sequence of *Magnetospirillum* sp. AMB-1, an aerobic magnetic bacterium. *Nucl. Acid Res.* **20**:1140.
65. **Keim, C. N., J. L. Martins, H. Lins de Barros, U. Lins, and M. Farina.** 2006. Structure, behavior, ecology and diversity of multicellular magnetotactic prokaryotes, p. 103-132. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
66. **Kirschvink, J. L.** 1982. Paleomagnetic evidence for fossil biogenic magnetite in western Crete. *Earth Planet. Sci. Lett.* **59**:388-392.
67. **Kirschvink, J. L., and J. W. Hagadorn.** 2000. A grand unified theory of biomineralization, p. 139-149, *The Biomineralisation of Nano- and Micro-Structures*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
68. **Kirschvink, J. L., A. Kobayashi-Kirschvink, and B. J. Woodford.** 1992. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:7683-7687.
69. **Kobayashi, A., J. L. Kirschvink, C. Z. Nash, R. E. Kopp, D. A. Sauer, L. E. Bertani, W. F. Voorhout, and T. Taguchi.** 2006. Experimental observation of magnetosome chain collapse in magnetotactic bacteria: Sedimentological, paleomagnetic, and evolutionary implications. *Earth Planet. Sci. Lett.* **245**:538-550.
70. **Komeili, A.** 2006. Cell biology of magnetosome formation, p. 163-174. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
71. **Komeili, A., Z. Li, D. Newman, and G. Jensen.** 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**:242-245.
72. **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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3839-3844.

- 
73. **Kröger, N., R. Deutzmann, and M. Sumper.** 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* **286**:1129-1132.
74. **Kürner, J.** 2005. Elektronentomographische und biochemische Untersuchung des Cytoskeletts von *Spiroplasma melliferum*. Dissertation. Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.
75. **Kürner, J., A. S. Frangakis, and W. Baumeister.** 2005. Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* **307**:436-438.
76. **Lang, C., and D. Schüler.** 2006. Biogenic nanoparticles: Production, characterization, and application of bacterial magnetosomes. *J. Phys.: Condens. Matter* **18**:S2815–S2828.
77. **Lang, C., and D. Schüler.** 2006. Biomineralization of magnetosomes in bacteria: Nanoparticles with potential applications, p. 107-124. *In* B. Rehm (ed.), *Microbial Bionanotechnology: Biological Self-assembly Systems and Biopolymer-based Nanostructures*. Horizon Bioscience, Wymondham.
78. **Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh, and K. Postle.** 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for *in vivo* physical interactions. *J. Bacteriol.* **179**:3213-3221.
79. **Larsen, R. A., G. E. Wood, and K. Postle.** 1993. The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **10**:943-953.
80. **Lins, U., and M. Farina.** 1998. Magnetosome size distribution in uncultured rod-shaped bacteria as determined by electron microscopy and electron spectroscopic imaging. *Microsc. Res. Tech.* **42**:459-464.
81. **Lohmann, K. J., and C. M. F. Lohmann.** 1996. Detection of magnetic field intensity by sea turtles. *Nature* **380**:59-61.
82. **Lowenstam, H. A.** 1962. Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Bulletin of the Geological Society of America* **73**:435-438.



83. **Lucic, V., F. Forster, and W. Baumeister.** 2005. Structural studies by electron tomography: From cells to molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **74**:833-865.
84. **Maher, B. A.** 1998. Magnetite biomineralization in termites. *Proc. R. Soc. London, B* **265**:733-737.
85. **Mann, S., N. H. C. Sparks, M. M. Walker, and J. L. Kirschvink.** 1988. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: Implications for magnetoreception. *J. Exp. Biol.* **140**:35-49.
86. **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**:157-166.
87. **Matsunaga, T., Y. Okamura, and T. Tanaka.** 2004. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles. *J. Mater. Chem.* **14**:2099-2105.
88. **McCartney, M. R., U. Lins, M. Farina, P. R. Buseck, and R. B. Frankel.** 2001. Magnetic microstructure of bacterial magnetite by electron holography. *Eur. J. Mineral.* **13**:685-689.
89. **McIntosh, R., D. Nicastro, and D. Mastrorarde.** 2005. New views of cells in 3D: An introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol.* **15**:43-51.
90. **McMahon, H. T., and J. L. Gallop.** 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**:590-596.
91. **Meldrum, F. C., S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, and D. A. Bazylinski.** 1993. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc. R. Soc. London, B* **251**:231-236.
92. **Moller-Jensen, J., R. B. Jensen, J. Löwe, and K. Gerdes.** 2002. Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J.* **21**:3119-3127.

93. **Moskowitz, B. M., R. B. Frankel, P. J. Flanders, R. P. Blakemore, and B. B. Schwartz.** 1988. Magnetic properties of magnetotactic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* **73**:273-288.
94. **Myers, S. J., Y. F. Huang, T. Genetta, and R. Dingledine.** 2004. Inhibition of glutamate receptor 2 translation by a polymorphic repeat sequence in the 5'-untranslated leaders. *J. Neurosci.* **24**:3489-3499.
95. **Nickell, S., O. Mihalache, F. Beck, R. Hegerl, A. Korinek, and W. Baumeister.** 2007. Structural analysis of the 26S proteasome by cryoelectron tomography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**:115-120.
96. **Okamura, Y., H. Takeyama, and T. Matsunaga.** 2000. Two-dimensional analysis of proteins specific to the bacterial magnetic particle membrane from *Magnetospirillum* sp. AMB-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**:441-446.
97. **Okuda, Y., K. Denda, and Y. Fukumori.** 1996. Cloning and sequencing of a gene encoding a new member of the Tetratricopeptide protein family from magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **171**:99-102.
98. **Okuda, Y., and Y. Fukumori.** 2001. Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing MAM22, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **491**:169-73.
99. **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**:255-264.
100. **Philipse, A., and D. Maas.** 2002. Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: Chain formation and colloidal stability. *Langmuir* **18**:9977-9984.
101. **Plitzko, J. M., A. S. Frangakis, S. Nickell, F. Förster, A. Gross, and W. Baumeister.** 2002. In vivo veritas: Electron cryotomography of cells. *Trends Biotechnol.* **20**:540-544.
102. **Ponting, C. P., C. Phillips, K. E. Davies, and D. J. Blake.** 1997. PDZ domains: Targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays* **19**:469-479.

103. **Posfai, M., P. R. Buseck, D. A. Bazylinski, and R. B. Frankel.** 1998. Iron sulfides from magnetotactic bacteria: Structure, composition, and phase transitions. *Am. Mineral.* **83**:1469-1481.
104. **Pósfai, M., T. Kasama, and R. E. Dunin-Borkowski.** 2006. Characterization of bacterial magnetic nanostructures using high-resolution transmission electron microscopy and off-axis electron holography, p. 197-225. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
105. **Postle, K., and R. J. Kadner.** 2003. Touch and go: tying TonB to transport. *Molecular Microbiology* **49**:869-882.
106. **Pradel, N., C. Santini, A. Bernadac, Y. Fukumori, and L. Wu.** 2006. Biogenesis of actin-like bacterial cytoskeletal filaments destined for positioning prokaryotic magnetic organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:17485–17489.
107. **Prozorov, T., S. K. Mallapragada, B. Narasimhan, L. Wang, P. Palo, M. Nilsen-Hamilton, T. J. Williams, D. A. Bazylinski, R. Prozorov, and P. C. Canfield.** 2007. Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **17**:951-957.
108. **Quinn, P., R. M. Bowers, Y. Y. Zhang, T. M. Wahlund, M. A. Fanelli, D. Olszova, and B. A. Read.** 2006. cDNA microarrays as a tool for identification of biomineralization proteins in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5512-5526.
109. **Reszka, R.** 2000. Applications for magnetosomes in medical research, p. 81-92. *In* E. Baeuerlein (ed.), *Biomineralization*. Wiley-VCH, Weinheim.
110. **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 groupspecific genes with putative functions in magnetosome biomineralization and magnetotaxis. *J. Bacteriol.* **189**:4899-4910.

111. **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**:69-73.
112. **Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linares, P. L. Graumann, J. M. Pätzold, and D. Schüler.** 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**:110-115.
113. **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.
114. **Schübbe, S.** 2005. Untersuchungen zur molekularen Organisation und Regulation der *mam*-Gene in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Dissertation. Universität Bremen.
115. **Schübbe, S., M. Kube, 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**:5779-5790.
116. **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**:5757-5765.
117. **Schüler, D.** 2004. Biochemical and genetic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In E. Baeuerlein (ed.), *Biomineralization*, 2th ed. Wiley-VCH, Weinheim.

118. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **181**:1-7.
119. **Schüler, D., and E. Baeuerlein.** 1997. Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J. Phys. IV **7**:647-650.
120. **Schüler, D., and E. Baeuerlein.** 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **166**:301-307.
121. **Schüler, D., and M. Köhler.** 1992. The isolation of a new magnetic spirillum. Zentralbl. Mikrobiol. **147**:150-151.
122. **Schüler, D., S. Spring, and D. A. Bazylinski.** 1999. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization. Syst. Appl. Microbiol. **22**:466-471.
123. **Schultheiss, D.** 2004. Entwicklung eines genetischen Systems für die Untersuchung der Magnetitbiomineralisation des magnetischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Dissertation. Universität Bremen.
124. **Schultheiss, D., M. Kube, and D. Schüler.** 2004. Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3624-3631.
125. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **179**:89-94.
126. **Shen, L. F., A. Stachowiak, S. E. K. Fateen, P. E. Laibinis, and T. A. Hatton.** 2001. Structure of alkanolic acid stabilized magnetic fluids. A small-angle neutron and light scattering analysis. Langmuir **17**:288-299.
127. **Simmons, S. L., and K. J. Edwards.** 2006. Geobiology of magnetotactic bacteria, p. 77-102. In D. Schüler (ed.), Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, vol. 3. Springer, Heidelberg.

128. **Stephens, C.** 2002. Chromosome segregation: Pushing dispatch plasmids apart. *Curr. Biol.* **12**:R728-R730.
129. **Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, and T. Takahashi.** 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**:563-564.
130. **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**:5234-5247.
131. **Taoka, A., R. Asada, H. Sasaki, K. Anzawa, L.-F. Wu, and Y. Fukumori.** 2006. Spatial localizations of Mam22 and Mam12 in the magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* **188**:3805-3812.
132. **Thomas-Keprta, K. L., D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, S. J. Clemett, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson, and C. S. Romanek.** 2000. Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**:4049-4081.
133. **Tsien, R. Y.** 1998. The green fluorescent protein. *Ann. Rev. Biochem.* **67**:509-544.
134. **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**:7176-7184.
135. **van de Meene, A. M. L., M. F. Hohmann-Marriott, W. F. J. Vermaas, and R. W. Roberson.** 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **184**:259-270.
136. **Van den Ent, F., L. A. Amos, and J. Löwe.** 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**:39-44.
137. **Venkatachalam, C. M., and D. W. Urry.** 1981. Development of a linear helical conformation from its cyclic correlate. Beta-spiral model of the Elastin poly(pentapeptide) (VPGVG)<sub>n</sub>. *Macromolecules* **14**:1225-1229.

138. **Viota, J. L., J. de Vicente, J. D. G. Duran, and A. Delgado.** 2005. Stabilization of magnetorheological suspensions by polyacrylic acid polymers. *J. Colloid Interface Sci.* **284**:527-541.
139. **Volkmer, D., M. Fricke, T. Huber, and N. Sewald.** 2004. Acidic peptides acting as growth modifiers of calcite crystals. *Chem. Commun.* **16**:1872-1873.
140. **Walcott, C., J. L. Gould, and J. L. Kirschvink.** 1979. Pigeons have magnets. *Science* **205**:1027-1029.
141. **Walker, M. M., T. E. Dennis, and J. L. Kirschvink.** 2002. The magnetic sense and its use in long-distance navigation by animals. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**:735-744.
142. **Walker, M. M., T. P. Quinn, J. L. Kirschvink, and C. Groot.** 1988. Production of single domain magnetite throughout life by sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *J. Exp. Biol.* **140**:51-63.
143. **Weiner, S., and P. M. Dove.** 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect, p. 1-29. *In* P. M. Dove, J. J. De Yoreo, and S. Weiner (ed.), *Biomineralization*, vol. 54. Mineralogical Society of America.
144. **Williams, T. J., C. L. Zhang, J. H. Scott, and D. A. Bazylinski.** 2006. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1322-1329.
145. **Williamson, M. P.** 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**:249-260.
146. **Wiltshko, W., and R. Wiltshko.** 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural. Behav. Physiol.* **191**:675-693.
147. **Winklhofer, M., and N. Petersen.** 2006. Paleomagnetism and magnetic bacteria, p. 255-273. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.

148. **Yang, F., L. G. Moss, and G. N. Phillips.** 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**:1246-1251.



## 5 Anhang

### 5.1 Berechnungen

A) Berechnung von  $L(x)$  für *M. magnetotacticum* MS-1 dessen magnetisches Moment ( $M$ )  $5 \times 10^{-16} \text{ A m}^2$  (entspricht  $5 \times 10^{-13} \text{ G cm}^3$ ) beträgt (42).

$$L(x) = \coth(x) - 1/x; \quad x = E_m / k_B T \quad (42)$$

$$E_m = M \cdot B_{\text{Erdmagnetfeld}} \quad (46)$$

$$E_m = 5 \times 10^{-13} [\text{G cm}^3] \cdot 0.5 [\text{G}] = 2.5 \times 10^{-13} [\text{G}^2 \text{ cm}^3] = 2.5 \times 10^{-20} [\text{J}]$$

$$k_B T = 4.1 \times 10^{-21} [\text{J}] \quad (46)$$

$$x = E_m / k_B T = 2.5 \times 10^{-20} [\text{J}] / 4.1 \times 10^{-21} [\text{J}] \approx 6.1$$

$$L(6.1) = \coth(6.1) - 1/6.1 \approx \underline{0.836}$$

B) Berechnung der Anzahl der Kristalle ( $n$ ) mit 40 nm Durchmesser ( $d$ ), die eine Kette aufweisen muss, damit die Bewegung einer magnetotaktischen Bakterienzelle im Erdmagnetfeld gerichtet ist ( $L(x) = 0.501$  bei  $x = 1.8$ ).

$$x = E_m / k_B T; \quad x = 1.8$$

$$E_m = 1.8 \cdot k_B T = 1.8 \cdot 4.1 \times 10^{-21} [\text{J}] = 7.38 \times 10^{-21} [\text{J}] = 7.38 \times 10^{-14} [\text{G}^2 \text{ cm}^3]$$

$$M = E_m / B_{\text{Erdmagnetfeld}} = 7.38 \times 10^{-14} [\text{G}^2 \text{ cm}^3] / 0.5 [\text{G}] = 1.476 \times 10^{-13} [\text{G cm}^3]$$

$$M = V_{\text{Magnetit}} \cdot J_{\text{Sättigungsmagnetisierung Magnetit}}$$

$$J_{\text{Sättigungsmagnetisierung Magnetit}} = 480 [\text{G}] \quad (147)$$

$$V_{\text{Magnetit}} = M / J_{\text{Sättigungsmagnetisierung Magnetit}} = 1.476 \times 10^{-13} [\text{G cm}^3] / 480 [\text{G}]$$

$$= 3.075 \times 10^{-16} [\text{cm}^3]$$

$$V_{\text{Kugel}} = (\pi \cdot d^3) / 6; \quad d = 40 [\text{nm}] = 4 \times 10^{-6} [\text{cm}]$$

$$V_{\text{Kugel}} = (\pi \cdot (4 \times 10^{-6} [\text{cm}])^3) / 6 \approx 3.35 \times 10^{-17} [\text{cm}^3]$$

$$V_{\text{Magnetit}} = n \cdot V_{\text{Kugel}}$$

$$n = V_{\text{Magnetit}} / V_{\text{Kugel}} = 3.075 \times 10^{-16} [\text{cm}^3] / 3.35 \times 10^{-17} [\text{cm}^3] \approx \underline{10}$$

Bei  $d = 30 \text{ nm}$  ist  $n \approx \underline{22}$ .



---

Teil II  
Publikationen

---

## Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden die folgenden Publikationen:

1. **Scheffel A.** und D. Schüler. (2006) Magnetosomes in magnetotactic bacteria. *In* J. M. Shively (ed.), *Microbiology monographs: Complex intracellular structures in prokaryotes*, vol. 1. Springer, Berlin / Heidelberg.

Dieser Buchartikel fasst den Stand des Wissens über magnetotaktische Bakterien zusammen, wobei der Schwerpunkt des Artikels, auf der Molekularbiologie der Magnetosomenbiomineralisation liegt. Beide Autoren trugen zu gleichem Anteil zum Manuskript bei.

2. **Scheffel A.**, Gruska M., Faivre D., Linaroudis A., Graumann, P. L., Plitzko J. M. und Schüler D. (2006) An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria, *Nature* 440: 110-114

Dieser Artikel beinhaltet die Beschreibung einer  $\Delta mamJ$ -Mutante von *M. gryphiswaldense* und ein Modell zur Bildung von Magnetosomenketten. Tomographische Aufnahmen der Mutante und des Wildtyps wurden von M. Gruska und J. M. Plitzko realisiert und A. Linderoudis half bei der Volumendarstellung der rekonstruierten Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden von A. Scheffel am Mikroskop von P. L. Graumann aufgenommen. D. Faivre entwickelte das Protokoll zur wachstumsunabhängigen Induktion der Magnetitbildung in unmagnetischen Zellen. Alle verbleibenden experimentellen Arbeiten wurden von A. Scheffel durchgeführt. D. Schüler lieferte zahlreiche Anregungen und erstellte zusammen mit A. Scheffel das Manuskript.

3. **Scheffel A.** und Schüler D. (2007) The acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly, *J. Bacteriol.* Im Druck

Dieser Artikel beinhaltet die detaillierte Charakterisierung des MamJ Proteins von *M. gryphiswaldense*. Konzept und Ideen stammen von A. Scheffel und D. Schüler. Experimente wurden fast ausschließlich von A. Scheffel durchgeführt. E. Katzmann half bei den Zwei-Hybrid Versuchen.

4. **Scheffel A.**, Gärdes A., Grünberg K., Wanner G. und Schüler D. (2007) Size of magnetite crystals is controlled by the cumulative action of MamGFDC proteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense*, In Vorbereitung

Dieser Artikel beinhaltet die Charakterisierung zweier durch gerichtete Deletionsmutagenese generierter Mutanten von *M. gryphiswaldense*. Eine der beiden Mutanten ( $\Delta mamGFDC$ ) wurde von K. Grünberg im Rahmen ihrer Dissertation erstellt und A. Gärdes generierte im Rahmen ihrer Diplomarbeit die zweite Mutante ( $\Delta mamC$ ). Diese Arbeit wurde durch A. Scheffel betreut. G. Wanner erstellte die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Dünnschnitte des Wildtyps und der  $\Delta mamGFDC$ -Mutante. Die detaillierte Charakterisierung der  $\Delta mamGFDC$  und der  $\Delta mamC$ -Mutante (Wachstumsversuche, Elektronenmikroskopie für Messungen der Kristallgrößen, Messung der Durchmesser der Magnetosomenvesikel in Dünnschnitten) sowie Untersuchungen zur Rolle der einzelnen Proteine (Komplementation) bei der Magnetosomenbiomineralisation lieferte A. Scheffel. D. Schüler und A. Scheffel erstellten in Zusammenarbeit das Manuskript.

Weitere Publikationen zu deren Entstehung beigetragen wurde:

1. Schübbe S., Kube M., **Scheffel A.**, Wawer C., Heyen U., Meyerdierks A., Madkour M. H., Mayer F., Reinhardt R. und Schüler D. (2003) Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island, J Bacteriol. 185: 5779-5790

Dieser Artikel beinhaltet die Charakterisierung einer spontanen nicht magnetischen Mutante von *M. gryphiswaldense* (MSR-1B), die von A. Scheffel isoliert und charakterisiert wurde.

**VOLUME 1 MICROBIOLOGY MONOGRAPHS: COMPLEX  
INTRACELLULAR STRUCTURES IN PROKARYOTES**

**CHAPER 7: MAGNETOSOMES IN MAGNETOTACTIC BACTERIA**

André Scheffel<sup>1</sup> & Dirk Schüler<sup>1</sup>

Manuskript 1

<sup>1</sup>Department for Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany.

**Table of Contents**

1. Introduction
2. Diversity and physiology of magnetotactic bacteria
3. Function of magnetosomes
4. Structure and magnetic characteristics of magnetosome crystals
5. The magnetosome membrane
  - 5.1 Structure and composition of the magnetosome membrane
  - 5.2 Magnetosome membrane proteins
6. Genetics and Molecular organization of magnetosome genes
  - 6.1 The magnetosome genes are clustered within a genomic magnetosome island
  - 6.2 The magnetosome island is a highly unstable genomic region and undergoes spontaneous rearrangements
  - 6.3 Mutational analysis of magnetosome formation
7. Subcellular organization and assembly of magnetosomes chains
8. Pathway of magnetite biomineralization and magnetosome formation
9. Biotechnological applications of magnetosomes
10. Conclusions
11. Acknowledgements
12. References

**Abstract**

**The ability of magnetotactic bacteria (MTB) to orient and migrate along magnetic field lines is based on magnetosomes, which are membrane-enclosed intracellular crystals of a magnetic iron mineral. The biomineralization of magnetosomes is a process with genetic control over the accumulation of iron, the deposition of the magnetic crystal within a specific compartment, as well as their intracellular assembly and alignment into chain-like structures. Magnetite crystals produced by MTB have uniform species-specific morphologies and sizes, which are mostly unknown from inorganic systems. In addition, magnetosome chain formation is an example for one of the highest structural level achieved in a prokaryotic cell. In this chapter, we give an overview over the biology of MTB and the structure and functions of bacterial magnetosomes. In addition we summarize the current knowledge of the physico-chemical and molecular genetic basis of magnetosome biomineralization and chain formation.**



## 1 Introduction

The intriguing capability of magnetotactic bacteria (MTB) to navigate along geomagnetic field lines is due to the presence of unique inclusions, the magnetosomes, which are chain-like intracellular structures that consist of nanometre-scale, magnetic iron-mineral crystals enveloped by a membrane vesicle. Of the many types of organelles and subcellular structures that have evolved in prokaryotic organisms, the magnetosome provides one of the rare examples in which an inorganic crystalline constituent is enclosed within a membrane vesicle that provides a nanoreactor for the controlled growth of a iron oxide or sulfide crystal. The bacterial magnetosome chain affords an example for one of the most complex subcellular structures found in a prokaryotic cell. The formation of this multi-particle magnetic receptor is achieved by a remarkable degree of control over the biomineralization of a perfectly shaped mineral crystal, which is assembled into a highly ordered chain-like structure. Bacterial magnetosomes have attracted a broad interdisciplinary interest which goes beyond microbiology and biochemistry. However, understanding of magnetosome organization and formation has remained poor for many years after the discovery of MTB by Richard Blakemore (13), mostly due to the unavailability of techniques to isolate, cultivate and manipulate MTB in the laboratory. The first pure culture of MTB, a magnetotactic spirillum, was isolated in R. Wolfe's lab by R. Blakemore and colleagues (15). Studies on this organism later lead to first description of "magnetosomes", as proposed by (4). Another milestone achieved by the same group in the understanding of magnetosome formation was the identification of a biological membrane termed "magnetosome membrane" (MM) enclosing the crystals, and it was established that empty MM vesicles are present before magnetite formation (35). These and several more recent findings later lead to the conclusion that bacterial magnetosomes represent true prokaryotic membrane-bounded organelles, displaying a comparable degree of complexity as eukaryotic counterparts (47). In recent years, tremendous progress has been made by several groups in the elucidation of biochemistry, genetics, and cell biology of bacterial magnetosome synthesis, which is being highlighted in this chapter.

## 2 Diversity and physiology of magnetotactic bacteria

Magnetosome formation occurs in several distinct phylogenetic lineages of MTB, which represent a heterogeneous group of aquatic prokaryotes with a variety of morphological types. All known MTB are motile by means of flagella and have a cell wall resembling that of typical Gram-negative bacteria. While most MTB from natural populations appear to be affiliated with the Alphaproteobacteria, examples for magnetosome formation has been also described for some representatives of the Deltaproteobacteria (21, 43), Gammaproteobacteria (80), and the *Nitrospira* phylum (31, 82). Based on this diversity, it was suggested that MTB are polyphyletic with respect to their 16S RNA and may descent from multiple evolutionary origins (1, 21). Commonly found morphotypes include coccoid cells as well rods, vibrios and spirilla of various dimensions and sizes (76). Notably, some unusual morphologies were observed among MTB, including the giant rod magnetotactic rod "*Magnetobacterium bavaricum*" containing up to nearly 1000 magnetosome particles (83, 89), and a multicellular magnetotactic prokaryote originally described by (29) and (51). Despite of their high abundance and ubiquitous occurrence, most MTB have proven recalcitrant to axenic cultivation and only very few species have been isolated in pure culture (8). The few isolated strains are metabolically diverse and versatile. Most magnetotactic isolates from the Alphaproteobacteria are sensitive towards high oxygen concentration and grow either microaerobically using oxygen or anaerobically using nitrate or nitrous oxide as electron acceptors, whereas the magnetite-forming Deltaproteobacterium *Desulfovibrio magneticus* grows anaerobically by reduction of fumarate or sulfate (for review see (8)). Many MTB metabolize short-chained organic acids, but several MTB have been recently shown to be capable of chemo-lithoautotrophic growth (7, 92). Difficulties in isolating and cultivating MTB arise from their lifestyle, which is adapted to complex chemical gradients that are typically encountered in stratified sediments. Accordingly, only a few species of MTB are available in pure culture, and therefore, our knowledge on magnetosome synthesis mostly comes from studies on *Magnetospirillum* species and closely related MTB within the Alphaproteobacteria.

### 3 Function of magnetosomes

There is compelling evidence that the primary function of bacterial magnetosomes is to serve as navigational devices in magnetotaxis by interaction with the Earth's magnetic field. Magnetotaxis refers to motility directed by a magnetic field, although this was suggested to be a misnomer, as in contrast to a true tactic response, magnetotactic cells do not actually sense magnetic field gradients (8). Instead, it has become apparent that passive magnetic orientation is effective in combination with other navigational mechanisms such as aerotaxis, so that alternative definitions such as "magneto-aerotaxis" in fact seem to be more precisely describing this phenomenon (33).

The preferred motility direction found in natural populations of MTB is northward in the northern hemisphere, whereas it is southward in the southern hemisphere. Because of the inclination of the geomagnetic field, migration in these preferred directions would cause cells in both hemispheres to swim downward. In the environment, MTB occur in highest numbers at or closely below the oxic-anoxic transition zone (OATZ) of marine and freshwater environments (6, 32, 80), which in most cases is located a few mm below the sediment surface, or alternatively may occur in stratified water columns. Thus, by facilitating vertical up and down orientation, magnetotaxis seems to aid bacteria in the navigation along the multiple and steep chemical gradients commonly found in that zone.

Although magnetosomes seem to be clearly optimized for navigation with respect to their chemical composition, size, shape, number, and organization, magnetosome formation is evidently not essential for growth and survival of cell under laboratory conditions, as demonstrated by analysis of non-magnetic mutants (15, 24, 53, 71, 88). Besides magnetotaxis, other possible explanations for the intracellular iron deposition have been considered, including for instance, a function in iron homeostasis (14, 50). In fact, growth of magnetosome-free mutants was more sensitive towards increased extracellular iron concentrations than growth of the magnetic wild-type, which seems to hint towards a potential role of magnetite precipitation in intracellular detoxification of potentially harmful levels of soluble iron (71). It might be envisioned that a contribution to iron homeostasis by the precipitation of an inert iron mineral could have been one of the initial steps driving the evolution of more elaborate chains of magnetosome crystals which in addition than

provided an additional selective advantage by functioning as a navigational device. Other suggested functions for magnetite formation were in energy conservation or redox cycling (38, 83), although there is so far no convincing evidence that magnetite formation might yield a significant contribution to cellular energy metabolism.

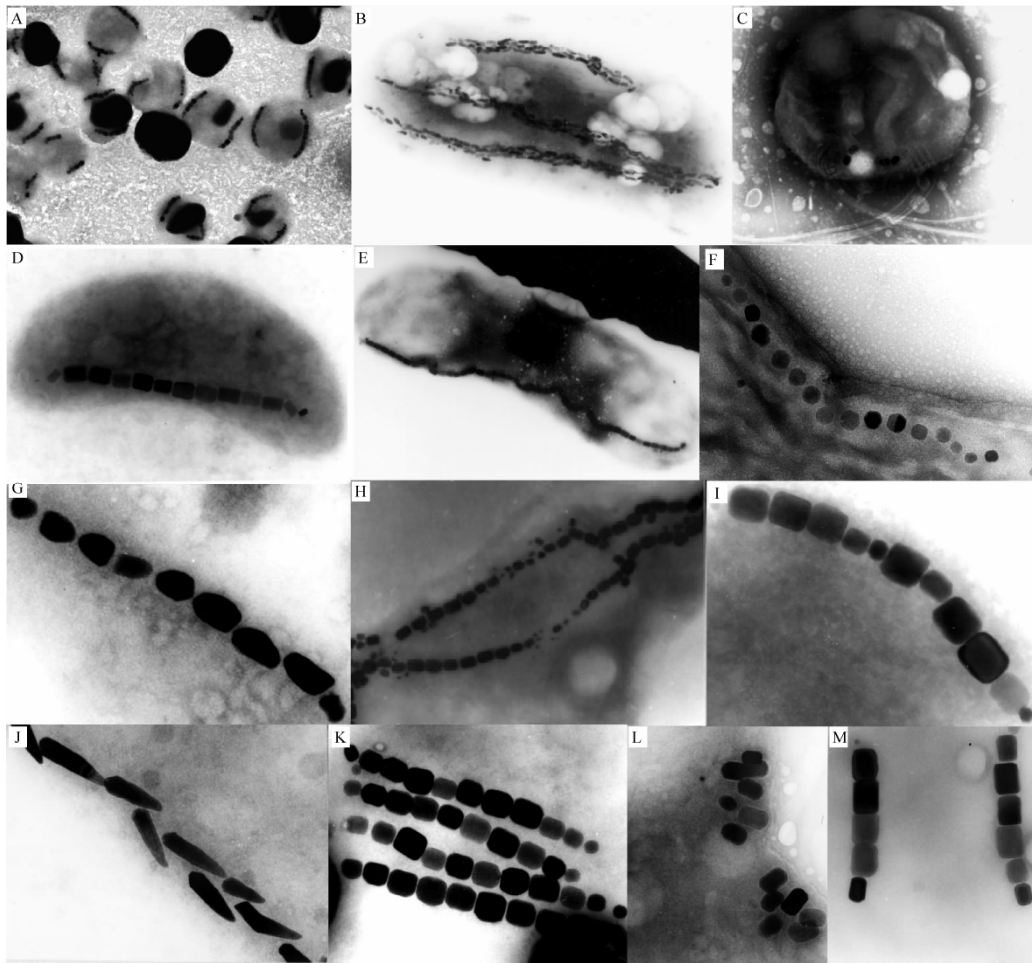
#### **4 Structure and magnetic characteristics of magnetosome crystals**

All magnetotactic bacteria synthesize inorganic ferrimagnetic crystals of either magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) or the iron sulfide greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (29, 34). In addition, the iron sulfides mackinawite (tetragonal FeS) and cubic FeS have been found in iron sulfide-type magnetosomes as putative precursors for greigite (66, 67). The chemical signature of magnetosome crystals within a species is genetically determined since bacteria continue to synthesize magnetite under conditions that favour greigite mineralization. Only one organism has been reported to simultaneously produce iron oxide and iron sulphide magnetosomes (11). In this uncultured bacterium magnetosome chains are assembled from magnetite and greigite particles with each mineral occurring in its mineral-specific crystal morphology as found in single mineral containing organisms. The formation of both mineral types within in same cell is remarkable since the physico-chemical conditions favouring formation of either mineral are vastly different with respect to the redox potential. While iron-sulfide producing bacteria seem generally confined to anaerobic,  $\text{H}_2\text{S}$ -containing habitats, magnetite producers mainly populate the oxic-anoxic transition zone with traces of oxygen (9, 32).

Crystal size distribution (CSD), morphology and chemical purity of magnetosome crystals are subject to a species-specific genetic control (22, 66). Unlike synthetically produced magnetite grains, which usually show log-normal CSDs, magnetosome particles are characterized by a negatively skewed CSD having a sharp limit towards larger crystal sizes (22).

Mature magnetite and greigite crystals produced by MTB typically fall within the stable single magnetic domain range between 30 nm – 120 nm (10, 57), and thus are of the optimum size for magnetotaxis. While crystals of this size range are permanently magnetic, smaller sizes would not efficiently contribute to the cellular magnetic moment, as those

crystals are superparamagnetic at ambient temperatures, which means they do not show a persistent magnetization. Contrary, in crystals larger than 120 nm domain walls can build up, thereby forming multiple magnetic domains of opposite magnetic orientation, which reduces the total magnetic remanence of the crystal. Nevertheless, unusually large magnetosomes of up to 200 nm in length were reported from an uncultivated magnetic diplococcus (49). While sizes and also habits of magnetic crystals are species-specific and uniform within a single cell, there is a considerable diversity of magnetosome morphologies found in different MTB (10, 64) (Fig. 1). High-resolution transmission electron microscopy and selected-area electron diffraction analysis of crystal habits synthesized by bacteria revealed that magnetite crystal morphology is based on combinations of the isometric crystallographic forms  $\{1\ 1\ 1\}$ ,  $\{1\ 1\ 0\}$  and (22). Reported non-isometric morphologies such as prismatic and bullet-, or hook shaped crystals might result from anisotropic growth due to chemical gradients or specific inhibition of growth sites by organic molecules. Morphologies of greigite crystals include mainly  $\{1\ 1\ 1\}$  and less frequently  $\{1\ 0\ 0\}$  forms and crystals were often found elongated along  $[1\ 0\ 0]$  axes (10, 66).



**Figure 1:** Diversity of magnetotactic bacteria and magnetosomes. (A–E) Transmission electron micrographs of a variety of morphological forms found in MTB, including (A, C) coccoid cell forms, (B, E) large rod-shaped bacteria with one or several magnetosome chains, (D) a magnetic vibrio and (F) spirilla. (G–M) Electron micrographs of crystal morphologies and organization of magnetosomes found in various MTB. With the exception of (F), all examples are from uncultivated MTB, which were magnetically collected from environmental samples.

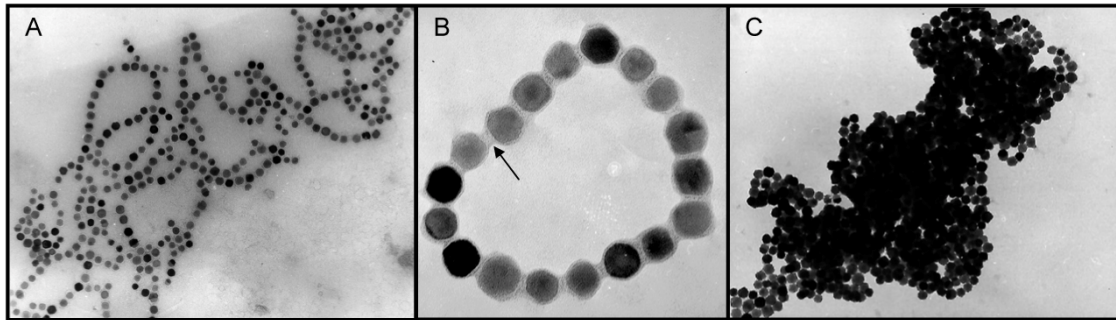
## 5 The magnetosome membrane

Magnetic crystals synthesized in *Magnetospirillum* species are enveloped by a lipid bilayer described as "magnetosome membrane" (MM) (35). There is growing evidence that the presence of a MM seems to be common to many, if not all magnetite-forming MTB, although it has been suspected that formation of magnetosomes in "*M. bavaricum*" and in some other magnetotactic bacteria is associated with a proteinaceous templating structure

rather than a membrane-bounded vesicles (40, 86). However, compartmentalization of the mineral synthesis by the MM provides strict control over the process of mineral formation by the precise regulation of the chemo-physical conditions within the vesicle. Magnetosome biomineralization is preceded by the formation of the magnetosome vesicles, which have been found to exist prior magnetite formation and which already tend to assemble into imperfect chains in iron-deprived cells (35, 47, 70). Empty vesicles are approximately 40 nm in diameter, which is roughly equivalent to the size of mature magnetite crystals (35).

### **5.1 Structure and composition of the magnetosome membrane**

Intact MM-enclosed magnetite crystals, which can be readily isolated and purified from disrupted cells by means of magnetic separation and ultracentrifugation, tend to form chains *in vitro* (Fig. 2A). Isolated magnetosomes can also spontaneously reorganize in the form of flux-closed rings (65), which besides magnetic interactions is apparently facilitated by direct contact mediated by the MM (Fig. 2B). The membrane can be solubilized by hot SDS treatment or organic solvents, which results in the immediate agglomeration from suspensions of the particles (Fig. 2C). Biochemical analysis of isolated magnetosomes from *M. gryphiswaldense* revealed that phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol were the most abundant lipids found in the MM and other cell membranes, while amide-linked fatty acids, which are common in the outer membranes of gram-negative bacteria, were not detected in the MM (3, 36). This similarity in lipid composition between the MM and the cytoplasmic membrane (CM) and the observed localization adherent to the CM seems to point towards a common cellular origin. Recently, Komeilli and co-workers presented electron-microscopic evidence that magnetosomes vesicles in fact derive from invaginations of the inner membrane (46), which suggest that MM and CM at least transiently form a continuum with each other (8, 35).



**Figure 2:** (A) Isolated magnetosome particles with intact MM spontaneously tend to form chains. (B) Membrane-enclosed particles frequently reorganize in form of flux-closed rings, which seem to be stabilized and interconnected by organic material of the MM that form junctions between crystals (arrow). (C) Removal of the MM by SDS treatment results in the instant agglomeration of membrane-free magnetite crystals.

## 5.2 Magnetosome membrane proteins

Most of the knowledge about the protein composition of the MM comes from the analysis of the *M. gryphiswaldense* magnetosome subproteom. The application of various proteomic techniques revealed a complex and highly specific subset of proteins present at various quantities. There is growing evidence that homologous MM constituents are present in other related MTB, although the protein patterns of total MM preparations from different MTB appear to be dissimilar (36, 37, 53, 60). Analysis of extracted MM from *M. gryphiswaldense* lead to the identification of 18 specific magnetosome membrane proteins (MMPs) (36, 37, 88) (Table 1). Several of the identified polypeptides in MM preparations represent oligomers or posttranslational modifications of the same protein, as for instance proteolytic processing, or covalently bound c-type heme as revealed by peroxidase staining. Glycosylation, which is a modification commonly found in proteins associated with other biomineralizing systems, was not detected in any MMP so far (36).

Beside a set of major and apparently specific MMPs, a number of minor constituents were occasionally found bound to isolated magnetosomes (36, 53). Because they were mostly identified in small amounts and represent highly abundant cellular proteins, they most likely represent contaminations from other subcellular compartments. For example, Mms16 which was detected in MM preparations from different *Magnetospirillum* strains, was originally suggested to be involved in the formation of



magnetosome membrane vesicles in *Magnetospirillum* strain AMB-1 (59). However, recent experimental evidence in *M. gryphiswaldense* demonstrates that Mms16 is not associated with magnetosomes *in vivo*. Moreover, its function seems entirely unrelated to magnetosome formation, and instead, it is associated with formation of PHB granules. Thus, it most likely represents a contamination, which becomes attached to magnetosomes during cell disruption (39, 77).

For *M. gryphiswaldense* several major MMPs has been assigned to a number of known protein families based on sequence similarity, which will be described in the following. The highly abundant MamA, which was also identified in other *Magnetospirillum* species, contains 4-5 copies of the tetratricopeptide repeat (TPR) motif (37, 47, 60). TPR motifs, which have been identified in a growing number of heterogeneous proteins with diverse functions, might contribute to protein-protein interactions (16). It therefore has been speculated that MamA may have an essential role on magnetosome formation by functioning as a MM receptor that interacts with cytoplasmic proteins or is involved in the assembly of multiprotein complexes within the MM (60, 61). However, MamA-deficient mutants of *Magnetospirillum* sp. AMB-1 were not affected in the formation of magnetosome vesicles, but produced magnetite crystals identical in shape and alignment to those in the wild-type, albeit at reduced numbers. These results indicate that MamA is not essential for magnetosome biomineralization, but has a so-far uncharacterized function, which might be in the "activation" of magnetosome vesicles as suggested by Komeili and co-workers (47).

A second conserved group of proteins present in the MM of various MTB are members of the cation diffusion facilitators (CDF) family (63). CDF proteins function as efflux pumps of toxic divalent cations, such as zinc, cadmium, cobalt, and other heavy-metal ions. The MMPs MamB and MamM display high sequence similarity to the CDF3 subfamily, which was postulated to comprise putative iron-transporting members of the family (58). Consequently, magnetosome-directed transport of iron was attributed to MamB and MamM and preliminary data from mutant analysis seem to support this assumption (37), K. Junge unpublished data).

Protein	Length (aa)	Deduced Mr (kDa)/pI	Closest homologue in non-magnetic organisms	Characteristics	Determined or putative function
MamA	217	24.01/5.64	MM2348/ <i>M. mazei</i>	TPR-motifs rel. abundance > 10%	“Activation” of magnetosomes (Komeili et al. 2004)
MamB	297	31.96/5.25	YdfM <i>B. subtilis</i>	CDF transporter	Iron transport
MamC	125	12.40/4.88	—	rel. abundance > 16%	Unknown
MamD	314	30.20/9.68	—	Leu/Gly-rich motif	Unknown
MamE	772	78.00/8.69	MLL5022 <i>R. loti</i>	PDZ domains protease domain	Serine protease
MamF	111	12.30/9.57	—	rel. abundance > 15%	Unknown
MamG	84	7.70/9.28	—	Leu/Gly-rich motif	Unknown
MamJ	466	48.51/3.80	—	Asp/Glu-rich repeats	Magnetosome chain formation (Scheffel et al. 2005)
MamM	318	34.50/5.82	BH 1238 <i>B. halodurans</i>	CDF transporter	Inorganic ion transport
MamN	437	46.14/6.70	TM0934 <i>T. maritima</i>	Membrane protein	Unknown
MamO	632	65.40/6.51	CC1282 <i>C. crescentus</i>	PDZ domains protease domain	Serine protease
MamQ	272	30.00/8.48	LemA <i>T. maritima</i>	Membrane protein	Unknown
MamR	72	8.10/8.48	—	Hydrophilic protein	Unknown
MamS	180	18.71/7.02	—	Membrane protein	Unknown
MamT	174	18.88/10.05	—	Heme binding	Unknown
MamW	138	15.01/12.8	—	Membrane protein	Unknown
Mms6	136	14.26/9.79	ApdA <i>R. rubrum</i>	Leu/Gly-rich motif	Iron binding (Arakaki et al. 2003)
MM22	196	20.00/7.14	<i>E. faecalis</i> V583	Membrane protein	Unknown

**Table 1:** Characteristics of identified MMPs from *M. gryphiswaldense* (Compiled from (36, 37, 88)).

The proteins MamE and MamO display sequence similarity to HtrA-like serine proteases. While MamE was found in the MM of *M. gryphiswaldense* and *M. magneticum*. AMB-1, a MamO homolog has not yet been identified in AMB-1 (53). Instead, the HtrA-like Mms67 protein was identified in the magnetosome membrane of AMB-1 (53, 55), indicating that multiple paralogs of this protein family seem to be present in the MM. Colocated with *mamE* and *mamO* on the same operon is the *mamP* gene in *M. gryphiswaldense* which encodes a further protein of this class. Members of the HtrA family contain PDZ domains combined with a conserved trypsin-like protease domain and are reported to act as molecular chaperones and heat-shock induced proteases, which degrade misfolded proteins in the periplasm, or have other regulatory functions (19). In magnetosome formation MamE and MamO were speculated to act in the processing, maturation and targeting of MMPs during MM assembly (36), but experimental evidence is missing so far.

Several MMPs seem to be universally present in other MTB, but lack any sequence homology with proteins of known function in non-magnetic organisms, which prevents any predictions of their putative functions. Among those MMPs, MamC and MamF are the most abundant MM-associated proteins in *M. gryphiswaldense*. A sequence feature common to MamD, Mms6 and MamG is a conspicuous hydrophobic sequence motif that is

rich in stretches of repeated leucine and glycine residues. Similar LG-rich repetitive motifs were found in framework proteins known to self aggregate forming therefore supermolecular structures sometimes associated with biomineralization (73). Experimental data shows that the Mms6 protein of *Magnetospirillum* strain AMB-1 exhibit iron-binding activity and affects the morphology of growing magnetite crystals in an *in vitro* magnetite crystallization assay (2). This suggests that Mms6 might be involved in the control of crystallization also *in vivo*. The C-terminal region of Mms6 is rich in acidic amino acid residues with carboxyl and hydroxyl groups (aspartate, glutamate tyrosine, serine), which are known to have a strong affinity to metal ions, and thus the observed activity of Mms6 was speculated to be determined by its acidic C-terminus. As clusters of polyelectrolytic groups are commonly found in numerous biomineralization proteins, this sequence feature is assumed to be involved in protein-mineral interactions (3). Another MMP which contains several domains of highly biased amino acid composition is MamJ. Its central domain contains two identical, highly acidic Glu-rich stretches, in which acidic amino acid residues account for 32.4 % of the sequence (70). Thus, MamJ was initially assumed to be involved in magnetite crystallization (73). However, recent data obtained from a *mamJ* deletion mutant of *M. gryphiswaldense* have revealed that MamJ rather is involved in the formation of magnetosome chains as will be discussed below (70).

## **6 Genetics and Molecular organization of magnetosome genes**

To identify genes controlling magnetosome formation different techniques have been applied, which include reverse genetics, analysis of spontaneous non-magnetic mutants and transposon mutagenesis studies.

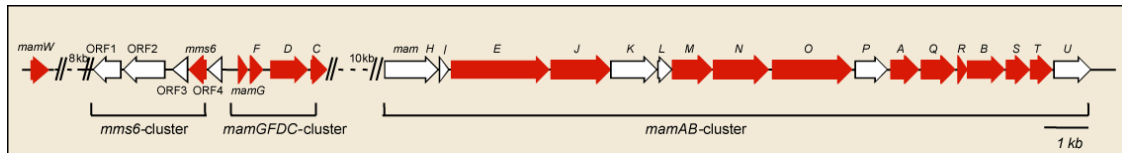
### **6.1 The magnetosome genes are clustered within a genomic magnetosome island**

Magnetosome genes were identified by reverse genetics in several strains of *Magnetospirillum*. In *M. gryphiswaldense* all identified MMPs are encoded within a hypervariable 130 kb genomic region (71, 88), which display the following characteristics

(i) it harbors all identified magnetosome (*mam/mms*) genes), (ii) it contains 42 transposase genes, (iii) most other ORFs are hypothetical genes. The 130 kb region contains numerous direct and inverted repeats, which mostly correspond to similar copies of transposase genes. Its G+C content is slightly distinct from that of the rest of the genome and displays a more heterogeneous distribution. Three tRNA genes are present within this region, which is also bounded by an integrase gene fragment. In summary, all these features are strongly reminiscent of those described for genome islands in other bacteria (23). Genome islands usually comprise large genomic regions, which, for instance, are present as pathogenicity islands (PAIs) in the genomes of pathogenic strains, but absent from the genomes of their nonpathogenic counterparts. They often encode “accessory” gene functions, tend to be genetically unstable and can transfer horizontally. Thus, it seems that the 130-kb region encoding magnetosomes genes represents a large genomic "magnetosome island", which may have been distributed by lateral gene transfer. It is currently not known if the presence of a MAI is common to all MTB. However, there is evidence that the genomic organization of magnetosome genes is conserved in *Magnetospirillum* species and to a lesser degree in the magnetic coccus MC-1 (37, 47, 53, 71).

Within the MAI the majority of identified MMPs is encoded within the *mam* (*magnetosome membrane*) and *mms* (*magnetic particle membrane-specific*) gene clusters, along with several genes of unknown function, which are located within less than 35 kb of the MAI (37, 71). In *M. gryphiswaldense*, the *mamAB* cluster encompasses 17 collinear open reading frames extending 16.4 kb of DNA (Fig. 3). The 2.1 kb *mamGFDC* cluster is located 15 kb upstream of the *mamAB* cluster and comprises 4 ORFs. The 3.6 kb *mms* cluster is located 368 bp upstream of the *mamGFDC* cluster and contains 5 ORFs. The collinear organization and close spacing of genes within the three clusters suggested that they each might be transcribed as polycistronic operons from a single promoter. Cotranscription of genes within the *mamAB*, *mamDC* and *mms* clusters was recently demonstrated indicating the presence of long polycistronic transcripts extending over more than 16 kb (72). The transcription start points of the *mamAB*, *mamDC*, and *mms* operons were mapped closely upstream of the first genes of the operons, respectively. The presence of transcripts was found to be independent from growth phase, however, the

expression of the *mam* and *mms* genes was up-regulated under magnetite-forming conditions, i.e. during microaerobiosis and in the presence of iron (72).



**Figure 3:** Molecular organization of a region from the genomic magnetosome island of *M. gryphiswaldense*. Genes encoding MMP (red arrows) are clustered within 35 kb and beside the monocistronic *mamW* comprise the *mamGFDC*, *mamAB*, and *mms6* operons.

## 6.2 The magnetosome island is a highly unstable genomic region and undergoes spontaneous rearrangements

Substantial sequence polymorphism between clones from different subcultures of *M. gryphiswaldense* was reported for the MAI (88), suggesting that this region undergoes frequent rearrangements during serial subcultivation in the laboratory. Spontaneous mutants affected in magnetosome formation arise at a frequency of up to  $10^{-2}$  after prolonged storage of cells at 4°C or exposure to oxidative stress (88). All non-magnetic mutants exhibited extended and multiple deletions within the MAI and had lost either parts or the entire *mms*- and *mam*-gene clusters encoding magnetosome proteins. Mutations are polymorphic with respect to the sites and extents of deletions, but were all found associated with the loss of various copies of IS elements. These observations indicate that the genomic MAI undergoes frequent transposition events, which lead to subsequent deletions by homologous recombination under conditions of physiological stress (71, 88). This could be interpreted in terms of adaptation to physiological stress and might contribute to the genetic plasticity and mobilization of the MAI.

The spontaneous loss of the ability to synthesize magnetosomes seems to be a characteristic trait common to diverse MTB and has been reported for different species (15, 24, 53, 71, 88). For instance, spontaneous non-magnetic mutants were regularly observed in marine magnetotactic vibrio MV-1. All mutants failed to express a major copper-containing periplasmic protein (ChpA) presumably involved in iron uptake (24). Although mutants

were genetically heterogeneous, they all exhibited two point mutations (transversions) at identical wobble positions within *chpA*, which apparently did prevent the translation of its transcript by an unknown mechanism. This finding suggests that there is no universal reason causing the observed genetic instability of the magnetic phenotype, but that different mechanisms are responsible for the appearance of spontaneous non-magnetic mutants in different MTB.

### 6.3 Mutational analysis of magnetosome formation

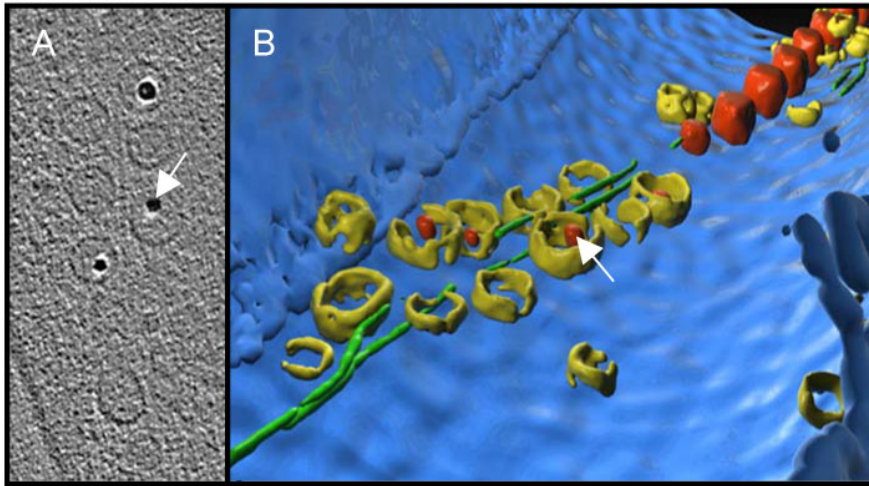
Other attempts to identify genes controlling magnetosome formation have involved conventional mutagenesis approaches. However, genetic analysis by mutagenesis is complicated by the aforementioned genetic instability of the magnetic phenotype, which requires careful controls, e. g. by complementation analysis, to confidently correlate the observed phenotype to the introduced mutation. In several studies involving transposon mutagenesis, genetic screens for magnetosome genes were performed (18, 52, 53, 90, 91). For example, of 5762 Tn mutants, 69 were found to be defective for magnetosomes, as recently reported by Matsunaga and co-workers. Disrupted genes were found distributed over the genome and could be categorized to functional groups including signal transduction, energy metabolism, cell envelope biogenesis, cell motility, and unknown functions (53). However, the roles of these genes await further clarification since none of the mutants could have been complemented so far. Curiously, neither of the previously identified *mam* and *mms* genes, which are essential for magnetosome synthesis, nor other genes located within these operons were among the affected genes in the studies mentioned above. In contrast, all transposon mutants obtained in an independent study on the same organism resulted from insertions in the *mamAB* cluster (47), which further corroborates the functional link of this region to magnetosome biomineralization. Since methods for targeted mutagenesis by allelic replacement have become available for two *Magnetospirillum* species (47, 78, 79), gene disruption studies for several genes within the *mamAB* cluster revealed their specific functions in activation and assembly of magnetosomes (47, 70).

## 7 Subcellular organization and assembly of magnetosomes chains

In most MTB magnetosome crystals are arranged in one or several chains parallel to the axis of motility in order to sum up their individual magnetic moments. By aligning several crystals into a linear chain with the easy axis of magnetization running parallel to the chain, the resulting magnetic torque is sufficiently large to align the cell body in the geomagnetic field as (25, 26, 44, 68). Magnetostatic calculations on magnetosome chains suggest that this arrangement would collapse without some form of rigid support (44). Chain stability was proposed to result from a cellular structure that physically connects the chain to the cell envelope, and which also transfers the magnetic torque to the cell body (35, 40).

Recently, details of subcellular organization supporting this notion were revealed by the application of cryo-electron tomography (cryo-ET), which is a novel electron-microscopic imaging technique that provides three-dimensional information about pleomorphic structures (5). Electron tomograms of vitrified *M. gryphiswaldense* cells clearly show a network of filamentous structures traversing the cell closely adjacent to the cytoplasmic membrane (Fig. 4). Most magnetosomes were found arranged intimately along this filamentous structure, which is suggested to be part of the cytoskeleton (70). Empty magnetosome vesicles and those with immature magnetite crystals were predominantly located at the ends of chains (70), whereas chains of magnetosomes are arranged adjacent to the cytoplasmic membrane, apparently following the cell curvature in a helical manner (35, 70). Such a close connection of the magnetosome chain with a cytoskeletal "magnetosome filament" meets both the requirements of chain stabilization and transfer of the magnetic torque to the cell body. It was speculated that the magnetosome filament might be formed by the *mamK* gene product because of its striking sequence similarity to actin-like MreB proteins (27, 73). The tight association of the magnetosome vesicles with the magnetosome filament apparently depends on the presence of the MMP MamJ (70). Mutant cells of *M. gryphiswaldense* lacking MamJ display a substantially reduced magnetic orientation, although they contain magnetosome crystals identical in number, size, and morphology to those in the wild-type. However, in the MamJ-deficient strain magnetosome crystals are no longer aligned in a straight chain as in the wild-type, but instead arrange in compact three-dimensional clusters (Fig. 5A,B). Empty magnetosome vesicles were found mostly scattered throughout the cytoplasm, were widely spaced from each other, and

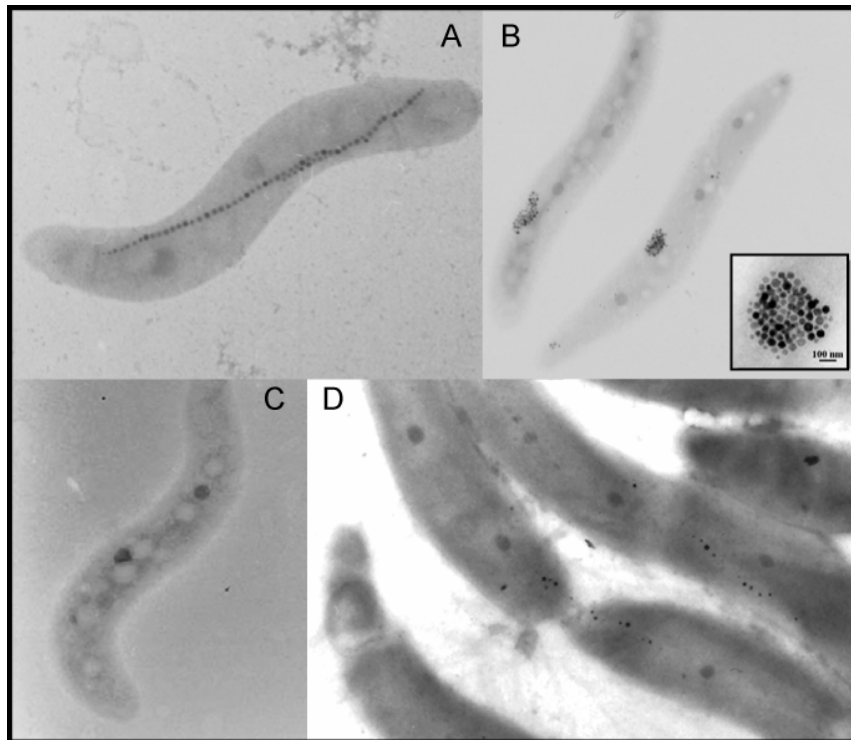
dissociated from the magnetosome filament as revealed by cryo-ET. This indicates that magnetosomes are attached to the magnetosome filament by MamJ in wild-type cells, whereas in cells lacking MamJ mature magnetosome crystals are free to agglomerate once they are in close proximity, thereby lowering the magnetostatic energy of their alignment (70).



**Figure 4:** Tomographic reconstruction of a *M. gryphiswaldense* cell. (A) A section in z-direction from the reconstructed volume showing empty MM vesicles, and those which are partially filled with growing, immature magnetite crystals, are closely attached to the magnetosome filament, which represents a cytoskeletal structure that stabilizes magnetosome chains. (B) Three-dimensional visualization of a part of a *M. gryphiswaldense* cell with the cytoplasmic membrane (blue), empty vesicles (yellow), growing and mature magnetite crystals (red), and the magnetosome filament (green) (micrographs and visualization by M. Gruska and J. M. Plitzko, MPI Martinsried).

Beside linear chain structures, magnetosome arrangements like clumps or individual scattered crystals have also been reported in MTB from natural environments. For instance, in cells of a many-celled magnetotactic prokaryote magnetosomes arrange in short chains or clusters (30). Similarly, in uncultivated MTB of the “*Bilophococcus*”-type (56) magnetosomes are clustered in arrays. Yet, despite of the deviations from the chain-like organization, magnetosomes still generate a total magnetic moment sufficient to facilitate magnetotaxis (66).



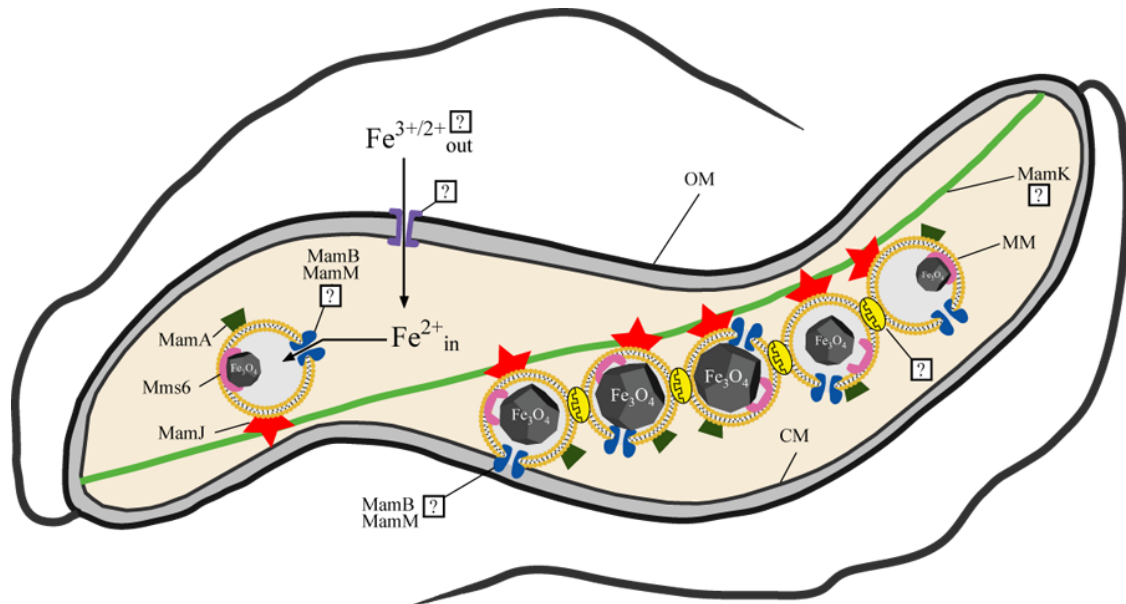


**Figure 5:** (A) Wild-type and (B-D) various mutant cells of *M. gryphiswaldense*, which are affected in magnetosome organization and crystal formation. (B)  $\Delta mamJ$  deletion mutant. Cells lacking the MamJ protein do not longer magnetosome chains, but instead form clusters of magnetosomes (C) Spontaneous non-magnetic mutant, which is devoid of any magnetite crystals, (D) Spontaneous mutant MSR-1K which forms smaller and irregular crystals (88).

## 8 Pathway of magnetite biomineralization and magnetosome formation

As magnetosome biomineralization is preceded by magnetosome vesicle formation, mineral synthesis may proceed simultaneously in multiple vesicles (70). Magnetite formation depends on the presence of iron and the prevalence of micro-oxic conditions (12, 74). When cells were grown under oxygen-controlled conditions in a fermenter, magnetite biomineralization occurred only at low dissolved oxygen concentrations below 20 mbar, while higher concentrations were inhibitory to mineral formation (42). The amount of magnetite formed did correlate with the dissolved oxygen concentration with most magnetite formed by cells at a partial pressure as low as 0.25 mbar (42). The formation of magnetite is coupled to the uptake of vast amounts of iron from the environment which can accumulate to an amount between 3 % to 10 % of dry weight (3). Details of biogenic

magnetite formation are still not fully understood, but a hypothetical model can be postulated based on available physiological, molecular genetic and ultrastructural data (Fig. 6).



**Figure 6:** Hypothetical model for the pathway of magnetite biomineralization and magnetosome chain formation, which is based on identified and putative functions of individual cellular constituents. Ferric or ferrous iron is transported into the cell by an energy-dependent process via an unknown uptake system (purple). Supersaturating amounts of ferrous iron are then transported by the MamB/MamM-proteins (blue) from the cytoplasm into the magnetosome vesicles, which are activated for magnetite formation by the MamA (dark green) protein. Alternatively, iron transport may proceed via MamB/MamM directly from the periplasmic space into the MM vesicles. Intravesicular iron is then thought to be reoxidized and bound to the Mms6 protein (pink), which promotes nucleation and crystal growth. MM vesicles, which are attached to the magnetosome filament (green) through the MamJ protein (red), align themselves at midcell along this cytoskeletal structure. Mature particles are interconnected by an unidentified constituent of the magnetosome membrane (yellow).

The high-affinity uptake system of *M. gryphiswaldense* was found to be saturated at extracellular ferric iron concentrations of 15-20  $\mu\text{M}$  Fe without any evidence for involvement of siderophores (75). In contrast, *Magnetospirillum* strain AMB-1 has been reported to excrete both hydroxamate- and catechol-type siderophores for the assimilation of large amounts of ferric iron (17, 62). Siderophore-mediated iron uptake of ferric iron was also suggested for the magnetic strain MV-1 (8). However, in the natural habitat of MTB at

or closely below the OATZ, a considerable amount of soluble ferrous is likely to be present. Thus, a periplasmic multicopper-containing Fe(II) oxidase identified in strain MV-1 was alternatively speculated to support the uptake of ferrous iron (24). In *M. magnetotacticum* an Fe(II)-nitrate oxidoreductase was reported to be involved in the subsequent oxidation of ferrous iron for the formation of the mixed-valence iron oxide magnetite ( $\text{Fe}^{+3}(\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3})\text{O}_4$ ) (93). Cytoplasmic iron is then transported to the magnetosome vesicle, where a part is then thought to form a highly reactive Fe(III) oxide, probably ferrihydrite, which may react with dissolved  $\text{Fe}^{2+}$  to form magnetite by a via-solution process (20). Alternatively, coprecipitation of ferrous and ferric iron at alkaline pH was suggested as a potential mechanism for magnetite particle formation based on results of *in vitro* crystallization experiments (28).

## 9 Biotechnological applications of magnetosomes

Biogenic magnetic particles produced by MTB have inspired numerous ideas for application due to their unique morphological, magnetic, and chemical characteristics (48, 54, 76). Typical sizes of the monocrystalline particles are in a range, which is not easily accessible by chemical synthesis. Moreover, the highly controlled pathway of biosynthesis provides a morphological diversity and, in some bacteria, shape anisotropy, which are not commonly known from inorganically produced magnetite crystals. In addition, size and morphology of magnetosome crystals are under genetic control, which could be used for the genetic engineering of magnetic nano-crystals with "tailored" characteristics. One of the most interesting features of bacterial magnetosomes is the presence of a biological membrane with defined biochemical composition. The encapsulation of the magnetic crystal within the MM provides a natural "coating", which ensures superior dispersibility of the particles and provides an excellent target for modification and functionalization of the particles. Taking together, the characteristics of biogenic magnetic particles offer additional advantages to many applications compared to the use of conventional abiogenic nano-magnets. So far, magnetosome particles have been successfully applied as diagnostic and therapeutic tools in magnetic resonance imaging and hyperthermia treatments (41, 69). In other experiments, peptides, enzymes, polymers or oligonucleotides were immobilized to

the magnetosome surface (reviewed by Lang et al. 2005). For instance, antibody-magnetosome conjugates have been used as biosensors to detect environmental pollutants, hormones and toxic substances while others were employed for the specific magnetic separation of cell targets (84, 85). Dendrimer-modified magnetosome particles have been used in automated DNA extraction procedures and mRNA isolation was facilitated by oligo(dT) modified magnetosomes (94),(81, 94). In summary, although in several case technological uses of bacterial magnetosomes have been demonstrated, they still have a largely untapped potential for future nanobiotechnological applications.

## 10 Conclusions

Since their discovery more than thirty years ago, magnetosomes have emerged as one of the most intriguing and complex intracellular structures found in bacteria, which have been suggested as model to study organelle formation in prokaryotes (47). Although our knowledge about magnetosome structure, function, and synthesis has increased tremendously over the last years, many open questions remain to be answered. Since the unexpected genetic complexity of magnetosome formation has been recognized, it now has become a major challenge to reveal the individual functions of the numerous genes and proteins which are suspected to be involved in the synthesis of magnetosome chains. Another intriguing problem is the question for the phylogenetic origin of the trait of magnetosome formation in diverse MTB, especially in the light of putative horizontal transfer of the "magnetosome island", which might have contributed to shape the genomes of various magnetic bacteria. As "magnetosome" particles similar to those of MTB have been found in higher organisms, the biological mechanism of magnetosome formation might also have relevance for the understanding of magnetoreceptive organelles in eukaryotic organisms (45), and even their use as markers for the biological origin of magnetite nanocrystals (87).

## 11 Acknowledgements

We would like to acknowledge our students, colleagues, and numerous collaborators. Research in the authors lab is supported by the Max Planck Society, the Deutsche Forschungsgemeinschaft, and the German BMBF.

## 12 References

1. **Amann, R., R. Rossello-Mora, C. Flies, and D. Schüler.** 2004. Phylogeny and in situ identification of magnetotactic bacteria. *In* E. Baeuerlein (ed.), *Biom mineralization*, 2th ed. Wiley-VCH, Weinheim.
2. **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**:8745-8750.
3. **Baeuerlein, E.** 2003. Biom mineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**:614-641.
4. **Balkwill, D., D. Maratea, and R. P. Blakemore.** 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**:1399-1408.
5. **Baumeister, W., R. Grimm, and J. Walz.** 1999. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol.* **9**:81-85.
6. **Bazylinski, D.** 1998. Ultrastructure and function of the bacterial magnetosome. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology* **981998**:15.
7. **Bazylinski, D. A., A. J. Dean, T. J. Williams, L. K. Long, S. L. Middleton, and B. L. Dubbels.** 2004. Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. *Arch. Microbiol.* **182**:373-387.
8. **Bazylinski, D. A., and R. B. Frankel.** 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev.* **2**:217-230.

9. **Bazylinski, D. A., R. B. Frankel, B. R. Heywood, S. Mann, J. W. King, P. L. Donaghay, and A. K. Hanson.** 1995. Controlled Biomineralization of Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and Greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) in a Magnetotactic Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3232-3239.
10. **Bazylinski, D. A., A. Garratt-Reed, and R. B. Frankel.** 1994. Electron-microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Res. Tech.* **27**:389-401.
11. **Bazylinski, D. A., B. R. Heywood, S. Mann, and R. B. Frankel.** 1993.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  in a bacterium. *Nature* **366**:218.
12. **Blakemore, R.** 1982. Magnetotactic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**:217-238.
13. **Blakemore, R. P.** 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* **190**:377-379.
14. **Blakemore, R. P., and N. Blakemore.** 1991. Magnetotactic magnetogens, p. 51-68, *Iron Biominerals*. Plenum Press, New York.
15. **Blakemore, R. P., D. Maratea, and R. S. Wolfe.** 1979. Isolation and pure culture of freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **140**:720-729.
16. **Blatch, G. L., and M. Lasse.** 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**:932-9.
17. **Calugay, R. J., H. Miyashita, Y. Okamura, and Matsunaga T.** 2003. Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**:371-375.
18. **Calugay, R. J., Y. Okamura, A. T. Wahyudi, H. Takeyama, and M. T.** 2004. Siderophore production of a periplasmic transport binding protein kinase gene defective mutant of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **323**:852-857.
19. **Clausen, T., C. Southan, and M. Ehrmann.** 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* **10**:443-55.
20. **Cornell, R. M., and U. Schwertmann.** 2003. The iron oxides (Structure, properties, reactions, occurrences and uses). Wiley-VCH, Weinheim.
21. **DeLong, E. F., R. B. Frankel, and D. A. Bazylinski.** 1993. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* **259**:803-806.

22. **Devouard, B., M. Posfai, X. Hua, D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, and P. B. Buseck.** 1998. Magnetite from magnetotactic bacteria : Size distributions and twinning. *Am. Min.* **83**:1387-1398.
23. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**:414-424.
24. **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**.
25. **Dunin-Borkowski, R. E., M. R. McCartney, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. Posfai, and P. R. Buseck.** 1998. Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* **282**:1868-1870.
26. **Dunin-Borkowski, R. E., M. R. McCartney, M. Posfai, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, and P. R. Buseck.** 2001. Off-axis electron holography of magnetotactic bacteria: magnetic microstructure of strains MV-1 and MS-1. *Eur. J. Min.* **13**:671-684.
27. **Errington, J.** 2003. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell. Biol.* **5**:175- 178.
28. **Faivre, D., P. Agrinier, N. Menguy, P. Zuddas, K. Pachana, A. Gloter, J.-Y. Laval, and F. Guyot.** 2004. Mineralogical and isotopic properties of inorganic nanocrystalline magnetites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**:4395-4403.
29. **Farina, M., D. M. S. Esquivel, and H. Lins de Barros.** 1990. Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* **343**:256-258.
30. **Farina, M., H. Lins de Barros, D. M. S. Esquivel, and J. Danon.** 1983. Ultrastructure of a magnetotactic microorganism. *Biol. Cell.* **48**:85 - 88.
31. **Flies, C., J. Peplies, and D. Schüler.** 2005. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2723-2731.
32. **Flies, C. B., 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.

33. **Frankel, R. B., D. A. Bazylinski, M. S. Johnson, and B. L. Taylor.** 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* **73**:994-1000.
34. **Frankel, R. B., G. C. Papaefthymiou, R. P. Blakemore, and W. O'Brian.** 1983. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **763**:147-159.
35. **Gorby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. Blakemore.** 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**:834-841.
36. **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**:1040-1050.
37. **Grünberg, K., C. Wawer, Tebo B. M., and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4573-4582.
38. **Guerin, W. F., and R. P. Blakemore.** 1992. Redox Cycling of Iron Supports Growth and Magnetite Synthesis by *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1102-1109.
39. **Handrick, R., S. Reinhardt, D. Schultheiss, T. Reichart, D. Schüler, V. Jendrossek, and D. Jendrossek.** 2004. Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *J. Bacteriol.* **186**:2466-75.
40. **Hanzlik, M., M. Winklhofer, and N. Petersen.** 2002. Pulsed-field-remnance measurements on individual magnetotactic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* **248**:258-267.
41. **Hergt, R., R. Hiergeist, M. Zeisberger, D. Schüler, U. Heyen, I. Hilger, and W. A. Kaiser.** 2005. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**:80-86.
42. **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.



43. **Kawaguchi, R., J. G. Burgess, T. Sakaguchi, H. Takeyama, R. H. Thornhill, and T. Matsunaga.** 1995. Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, Rs-1, demonstrates its membership of the Delta-Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**:277-282.
44. **Kirschvink, J. L.** 1982. Paleomagnetic evidence for fossil biogenic magnetite in western Crete. *Earth Planet. Sci. Lett.* **59**:388-392.
45. **Kirschvink, J. L., M. M. Walker, and C. E. Diebel.** 2001. Magnetite-based magnetoreception. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**:462-467.
46. **Komeili, A., Z. Li, D. Newman, and G. Jensen.** 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**:242-245.
47. **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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3839-3844.
48. **Lang, C., and D. Schüler.** 2006. Biomineralization of magnetosomes in bacteria: Nanoparticles with potential applications, p. 107-124. *In* B. Rehm (ed.), *Microbial bionanotechnology: Biological self-assembly systems and biopolymer-based nanostructures*. Horizon Bioscience, Wymondham.
49. **Lins, U., and M. Farina.** 1998. Magnetosome size distribution in uncultured rod-shaped bacteria as determined by electron microscopy and electron spectroscopic imaging. *Microsc. Res. Tech.* **42**:459-464.
50. **Mann, S., N. H. C. Sparks, and R. G. Board.** 1990. Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology. *Adv. Microbiol. Physiol.* **31**:125-181.
51. **Mann, S., N. H. C. Sparks, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, and H. W. Jannash.** 1990. Biomineralization of ferrimagnetic greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) and iron pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) in a magnetotactic bacterium. *Nature* **343**:258-260.
52. **Matsunaga, T., C. Nakamura, J. G. Burgess, and K. Sode.** 1992. Gene transfer in magnetic bacteria: Transposon mutagenesis and cloning of genomic DNA fragments required for magnetosome synthesis. *J. Bacteriol.* **174**:2748-2753.

53. **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**:157-166.
54. **Matsunaga, T., Y. Okamura, and T. Tanaka.** 2004. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles. J. Mater. Chem. **14**:2099-2105.
55. **Matsunaga, T., N. Tsujimura, H. Okamura, and H. Takeyama.** 2000. Cloning and characterization of a gene, *mpsA*, encoding a protein associated with intracellular magnetic particles from *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. Biochem. Biophys. Res. Communications **268**:932-937.
56. **Moench, T.** 1988. *Bilophococcus magnetotacticus* gen. nov. sp. nov., a motile, magnetic coccus. Antonie van Leeuwenhoek **54**:483-496.
57. **Moskowitz, B. M.** 1995. Biomineralization of magnetic minerals. Rev. Geophys. **33**:123-128.
58. **Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. **27**:313-39.
59. **Okamura, Y., H. Takeyama, and T. Matsunaga.** 2001. A magnetosome specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. J. Biol. Chem. **276**:48183-8.
60. **Okuda, Y., K. Denda, and Y. Fukumori.** 1996. Cloning and sequencing of a gene encoding a new member of the Tetratricopeptide protein family from magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. Gene **171**:99-102.
61. **Okuda, Y., and Y. Fukumori.** 2001. Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing MAM22, in *Escherichia coli*. FEBS Lett. **491**:169-73.
62. **Paoletti, L. C., and R. P. Blakemore.** 1986. Hydroxamate production by *Aquaspirillum magnetotacticum*. J. Bacteriol. **167**:73-76.
63. **Paulsen, I. T., and M. H. Saier.** 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. J. Membr. Biol. **156**:99-103.

- 
64. **Petersen, N., D. G. Weiss, and H. Vali.** 1989. Magnetic bacteria in lake sediments, p. 231-241. *In* F. J. e. a. Lowes (ed.), *Geomagnetism and Paleomagnetism*. Kluwer Academic Publishers.
  65. **Philipse, A., and D. Maas.** 2002. Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: Chain formation and colloidal stability. *Langmuir* **18**:9977-9984.
  66. **Posfai, M., P. R. Buseck, D. A. Bazylinski, and R. B. Frankel.** 1998. Iron sulfides from magnetotactic bacteria: Structure, composition, and phase transitions. *Am. Mineral.* **83**:1469-1481.
  67. **Posfai, M., P. R. Buseck, D. A. Bazylinski, and R. B. Frankel.** 1998. Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science* **280**:880-883.
  68. **Proksch, R. B., T. E. Schaffer, B. M. Moskowitz, E. D. Dahlberg, D. A. Bazylinski, and R. B. Frankel.** 1995. Magnetic force microscopy of the submicron magnetic assembly in a magnetotactic bacterium. *Appl. Phys. Lett.* **66**:2582-4.
  69. **Reszka, R.** 2000. Applications for magnetosomes in medical research, p. 81-92. *In* E. Baeuerlein (ed.), *Biomineralization*. Wiley-VCH, Weinheim.
  70. **Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, P. L. Graumann, J. M. Plitzko, and D. Schüler.** 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**:110-115.
  71. **Schübbe, S., M. Kube, 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**:5779-5790.
  72. **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**:5757-5765.
  73. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**:1-7.

74. **Schüler, D., and E. Baeuerlein.** 1998. Dynamics of Iron Uptake and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Biomineralization during Aerobic and Microaerobic Growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J. Bacteriol. **180**:159-162.
75. **Schüler, D., and E. Baeuerlein.** 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **166**:301-307.
76. **Schüler, D., and R. B. Frankel.** 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**:464-473.
77. **Schultheiss, D., R. Handrick, D. Jendrossek, M. Hanzlik, and D. Schüler.** 2005. The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bounded protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J. Bacteriol. **187**:2416-2425.
78. **Schultheiss, D., M. Kube, and D. Schüler.** 2004. Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3624-3631.
79. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **179**:89-94.
80. **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**:6230-9.
81. **Sode, K., S. Kudo, T. Sakaguchi, N. Nakamura, and T. Matsunaga.** 1993. Application of bacterial magnetic particles for highly selective messenger-RNA recovery system. Biotechnol. Tech. **7**:688-694.
82. **Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, D. Schüler, K. Poralla, and N. Petersen.** 1994. Phylogenetic analysis of uncultured magnetotactic bacteria from the Alpha-subclass of Proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol. **17**:501-508.
83. **Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, H. van Gemerden, and N. Petersen.** 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. Appl. Environ. Microbiol. **50**:2397-2403.

84. **Tanaka, T., and T. Matsunaga.** 2000. Fully automated chemiluminescence immunoassay of insulin using antibody-protein A-bacterial magnetic particle complexes. *Anal. Chem.* **72**:3518-3522.
85. **Tanaka, T., H. Takeda, Y. Kokuryu, and T. Matsunaga.** 2004. Spontaneous integration of transmembrane peptides into a bacterial magnetic particle membrane and its application to display of useful proteins. *Anal. Chem.* **76**:3764-3769.
86. **Taylor, A. P., and J. C. Barry.** 2004. Magnetosomal matrix: Ultrafine structure may template biomineralization of magnetosomes. *J. Microsc.* **213**:180-197.
87. **Thomas-Keppta, K. L., S. J. Clemett, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson Jr., and C. S. Romanek.** 2002. Magnetofossils from ancient Mars: A robust biosignature in the Martian meteorite ALH84001. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3663-3672.
88. **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**:7176-7184.
89. **Vali, H., O. Forster, G. Amaratidid, and H. Petersen.** 1987. Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* **86**:389-400.
90. **Wahyudi, A. T., H. Takeyama, and T. Matsunaga.** 2001. Isolation of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 mutants defective in bacterial magnetic particle synthesis by transposon mutagenesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91-93**:147-54.
91. **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**:223-9.
92. **Williams, T. J., C. L. Zhang, J. H. Scott, and D. A. Bazylinski.** 2006. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1322-1329.
93. **Yamazaki, T., H. Oyanagi, T. Fujiwara, and Y. Fukumori.** 1995. Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum* - a novel cytochrome Cd(1) with Fe(II)-nitrite oxidoreductase activity. *Eur. J. Biochem.* **233**:665-671.

94. **Yoza, B., A. Arakaki, and T. Matsunaga.** 2003. DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *J. Biotechnol.* **101**:219-228.

# **An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria**

André Scheffél<sup>1</sup>, Manuela Gruska<sup>2</sup>, Damien Faivre<sup>1</sup>, Alexandros Linaroudis<sup>2</sup>, Peter L. Graumann<sup>3</sup>,  
Jürgen M. Pitzko<sup>2</sup> & Dirk Schüler<sup>1</sup>

Nature (2006) 440: 110-115

## **Manuskript 2**

<sup>1</sup>Department for Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany.

<sup>2</sup>Department of Structural Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany.

<sup>3</sup>Institute for Microbiology, University of Freiburg, Schänzlestrasse 1, D-79104 Freiburg, Germany.

**Magnetotactic bacteria are widespread aquatic microorganisms that use unique intracellular organelles to navigate along the earth's magnetic field. These organelles, called magnetosomes, consist of membrane-enclosed magnetite crystals that are thought to help to direct bacterial swimming towards growth-favouring microoxic zones at the bottom of natural waters (2). Questions in the study of magnetosome formation include understanding factors governing the size and redox-controlled synthesis of the nano-sized magnetosomes and their assembly into a regular chain in order to achieve the maximum possible magnetic moment, against the physical tendency of magnetosome agglomeration. A deeper understanding of these mechanisms is expected from studying the genes present in an identified chromosomal 'magnetosome island', for which the connection with magnetosome synthesis has become evident (23). Here we use gene deletion in *Magnetospirillum gryphiswaldense* to show that magnetosome alignment is coupled to the presence of the *mamJ* gene product. MamJ is an acidic protein associated with a novel filamentous structure, as revealed by fluorescence microscopy and cryo-electron tomography. We suggest a mechanism in which MamJ interacts with the magnetosome surface as well as with a cytoskeleton-like structure. According to our hypothesis, magnetosome architecture represents one of the highest structural levels achieved in prokaryotic cells.**

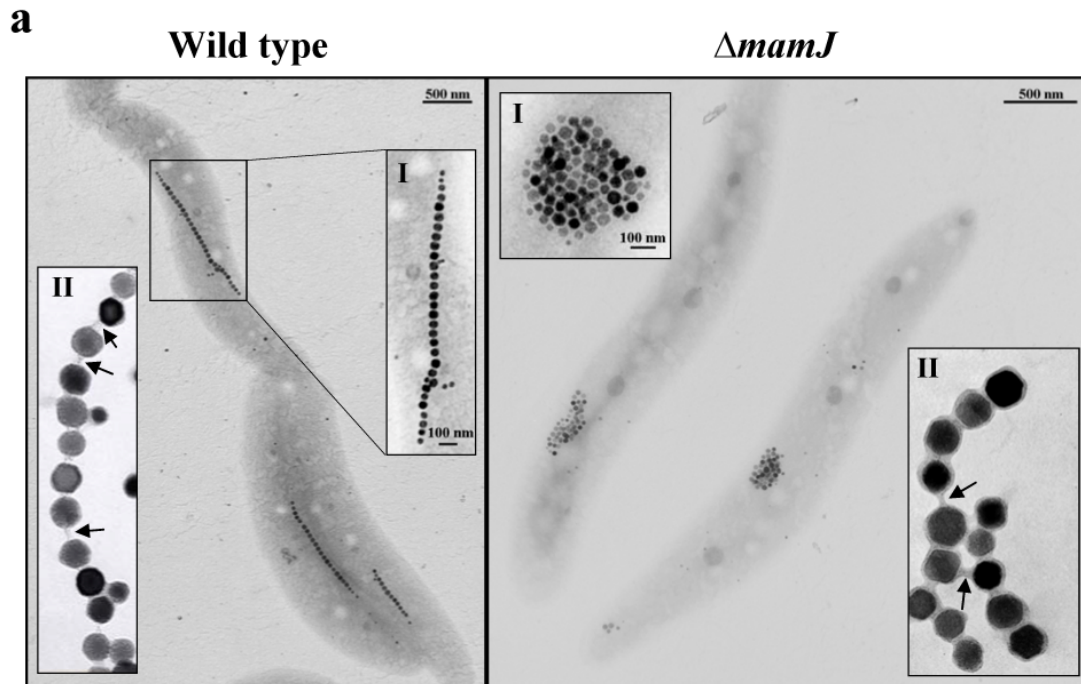
Magnetotactic bacteria are of considerable biophysical interest because they have evolved cellular mechanisms that allows them to precisely meet the requirements for effective magnetic orientation (1, 2). First, they must precisely control the biomineralization of a magnetite crystal within the single-magnetic-domain size range. Second, growing particles must be properly assembled into a linear chain (3). In such a configuration, the total magnetic dipole moment is the sum of the moments of individual particles — this generates the maximum possible magnetic moment for magnetotaxis (5). However, a string of magnetic dipoles has an inherent tendency to agglomerate in order to lower its magnetostatic energy (11), unless it is adequately stabilized by an organic structure. In addition such a structure would have to properly anchor the chain, in order to rotate the whole cell into alignment with magnetic field lines (24).



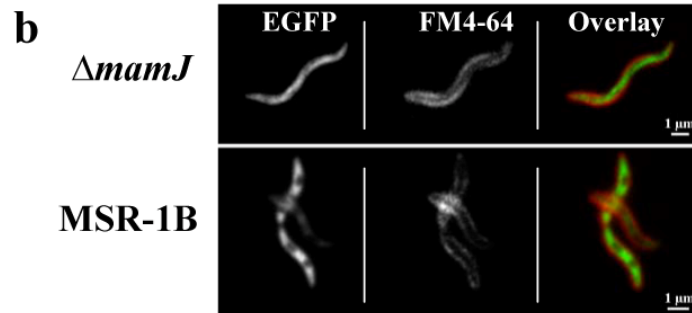
The mechanisms governing the formation of magnetosome chains, and any structures preventing them from collapse, have remained elusive. Consistent with a tightly controlled biosynthetic assembly, a large genomic ‘magnetosome island’ was identified as being essential for magnetosome formation in *M. gryphiswaldense* (23). This magnetosome island encodes a number of specific magnetosome-associated polypeptides, the exact functions of which are unknown. Among them, we identified the conspicuous 426-amino-acid MamJ protein (9), which is characterized by a high content of acidic amino acids and a repetitive domain structure (Supplementary Fig. 1), features that have frequently been found in other proteins associated with biomineralization processes (7).

To verify the assumed essential role of MamJ in the formation of functional magnetosomes, we generated a MamJ-deficient mutant strain ( $\Delta mamJ$ ) (Supplementary Fig. 2). Contrary to our expectations, the mutant was not affected in biomineralization, but produced magnetite crystals identical in size, morphology and number to wild-type magnetosomes. However, although mutant cells responded to external magnetic fields if examined by microscopy, they showed substantially reduced magnetic orientation in a quantitative light-scattering assay (20), as measured by  $C_{mag}$  (the ratio of maximum and minimum scattering intensities;  $C_{mag}$  wild-type, 1.7;  $\Delta mamJ$ , 0.5). Notably, transmission electron microscopy (TEM) revealed that the mutant no longer produced straight magnetosome chains, but that magnetite crystals were instead arranged in compact three-dimensional clusters (Fig. 1a).

To determine whether clustering resulted from a loss of magnetosome membrane integrity caused by the  $\Delta mamJ$  mutation, we isolated magnetosomes from wild-type and mutant cells. Magnetite crystals from  $\Delta mamJ$  cells were membrane-enclosed and no longer organized in clusters, but spontaneously re-formed in-plane chains or flux-closed rings identical to those of wild-type cells (9, 15); however, removal of organic material by SDS caused agglomeration of particles. At closer inspection, both wild-type and mutant magnetosomes were tightly interconnected by organic material, which appeared to form junctions between individual particles (Fig. 1a, inset II). These observations indicate that the presence of the magnetosome membrane is required for coherence within the chain, but that the ability to form chains *in vitro* is not affected by loss of MamJ.



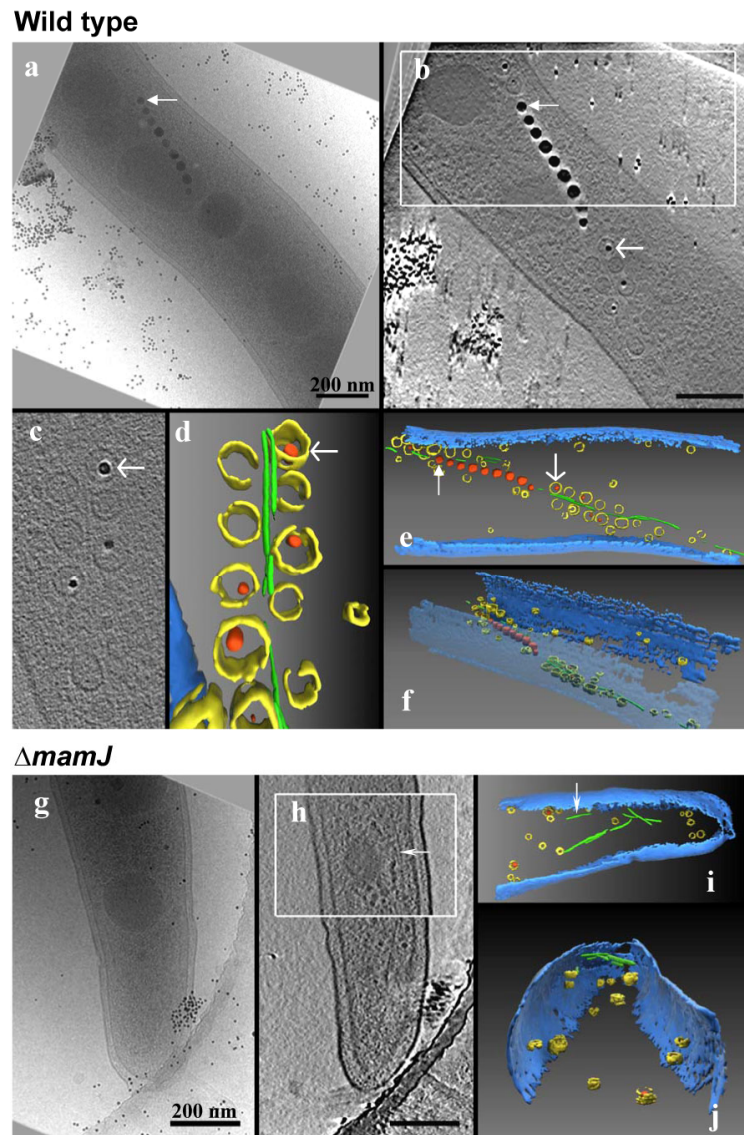
**Figure 1:**  $\Delta mamJ$  mutant phenotype and intracellular localization of MamJ. (a) Transmission electron micrographs of wild-type and  $\Delta mamJ$  cells. Insets show (I) magnification of magnetosome organization and (II) magnetosome membranes forming junctions (arrows) between isolated crystals. (b) A MamJ–EGFP fusion protein that restores chain formation in  $\Delta mamJ$  cells localizes as a line along the concave cell boundary, but shows punctuate cytoplasmic localization in the non-magnetic deletion mutant MSR-1B, which lacks the magnetosome genes. Cell membranes were stained with the membrane-specific fluorescent dye FM4-64.



We next constructed enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion proteins in order to visualize the subcellular localization of MamJ. *In vivo*, a functional MamJ-GFP fusion protein was visualized as a linear structure traversing from pole to pole in both wild-type and  $\Delta mamJ$  cells (Fig. 1b). Consistent with the position of magnetosome chains as revealed by TEM (Figs 1, 3), the fluorescent structure is located close to the concave side of the cell, but exceeds the length of magnetosome chains, which are usually confined to the midcell.

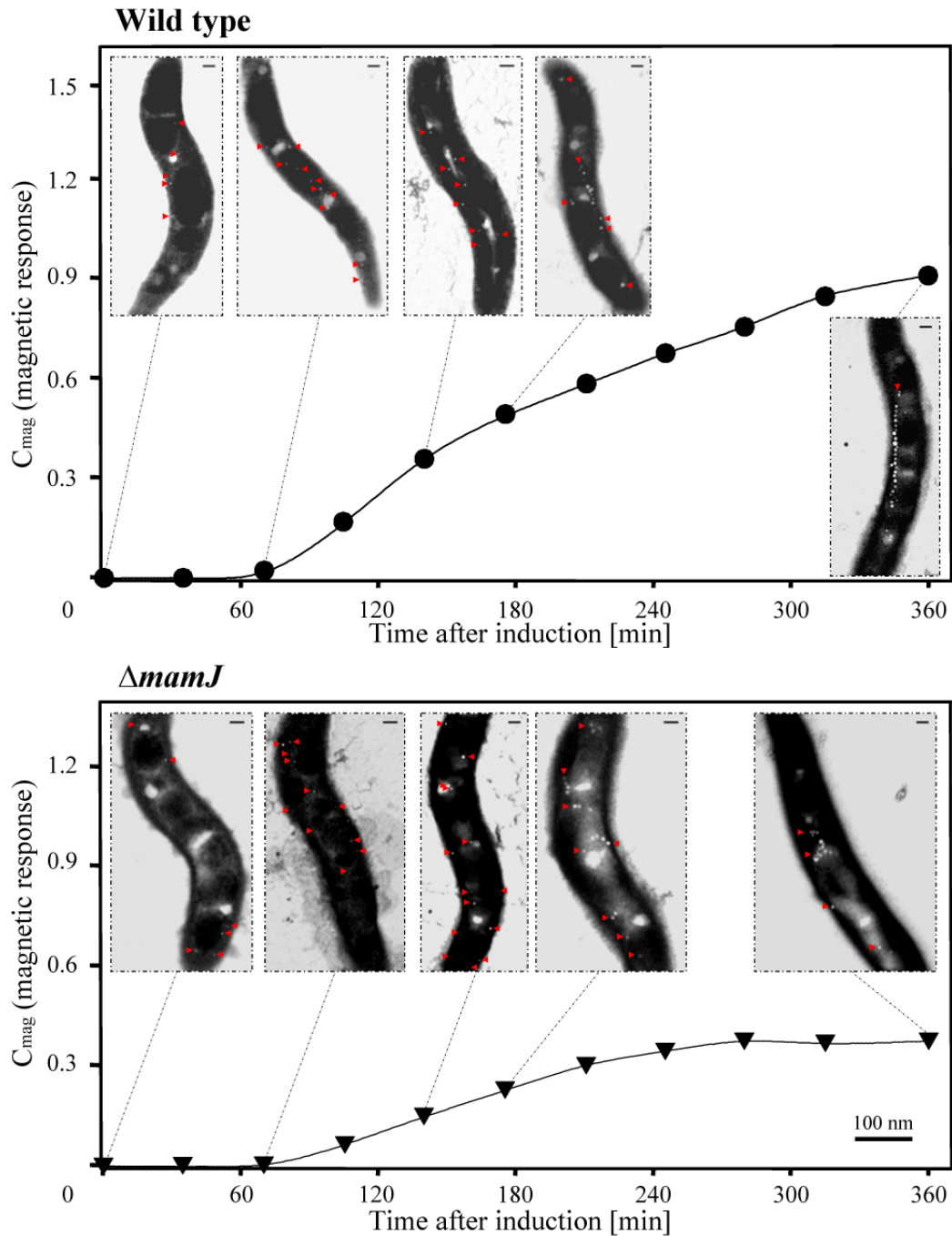
This pattern, which is reminiscent of the localization of a GFP fusion with a different magnetosome protein (MamA) (12), indicates that the localization of MamJ does not depend on the presence of mature magnetite crystals. In contrast, cytosolic localization of the MamJ-EGFP fusion was observed if expressed in the non-magnetic mutant strain MSR-1B, in which a large part of the magnetosome island (including all magnetosome genes) has been deleted (17, 23). This suggests that MamJ interacts with a linear structure encoded within the magnetosome island, but is not likely to form this structure itself.

To analyze this in greater detail in a close-to-native state, we studied subcellular structures putatively governing the localization of MamJ by means of cryo-electron tomography (cryo-ET), which allows three-dimensional reconstruction at high resolution with a minimum of preparative artefacts. In fully magnetic wild-type cells, mature magnetosome chains were adjacent to the cytoplasmic membrane, apparently following the cell curvature in a helical manner (Supplementary Fig. 2). For better visualization of empty vesicles, we grew cells at moderate iron limitation to reduce the number of magnetite crystals. Tomograms of wild-type and  $\Delta mamJ$  cells clearly showed a network of filamentous structures (Fig. 2 and Supplementary Video 1). Individual filaments were approximately 3–4 nm thick, which is in good agreement with similar structures observed in *Spiroplasma melliferum* (13). Filaments extended up to the cell pole (data not shown) and were located close to the cytoplasmic membrane. Notably, most magnetosome vesicles were arranged closely along this filamentous structure in wild-type cells. Empty vesicles and immature magnetosomes were predominantly located at the ends of chains in wild-type cells, and mature magnetosomes were mostly found at midcell. In  $\Delta mamJ$  cells, however, empty vesicles and those containing immature crystals were scattered throughout the cytoplasm and were dissociated from the filaments. The organization of the filamentous structures, however, appeared identical to that in wild-type cells. These results indicate that a structure resembling a cytoskeleton is associated with the magnetosome chain, and that the MamJ protein connects magnetosome vesicles to this putative cytoskeletal structure.



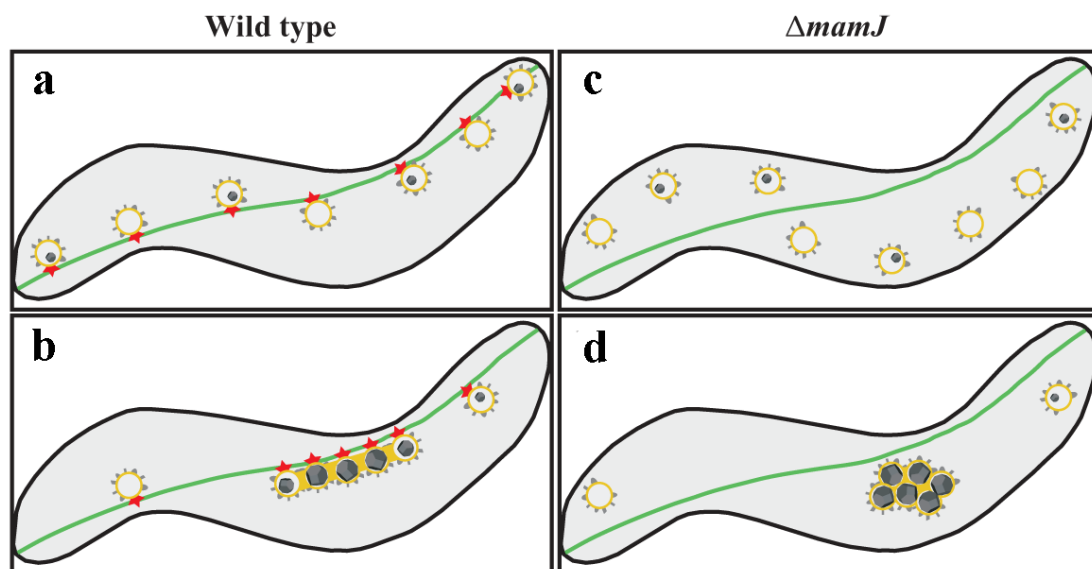
**Figure 2:** Cryo-electron tomography of (a–f) wild-type and (g–j)  $\Delta mamJ$  cells. Arrows (solid or fine) indicate identical positions in different views. The apparent absence of the magnetosome membrane around mature particles is due to the adverse effect of diffraction contrast of the crystalline magnetite. (a–f) TEM of a vitrified wild-type cell. (a) The two-dimensional image represents one projection from an angular tilt-series. (b–f) Three-dimensional reconstruction of a wild-type cell. (b) Superimposed  $x$ – $y$  slices along the  $z$  axis through a typical tomogram. (c) Magnified  $x$ – $y$  slice of vesicles, which are either empty or contain growing crystals (arrow) connected to the filamentous structure. (d) Surface-rendered representation of a segment of the cell showing vesicles (yellow), magnetite crystals (red) and a filamentous structure (green). (e, f) Complete three-dimensional visualization of the whole cell in different views (membrane in blue). (g–j) TEM of a vitrified  $\Delta mamJ$  cell. (g) The two-dimensional image represents one projection from an angular tilt-series. (h–j) Three-dimensional reconstruction of a mutant cell. (h) Superimposed  $x$ – $y$  slices along the  $z$  axis through a typical tomogram. (i) Surface-rendered representation of the whole cell. (j) In contrast to the wild-type cell, magnetosome vesicles in  $\Delta mamJ$  cells are scattered throughout the cytoplasm and are not associated with the filaments.

In  $\Delta mamJ$  cells, empty vesicles were widely spaced and located along the entire length of cells, in contrast to the tightly packed clusters of mature magnetite crystals usually located at midcell. This observation prompted us to examine whether the formation of clusters results from agglomeration of empty magnetosome vesicles, or whether chain collapse is instead caused by magnetic interactions between mature magnetite crystals. We therefore studied the process of magnetosome formation in a time course experiment (Fig. 3). Approximately 30 min after induction, small (approximately 5-10 nm in diameter) crystallites were formed simultaneously at multiple discrete sites along the entire length of both wild-type and mutant cells. In wild-type cells, growing crystals started to concentrate at midcell after 175 min, first assembling into imperfect, loosely spaced chains that gradually (over 360 min) developed into straight, tightly packed chains of mature particles. At this time, electron-dense particles seemed mostly confined to midcell. This pattern might be most likely explained by the dynamic localization of magnetosome particles during chain assembly. In contrast, the localization of immature crystals did not change significantly for about 140 min in  $\Delta mamJ$  cells. However, clustering of magnetosomes started at about 175 min, as numerous larger particles were present. This indicates that the agglomeration of particles occurs at a later stage of crystal growth, and is probably caused by increasing magnetic attraction between crystals once they are in close proximity to each other.



**Figure 3:** Time course of magnetite formation in wild-type and  $\Delta mamJ$  cells after induction. Magnetite formation was induced in non-growing iron-deprived cells by the addition of 50  $\mu\text{M}$  ferric citrate, and was followed by magnetic response measurements ( $C_{mag}$ ) and TEM. ‘Most probable loss images’ obtained by energy-filtered TEM show the distribution of growing magnetite crystals (red arrowheads) in characteristic cells after different elapsed times. The micrographs show that growing magnetosome particles seem to undergo dynamic localization during chain assembly, and that the agglomeration of particles in  $\Delta mamJ$  cells occurs at a later stage of crystal growth than in wild-type cells. This agglomeration is probably caused by increasing magnetic attraction between particles.

Given the essential requirement of MamJ for the assembly of magnetosome chains, we postulate a mechanism that involves magnetic interactions within the chain, physical contact between adjacent particles, and the interaction of MamJ with a cytoskeleton-like structure that directs the assembly and localization of the prokaryotic organelles (Fig. 4). Intriguingly, *mamJ* is co-transcribed with the *mamK* gene (18), which has previously been hypothesized to encode a cytoskeletal structure because of its striking similarity to actin-like MreB proteins in other bacteria (6, 19). Our observation that this cytoskeletal structure seems to be absent in the MSR-1B mutant (which lacks *mamK*) is consistent with this speculated role.



**Figure 4:** Model for magnetosome chain assembly. MamJ (red) attaches the empty magnetosome vesicles (yellow) to the cytoskeletal filaments (green), resulting in a loosely spaced ‘beads-on-a-string’-like alignment. (a) Magnetite biomineralization is initiated at multiple discrete sites distributed over the length of the cell. As magnetite crystals (black) continue to grow, their magnetic moments increasingly force the particles to interact. (b) Positioning of mature magnetosomes at midcell is then directed along filaments. Once particles are in close contact, growing chains are further stabilized by interaction through the magnetosome membrane. (c) In contrast, vesicles in the  $\Delta mamJ$  mutant are detached from the filaments. (d) Vesicles are free to diffuse within the cells, resulting in agglomeration of particles upon close contact as magnetic interactions between growing magnetite crystals increase.

Our results demonstrate that magnetosome chain assembly is genetically controlled to achieve one of the highest structural levels in a prokaryotic cell for optimal function in magnetotaxis. Given that magnetosome chains resembling those in magnetotactic bacteria

have been identified in higher organisms (4, 14), the biological mechanisms of chain formation will be relevant for understanding the evolution and function of magnetoreceptive organelles in both prokaryotic and eukaryotic organisms.

## Methods

### Bacterial strains, media and magnetosome isolation

*Escherichia coli* strains were grown as described (16). Liquid cultures of wild-type and mutant strains of *M. gryphiswaldense* MSR-1 (DSM6361) were grown microaerobically in modified FSM medium (10). Single colonies were cultivated on ACA medium (22). Non-magnetic cells were grown at moderate iron limitation by repeated cultivation in modified FSM medium, from which ferric citrate and yeast extract were omitted. In this medium, which contained only trace amounts of iron, cells formed only a few tiny crystallites and did not show a magnetic response. Magnetite induction experiments were performed microaerobically on these non-magnetic cells in modified FSM medium that had a reduced content of carbon sources. Under these conditions, cells did not grow significantly but remained viable and produced magnetosomes for several hours upon induction of magnetite formation by the addition of ferric citrate to a final concentration of 50  $\mu$ M. Magnetosomes were isolated as previously described (9) from cultures grown microaerobically in an oxygen-controlled fermenter (10).

The average magnetic orientation of cell suspensions ('magnetic response') was assayed by an optical method as previously described (20). Briefly, cells were aligned at different angles relative to a light beam by means of an external magnetic field. The ratio of the resulting maximum and minimum scattering intensities ( $C_{\text{mag}}$ ) is well correlated with the average number of magnetic particles and can be used for quantitative assessment of magnetite formation (for practical purposes, non-magnetic cells were assumed to have  $C_{\text{mag}}=0$ ).

### Construction and detection of fusion proteins

The *M. gryphiswaldense* *mamJ* gene (accession number AM085146) and *egfp* (pEGFP-N2, Clontech) were amplified using primers ASmamJs\_f/ASmamJe\_r5



(5'-GGAATTCATGGCAAAAAACCGGCGTG-3'; 5'-GCCCTTGCTCACCATTTTA TTCTTATCTTCAGC-3') and ASegfp\_f1/ASegfp\_r3 (5'-GCTGAAGATAAGAATAA AATGGTGAGCAAGGGC-3'; 5'-TCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC C-3'), respectively. Using the gene fragments as templates, fusion polymerase chain reaction (PCR) with the ASmamJs\_f/ASegfp\_r3 primer pair generated a functional 1,998-bp *mamJ*-*egfp* fusion, which was cloned into the *EcoRI* and *XbaI* sites of the pBBR1MCS-2 vector, resulting in pASG2. Expression of MamJ-EGFP in  $\Delta$ *mamJ* cells restored magnetosome chain formation as monitored by electron microscopy. Fluorescence microscopy was performed using an Olympus AX70 microscope equipped with a digital CCD camera. Images were acquired with Metamorph 5.0 (Universal Imaging Corp.) using exposure times of 0.5–5.0 s. Image rescaling and cropping was done using Photoshop 6.0. Cell membranes were stained with FM4-64 (final concentration 1  $\mu$ M).

#### **Construction of an unmarked in-frame *mamJ* deletion mutant**

Gene replacement was performed by homologous recombination of flanking sequence regions of *mamJ* between the *M. gryphiswaldense* chromosome and pAS2. A 1,394-bp upstream region and a 1,433-bp downstream region of *mamJ* were amplified using the primers ASmamJu\_f/ASmamJs\_r (5'- GGAATTCCTTACCCCAATGGTGCGT TTG-3'; 5'-CCCGGGCATTATCCCGCTCCACCCTCAA-3') and ASmamJe\_f/ASmamJd\_r (5'-CCCGGGTAGAGACCTGTGGATTGATCTGT-3'; 5'-CTCTAGAGCTCATCCTTACC TACTCCAAAG-3'), respectively. Fragments were fused by cloning into the *EcoRI* and *XbaI* sites of the pK19*mobsacB* vector, resulting in pAS2. Plasmids were introduced into *M. gryphiswaldense* by biparental conjugation and screening for recombinants was performed as previously described (21). Double-crossover was confirmed by Southern blot analysis. The nonpolar character of the mutation was confirmed by reverse transcription PCR detection of the transcripts of several genes located downstream of *mamJ*. In addition, presence of the product of the *mamK* gene (which is located immediately downstream of *mamJ*) was confirmed using a specific antibody (data not shown). Restoration of the chain-forming phenotype in  $\Delta$ *mamJ* cells was achieved by transcomplementation with wild-type *mamJ* expressed from plasmid pBBR1MCS-2.

### **Electron microscopy**

For TEM, cells and isolated magnetosomes were adsorbed on carbon-coated copper grids. Purified magnetosomes were negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. Bright-field TEM images were obtained with a Zeiss EM10 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 60 kV. Energy-filtered TEM was performed on a Philips CM120 BioTwin equipped with a Gatan energy filter. ‘Most probable loss images’ were acquired at around 30 eV with a 20 eV energy window and with white and black inverted as described (8). For tomography, wild-type and  $\Delta mamJ$  mutant cells were vitrified in liquid ethane and investigated at liquid nitrogen temperature with a Philips CM300 field emission transmission electron microscope equipped with a Gatan energy filter. Multiple single-axis tilt-series at cryo-conditions and in zero-loss imaging mode were recorded and reconstructed by weighted back-projection. All surface-rendered visualizations were de-noised beforehand by anisotropic nonlinear diffusion. Owing to the limited tilt-range ( $\pm 60^\circ$ ), all tomograms contain artefacts (the ‘missing-wedge’ effect, that is, information missing perpendicular to the tilt-axis), resulting in surface-rendered representations that show incomplete visualization of the cellular membrane and vesicles.

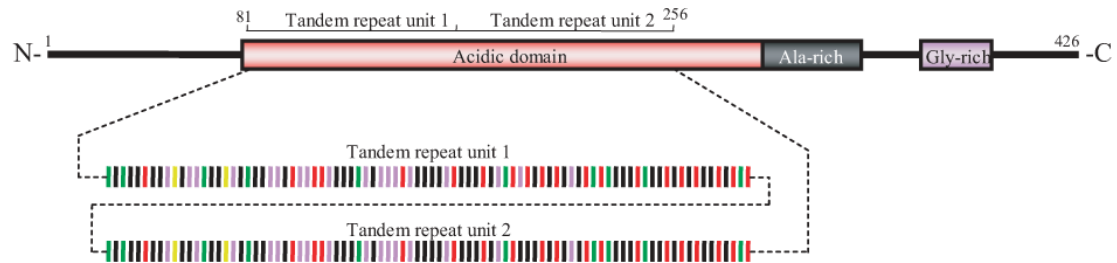
### **Acknowledgements**

We thank F. Widdel for helpful comments. This research was supported by the Max Planck Society and the Biofuture program of the Bundesministerium für Bildung und Forschung.

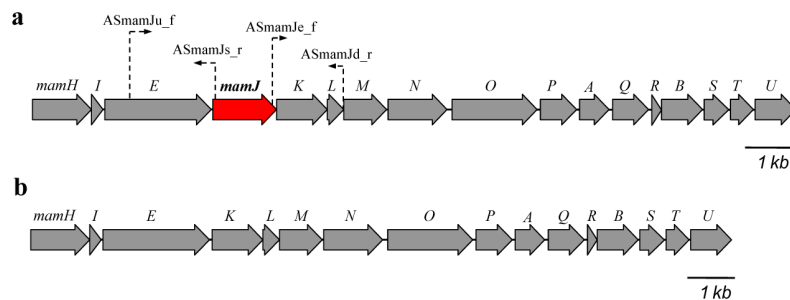
### **Author Contributions**

A.S. carried out all genetic and growth experiments and performed fluorescence and TEM microscopy, M.G. carried out Cryo-ET and analysis of tomograms, D.F. participated in induction experiments, A.L. participated in 3D visualization, P.G. directed fluorescence microscopy, J.P. directed Cryo-ET and EFTEM experiments and data analysis, D.S. coordinated the study and with A.S. finalized the manuscript.

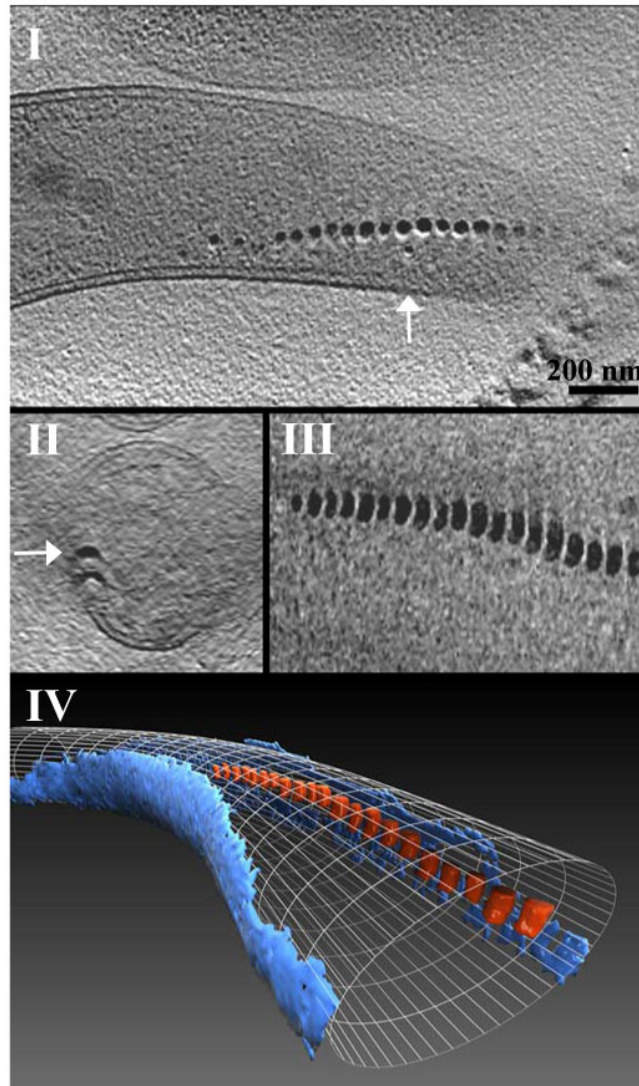
## Supplementary data



**Supplementary Figure 1:** Domain structure of the MamJ protein. The 426 aa protein with a calculated mass of 44.3 kDa and isoelectric point of 3.9 contains several domains with highly biased amino acid composition. The central acidic domain contains two identical Glu-rich stretches (81-168 and 169-256) that are arranged as tandem repeats (acidic aa, red; basic aa, yellow; hydrophobic aa, black; hydrophilic aa except Glu and Asp, purple). Within the acidic domain, Glu and Asp residues are predominantly located between position 224 and 294, accounting for 32.4 % of all amino acid residues within that region.



**Supplementary Figure 2:** Molecular organization of the *mamAB* cluster in the wild-type and  $\Delta$ *mamJ*. (a) The *mamJ* gene (red) is located within the *mamAB* cluster encompassing 17 ORFs. An unmarked *in frame* deletion mutant  $\Delta$ *mamJ* strain was generated by homologous recombination between the chromosome and the suicide vector pAS2 harbouring flanking sequence regions of *mamJ* (upstream fragment ASmamJu\_f/ASmamJs\_r; downstream fragment ASmamJe\_f/ASmamJd\_r). (b) By double crossover *mamJ* is deleted from the *mamAB* cluster in the mutant. Recombining sequences on pAS2 were designed to preserve *mamJ* start and stop codon.



**Supplementary Figure 3:** Cryo-ET of a wild-type cell showing a chain of mature magnetosome crystals located adjacent to the cytoplasmic membrane. Three-dimensional reconstruction of a vitrified magnetic wild-type cell showing the location of a magnetosome chain within the cell. (I) In x-y slices magnetosomes form a chain located at midcell with small crystals at the chain ends. While in x-y the chain follows the concave cell boundary, (II) the magnetosomes are located adjacent to membrane in x-z view at the position indicated by the arrow in (I). (III) Chain of magnetosomes is slightly curved as illustrated in y-z view. (IV) Surface-rendered representation of the cell showing the magnetite crystals (auburn) forming a curved chain adjacent to the membrane (blue). Mesh depicts the modeled outline of the complete membrane.

## References

1. **Bazyliniski, D.** 1995. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**:337-343.
2. **Bazyliniski, D. A., and R. B. Frankel.** 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev.* **2**:217-230.
3. **Bazyliniski, D. A., A. Garratt-Reed, and R. B. Frankel.** 1994. Electron-microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Res. Tech.* **27**:389-401.
4. **Diebel, C. E., R. Proksch, C. R. Green, P. Nellson, and M. M. Walker.** 2000. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* **406**:299-302.
5. **Dunin-Borkowski, R. E., M. R. McCartney, R. B. Frankel, D. A. Bazyliniski, M. Posfai, and P. R. Buseck.** 1998. Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* **282**:1868-1870.
6. **Errington, J.** 2003. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell Biol.* **5**:175- 178.
7. **Evans, J. S.** 2003. 'Apples' and 'oranges': comparing the structural aspects of biomineral- and ice-interaction proteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**:48-54.
8. **Grimm, R., D. Typke, M. Barmann, and W. Baumeister.** 1996. Determination of the inelastic mean free path in ice by examination of tilted vesicles and automated most probable loss imaging. *Ultramicroscopy* **63**:169-179.
9. **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**:1040-1050.
10. **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.

11. **Kirschvink, J. L.** 1982. Paleomagnetic evidence for fossil biogenic magnetite in western Crete. *Earth Planet. Sci. Lett.* **59**:388-392.
12. **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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3839-3844.
13. **Kürner, J., A. S. Frangakis, and W. Baumeister.** 2005. Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* **307**:436-438.
14. **Mora, C. V., M. Davison, J. Martin Wild, and M. M. Walker.** 2004. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. **432**:508-511.
15. **Philipse, A., and D. Maas.** 2002. Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: Chain formation and colloidal stability. *Langmuir* **18**:9977-9984.
16. **Sambrook, J., and D. Russel, W.** 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
17. **Schübbe, S., M. Kube, 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**:5779-5790.
18. **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**:5757-5765.
19. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **11**:1-7.
20. **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.

- 
21. **Schultheiss, D., M. Kube, and D. Schüler.** 2004. Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3624-3631.
  22. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**:89-94.
  23. **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**:7176-7184.
  24. **Vali, H., and J. L. Kirschvink.** 1990. Observation of magnetosome organization, surface structure, and iron biomineralization of undescribed magnetic bacteria: evolutionary speculations, p. 97-115. *In* R. B. Frankel and R. P. Blakemore (ed.), *Iron biominerals*. Plenum Press, New York.





**The acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum*  
*gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is  
not required for magnetosome chain assembly**

André Scheffel<sup>1</sup> & Dirk Schüler<sup>1, 2</sup>

Journal of Bacteriology im Druck

Manuskript 3

<sup>1</sup> Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

<sup>2</sup> present address: Ludwig Maximilians-University, Fakultät f. Biologie, Bereich Mikrobiologie, Maria-Ward-Str. 1a, D-80638 München, Germany

## Abstract

Magnetotactic bacteria navigate along the earth's magnetic field using chains of magnetosomes, which are intracellular organelles comprising membrane-enclosed magnetite crystals. The assembly of highly ordered magnetosome chains is under genetic control and involves several specific proteins. Based on genetic and cryo-electron tomography studies, a model was recently proposed, in which the acidic MamJ magnetosome protein attaches magnetosome vesicles to the actin-like cytoskeletal filament formed by MamK, thereby preventing magnetosome chains from collapsing. However, the exact functions as well as the mode of interaction between MamK and MamJ are unknown. Here, we demonstrate that several functional MamJ variants from *Magnetospirillum gryphiswaldense* and other magnetotactic bacteria share an acidic- and repetitive central domain, which displays an unusual intra- and interspecies sequence polymorphism, probably caused by homologous recombination between identical copies of Glu and Pro-rich repeats. Surprisingly, *mamJ* mutant alleles in which the central domain was deleted retained their potential to restore chain formation in a  $\Delta$ *mamJ* mutant, suggesting that the acidic domain is not essential for MamJ's function. Results of two-hybrid experiments indicate that MamJ physically interacts with MamK, and two distinct sequence regions within MamJ were shown to be involved in binding to MamK. Mutant variants of MamJ lacking either of both binding domains were unable to functionally complement the  $\Delta$ *mamJ* mutant. In addition, two-hybrid experiments suggest both MamK binding domains to confer oligomerization of MamJ. In summary, our data reveal domains required for the functions of the MamJ protein in chain assembly and maintenance, and provide first experimental indications for a direct interaction between MamJ and the cytoskeletal filament protein MamK.

## Introduction

For navigation along the earth's magnetic field, magnetotactic bacteria (MTB) use unique organelles, the magnetosomes, which in most MTB are membrane-enclosed crystals of the magnetic iron mineral magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Intracellular vesicles formed by the magnetosome membrane (MM), which are synthesized prior to magnetite formation by invagination from the cytoplasmic membrane (14, 26), represent a distinct subcellular compartment that provides spatial and physico-chemical control over magnetite crystal formation. A specific subset of proteins was identified in the MM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* and related MTB, which have presumed functions in vesicle maturation, magnetosome-directed iron transport, crystal formation, and magnetosome chain formation (6, 7, 30, 31).

Efficient geomagnetic field orientation of MTB depends on highly ordered linear chains of magnetosome particles, which transmit the rotational magnetic torque to the cell body (2). However, the assembly and stabilization of magnetosome chains has remained a puzzle, because magnetic dipoles tend to arrange into more energetically favored assemblages such as rings and aggregates, unless stabilized by a biological structure (11, 12, 21). Recently, several studies addressed the mechanism of magnetosome chain assembly at molecular level. It was reported by Scheffel and co-workers that cells of *Magnetospirillum gryphiswaldense*, in which the gene encoding the acidic magnetosome protein MamJ was deleted, no longer assemble linear chains of magnetosomes, but instead magnetosomes are arranged in three-dimensional clusters (26). Cryo-electron tomography (cryo-ET) revealed that in wild-type cells, empty and mature magnetosomes were attached to a novel filamentous structure, which extended from pole to pole adjacent to the cytoplasmic membrane (26). The observation that empty magnetosome vesicles of MamJ-deficient cells in contrast were detached from the cytoskeletal magnetosome filament and scattered throughout the cytoplasm, lead to a model in which MamJ connects magnetosome vesicles to the magnetosome filament, possibly by interaction through its conspicuous central acidic repetitive domain, thereby preventing the magnetosome chain from collapsing. Because of its striking sequence homology to bacterial actin-like proteins (31), it was further speculated by Scheffel et al. that the magnetosome filament is formed by product of the *mamK* gene, which is cotranscribed with the adjoining *mamJ* gene within

the *mamAB* operon of the genomic magnetosome island (29, 37). First experimental data supporting this hypothesis were provided by Komeili and co-workers (2006) who generated a  $\Delta$ *mamK* mutant strain of *M. magneticum* which they analyzed by cryo-ET. In tomograms of  $\Delta$ *mamK* mutant cells the magnetosome filament was not apparent, suggesting its absence to be connected to the deletion of the *mamK* gene (Komeili *et al.*, 2006). Lately, Pradel and co-workers (2006) expressed GFP-tagged MamK of *M. magneticum* in *Escherichia coli* and observed the formation of a linear MamK-GFP filament which is structurally distinct from other prokaryotic actin-like filaments as formed by MreB or ParM. Taken together, reported observations indicate MamK serves as a filamentous scaffold for stabilizing magnetosome chains in a manner as proposed by Scheffel and co-workers (2006) but experimental data confirming the suggested physical interaction between MamJ and MamK has not been provided yet.

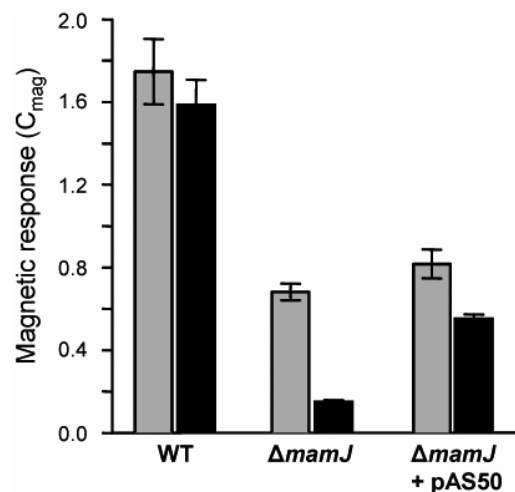
In order to gain better understanding of the mechanisms directing magnetosome chain assembly and to address the role of the conspicuous acidic repetitive domain of MamJ, we analyzed the domain structure of the MamJ protein with respect to its function in chain formation in greater detail. Various truncated MamJ proteins were constructed, which enabled us to map essential regions of MamJ by assaying the potential of mutant proteins to restore magnetosome chain formation in the  $\Delta$ *mamJ* strain. We further present first evidence for a physical interaction between MamJ and MamK, and show that C- and N-terminal sequence regions mediate interaction, whereas the central acidic repetitive domain apparently is dispensable for MamJ function under all tested conditions.

## Results

### Transcomplementation of the $\Delta$ *mamJ* mutant restores chain formation

We previously noticed that a  $\Delta$ *mamJ* mutant still aligns within magnetic fields, albeit magnetic response ( $C_{\text{mag}}$ ) was reduced compared to the wild-type (26). As  $C_{\text{mag}}$  measurements by means of light scattering is of critical importance for assaying the magnetic response of different cultures, we systematically assessed this method for its applicability to quantify chain formation in  $\Delta$ *mamJ* and *in trans* complemented  $\Delta$ *mamJ* cells. To eliminate any effects of motility, cells were killed by the addition of formaldehyde

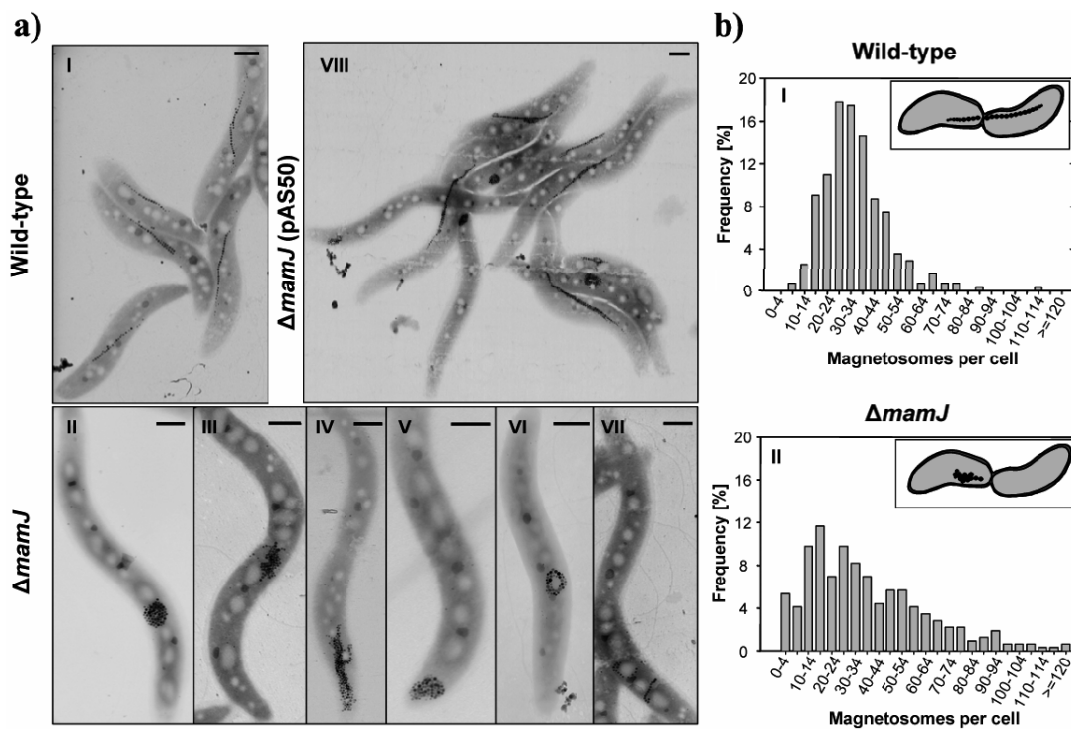
or heat treatment. While  $C_{\text{mag}}$  values were comparable for viable and inactivated wild-type cells, the effect of formaldehyde killing was more pronounced in  $\Delta\text{mamJ}$  and transcomplemented  $\Delta\text{mamJ}$  cells (pAS50), suggesting that alignment along field lines is counteracted by active motility in those strains (Fig. 1).



**Figure 1:**  $C_{\text{mag}}$  values (average magnetic response) of wild-type,  $\Delta\text{mamJ}$ , and  $\Delta\text{mamJ}$  transcomplemented with the full-length wild-type allele (pAS50). Grey bars: motile cells, black bars: formaldehyde-killed cells. Cultures were grown in triplicate and diluted to  $\text{OD}_{565 \text{ nm}} 0.1$  prior to  $C_{\text{mag}}$  measurements.

The same effect was observed when motility was inactivated by heat treatment of cells (data not shown). Magnetic response of formaldehyde-killed  $\Delta\text{mamJ}$  cells ( $C_{\text{mag}} = 0.15 \pm 0.01$ ) was significantly reduced compared to wild-type cultures ( $C_{\text{mag}} = 1.59 \pm 0.12$ ) although they contained nearly identical average numbers of magnetosome particles (34 and 37, respectively). By inspection of 309 cells we found the  $\Delta\text{mamJ}$  strain to display a different distribution of magnetosome numbers per cell. In wild-type populations, magnetosome numbers exhibited a rather narrow symmetric distribution ( $\mu = 34$ ,  $\sigma = 14$ ) (Fig. 2b I). Cells containing either very many ( $>60$ ) or very few ( $<15$ ) magnetosomes were only rarely observed and occurred at frequencies of only 4.21 % and 3.34 %, respectively. In contrast to the wild-type,  $\Delta\text{mamJ}$  cells exhibited a much wider distribution (Fig. 2b II), with a higher proportion of cells with very many (frequency 17.24 %) and very few or no magnetosome crystals (frequency 19.12 %).  $\Delta\text{mamJ}$  cells entirely devoid of magnetosome crystals occurred at a frequency of 3.5 %. These divergent

distributions of magnetosome numbers between wild-type and  $\Delta mamJ$  cultures most likely result from asymmetric segregation of the magnetosome particles during cell division. A spot-like localization of magnetosomes as found in the magnetosome clusters of  $\Delta mamJ$  cells, more frequently will cause an "all-or-nothing" distribution of particles to the daughter cells than a linear chain, which is more likely to be divided evenly (Fig. 2b I,II, insets).



**Figure 2:** (a) TEM micrographs of wild-type (I),  $\Delta mamJ$  (II-VII) and  $\Delta mamJ$  cells transcomplemented with pAS50 (VIII). (Scale bars: 500 nm) (b) Distribution of magnetosome crystal numbers in stationary cultures of wild-type (I) and  $\Delta mamJ$  cells (II). Numbers were determined by counting 309 cells by TEM. Insets illustrate the magnetosome distribution to daughter cells during cell division in wild-type and  $\Delta mamJ$  cells.

In addition to a larger proportion of cells containing no or only few magnetosomes, the reduced magnetic response of  $\Delta mamJ$  cultures probably is also due to the non-linear magnetosome arrangement, as irregularly arranged magnetosome particles partially or entirely will zero out their individual magnetic moments instead of adding up as in chains which occur in single, or occasionally, in duplicate in wild-type cells (Fig. 2a I). Beside clusters, we occasionally observed ring-like structures or imperfect short chains

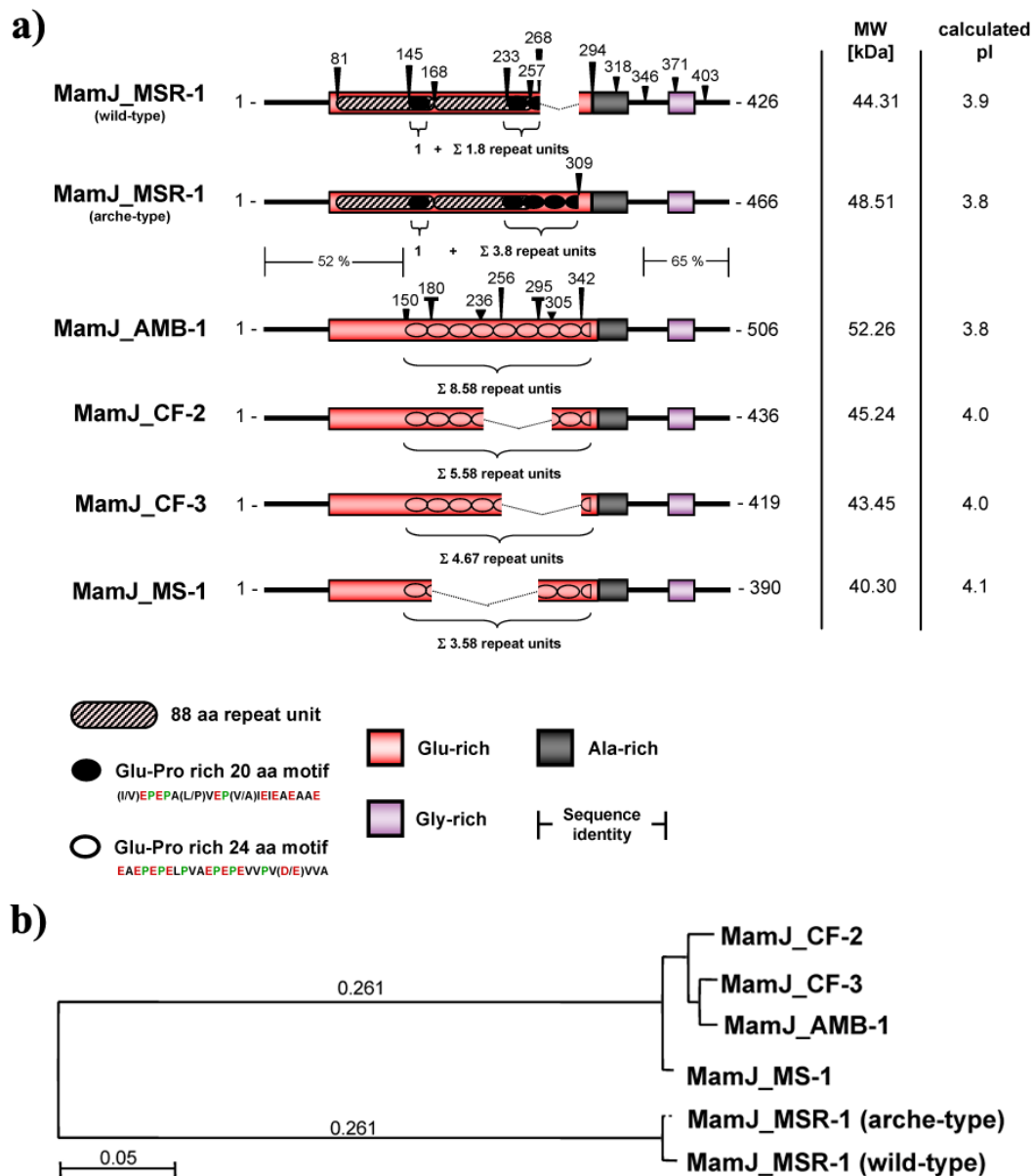
perpendicular to the cell long axis in  $\Delta mamJ$  cells (Fig. 2a II-VII), whose contribution to cellular magnetic response is adverse or uncertain.

*In trans* complementation of  $\Delta mamJ$  cells with the full-length wild-type *mamJ* resulted in significant restoration of chain formation as indicated by electron microscopy (Fig. 2a VIII). However, restoration of the wild-type phenotype was not complete, as only approximately 50% of the transcomplemented  $\Delta mamJ$  cells produced wild-type-like chains, and  $C_{mag}$  values of transcomplemented cells consequently did not reach wild-type level, which we attribute to artificial *mamJ* expression levels from a non-native promoter, or an effect of plasmid copy number.

### **Functional MamJ proteins display intra- and interspecies length polymorphism**

We noticed that PCR amplification of *mamJ* from various magnetic subcultures of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 yielded products of different lengths. For example, either a 1281 bp (in the following referred to as wild-type *mamJ*) or a 1401 bp product (referred to as arche-type *mamJ*) were amplified from the arche-type and the lab strain, respectively. Sequencing of wild-type *mamJ* revealed an *in frame* deletion encompassing a continuous 120 bp nucleotide stretch in the 3' gene region. The absence of the 120 bp fragment apparently had no effect on chain formation, as cells harboring either arche-type or wild-type alleles developed magnetosome chains that were virtually identical. The deduced amino acid sequence of both MSR-1 MamJ variants contains several distinct domains that display a highly biased amino acid composition (Fig. 3a). The most conspicuous sequence feature is the central acidic repetitive domain (in the following referred to as CAR domain) which comprises a direct repetition of a 88 amino acid (aa) motif (residue 81 to 168 and 169 to 256) followed by tandemly arranged copies of a highly acidic motif of 20 aa consisting primarily of Pro and Glu residues arranged in Glu-Pro segments. While the CAR domain of arche-type MamJ comprises altogether 4.8 copies of the 20 aa motif (i.e. 2.8 copies located adjacent to the large repeat (residues 253 to 308), and one copy in each of the two 88 aa repeat units (residues 145 to 164 and 233 to 252), wild-type MamJ contains 2.8 copies because the deletion comprises a tandem copy of two 20 aa motifs (wild-type MamJ lacks residues 257 to 296 of arche-type MamJ). In both

MamJ variants, the CAR domain is followed by an Ala-rich domain, and a Gly-rich domain is positioned near the C-terminus, which is predicted to encompass a transmembrane segment (SAPS [http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/saps-simple.html], TopPred, Tmpred, TMAP [http://ca.expasy.org/tools/]).



**Figure 3:** Domain organization, sequence characteristics (a), and similarity tree (b) of MamJ protein sequences from *M. gryphiswaldense*, *M. magneticum*, *M. magnetotacticum*, and strains *Magnetospirillum* spec. CF-2 and CF-3.



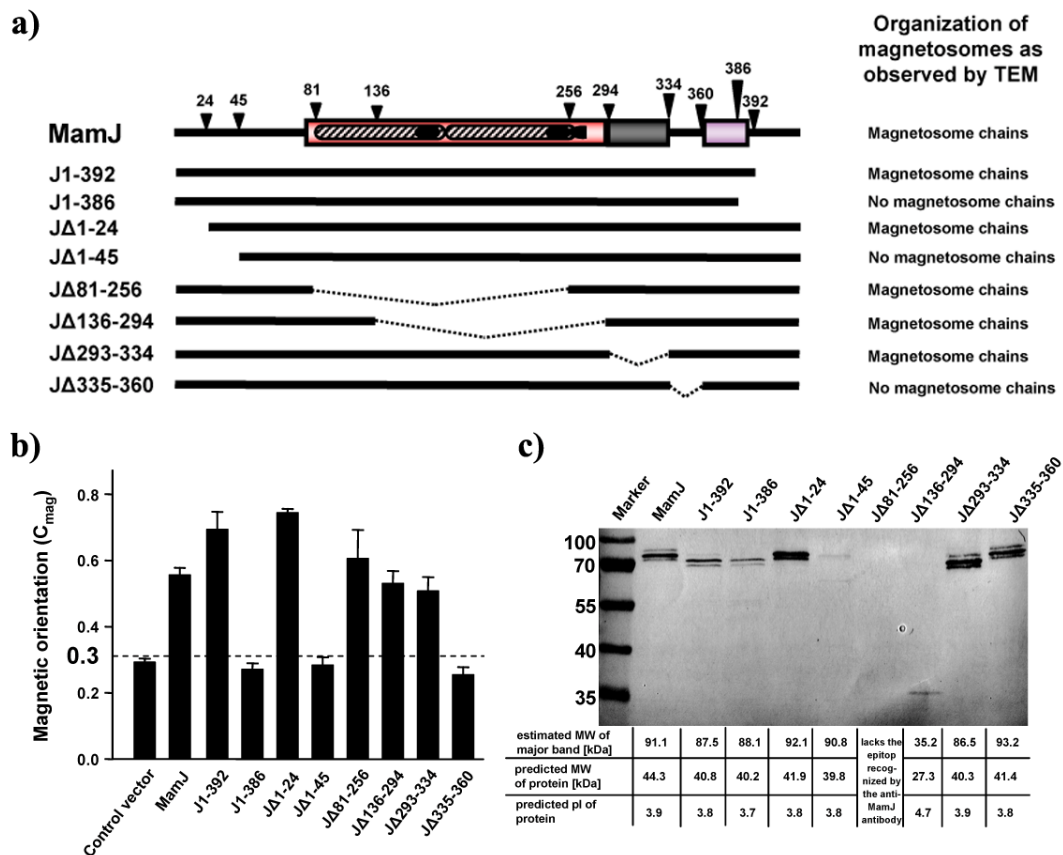
To elucidate whether sequence variability within the CAR domain of MamJ is a general phenomenon, we compared MamJ sequences of *M. gryphiswaldense*, *M. magneticum* AMB-1, *M. magnetotacticum* MS-1 and of the two novel environmental isolates *Magnetospirillum* strains CF-2 and CF-3 (5). In general, the sequence organization was found conserved in all homologs. However, sequence alignment showed MamJ of MSR-1 to be most divergent. While MamJ homologs from *Magnetospirillum* strains AMB-1, MS-1, CF-2, and CF-3 share more than 97 % identity, sequence conservation to MamJ from MSR-1 is restricted to the first N-terminal 135 aa and the last C-terminal 76 aa, with 52 % and 65 % identity, respectively (Fig. 3b). Similar to MamJ variants of MSR-1, all other MamJ homologs display extensive tandem repeat polymorphism within the CAR domain. However, in MamJ from AMB-1, MS-1, CF-2 and CF-3, the tandem repeat consists of 24 aa-units rich in Glu and Pro residues, which are repeated 8.6, 3.6, 5.6 and 4.7 -fold, respectively. Despite sequence variations, all tested *Magnetospirillum* species displayed fully developed magnetic chains, and *in trans* expression of polymorphic *mamJ* homologs restored the formation of wild-type -like magnetosome chains in  $\Delta mamJ$ , indicating that polymorphism of the CAR domain does not affect protein functionality.

#### **The hypervariable central acidic- and repetitive (CAR) domain of MamJ is not required for magnetosome chain restoration in $\Delta mamJ$ cells**

As the tandem repeat polymorphism within the CAR domain of MamJ has no obvious effect on the function of the protein, we were interested whether the hypervariable domain is required for magnetosome chain restoration at all. Therefore we constructed various *mamJ* variants containing different deletions. To ensure expression of the various *mamJ* constructs, protein crude extracts of *in trans* complemented  $\Delta mamJ$  strains were subjected to SDS-PAGE. An antibody directed against MamJ recognized a band corresponding to 91.1 kDa, which is 2.06 fold greater than the calculated MW of 44.3 kDa (Fig. 4c). Likewise, mutated MamJ proteins displayed aberrant migration behaviour as well: C-terminal truncated proteins J1-392 and J1-386 migrated at 87.5 and 88.1 kDa respectively, N-terminal truncated proteins J $\Delta$ 1-24 and J $\Delta$ 1-45 migrated at 92.1 and 90.8 kDa respectively and internal deletion containing mutant proteins J $\Delta$ 293-334 and J $\Delta$ 335-360 migrated at 86.5 and 93.2 kDa respectively (Fig. 4c). A strong shift in migration

behavior (apparent MW 35.2 kDa) was observed upon deletion of about 76 % of the CAR domain. For wild-type MamJ the discrepancy between expected and actual electrophoretic mobility persisted after treatment with endo- and exoglycosidases, or various strong denaturing agents, such as 8 M urea or 6 M guanidinium HCl (data not shown). Therefore it is very unlikely that aberrant electrophoretic mobility is caused by incomplete dissociation of oligomers which was previously suggested by Grünberg and co-workers (2004). Instead, the observed shifts in mobility most likely results from the unusually high abundance of charged residues within the CAR domain of MamJ.

In order to identify essential domains of MamJ,  $\Delta mamJ$  cultures expressing the various *mamJ* constructs were analyzed for restoration of magnetosome chain formation by TEM and our  $C_{mag}$  assay (Fig. 4a, b). TEM revealed that restoration of the wild-type phenotype was not complete and varied between cultures expressing different constructs. However, consistent with the entire absence of wild-type-like straight magnetosome chains in  $\Delta mamJ$  strains expressing J1-386, J $\Delta$ 1-45 and J335-360 in TEM, these cells exhibited a significantly lower  $C_{mag}$  than cultures expressing MamJ constructs J1-392, J $\Delta$ 1-24, J $\Delta$ 81-256, J $\Delta$ 136-294, and J $\Delta$ 293-334, where wild-type-like chain formation was found restored in a significant proportion of cells.

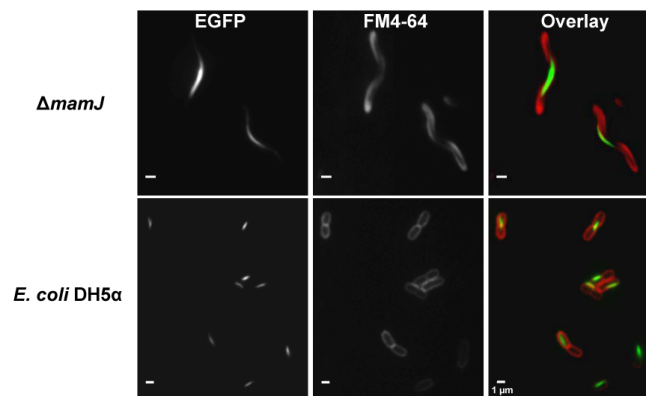


**Figure 4:** Ability of various MamJ mutant proteins to restore magnetosome chain formation in  $\Delta mamJ$ . **(a)** Overview of constructs used for transcomplementation. Dashed lines indicate deleted sequence fragments. **(b)**  $C_{mag}$  values (average magnetic response) of formaldehyde killed  $\Delta mamJ$  cultures transcomplemented with different MamJ mutant constructs. Dashed line represents a threshold ( $C_{mag} = 0.3$ ) that discriminates between functional and non-functional MamJ mutant constructs. **(c)** Immunodetection of wild-type and mutant MamJ proteins. Proteins were expressed *in trans* in the  $\Delta mamJ$  mutant and immunodetected by an anti-MamJ peptide antibody in crude extracts resolved by SDS-PAGE. Mutant protein JΔ81-256 lacks the epitope recognized by the antibody. Predicted molecular masses and isoelectric points are indicated below.

In conclusion, restoration of magnetosome chains by JΔ81-256 and JΔ136-294 indicates that the hypervariable CAR domain is not essential for magnetosome chain restoration in  $\Delta mamJ$ . Likewise, the Ala-rich domain (JΔ293-334) domain and also the first N-terminal residues (JΔ1-24) are not required to restore chain formation as well. However, regions indispensable for MamJ of MSR-1 are located in the N-terminal (residues 25 to 80) and in the C-terminal (residues 335 to 392) region of the protein.

### MamJ interacts with itself and with MamK

In the proposed model for magnetosome chain formation, MamJ at least transiently interacts directly with the filament-forming MamK protein (27). Since MamJ-EGFP does not properly localize in the 40-kb deletion mutant MSR-1B lacking *mamK* (26), we asked whether the absence of MamJ on the other hand would affect the localization of MamK. However, our MamK-EGFP fusion displayed a localization pattern in the  $\Delta mamJ$  mutant indistinguishable from that in the wild-type (Fig. 5). Likewise, MamK-EGFP showed a linear localization pattern in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , indicating that filamentous localization of *M. gryphiswaldense* MamK does not depend on the presence of MamJ. This finding is in accordance with the assumption that MamJ attaches magnetosomes to a MamK homofilament.



**Figure 5:** Intracellular localization of a MamK-EGFP fusion in  $\Delta mamJ$  and in *E. coli* DH5 $\alpha$  cells. Fluorescence micrographs of  $\Delta mamJ$  cells and of DH5 $\alpha$  cells stained with the membrane dye FM4-64 (red) and expressing a MamK-EGFP (green) fusion.

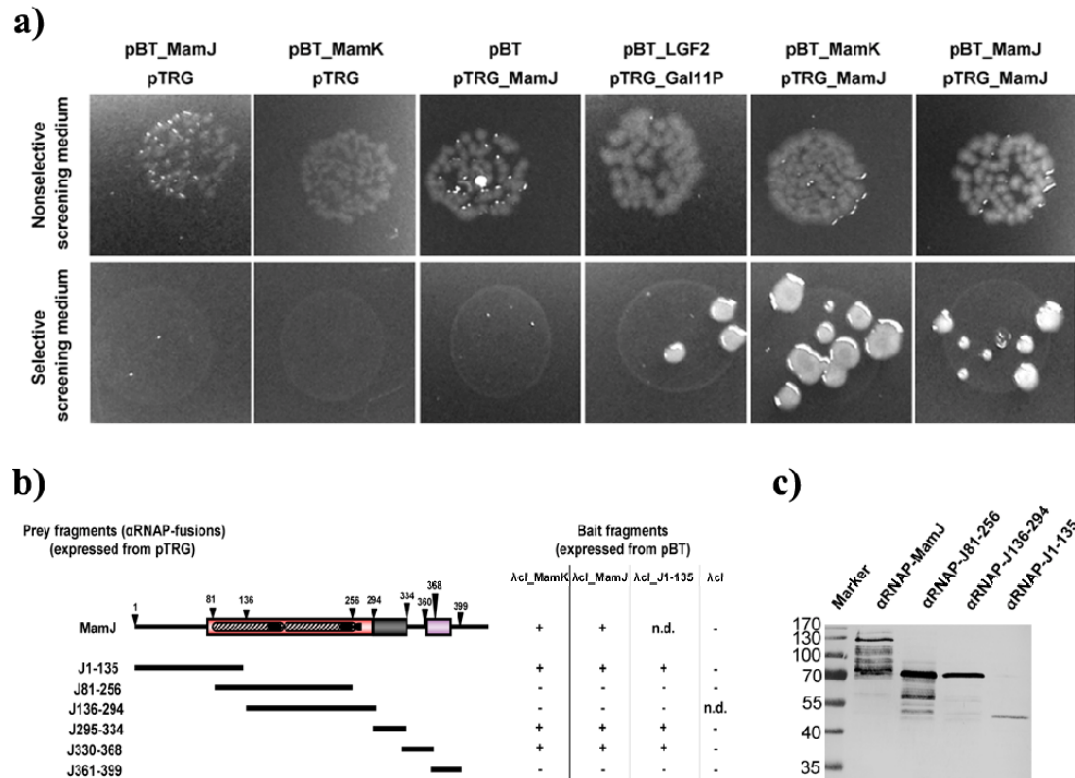
To provide experimental evidence for the proposed physical association between MamJ and MamK, we performed two-hybrid interaction analysis by means of commercial version of a prokaryotic two hybrid system developed by Dove and co-workers (4). In the “BacterioMatch II” system, one protein of the pair of interest is expressed as C-terminal fusion with the  $\lambda$ cI protein (bait fusion encoded on plasmid pBT), while the other is fused to the C-terminus of the alpha subunit of the RNA polymerase ( $\alpha$ RNAP) (prey fusion encoded on plasmid pTRG). Recombinant bait- and prey- expression vectors will be

co-transformed into the *E. coli* reporter strain for expression of the protein fusions. In case both proteins interact, transcription of a chromosomal encoded reporter cassette, consisting of a *HIS3* reporter and an *aadA* gene, is increased to levels sufficiently high to overcome competitive inhibition of the His3 enzyme by 3-AT, an additive of the selective screening medium, and AadA confers resistance to streptomycin as a secondary reporter.

Co-transformation of our bait- (pBT\_MamJ and pBT\_MamK) and prey- expression vectors (pTRG\_MamJ and pTRG\_MamK) into the *E. coli* reporter strain yielded numerous colonies on non-selective screening medium, indicating that the transformation was successful (Fig. 6a). In contrast, co-transformants harboring pTRG\_MamK only grew on non-selective screening medium when the IPTG concentration was reduced from 50  $\mu$ M to 1  $\mu$ M. This suggests that strong overexpression of the  $\alpha$ RNAP-MamK fusion might be deleterious for the *E. coli* reporter strain. Fusion proteins  $\lambda$ cI-MamJ and  $\alpha$ RNAP-MamJ were found to interact because colony growth of co-transformed *E. coli* cells on selective screening medium was observed, which clearly indicates that MamJ does oligomerize (Fig. 6a). Colony formation on selective screening medium was also obtained for cells harboring the vector pair pBT\_MamK / pTRG\_MamJ, which indicates physical interaction between the fusion proteins  $\lambda$ cI-MamK and  $\alpha$ RNAP-MamJ. To verify observed positive interactions, we transferred patches of several colonies onto dual selective screening medium which contains 3-AT and streptomycin as second inhibitor. We found transferred cells to grow to colonies which proves expression of the streptomycin resistance gene as consequence of a physical interaction between bait and prey fusion proteins. To ensure specificity of the observed interactions between  $\alpha$ RNAP-MamJ /  $\lambda$ cI-MamJ and  $\alpha$ RNAP-MamJ /  $\lambda$ cI-MamK, we further tested  $\lambda$ cI-MamJ and  $\lambda$ cI-MamK for interaction with  $\alpha$ RNAP-MamA,  $\alpha$ RNAP-MamE,  $\alpha$ RNAP-MamP,  $\alpha$ RNAP-Gal11<sup>P</sup>, and  $\alpha$ RNAP. No colony growth on selective screening medium was found, which shows that neither  $\lambda$ cI-MamJ nor  $\lambda$ cI-MamK alone can self-activate expression of the reporter genes, or physical interact with MamA, MamE, MamP, or with Gal11<sup>P</sup>, respectively.

**C- and N-terminal sequence regions of MamJ are involved in oligomerization and binding to MamK**

Results of our complementation study described above already indicated that the hypervariable CAR domain of MamJ apparently is dispensable for maintaining protein functionality. To identify sequence regions of MamJ essential for either oligomerization or binding to MamK, we generated the prey expression vectors pTRG\_J1-135, pTRG\_J81-256, pTRG\_J136-294, pTRG\_J295-334, pTRG\_J330-368 and pTRG\_J361-399 by cloning various fragments of *mamJ* into plasmid pTRG. Cells of the *E. coli* reporter strain harboring either pBT\_MamK or pBT\_MamJ grew on selective agar plates when co-transformed with either pTRG\_J1-135, or pTRG\_J295-334, or pTRG\_J330-368 (Fig. 6b), indicating that protein binding activity of MamJ is inherent to its N-terminal sequence region and the sequence connecting the Gly-rich and the CAR domain. In contrast, the reporter strain did not form colonies on selective screening media after successful co-transformation of either pBT\_MamK or pBT\_MamJ in combination with either vector pTRG\_J81-256 or vector pTRG\_J136-294 or vector pTRG\_J361-399. In addition, no growth on selective media was found after co-transformation of each prey expression vector together with pBT indicating that fusions of  $\alpha$ RNAP with MamJ fragments do not auto-activate transcription of the reporter cassette. In conclusion this data provides additional evidence that neither the Glu-Pro rich hypervariable CAR domain, nor the C-terminus of MamJ are involved in oligomerization or binding to MamK.



**Figure 6:** Two-hybrid analysis of the interaction between MamJ and MamK, and MamJ and MamJ. **(a)** Growth of reporter *E. coli* spotted onto selective and nonselective screening medium after co-transformation with different bait- (derivative of pBT) and prey (derivative of pTRG) expression vectors. **(b)** Overview of analyzed MamJ sequence regions (prey) for two-hybrid interaction with MamK, MamJ, and the N-terminal part of MamJ (bait). Growth on both selective and nonselective screening medium is shown by (+), (-) indicates growth on nonselective screening medium only (*n.d.*: not determined). **(c)** Immunodetection of prey fusion proteins by an anti-MamJ peptide antibody in protein crude extracts of the BacterioMatch reporter *E. coli* resolved by SDS-PAGE. RNAP fusions with J295-334, J330-368, and J361-399 lack the epitope recognized by the antibody.

## Discussion

We further investigated the MamJ protein and its function in magnetosome chain assembly. A more comprehensive characterization of the  $\Delta mamJ$  strain revealed that cells are not only impaired in chain formation, but in addition display a different distribution of magnetic particles per cell compared to the wild-type, which most likely result from asymmetric distribution of the aggregated particles during cell division. In addition to more or less spherical clusters, we occasionally observed ring-like structures and imperfect chains. A  $\Delta mamJ$  mutant could be functionally complemented by *in trans* expression of various

homologous and heterologous MamJ variants as well as truncated MamJ fragments. Although transcomplementation did not fully restore the wild-type phenotype, the potential of chain formation could be monitored semi-quantitatively by our light scattering assay. This was crucial for domain analysis by *in trans* complementation, as allelic exchange of multiple fragments has remained a challenge due to poor efficiency of chromosomal insertions in magnetotactic bacteria.

The MamJ protein of *Magnetospirillum* species consists of three conserved domains of highly biased amino acid composition. The most prominent sequence feature of MamJ is the hypervariable central acidic repetitive (CAR) domain. We found extensive intra- and interspecies sequence variation within the CAR region between fully functional MamJ homologs of different *Magnetospirillum* species in the form of tandem repeat polymorphism. For comparison, other magnetosome proteins such as MamK, MamA, or the CDF-transporters MamB and MamM are much more conserved between various *Magnetospirillum* species with identity levels >93 % (data not shown).

The tandem repeat polymorphism among MamJ homologs, which has been probably caused by homologous recombination events between identical repeats, indicates that there is no or only low selective pressure for preservation of a defined structure to maintain protein functionality. On the other hand, variation of repeat copy numbers have been associated with variation of bacterial pathogenicity and human diseases, and generate functional variability in yeast (38) (20). Thus, the observed variability might be a so-far unrecognized source of genetic and phenotypic diversity of magnetosome organization and provide a mean for rapid adaptation to the environment, e. g. by the modification of magnetosome organization as observed in other MTB species.

The conspicuous Glu-Pro rich tandem repeat units within the CAR domain were expected to impart properties essential for the entire protein because clusters of charged residues increase protein solubility and contribute to both protein complex formation and repulsion between protein assemblages by electrostatic interactions (10), while on the other hand Pro-rich regions often are of structural importance (1, 39). Repetitions of Glu-Pro segments have been identified in a number of other eukaryotic and prokaryotic proteins. Although their exact function is mostly unknown, they are assumed to be of functional



importance because of structural constraints that they confer upon the entire protein. For example, the bacterial periplasmic TonB protein, which is required for the uptake of several solutes, contains repeated Glu-Pro and Lys-Pro dipeptides separated by a short segment of 13 residues (3). Engineered TonB mutant proteins, in which the Pro-rich sequences were eliminated, retained functionality in *E. coli* grown under standard laboratory conditions. However, mutant TonB activity was reduced under osmolytic conditions that increase the periplasmic space (17, 18, 23), indicating that this domain is required for TonB function only under very specific environmental conditions. Contrary to our expectations, our data suggest no obvious function of this conspicuous sequence region, because engineered MamJ variants lacking these repeats were fully functional in restoration of magnetosome chain formation. However, we cannot exclude that the Glu-Pro rich repeats confer a less obvious function, which has not become apparent under the experimental conditions as described. For instance, non-native protein levels due to *in trans* expression of MamJ might have compensated more subtle phenotypes of MamJ alleles lacking the CAR domain, which could have escaped our notice. Thus, we can not entirely rule out a possible regulatory function of the Glu-Pro rich repeats, for instance by modulating the strength of the vesicle attachment to the MamK based filaments.

Two-hybrid systems have been widely applied to either detect novel protein interaction partners, but also to identify minimal domains or residues critical for interaction between defined protein pairs (16, 22). Despite the potential caveat that interactions identified by two-hybrid experiments are not always fully representative, our study indicates that MamJ possesses two distinct protein-protein interaction domains: One located in the C-terminal, and a second one in the N-terminal region. We were able to narrow down the N-terminal interacting domain to residues 23 to 81, which are located upstream of the CAR domain, while the C-terminal interacting domain encompasses residues 295 to 368. However, we assume the C-terminal interaction motif to be even smaller than 74 residues, because our complementation study suggested the Ala-rich domain (residues 293 to 334) to be dispensable for MamJ function. The capacity of Ala-rich domain of binding to MamJ and MamK might arise from a few residues in its C-terminus that are part of a larger interaction motif primarily spanning the sequence region between Ala-rich and Gly-rich domain. However, both identified interaction domains show MamJ-binding, and thus might

confer MamJ oligomerization, although the putative function of homo-oligomerization remains elusive. In addition, we found both domains to interact with MamK, which is a prerequisite for MamJ's function to align magnetosomes along filamentous MamK. Although the subcellular localization of MamK was predicted to be cytoplasmic, it was recently identified to be associated with the magnetosome membrane (MM) by proteomic analysis of magnetosomes in *M. magneticum* (36), which might be due to tight binding to MM-associated MamJ. However, the presented indications here, for a physical interaction between MamK and MamJ require additional confirmation by other techniques, such as pull-down or co-immunoprecipitation assays.

We previously observed cytoplasmic localization of MamJ-EGFP if expressed in the 40-kb deletion mutant MSR-1B, suggesting that MamK and/or other determinants encoded within the magnetosome island specifically direct the linear localization of MamJ. In contrast, intracellular localization of MamK appears to be independent from its cognate interaction partner, despite of the observed interaction with MamJ. When expressed in both the  $\Delta mamJ$  mutant and strain MSR-1B (data not shown), MamK-EGFP generated a linear fluorescence signal, which was consistent with the position of the magnetosome chain. An essentially identical localization of fluorescently-tagged MamK was found in a  $\Delta mamK$  mutant of *M. magneticum* and *E. coli*, suggesting MamK to oligomerize into a filament independently of MamJ or other magnetosome membrane proteins (14, 24). However, reported localization patterns of fluorescent MamK fusion proteins seem confined to the length of a magnetosome chain and do not fully extend from pole to pole, as observed for example for MamA-GFP or MamJ-EGFP. As this in conflict with the pole-to-pole localization of the protein filaments observed by cryo-ET, it will require further clarification (13, 15, 26).

In conclusion, our study provides further evidence that chain assembly in MTB is structurally and mechanistically complex and under subtle genetic control. Next questions to be solved are the process of magnetosome attachment to the MamK filaments and the mechanism driving the dynamic localization of magnetosomes, and it further remains to be shown whether components in addition to MamK and MamJ are involved in magnetosome chain formation.

## Materials and methods

### Bacterial strains and media

Strains *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (DSM6361), strain MSR-1 $\Delta$ *mamJ* (26), MSR-1B (28), *M. magnetotacticum* MS-1 (ATCC31632) and the two novel isolates *Magnetospirillum* strains CF-2 and CF-3, which are closely related to *Magnetospirillum* sp. MSM-6 (32); (5) were used. Liquid cultures of all *Magnetospirillum* strains were grown in modified FSM medium (8). For growth of *Escherichia coli* strain BW29427 (a *dap* auxotroph derivative of strain B2155 kindly provided by Barry Wanner), LB broth was supplemented with DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimelic acid (Sigma-Aldrich, Switzerland) to 1 mM. Media for the *E. coli* BacterioMatch II validation reporter strain (Stratagene, La Jolla, CA) was prepared according to the instruction manual of the BacterioMatch II kit. Culture conditions for *E. coli* strains were as previously described (25).

### DNA techniques

Total DNA from all *Magnetospirillum* strains used in this study was isolated as described previously (19). Genetic constructs used in complementation- and two-hybrid studies were generated using standard PCR procedures. Primer and plasmids used in this study are shown in Supplementary Table 1, 2. Primer sequences for amplification of DNA fragments from *M. gryphiswaldense* MSR-1 were deduced from GenBank sequence deposition BX571797. The primer pair used for the amplification of *mamJ* from *Magnetospirillum* strains MS-1, CF-2, and CF-3 was deduced from sequence deposition NZ\_AAAP01003824.1. For sequencing BigDye terminators v3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) were used. Sequence data were analyzed with Lasergene 6 (DNASTAR Inc., Madison, WI) and MacVector 7.0 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, United Kingdom) programs.

### Complementation studies

For genetic complementation of the  $\Delta$ *mamJ* mutant, full-length and mutated *mamJ* constructs were inserted in *EcoRI*-*XbaI* restricted pBBR1MCS-2 (Supplementary Table 1) and introduced into the recipient strain *M. gryphiswaldense* MSR-1 $\Delta$ *mamJ* by biparental conjugation with *E. coli* BW29427 as a donor. Kanamycin-resistant transconjugants of strain  $\Delta$ *mamJ* were selected essentially as described (35). Full-length *mamJ* from *M.*

*gryphiswaldense* was amplified using primer pair ASmamJs\_f/ASmamJe\_r1 and *mamJ* from strains MS-1, CF-2 and CF-3 was amplified using ASmamJ-MS1\_f/ ASmamJ-MS1\_r. Genetic constructs encoding N-terminal truncated MSR-1 MamJ proteins JΔ1-24 and JΔ1-45 were amplified using primer pairs ASmamJ-N24AS\_f/ASmamJe\_r1 and ASmamJ-N45AS\_f/ASmamJe\_r1 respectively. Constructs encoding the C-terminal truncated MamJ proteins J1-392 and J1-386 were amplified with forward primer ASmamJs\_f in combination with backward primers ASmamJ-34AS\_r and ASmamJ-40AS\_r respectively. MamJ constructs containing internal deletions were generated by fusion PCR (9) of partially overlapping DNA fragments as PCR template by using flanking primers ASmamJs\_f/ASmamJe\_r1. For construction of *mamJ* mutant construct JΔ81-256, fusion PCR was done with overlapping DNA fragments amplified by using primer pairs ASmamJs\_f/ASmamJ-otr\_r and ASmamJ-otr\_f/ASmamJe\_r1, for construct JΔ136-294 using ASmamJs\_f/ASmamJ-oad\_r and ASmamJ-oad\_f/ASmamJe\_r1, for construct JΔ293-334 using ASmamJs\_f/ASmamJ-ala\_r and ASmamJ-ala\_f/ASmamJe\_r1, and for JΔ335-360 using ASmamJs\_f/ASmamJ-lag\_r and ASmamJ-lag\_f/ASmamJe\_r1. Internal deletion constructs of MamJ have the following characteristics: JΔ81-256 lacks the tandem repeat consisting of two 88 amino acid repeat units, JΔ136-294 lacks about 76 % of the central acidic repetitive domain, JΔ293-334 lacks the entire Ala-rich domain and JΔ335-360 lacks the sequence region between Ala-rich and Gly-rich domain. Cell growth and magnetic response ( $C_{\text{mag}}$ ) of cultures were measured turbidimetrically at 565 nm as previously described (33) (for practical purposes,  $C_{\text{mag}}=0$  was assumed for non-magnetic cells). To inactivate cell motility, cell suspensions were either treated with formaldehyde (0.002 vol of a 37 % aqueous formaldehyde solution (Fluka, Switzerland) was added) or heat inactivated (60 °C for 20 min) prior to  $C_{\text{mag}}$  measurements. By TEM inspection of more than 300 wild-type cells we found that more than 99 % of all cells had a linear, continuous chain of at least 10 magnetite crystals. Consequently, we considered complementation constructs capable of restoring wild-type chains when  $\Delta\textit{mamJ}$  mutant cells containing magnetosomes arranged in such manner. Proper expression of the complementation constructs was verified by immunoblotting of protein crude extracts from complemented *M. gryphiswaldense* $\Delta\textit{mamJ}$  cultures using a polyclonal antiserum raised against MamJ.

### **Construction of MamK-EGFP**

A *mamK-egfp* fusion was generated by fusion PCR (9) using primer pairs ASmamKs\_f/ASmamKe\_r4 and ASegfp\_f11/ASegfp\_r3. The *mamK-egfp* fusion gene was cloned into the *EcoRI* and *XbaI* sites of vector pBBR1MCS-2 for expression. In the fusion protein, a –Gly-Ser- spacer lies between MamK and EGFP, the initiator ATG *met* codon of EGFP is replaced by the ATC *ile* codon, and the initiator CTG *leu* codon of MamK is replaced by the ATG *met* codon.

### **Immunoblot assay**

Western blotting was performed as previously described (34). For MamJ detection a primary antibody was raised against the 15-amino acid epitope (APLAGNAESSEEGVV), which is present twice in full-length MamJ (one copy in each 88 aa repeat unit). Alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

### **Electron microscopy and fluorescence microscopy**

Transmission electron microscopy was performed on a Zeiss EM 10 (PLANO, Wetzlar, Germany) with unstained cells adsorbed on carbon-coated copper grids.

Fluorescence microscopy was performed on a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped with a cooled CCD camera. Images were acquired using Metamorph 6.3 (Universal Imaging Corp.) at exposure times between 1-3.0 s. Image rescaling and cropping was done using Photoshop 6.0. Cell membranes were stained with the fluorescent dye FM4-64 (Molecular Probes) at a final concentration of 30  $\mu$ M.

### **Bacterial two-hybrid assay**

Protein-protein interactions were investigated using the BacterioMatch II two-hybrid system vector kit and the BacterioMatch II validation reporter strain (Stratagene). To detect putative protein-protein interactions the BacterioMatch II validation reporter strain was co-transformed with a pBT-derived bait expression vector (encodes fusion of bacteriophage  $\lambda$  repressor protein ( $\lambda$ cI) with protein to test for protein binding activity) and a pTRG-derived prey expression vector (encodes fusion of alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase ( $\alpha$ RNAP) with protein to test for protein binding activity). Growth of the co-transformants

on selective screening medium plates containing 2.5 mM 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) was assessed according to the manufacturers instructions. For construction of bait and prey expression vectors full-length wild-type *mamJ*, full-length *mamK*, and partial *mamJ* sequences were in-frame inserted into *EcoRI-XhoI* restricted pBT and pTRG (Supplementary Table 1). Hence, expression vectors pBT\_MamJ and pTRG\_MamJ contained full-length wild-type *mamJ* while pBT\_MamK and pTRG\_MamK harbored *mamK*. Bait and prey fusions with the N-terminal sequence of MamJ were encoded by vectors pBT\_J1-135 and pTRG\_J1-135. Only prey expression vectors were constructed with sequence regions encoding MamJ constructs J81-256 (pTRG\_J81-256), J136-294 (pTRG\_J136-294), J295-334 (pTRG\_J295-334), J330-368 (pTRG\_J330-368), and J361-399 (pTRG\_J361-399). For construction of pTRG-based expression vectors for MamE (pTRG\_MamE) and MamP (pTRG\_MamE), *mamE* and *mamP* were inserted into *EcoRI-XhoI* sites of pTRG while for MamA (pTRG\_MamA) *EcoRI-SpeI* restriction sites of pTRG were used. Expression of pTRG encoding MamJ fusion constructs, containing the epitope targeted by the anti-MamJ peptide antibody, was confirmed by immunoblotting.

### **Acknowledgment**

We are grateful to Barry L. Wanner and Kirill A. Datsenko (Purdue University, Indiana, US) for generously providing strain BW29427. We thank Emanuel Katzmann for help with two-hybrid studies. This work was supported by the BMBF BioFuture program and the Max Planck Society. We are grateful to Wolfgang Heyser and Anke Toltz (University of Bremen, Germany) for support and access to the electron microscope. The continued support of Friedrich Widdel (Dept. Microbiology, MPI Bremen) is greatly acknowledged.

**Supplementary Table 1: Plasmids.**

<b>Plasmid</b>	<b>Description</b>	<b>Source or reference</b>
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , <i>lacZα</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pAS50	pBBR1MCS-2 with wild-type (wt) <i>mamJ</i> (encoding J426) of <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS51	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> of <i>Magnetospirillum</i> strain CF-2 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS53	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> of <i>Magnetospirillum</i> strain CF-3 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS55	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> of <i>M. magnetotacticum</i> strain MS-1 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS87	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ81-256 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS88	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ136-294 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS90	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct J1-386 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS91	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct J1-392 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS92	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ1-24 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS93	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ1-45 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS94	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ293-334 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pAS95	pBBR1MCS-2 with <i>mamJ</i> construct JΔ335-360 inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pASG5	pBBR1MCS-2 with <i>mamK-egfp</i> inserted between <i>EcoRI-XbaI</i> restriction sites	This work
pBT	Cm <sup>r</sup> , Two-hybrid bait fusion expression vector	Stratagene
pBT-LGF2	Cm <sup>r</sup> , Two-hybrid control plasmid	Stratagene
pBT_MamJ	pBT with wt <i>mamJ</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pBT_MamK	pBT with <i>mamK</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pBT_J1-135	pBT with <i>mamJ</i> construct J1-135 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work

pTRG	Tc <sup>r</sup> , Two-hybrid target fusion expression vector	Stratagene
pTRG-Gal11 <sup>P</sup>	Tc <sup>r</sup> , Two-hybrid control plasmid	Stratagene
pTRG_MamJ	pTRG with wt <i>mamJ</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_MamK	pTRG with <i>mamK</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_MamA	pTRG with wt <i>mamA</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-SpeI</i> restriction sites	This work
pTRG_MamE	pTRG with wt <i>mamE</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_MamP	pTRG with wt <i>mamP</i> of strain MSR-1 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J1-135	pTRG with <i>mamJ</i> construct J1-135 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J81-256	pTRG with <i>mamJ</i> construct J81-256 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J136-294	pTRG with <i>mamJ</i> construct J136-294 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J295-334	pTRG with <i>mamJ</i> construct J295-334 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J330-368	pTRG with <i>mamJ</i> construct J330-368 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work
pTRG_J361-399	pTRG with <i>mamJ</i> construct J361-399 inserted between <i>EcoRI-XhoI</i> restriction sites	This work

## Supplementary Table 2: Primer.

Name	Target/Position <sup>a</sup>	Sequence (5' - 3')
ASmamJs_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1-19	<u>GAATTC</u> ATGGCAAAAAACCGGCGTG
ASmamJe_r1	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1251-1281	<u>TCTAGACT</u> ATTTATTCTTATCTTCAGCATCACATTC
ASmamJ-34AS_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1157-1176	<u>TCTAGACT</u> AAACGAGGCGGCCCTCCCTTGA
ASmamJ-40AS_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1139-1158	<u>TCTAGACT</u> AGACCACTCCATCGACGAATC
ASmamJ-N24AS_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /73-90	<u>GAATTC</u> ATGGAGATTGTTTCGGTGACG
ASmamJ-N45AS_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /136-154	<u>GAATTC</u> ATGGGCGACATTTGGGCTAGCT
ASmamJ-ala_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1003-1017	<u>TTCGAGTATTCG</u> CAGACCCGCCAGCCTAAC
ASmamJ-ala_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /862-876	<u>GTTAGGCTGG</u> CGGGTCTGCGAATACTCGAA
ASmamJ-lag_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /1081-1095	<u>GTGGCGGT</u> CGAAGCCGGGGGATTTCGGC
ASmamJ-lag_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /988-1002	<u>GCCGAAAT</u> CCCCCGGCTTCGACCGCCAC
ASmamJ-otr_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /223-240	<u>AACCGGCG</u> CGGGTCTGGAACGAATGGG
ASmamJ-otr_f	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /769-780	<u>CCCATTCG</u> TCCCAGGACCCCGCGCCGTT
ASmamJ-oad_r	<i>mamJ</i> <sup>b</sup> /388-405	<u>CAATCCGCT</u> GATGCAACGCTCGGCTGGACATCAATCAC



ASmamJ-oad_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /886-903	<u>GTGATTGATGTCCAGCCGAGCGTTGCATCAGCGGATTTG</u>
ASmamJ-MS1_f	<i>mam</i> <sup>J</sup> /1-32	<u>GAATTC</u> ATGGCGAATAACCGGCGAGATCGCGACAAAGG
ASmamJ-MS1_r	<i>mam</i> <sup>J</sup> /1147-1173	<u>TCTAGACT</u> ATTTTTCTTGCCACCGTATCGCA
ASmamKs_f	<i>mam</i> <sup>Kb</sup> /4-18	<u>GAATTCGGAGGCTTCATATGTGGATTGATCTGTTA</u>
ASmamKe_r4	<i>mam</i> <sup>Kb</sup> /1063-1080	<u>GATCGAGCCCTGACCGGAAACGTCACC</u>
ASegfp_f11	<i>egfp</i> <sup>A</sup> /4-21	<u>TCCGGTCAGGGCTCGATCGTGAGCAAGGGCGAGGAG</u>
ASegfp_r3	<i>egfp</i> <sup>A</sup> /697-720	<u>TCTAGATTACTTGACAGCTCGTCCATGCC</u>
ASmamJ_pBT_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1-19	<u>GAATTC</u> GATGGCAAAAAACCGGCGTG
ASmamJ_pTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1-19	<u>GAATTC</u> AGATGGCAAAAAACCGGCGTG
ASmamJe_r9	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1251-1281	<u>CTCGAGCT</u> ATTTATTCTTATCTTACGATCACATTC
ASmamK_pBT_f	<i>mam</i> <sup>Kb</sup> /1-21	<u>GAATTC</u> CCTGTGGATTGATCTGTTAGCA
ASmamK_pTRG_f	<i>mam</i> <sup>Kb</sup> /1-21	<u>GAATTC</u> TGTGGATTGATCTGTTAGCA
ASmamK_pTRG_r2	<i>mam</i> <sup>Kb</sup> /1058-1082	<u>CTCGAGT</u> CACTGACCGGAAACGTCACCAAGCT
ASmamA_pTRG_f	<i>mam</i> <sup>A</sup> /1-16	<u>GAATTC</u> AGATGTCTAGCAAGCCGT
ASmamA_pTRG_r	<i>mam</i> <sup>A</sup> /640-654	<u>ACTAGTT</u> TAGACGGCCGAACG
ASmamP_pTRG_f	<i>mam</i> <sup>Pb</sup> /1-16	<u>GAATTC</u> AGATGAATAGCAAACCTCG
ASmamP_pTRG_r	<i>mam</i> <sup>Pb</sup> /796-813	<u>CTCGAGCT</u> AATTTATCACGTGGCA
ASmamE_pTRG_f	<i>mam</i> <sup>Eb</sup> /1-24	<u>GAATTC</u> AGATGACCATGTTCAATGGTGATGTG
ASmamE_pTRG_r	<i>mam</i> <sup>Eb</sup> /2302-2319	<u>CTCGAGT</u> CAAAGAACAATCCAGAA
ASglyTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1081-1095	<u>GAATTC</u> AGGGGGGATTTCGGC
ASgly_r1	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1186-1197	<u>CTCGAGCT</u> ACCCGGCGACCAC
ASalaTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /883-899	<u>GAATTC</u> AGAGCGTTGCATCAGCGGA
ASala_r	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /988-1002	<u>CTCGAGCT</u> AGGCTTCGACCGCCAC
ASlinkA-GTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /988-1001	<u>GAATTC</u> AGGTGGCGGTGCGAAGC
ASlinkA-G_r	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /1094-1104	<u>CTCGAGCT</u> ATCCGGCGACGC
ASgluTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /406-417	<u>GAATTC</u> AGGAAACGGATGCC
ASglu_r	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /868-882	<u>CTCGAGCT</u> ACTCCGCCTGCGAATA
ASlarger_r	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /488-504	<u>CTCGAGCT</u> ATTCGGCTCGACTTCGG
ASlargerTRG_f	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /241-255	<u>GAATTC</u> AGCCTGTGCCGTTGCC
ASN-termi_r	<i>mam</i> <sup>Jb</sup> /391-405	<u>CTCGAGCT</u> ACGGCTGGACATCAAT

Restriction sites are underlined. Additional nucleotides which do not bind to the template sequence during PCR.

<sup>a</sup>Position within the target sequence.

<sup>b</sup>Gene of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 (Sequence deposition number BX571797).

<sup>c</sup>Gene of *Magnetospirillum magnetotacticum* strain MS-1 (Sequence deposition number NZ\_AAAP01003824.1).

<sup>d</sup>Targets the *egfp* gene from vector pEGFP-N3 (Sequence deposition number U57609).

## References

1. **Ball, L. J., R. Kuhne, J. Schneider-Mergener, and H. Oschkinat.** 2005. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**:2852-2869.
2. **Blakemore, R. P.** 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* **190**:377-379.

3. **Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal-transduction through the Gram-negative outer-membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:295-307.
4. **Dove, S. L., J. K. Joung, and A. Hochschild.** 1997. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**:627-630.
5. **Flies, C., J. Peplies, and D. Schüler.** 2005. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2723-2731.
6. **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**:1040-1050.
7. **Grünberg, K., C. Wawer, Tebo B. M., and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4573-4582.
8. **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.
9. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
10. **Karlin, S., V. Brendel, and P. Bucher.** 1992. Significant similarity and dissimilarity in homologous proteins. *Mol. Biol. Evol.* **9**:152-167.
11. **Kirschvink, J. L.** 1982. Paleomagnetic evidence for fossil biogenic magnetite in western Crete. *Earth Planet. Sci. Lett.* **59**:388-392.
12. **Kobayashi, A., J. L. Kirschvink, C. Z. Nash, R. E. Kopp, D. A. Sauer, L. E. Bertani, W. F. Voorhout, and T. Taguchi.** 2006. Experimental observation of magnetosome chain collapse in magnetotactic bacteria: Sedimentological, paleomagnetic, and evolutionary implications. *Earth Planet. Sci. Lett.* **245**:538-550.

13. **Komeili, A.** 2006. Cell biology of magnetosome formation. *In* D. Schüler (ed.), Magnetoreception and magnetosomes in bacteria. Springer, Heidelberg.
14. **Komeili, A., Z. Li, D. Newman, and G. Jensen.** 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**:242-245.
15. **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. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3839-3844.
16. **Ladant, D., and G. Karimova.** 2000. Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria. *Res. Microbiol.* **151**:711-720.
17. **Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh, and K. Postle.** 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for *in vivo* physical interactions. *J. Bacteriol.* **179**:3213-3221.
18. **Larsen, R. A., G. E. Wood, and K. Postle.** 1993. The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **10**:943-953.
19. **Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218.
20. **O'Dushlaine, C. T., E. J. Edwards, S. D. Park, and D. C. Shields.** 2005. Tandem repeat copy-number variation in protein-coding regions of human genes. *Genome Biology* **6**.
21. **Philipse, A., and D. Maas.** 2002. Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: Chain formation and colloidal stability. *Langmuir* **18**:9977-9984.
22. **Phizicky, E. M., and S. Fields.** 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* **59**:94-123.
23. **Postle, K., and R. J. Kadner.** 2003. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**:869-882.

24. **Pradel, N., C. Santini, A. Bernadac, Y. Fukumori, and L. Wu.** 2006. Biogenesis of actin-like bacterial cytoskeletal filaments destined for positioning prokaryotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:17485–17489.
25. **Sambrook, J., and D. Russel, W.** 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
26. **Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, P. L. Graumann, J. M. Pitzko, and D. Schüler.** 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**:110-115.
27. **Scheffel, A., and D. Schüler.** 2006. Magnetosomes in magnetotactic bacteria. *In* J. M. Shively (ed.), *Inclusions in prokaryotes*, vol. 1. Springer, Berlin / Heidelberg.
28. **Schübbe, S., M. Kube, 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**:5779-5790.
29. **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**:5757-5765.
30. **Schüler, D.** 2006. *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*. Springer, Heidelberg.
31. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**:1-7.
32. **Schüler, D., S. Spring, and D. A. Bazylinski.** 1999. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:466-471.

33. **Schüler, D., R. Uhl, and E. Baeuerlein.** 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. FEMS Microbiol. Let. **132**:139-145.
34. **Schultheiss, D., R. Handrick, D. Jendrossek, M. Hanzlik, and D. Schüler.** 2005. The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bounded protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J. Bacteriol. **187**:2416-2425.
35. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Arch. Microbiol. **179**:89-94.
36. **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**:5234-5247.
37. **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**:7176-7184.
38. **Verstrepen, K. J., A. Jansen, F. Lewitter, and G. R. Fink.** 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. Nat. Genet. **37**:986-990.
39. **Williamson, M. P.** 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. Biochem. J. **297**:249-260.



**Size of magnetite crystals is controlled by the cumulative action  
of MamGFDC proteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense***

André Scheffel<sup>1</sup>, Astrid Gärdes<sup>1</sup>, Karen Grünberg<sup>1</sup>, Gerhard Wanner<sup>2</sup>  
and Dirk Schüler<sup>1,2</sup>

In Vorbereitung

Manuskript 4

<sup>1</sup> Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

<sup>2</sup> present address: Ludwig Maximilians-University, Fakultät f. Biologie, Bereich Mikrobiologie,  
Maria-Ward-Str. 1a, D-80638 München, Germany

## Abstract

Magnetosomes of magnetotactic bacteria (MTB) are specific organelles, which are membrane-bounded crystals of a magnetic mineral, which enable the cells to orient in the Earth's magnetic field. A set of several MTB-specific proteins are associated with the magnetosome membrane, which are expected to be involved in the molecular mechanisms of magnetosome and magnetosome chain formation, as has been shown recently for MamA, the acidic MamJ and the actin-like MamK protein. However, the most abundant proteins in the magnetosome membrane are the products of the small *mamGFDC* operon, whose functions remain unknown since they have no homologs in the databases.

Here we generated a *mamC* and a *mamGFDC* deletion mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* to study the role of the MamGFDC proteins. Surprisingly, magnetosome formation was not impeded by deletion of the *mamGFDC* operon, suggesting that the most abundant proteins of the magnetosome membrane are not essential membrane constituents. While the deletion of *mamC* had only minor effects on the crystal formation inside the magnetosome vesicles, we found the *mamGFDC* deletion strain to produce magnetosome crystals of only 75 % wild -type size. The formation of smaller crystals by the *mamGFDC* mutant strain persisted at increased iron concentration, suggesting that crystal growth is not inhibited by a reduced flux of iron from the exterior into the magnetosome vesicles. Magnetosome vesicles in thin sections of wild-type and *mamGFDC* mutant cells were of almost equal size, indicating that spatial growth of crystals is not restricted by the vesicle size. By complementation analysis we demonstrate that the MamGFDC proteins act in a cumulative manner on the size of magnetosome crystals. Altogether, we conclude that the MamGFDC proteins act on the crystal size by either regulating the physico-chemical conditions with the interior of the magnetosome vesicles or more indirectly by recruiting other proteins which support the growth of crystals.



## Introduction

The ability of magnetotactic bacteria (MTB) to orient in the Earth's magnetic field is based on specific organelles, the magnetosomes, which are membrane-enveloped crystals of a magnetic mineral that are arranged in chain-like structures within the cell (5). Magnetosome crystals display a variety of species-specific shapes and sizes, which in most MTB are between 35 - 120 nm (3, 4). In MTB of the genus *Magnetospirillum*, cubo-octahedral nanocrystals of the magnetic mineral magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) are synthesized within magnetosome membrane (MM) vesicles, which have a roughly spherical shape and are formed by invagination from the cytoplasmic membrane prior to magnetite biomineralization (2, 16, 27). The MM is a phospholipid bilayer with a distinctive biochemical composition (8, 29, 35). In *M. gryphiswaldenese*, a specific set of 20 magnetosome membrane proteins (MMPs) was identified by biochemical and proteomic approaches (9, 10, 22). Although MMPs were assigned to several distinct protein families based on sequence similarity (29), their individual functions have remained largely unknown/were not revealed yet, and only few MMPs were characterized experimentally with respect to their role in magnetosome formation. For example, the tetratricopeptide repeat protein MamA, although not essential for magnetosome formation, was speculated to "activate" magnetosome vesicles for magnetite biomineralization by an unknown mechanism (15). The Mms6 protein is an MMP that *in vitro* exhibits iron-binding activity and affects crystal morphology in crystallization assays (1, 21). Another example is the acidic MamJ protein, which is involved in assembly and stabilization of magnetosome chains (25), probably by aligning the individual particles along a cytoskeletal magnetosome filament formed by the actin-like MamK protein (15, 20, 26).

Although these studies revealed that magnetosome formation is a complex process with strict control over MM-vesicle differentiation and formation, iron transport, and nucleation, growth and assembly of magnetite crystals, several aspects of magnetosome synthesis have remained poorly understood. For example, it is not clear how the species-specific shapes and sized of magnetite crystals are realized. In order to function efficiently in magnetic orientation, the crystal sizes and shapes have to be controlled precisely within the narrow magnetic single domain size range, as the magnetic properties of magnetite nanocrystals change dramatically with the particles dimensions (3, 7). The

isolation of spontaneous *M. gryphiswaldense* mutants, which produce smaller and aberrantly-shaped particles (14, 37), indicated that crystal dimensions are under genetic control. However, it is not known how this control is achieved at the structural, biochemical, and molecular level.

Genes for most MMPs are organized in several polycistronic operons within the conserved genomic magnetosome island (MAI) (22, 37). For example, a set of four small, abundant MMPs is encoded by the *mamGFDC* operon in *M. gryphiswaldense* and other magnetospirilla. Transcriptional analysis revealed that these genes are transcribed from a single promoter and are constitutively expressed (28). Whereas *mamG* is a *Magnetospirillum*-specific gene with no orthologs in the magnetic coccus MC-1, *mamD*, *mamF*, and *mamC* are part of the MTB-specific set of 28 "signature" genes revealed by a comparative genomics approach (22). This means that these genes are specifically associated with the magnetotactic phenotype and occur in all MTB analyzed so far, but do not have detectable homologs in any non-magnetic organism. Quantitative analysis of the MM subproteom of *M. gryphiswaldense* showed that the *mamG*, *mamF*, *mamD*, and *mamC* gene products collectively account for approximately 35 % of all magnetosome-associated polypeptides. The 12.4 kDa MamC protein represents the most abundant MMP. MamC was shown to be resistant against solubilization by weak detergents and is tightly associated with the MM as it (10), probably via two predicted transmembrane segments. In *M. magnetotacticum*, MamC was shown to be exclusively located in the MM by immunogold detection (36). The anchor properties of Mms13, a MamC homolog present in *M. magneticum*, were used to display functional proteins on the surface of magnetosomes in order to generate functionalized biogenic magnetic particles with potential use in numerous biotechnological applications (39). The second-most abundant protein identified in MM preparations is the 12.3 kDa MamF protein, which was shown to form stable oligomers in the presence of SDS, and which contains three predicted transmembrane segments (9). The hydrophobic proteins MamD (30.2 kDa) and the small MamG (7.7 kDa) protein are partially identical and share a conspicuous motif containing a Leu-Gly-dipeptide repeat, which is reminiscent to repetitive sequences found in self-aggregating framework proteins that are implicated in several biomineralization processes (6, 34). Based on their high abundance in the MM, their exclusive occurrence and high conservation in all MTB,

MamC and the other gene products of the *mamGFDC* operon were suggested to play a key role in magnetite crystal formation (29, 36, 39). However, until present, their specific roles in magnetosome formation have remained entirely elusive.

This study was initiated to analyze the functions of the MamGFDC proteins. By analysis of deletion mutants lacking either *mamC* or the entire *mamGFDC* operon we show that, unexpectedly, neither MamC nor MamG, MamF, and MamC are essential for magnetite biomineralization. However, by complementation analysis we further demonstrate that size and shape anisotropy of magnetosome crystals is controlled by the cumulative action of the *mamGFDC* proteins, which are specifically located at the MM.

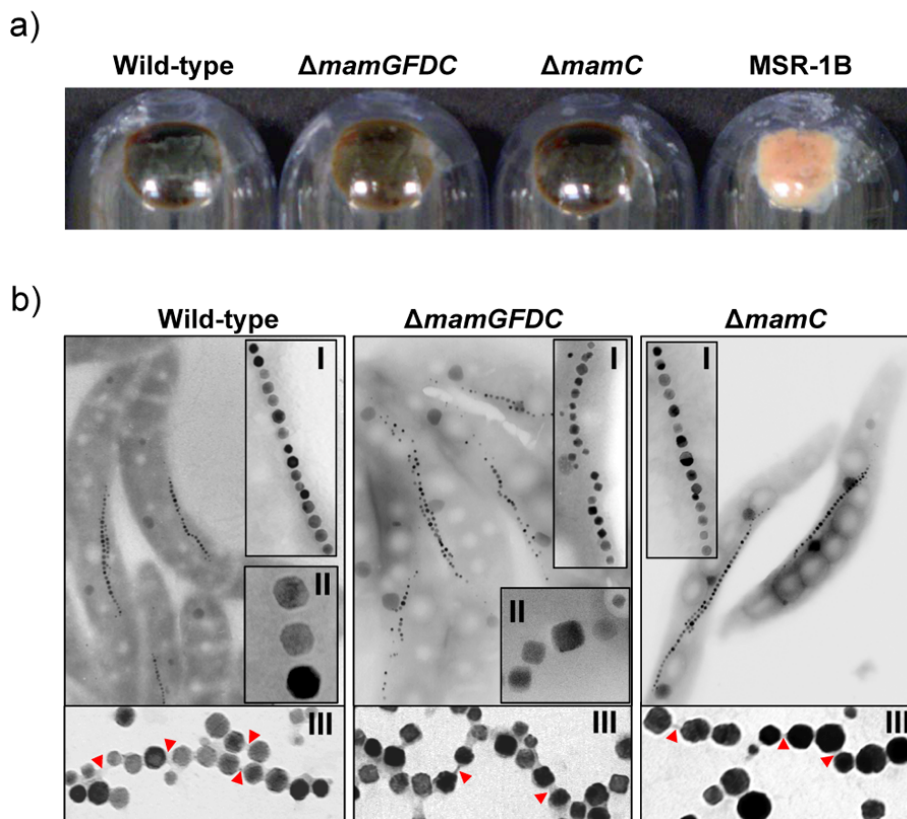
## Results

### Loss of MamC has only minor effects on magnetite crystal formation

Under the microscope, cells of the  $\Delta$ *mamC* mutant exhibited a magnetic reaction and formed brown colonies virtually identical to those of the wild-type. In electron micrographs, magnetosomes were found arranged in chains and had sizes and shapes very similar to the wild-type (Fig. 1b). Size measurement of 225 magnetosome from  $\Delta$ *mamC* mutant cells revealed that mature magnetite crystals were on average slightly smaller compared to those of the wild-type (Fig. 2, Tab. 1 & 2). Complementation of the mutant strain by pAS35 restored the formation of magnetosome sizes close to the wild-type range. Analysis of solubilized MMPs from the mutant by SDS-PAGE and Western blotting revealed the absence of the highly abundant 12.4 kDa MamC band from the resolved polypeptide pattern, which was otherwise virtually unchanged compared to the wild-type (data not shown). In electron micrographs isolated magnetosome particles from the mutant appeared identical to wild-type magnetosomes with respect to the presence of an organic membrane layer, the inter-particle spacing, and their tendency to rearrange in chains. (Fig. 1b), suggesting that the absence of MamC did not markedly affect the formation of a functional magnetosome membrane.

### Magnetosome crystals in a $\Delta mamGFDC$ mutant are smaller by about 25%

The unexpected finding that loss of the most abundant magnetosome protein MamC had only a minor effect on magnetosome biomineralization raised the question of the functions of the other abundant MMPs encoded by the *mamGFDC* operon. Therefore, a deletion mutant lacking the entire operon was constructed, which was designated strain  $\Delta GFDC$ . Cells of  $\Delta GFDC$  exhibited a magnetic response if checked by microscopic observation. However, in contrast to the dark brown wild-type and  $\Delta mamC$  mutant, colonies of strain  $\Delta GFDC$  only had a slightly brownish color (Fig. 1a). TEM micrographs of mutant cells revealed the presence of small magnetosome crystals that frequently had a cuboidal shape, and were aligned in irregular, widely-spaced chains (Fig. 1b, Tab. 1).



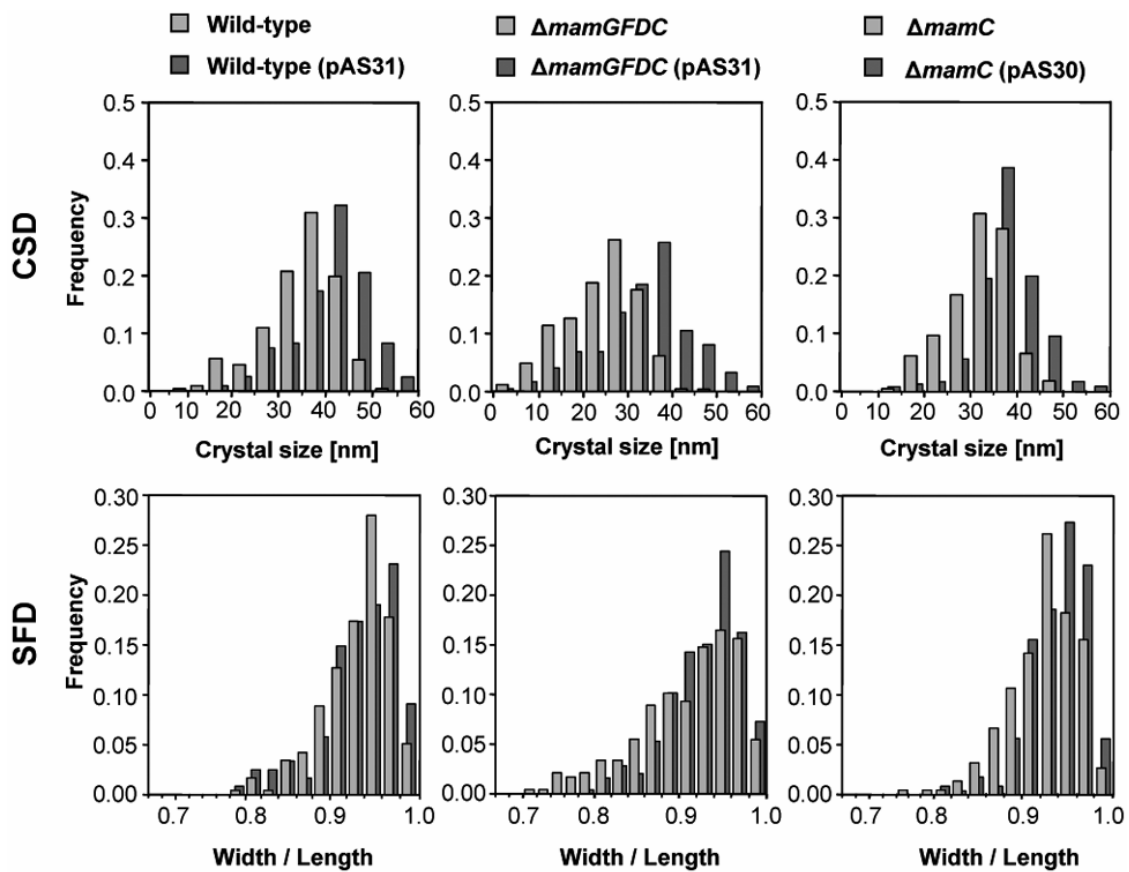
**Figure 1:** Phenotypic analysis of  $\Delta mamC$  and  $\Delta mamGFDC$  mutant strains. (a) Appearance of colony color on solid medium. For comparison a pellet of the magnetosome-free *M. gryphiswaldense* MSR-1B mutant is shown. (b) Transmission electron micrographs of wild-type,  $\Delta mamC$  and  $\Delta mamGFDC$  cells. Insets show (I) magnification of a prevalent magnetosome chain, (II) prevalent crystal shapes and (III) purified magnetosomes which were negative stained with uranyl-acetate. Arrowheads indicate magnetosome membrane junctions between isolated crystals.

Analysis of more than 220 crystals confirmed that mutant crystal size distribution (CSD) is shifted towards smaller sizes (Mann-Whitney probability value determined for CSD of wild-type and of  $\Delta$ GFDC crystals is  $p=2.77E-8$ , indicating that difference is statistically significant). For the mutant, crystals between 25 - 30 nm occurred at highest frequency, whereas crystals larger 30 nm were of low abundance, accounting for only 24.3 % in the analyzed population. In contrast, crystals between 35 -- 40 nm in size were most abundant in the wild-type, thus crystals larger 30 nm had a significantly higher frequency of 77.5 %. Maximum sizes of crystals without obvious crystal defects, such as twinning, were measured to 41.5 nm in mutant cells, and to 50.1 nm for the wild-type. In addition, mutant crystals showed more often anisotropic shapes (shape factor, SF) as only 37.4 % of analyzed crystals were equidimensional ( $SF > 0.94$ ) whereas 50.8 % of wild-type crystals had a  $SF > 0.94$ .

**Table 1:** Statistical parameter of crystal size and shape factor distributions (CSD and SFD) of magnetite crystals from wild-type and mutant strains of *M. gryphiswaldense*.

Strain	inter Crystal Space (nm)	Number of Crystals	CSD				SFD	
			Maximum (nm)	Mean (nm)	Median (nm)	Cut-off (nm)	Maximum	Mean
Wild-type	53±5	236	35-40	34.8	36.2	50.4	0.94-0.96	0.932
$\Delta$ GFDC	n.d.	235	25-30	24.1	25.3	41.5	0.94-0.96	0.908
$\Delta$ GFDC_GFDC	51.3±6.5	245	35-40	33.7	34.8	57.8	0.94-0.96	0.929
$\Delta$ GFDC_MCS2	n.d.	139	25-30	28.1	28.4	42.0	0.94-0.96	0.922
$\Delta$ GFDC_G	n.d.	169	30-35	30.6	31.7	42.7	0.92-0.94	0.914
$\Delta$ GFDC_F	n.d.	160	30-35	31.3	31.4	46.4	0.92-0.94	0.917
$\Delta$ GFDC_D	n.d.	179	30-35	32.6	33.1	42.7	0.94-0.96	0.922
$\Delta$ GFDC_C	n.d.	230	30-35	33.3	33.1	47.7	0.94-0.96	0.921
$\Delta$ GFDC_GD	n.d.	110	30-35	30.3	30.9	45.1	0.94-0.96	0.920
$\Delta$ GFDC_GC	n.d.	187	30-35	31.8	32.3	45.2	0.92-0.94	0.921
$\Delta$ GFDC_FD	n.d.	199	35-40	35.5	36.9	54.9	0.94-0.96	0.932
$\Delta$ GFDC_FC	n.d.	177	30-35	31.3	32.6	43.4	0.92-0.94	0.917
$\Delta$ GFDC_DC	n.d.	184	35-40	32.9	33.5	44.3	0.94-0.96	0.933
$\Delta$ GFDC_GFD	n.d.	141	30-35	31.0	32.8	55.1	0.96-0.98	0.921
$\Delta$ GFDC_GFC	n.d.	204	35-40	34.7	35.5	51.4	0.94-0.96	0.929
$\Delta$ GFDC_GDC	n.d.	182	35-40	33.0	34.5	46.3	0.90-0.92	0.917
$\Delta$ GFDC_FDC	n.d.	143	35-40	34.9	35.5	49.6	0.94-0.96	0.921
$\Delta$ C::Kan	51.3±8.5	225	30-35	31.9	33.4	49.1	0.92-0.94	0.925
$\Delta$ C_C	54.5±4.5	230	35-40	37.5	37.8	56.0	0.94-0.96	0.939

Complementation of strain  $\Delta$ GFDC with plasmid pAS31 harboring the entire *mamGFDC* cluster increased the size of mature magnetite crystals to wild-type size range. CSD and SF distributions of wild-type and complemented mutant strain were almost similar ( $p=2.11E-01$ ) which substantiates that the effects on the  $\Delta$ GFDC magnetosome crystals result from loss of the MamGFDC proteins (Fig. 2, Tab. 1 & 2).



**Figure 2:** Crystal size and shape factor distributions for the wild-type, the mutant strains  $\Delta$ *mamC* and  $\Delta$ *mamGFDC* and the complemented strains.

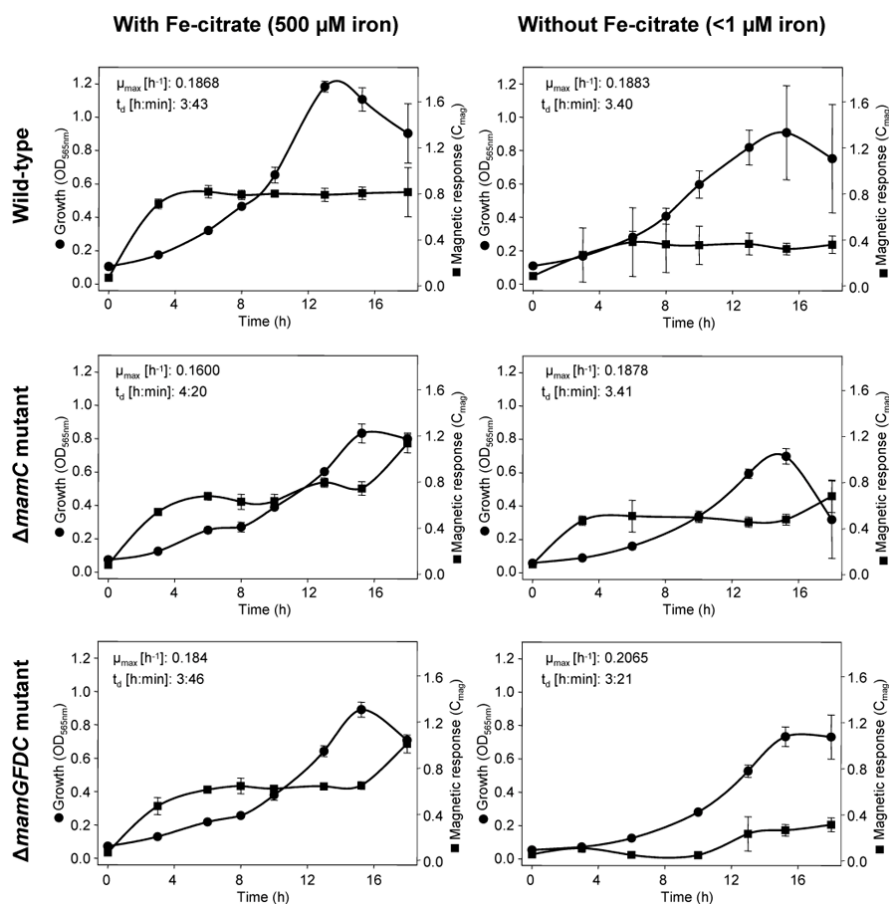
**Table 2:** Results of the Mann-Whitney significance test for CSD and SFD of magnetite crystals form wild-type and mutant strains of *M. gryphiswaldense*. \*Mann-Whitney probability test is statistically highly significant ( $P < 1E-03$ ).

	CSD		SFD	
	Wild-type	$\Delta$ GFDC	Wild-type	$\Delta$ GFDC
Wild-type		2.77 E-38*		2.54E-06*
$\Delta$ GFDC	2.77 E-38*		2.54 E-06*	
$\Delta$ GFDC_GFDC	2.11 E-01	2.55 E-27*	4.17 E-01	9.89 E-04*
$\Delta$ GFDC_MCS2	1.19 E-17*	4.80 E-06*	6.22 E-02	1.28 E-01
$\Delta$ GFDC_G	3.87 E-10*	7.60 E-17*	4.16 E-04*	6.04 E-01
$\Delta$ GFDC_F	2.52 E-07*	9.71 E-18*	1.75 E-03	3.75 E-01
$\Delta$ GFDC_D	4.32 E-06*	2.26 E-28*	2.97 E-02	7.69 E-02
$\Delta$ GFDC_C	1.21 E-03	5.48 E-34*	1.02 E-03	1.92 E-01
$\Delta$ GFDC_GD	3.81 E-08*	4.81 E-11*	5.04 E-02	1.70 E-01
$\Delta$ GFDC_GC	1.64 E-08*	1.61 E-24*	1.87 E-03	2.03 E-01
$\Delta$ GFDC_FD	4.56 E-01	1.42 E-37*	6.31 E-01	4.34 E-04*
$\Delta$ GFDC_FC	4.29 E-08*	3.90 E-20*	1.41 E-03	3.62 E-01
$\Delta$ GFDC_DC	1.36 E-04*	2.75 E-29*	6.71 E-01	8.40 E-05*
$\Delta$ GFDC_GFD	3.82 E-06*	1.57 E-12*	1.72 E-02	1.83 E-01
$\Delta$ GFDC_GFC	4.20 E-01	1.44 E-37*	4.04 E-01	1.58 E-03
$\Delta$ GFDC_GDC	1.87 E-03	2.62 E-27*	8.80 E-05*	6.26 E-01
$\Delta$ GFDC_FDC	7.00 E-01	5.00 E-30*	1.01 E-02	1.83 E-01
$\Delta$ C::Kan	6.12 E-07*	5.24 E-25*	1.95 E-02	3.70 E-02
$\Delta$ C_C	5.76 E-04*	2.35 E-06*	8.12 E-02	2.31 E-06*

### The formation of small magnetosome can not be compensated by increased iron concentration

We speculated that one possible reason for the formation of smaller (growth-inhibited) crystals could be a reduced flux of iron into the magnetosome vesicles. We therefore compared growth and magnetosome formation of the wild-type and the  $\Delta$ *mamC* and the  $\Delta$ *mamGFDC* mutant at low ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) and high iron ( $\sim 500 \mu\text{M}$ ) concentrations (Fig. 3). The formation of small magnetosome could not be compensated by increased iron, as indicated by TEM and  $C_{\text{mag}}$  measurements. Almost identical doubling times (3 h 40 min) were determined for the wild-type under both conditions, for  $\Delta$ GFDC at  $500 \mu\text{M}$  Fe, and for the  $\Delta$ *mamC* mutant under low iron conditions. Even though strain  $\Delta$ GFDC grew slightly faster at low iron, and growth of  $\Delta$ C was slightly slower at  $500 \mu\text{M}$  Fe, we found no substantial effect on growth caused by the deletion of *mamC* or *mamGFDC* genes. The development of

magnetic response after transfer to iron-sufficient conditions was similar in iron-starved wild-type and  $\Delta mamC$  cultures (Fig. 3). Freshly inoculated cultures were nearly non-magnetic ( $C_{mag} < 0.1$ ), and magnetic responses increased within the first 3 h of cultivation to a level which remained almost unchanged during further growth, indicating that the kinetics of magnetite formation are unaffected in the  $\Delta mamC$  mutant. Likewise, lack of the MamGFDC proteins did not affect the development of the magnetic response under high iron concentration. Under low iron concentrations, however, magnetic response of the  $\Delta mamGFDC$  cultures was close to lower detection limit during the first 10 h of cultivation which might result from slower growth of crystals to sizes of permanent magnetic remanence. At non-limiting iron concentrations for magnetite formation,  $C_{mag}$  values of  $\Delta mamGFDC$  cultures were slightly lower than those of the wild-type due to the less regular chain arrangement and smaller crystal size.



**Figure 3:** Growth and magnetic response of wild-type,  $\Delta mamC$  and  $\Delta mamGFDC$  mutant under high and low iron conditions.



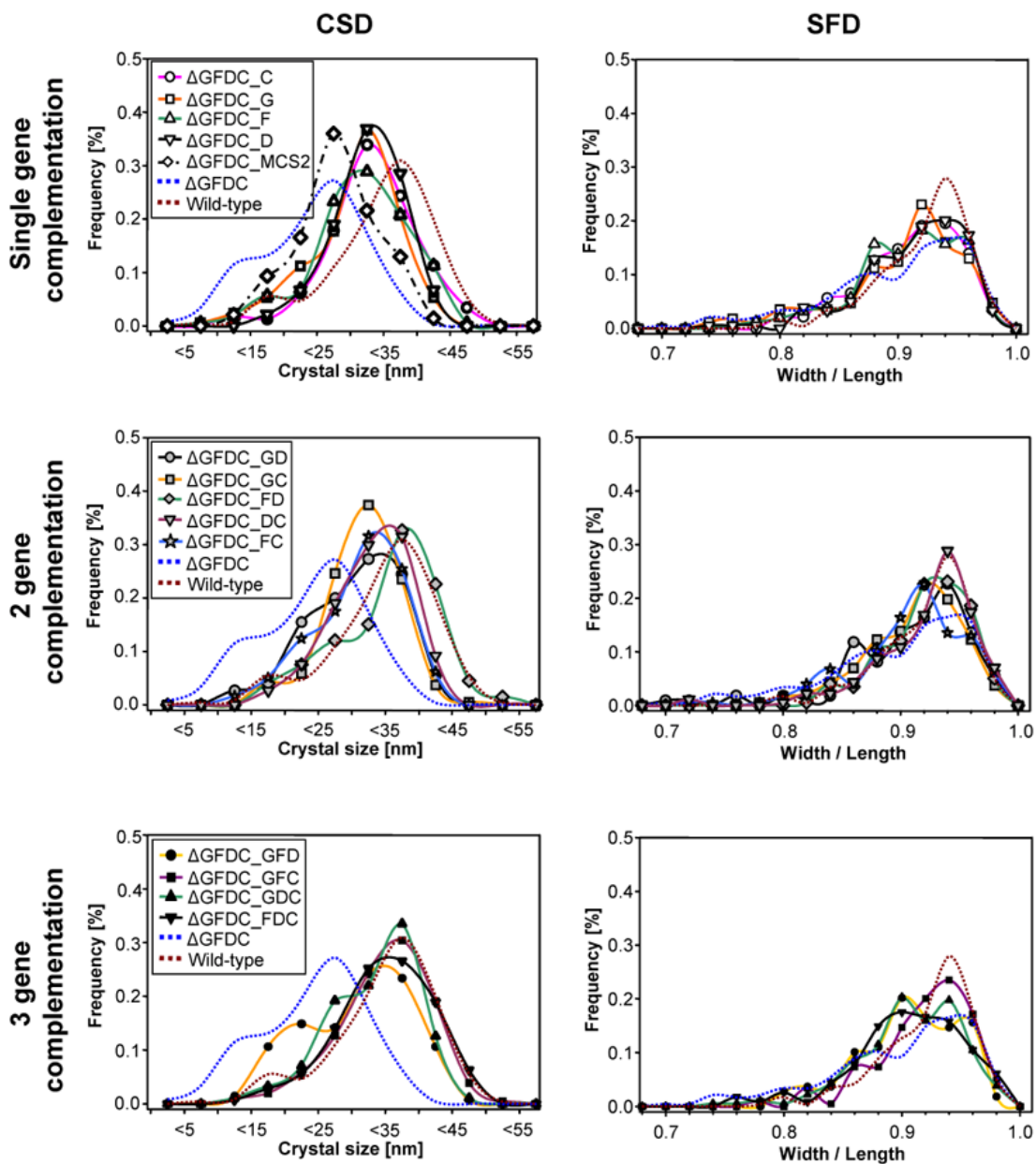
### **The $\Delta mamGFDC$ mutant contains regular magnetosome membrane vesicles**

Isolated  $\Delta mamGFDC$  magnetosomes were associated with an organic envelope suggesting that the formation of the magnetosome membrane was not severely affected by the deletion (Fig. 1). Iron-starved mutant and wild-type cell were further analyzed by thin-sectioning and TEM. Empty membrane vesicles were visible in micrographs of the mutant, which had the same shape and thickness of the membranes as in the wild-type (data not shown). Size measurements of about 50 vesicles in the mutant and the wild-type revealed that there is no significant difference in the vesicle diameter between both strains ( $P > 0.01$ ).

### **Complementation analysis of the $\Delta mamGFDC$ mutant strain**

After we had confirmed that the mutant phenotype of the mutant can be restored to wild-type level in the  $\Delta mamGFDC$  mutant by *in trans* complementation (Fig. 4, Tab. 1 & 2), we utilized the complementation assay to assess the contributions of the individual *mamGFDC* genes on to the observed effects on crystal size and shape development. Instead of constructing many different knockout mutants, 13 variants of the *mamGFDC* operon were constructed which permitted the *in trans* expression of individual genes of the operon as well as in any combination of genes in the  $\Delta mamGFDC$  mutant. Comparison of crystal sizes from different complemented mutants with those produced by the wild-type and the  $\Delta mamGFDC$  mutant showed in most cases that differences between CSDs are statistically significant, indicating that the complementation constructs had a measurable effect on crystal size. Strains complemented with only one of the four *mamGFDC* genes (strains  $\Delta GFDC\_G$ ,  $\Delta GFDC\_F$ , and  $\Delta GFDC\_D$ ) or with any two genes (strains  $\Delta GFDC\_GD$ ,  $\Delta GFDC\_GC$ ,  $\Delta GFDC\_FC$  and  $\Delta GFDC\_DC$ ) produced mature crystals larger than the  $\Delta mamGFDC$  mutant but smaller than the wild-type, suggesting that crystal size is not controlled by a single gene of the *mamGFDC* cluster (Fig. 4, Tab. 1 & 2). In contrast, strains complemented with any three of the four *mamGFDC* genes (strains  $\Delta GFDC\_GFC$ ,  $\Delta GFDC\_GDC$ , and  $\Delta GFDC\_FDC$ ) produced mature crystals of essentially wild-type size ( $p > 1E-03$ ) (Fig. 4, Tab. 1 & 2). Although CSD of strains  $\Delta GFDC\_C$ ,  $\Delta GFDC\_FD$ , and  $\Delta GFDC\_GFD$  represent minor deviations from the trend, it generally seems that restoration of wild-type-like crystal sizes requires at least three of the four MamGFDC proteins, almost independently of their combination. This suggests the

MamGFDC proteins to act in a cumulative manner on the crystals size. In contrast, we failed to detect a significant effect of individual MamGFDC proteins on crystal shape, as differences between SFDs of wild-type,  $\Delta mamGFDC$  mutant, and complemented mutant strains were mostly below significance (Fig. 4, Tab. 1 & 2).



**Figure 4:** Complementation analysis of the  $\Delta mamGFDC$  mutant. Size and shape factor distributions of magnetite crystals produced by  $\Delta mamGFDC$  strains *in trans* complemented with engineered variants of the *mamGFDC* cluster.

## Discussion

In this study we analyzed the function of the MamC and of the other abundant magnetosome membrane proteins (MMPs) encoded by the *mamGFDC* operon by targeted mutagenesis and complementation analysis. This was done by the establishment of an alternative mutagenesis approach utilizing the Cre-*loxP* system for antibiotic marker recycling (18) for generating the  $\Delta$ *mamC* mutant strain. As most *mam* and *mms* genes are arranged in polycistronic operons, mutagenesis strategies require the construction of unmarked in frame deletions, whose generation in MTB has remained very cumbersome due to difficulties in enforcing multiple double-crossover events. We found this system to provide an advantage over the conventional technique, and exchange of the targeted locus by a selective marker allows selection against revertant growth. In addition, marker recycling by the site-specific Cre recombinase enables the generation of strains bearing multiple genetic modifications with one selectable marker gene only.

Surprisingly, our analysis revealed that neither MamC nor MamG, MamF, and MamD, which together account for nearly 35 % of all MMPs, are essential for magnetite biomineralization. We found that the loss of the most abundant magnetosome protein MamC only had a minor effect on the size of mature crystals. Even the absence of all four proteins did prevent magnetosome formation not entirely. However, the loss of MamGFDC has a significant effect on crystal size and chain organization, indicating that these proteins might have regulatory or accessory functions. It was impossible to assign these functions to one of the individual MamGFDC proteins, as our complementation study of the  $\Delta$ *mamGFDC* mutant suggested that they have overlapping and partially redundant functions, and may collectively act on the crystal size. One possible explanation for the unexpectedly weak phenotype caused by their loss is the presence of a further *mamF*-like gene (*mmsF*) identified within the *mms6* operon (22) which might have a redundant function and partially might compensate the loss of the *mamGFDC* operon.

It remains unclear how MamGFDC act on the size of the magnetosome crystals. In principle, there are several different factors which may affect the growth of magnetite crystals, such as (i) the size and the shape of the vesicles which simply constrain crystal growth spatially, (ii) their interior, such as the charge distribution (iii) the flux of iron into

the vesicles, (iv) milieu inside the vesicle i.e. with respect to pH and redox conditions. Previous studies showed that size and shape of crystals of *M. gryphiswaldense* are affected by redox conditions during magnetite biomineralization, and partial or total inhibition of crystal growth was observed under highly oxidizing conditions, resulting in small and imperfect particles resembling those in the  $\Delta mamGFDC$  mutant strain (12), (v) regulatory processes that deactivate magnetosomes for magnetite formation. However, our observation that any combination of several different, unrelated proteins is capable of gradually restoring the mutant phenotype seems to argue against a specific regulatory function. The selective expression of different magnetosome proteins resulted in distinct mean particle sizes that consistently differed by only a few nanometers, while the number of magnetosomes per cell is not affected. Intriguingly, fine tuning of the MamGFDC expression might provide a powerful strategy for the precise control the particle size by genetic means. Size controlled magnetic nanoparticles by genetic engineering would be of great interest in a number of technological applications, since physical characteristics of MNP such as sedimentation stability or magnetic remanence are functions of the particle size (11, 38).

In conclusion, our study has demonstrated that magnetosome crystal size is under genetic control. Further studies are required to fully unveil the mechanistic action of the MamGFDC proteins and might address questions such as whether the abundance of the individual MamGFDC proteins in the magnetosome membrane regulates crystal/vesicle size or whether the MamF-like protein (MmsF) (22) is involved in regulating the magnetosome crystal size.

## **Materials and methods**

### **Bacterial strains, media and growth conditions**

Bacterial strains used in this study are listed in Table 3. Liquid cultures of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain R3/S1 (32) were grown in modified FSM medium (12). Colonies of *M. gryphiswaldense* were obtained on activated charcoal agar medium (ACAM) that was incubated microaerobically at 28°C (32). Growth experiments were carried out under micro-oxic conditions in 1-l flasks containing 100 ml

low- or high iron containing medium. Low-iron containing medium (LIM) essentially is FSM medium lacking yeast extract and ferric citrate, whereas for high-iron medium ferric citrate was added to 500  $\mu\text{M}$  to LIM. To grow magnetite free cells (no magnetic response), *M. gryphiswaldense* strains were passaged for 3 successive transfers in LIM. Optical densities and magnetic response ( $C_{\text{mag}}$ ) of *M. gryphiswaldense* cultures were measured turbidimetrically at 565 nm on immotile cells inactivated by addition of formaldehyde (Fluka, Switzerland) to a final concentration of 0.074 % prior the measurement (26, 30). Magnetosomes were isolated as described previously (9) from cultures grown under micro-oxic conditions. For conjugation experiments *Escherichia coli* strain S17-1 (33) was used as a donor and cultivated as previously described (23).

**Table 3:** Bacterial strains.

Strain	Description	Reference
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 R3/S1	Rifr, Smr spontaneous mutant	(31)
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{C}::\text{Kan}$	<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{mamC}::\text{Kan}$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{C}$	<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{mamC}$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{C}_\text{C}$	<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{C}(\text{pAS35})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}$	<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{mamGFDC}$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{MCS2}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pBBR1MCS-2})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GFDC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS31})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{G}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS32})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{F}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS33})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{D}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS34})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{C}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS35})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GD}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS36})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS37})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{FD}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS38})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{FC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS39})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{DC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS40})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GFD}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS41})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GFC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS42})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{GDC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS43})$	This study
<i>M. gryphiswaldense</i> $\Delta\text{GFDC}_\text{FDC}$	$\Delta\text{GFDC}(\text{pAS44})$	This study

### DNA techniques

DNA isolation, digestion, ligation and transformation essentially followed standard methods (23). Plasmids and primers used in this study are listed in Table 4 and Supplementary Table 1. PCR products and vector inserts were sequenced using BigDye Terminator v3.1 chemistry (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) on an ABI 3700 capillary sequencer. Sequence data were analyzed with Lasergene 6 (DNASTar Inc., Madison, WI) and MacVector 7.0 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, United Kingdom) programs.

### Generation of $\Delta mamGFDC$ and $\Delta mamC$ mutant strains

A *M. gryphiswaldense* mutant lacking the *mamGFDC* cluster was generated using plasmid pDC2. For construction of pDC2 we amplified 670 bp of *mamGFDC*-upstream sequence including the ATG-start codon of *mamG* by primer pair G/EcoRI-for and G/PstI\_rev and 810 bp of *mamGFDC*-downstream sequence including TGA-stop codon of *mamC* by primer pair C/PstI-for and C/XbaI\_rev. Both amplification products were fused by a 3 fragment ligation between the *EcoRI* and *XbaI* sites of plasmid pK19*mobsacB* to produce pDC2. Plasmid pDC2 was introduced into *M. gryphiswaldense* R3/S1 by conjugation from *E. coli* S-17 and clones, which had chromosomal integrated pDC2, were selected on kanamycin (Kan) containing ACAM medium. As we failed to obtain double-crossovers mutants by sucrose selection due to instable *sacB* expression, 300 randomly selected colonies were replica-plated on ACAM medium (with and without Kan) and Southern blotting on 3 clones that showed sensitivity to Kan confirmed deletion of the *mamGFDC* operon. One mutant clone, designated  $\Delta GFDC$ , was selected for further studies.

For generation of a *mamC* mutant, we alternatively used the broad-host-range Cre-*loxP* antibiotic marker recycling system described by Marx and Lidstrom (2002) in order to test its usability in *M. gryphiswaldense* (18). Searches for *lox* sites (34 bp composed of short core sequence between 2 inverted repeats) in a draft version of the *M. gryphiswaldense* genome sequence identified no site showing the characteristic sequence organisation of *lox* which might have targeted by the Cre recombinase. The Cre recombinase of bacteriophage P1 catalyzes site specific recombination between *lox* sites and in particular the *in vivo* excision of DNA regions flanked by co-directional *loxP* recognition sites (19). Cre expression from plasmid pCM157 (18) in *M. gryphiswaldense*

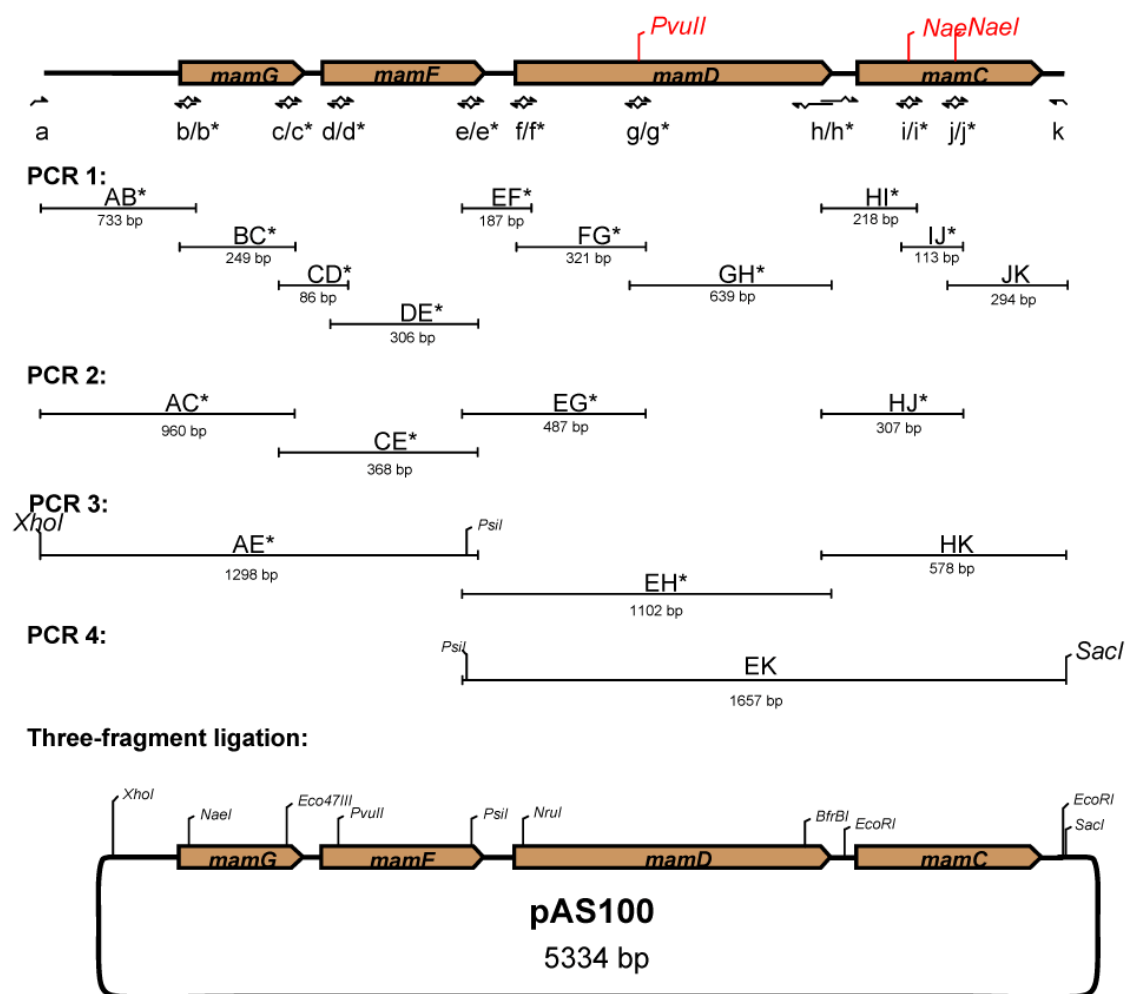
was verified by means of RT-PCR. Cells expressing Cre did not show any apparent change in growth or magnetosome biomineralization, suggesting that Cre does not catalyze recombination between sequence sites inherent to the chromosome of *M. gryphiswaldense*. For the *mamC* deletion construct the regions immediately flanking *mamC* were PCR amplified using the following primer pairs: AGmamCu\_f/MunI and AGmamCu\_r/NdeI-2 for the upstream region and AGmamCDd\_f/ApaI and AGmamCd\_r/SacI for the downstream region. PCR products for *mamC*-upstream (1822 bp) and for *mamC*-downstream (1450 bp) were cloned into pGEM-T Easy (Promega) to produce pAG1 and pAG2, respectively. The 1822 bp *MunI*-*NdeI* fragment from pAG1 was introduced between the *MunI* and *NdeI* sites of pCM184 (18), which is upstream of a *loxP* flanked Kan resistance marker to yield pAS3. Sequencing of the *mamC*-downstream fragment revealed 204 bp downstream the 5' end an *ApaI* restriction site, which is missing in the partial 35 kb sequence deposition (BX571797) of the magnetosome island which was used for primer construction. Consequently digestion of pAG2 by *ApaI* and *SacI* yielded a 1246 bp *mamC* downstream fragment that was inserted downstream of the *loxP* flanked Kan resistance marker of *ApaI/SacI* digested pAG3, producing pAG4. Allelic exchange vector pAG4 was introduced into *M. gryphiswaldense* strain R3/S1 by conjugation from *E. coli* S-17 and transconjugants were selected on solid ACAM-medium containing Kan. Kan-resistant transconjugants were found at frequency of  $2.2 \cdot 10^{-6}$  per recipient cell. Several randomly selected clones were propagated one passage in liquid medium and streaked out on solid medium without antibiotics. Colonies from those plates were screened by PCR for loss of *mamC* which occurred at a frequency of  $1.0 \cdot 10^{-1}$ . For one clone, designated  $\Delta C::Kan$ , replacement of *mamC* by a *loxP* flanked Kan resistance marker was confirmed by Southern blot analysis. For excision of the Kan marker gene from clone  $\Delta C::Kan$ , plasmid pCM157 was introduced by conjugation from *E. coli* S-17 and transconjugants were selected on tetracycline. After one passage on solid medium with tetracycline, 96 % of the tetracycline-resistant  $\Delta C::Kan$  derived clones were Kan sensitive. For one clone designated  $\Delta C$  loss of the Kan gene was confirmed by Southern blot analysis. Plasmid pCM157 was cured from  $\Delta C$  by transfer to medium lacking tetracycline. Excision of the marker by Cre leaves behind a *loxP*-scar at the position of the *mamC* gene.

### Complementation studies

For genetic complementation of the  $\Delta C$  and the  $\Delta GFDC$  mutant strain, a series of pBBR1MCS-2-based plasmids, harboring full-length (pAS31) or deletion-containing variants of the *mamGFDC* cluster (pAS32-pAS44), were generated. Sequence deletions within the recombinant *mamGFDC* cluster were generated in plasmid pAS100 by restriction digestion. Generated *mamGFDC* cluster variants were then cloned between *XhoI* and *SacI* sites of pBBR1MCS-2 for expression in *M. gryphiswaldense*. Construction of plasmid pAS100, harboring a 2941 bp *XhoI-SacI* fragment consisting of 705 bp *mamGFDC* upstream sequence, the *mamGFDC* cluster (2077 bp) containing silent mutations, and 159 bp *mamGFDC* downstream sequence is illustrated in Figure 5. For construction of the 2941 bp fragment primer annealing to the 5' and the 3' sequence region of *mamC* (5' b/b\*; 3' c/c\*), *mamF* (5' d/d\*; 3' e/e\*) and *mamD* (5' f/f\*; 3' h/h\*), within *mamD* (g/g\*), within *mamC* (i/i\*; j/j\*), upstream of *mamG* start codon (a), and downstream of *mamC* stop codon (k) were deduced from magnetosome island sequence deposition BX571797. Primer annealing within the *mamGFDC* cluster contained a mismatch to generate silent point mutations which either created or removed a restriction site: primer b/b\* and c/c\* created a *NaeI* and a *Eco47III* site within *mamG*, primer d/d\* and e/e\* a *PvuII* and a *PsiI* site within *mamF*, primer f/f\* and h created a *NruI* and a *BfrBI* site within *mamD*, primer g/g\* removed a *PvuII* site contained in *mamD*, primer h\* created an *EcoRI* site 18 bp upstream of *mamC*, primer i/i\* and j/j\* removed *NaeI* sites contained in *mamC*. Assembly of the 2941 bp *XhoI-SacI* sequence fragment was accomplished by four rounds of PCR. The first round produced 10 sequence fragments: AB\* (primer pair a/b\*), BC\* (primer pair b/c\*), CD\* (primer pair c/d\*), DE\* (primer pair d/e\*), EF\* (primer pair e/f\*), FG\* (primer pair f/g\*), GH\* (primer pair g/h\*), HI\* (primer pair h/i\*), IJ\* (primer pair i/j\*), JK (primer pair j/k). Next, sequence fragments of the first PCR round were fused in three successive rounds of fusion PCR (13) until two sequence fragments remained (AE\* and EK) which were ligated between *XhoI* and *SacI* digested pSP72 to produce pAS100. Sequence deletions in modified variant of the *mamGFDC* cluster were created in pAS100 by parallel digestion with two restriction enzymes and subsequent re-ligation of the vector backbone. For instance, for excision of *mamC*, pAS100 was digested with *EcoRI* and recirculated producing pAS104, while for creating a large deletion with *mamG* pAS100 was digested



with *NaeI* and *Eco47III* producing pAS101. pBBR1MCS-2 based expression vectors containing single gene constructs were pAS32 (*mamG*), pAS33 (*mamF*), pAS34 (*mamD*) and pAS35 (*mamC*), vectors containing double gene constructs were pAS36 (*mamGD*), pAS37 (*mamGC*), pAS38 (*mamFD*), pAS39 (*mamFC*), and pAS40 (*mamDC*) and vectors containing triple gene constructs were pAS41 (*mamGFD*), pAS42 (*mamGFC*), pAS43 (*mamGDC*) and pAS44 (*mamFDC*). For negative control we used vector pBBR1MCS-2 without insert.



**Figure 5:** Scheme of construction of an engineered variant of the *mamGFDC* cluster of *M. gryphiswaldense* for complementation studies.

Complementation constructs were introduced into the recipient mutant strains of *M. gryphiswaldense* by biparental conjugation with *E. coli* S17-1 as a donor. Expression of single, double and triple complementation constructs was verified by reverse transcription PCR, showing that the created deletions within the *mamGFDC* operon do not inhibit transcription of downstream located operon genes.

**Table 4:** Plasmids.

Plasmid	Description	Reference
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , <i>lacZα</i>	(17)
pGEM-T Easy	Ampr, <i>lacZα</i> , PCR cloning vector	Promega
pK19mobsacB	Kn <sup>r</sup> , <i>sacB</i> modified from <i>B. subtilis</i> , <i>lacZ</i>	(24)
pCM184	Apr; Knr	(18)
pCM157	Tcr	(18)
pDC2	pK19mobsacB with <i>mamGFDC</i> cluster upstream and downstream flank	This study
pAG1	pGEM-T Easy with 1822 bp <i>mamC</i> upstream flank	This study
pAG2	pGEM-T Easy with 1446 bp <i>mamC</i> downstream flank	This study
pAG3	pCM184 with <i>mamC</i> upstream flank between <i>MunI/NdeI</i>	This study
pAG4	pAG3 with <i>mamC</i> downstream flank between <i>ApaI/SacI</i>	This study
pAS100	pSP72 with 2.941 kb construct consisting of the 2077 bp <i>mamGFDC</i> operon, 705 bp upstream and 159 bp downstream sequence between <i>XhoI/SacI</i> restriction sites	This study
pAS101	pAS100 cut with <i>NaeI</i> and <i>Eco47III</i> , self-ligated,	This study
pAS102	pAS100 cut with <i>PvuII</i> and <i>PsiI</i> , self-ligated,	This study
pAS103	pAS100 cut with <i>NruI</i> and <i>BfrBI</i> , blunted and self-ligated,	This study
pAS104	pAS100 cut with <i>EcoRI</i> and self-ligated,	This study
pAS105	pAS100 cut with <i>NaeI</i> and <i>PsiI</i> , self-ligated,	This study
pAS106	pAS100 cut with <i>NaeI</i> and <i>BamHI</i> , blunted, and self-ligated,	This study
pAS107	pAS100 cut with <i>PvuII</i> and <i>BamHI</i> , blunted, and self-ligated,	This study
pAS109	pAS105 cut with <i>EcoRI</i> and self-ligated,	This study
pAS110	pAS100 cut with <i>PvuII</i> and <i>EcoRI</i> , blunted, and self-ligated,	This study
pAS111	pAS101 cut with <i>NruI</i> and <i>EcoRI</i> , blunted, and self-ligated,	This study
pAS112	pAS109 cut with <i>PvuII</i> and <i>PsiI</i> , self-ligated,	This study
pAS113	pAS104 cut with <i>NruI</i> and <i>Eco47III</i> , self-ligated,	This study
pAS114	pAS101 cut with <i>NruI</i> and <i>BamHI</i> , blunted, and self-ligated,	This study
pAS31	pBBR1MCS-2 with 2941 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment of pAS100, for <i>mamGFDC</i> expression	This study
pAS32	pBBR1MCS-2 with 1014 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS110, for <i>mamG</i> expression	This study
pAS33	pBBR1MCS-2 with 1229 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS111, for <i>mamF</i> expression	This study

**Table 4 continued.**

pAS34	pBBR1MCS-2 with 1826 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS109, for <i>mamD</i> expression	This study
pAS35	pBBR1MCS-2 with 1538 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS106, for <i>mamC</i> expression	This study
pAS36	pBBR1MCS-2 with 2104 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS112, for <i>mamGD</i> expression	This study
pAS37	pBBR1MCS-2 with 1819 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS107, for <i>mamGC</i> expression	This study
pAS38	pBBR1MCS-2 with 2165 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS113, for <i>mamFD</i> expression	This study
pAS39	pBBR1MCS-2 with 2038 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS114, for <i>mamFC</i> expression	This study
pAS40	pBBR1MCS-2 with 2375 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS105, for <i>mamDC</i> expression	This study
pAS41	pBBR1MCS-2 with 2401 kb <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS104, for <i>mamGFD</i> expression	This study
pAS42	pBBR1MCS-2 with 2265 bp <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS103, for <i>mamGFC</i> expression	This study
pAS43	pBBR1MCS-2 with 2668 kb <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS102, for <i>mamGDC</i> expression	This study
pAS44	pBBR1MCS-2 with 2722 kb <i>XhoI-SacI</i> fragment from pAS101, for <i>mamFDC</i> expression	This study

### Electron microscopy and size analysis of membrane vesicles and magnetite crystals

Transmission electron microscopy was performed either on a Zeiss EM 10 on unstained cells adsorbed on carbon-coated copper grids, or on a Zeiss EM 912, equipped with an integrated OMEGA energy filter operated in the zero loss mode, on thin sections.

For thin sections cells were fixed with 2.5 % glutardialdehyde in 75 mM sodium cacodylate, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.0) for 1 h at room temperature. Post-fixation was performed for 1 h with 1 % osmium tetroxide in fixative buffer. Then cells were stained *en bloc* with 1 % uranyl acetate in 20 % acetone for 30 min. Dehydration was performed with a graded acetone series. Samples were then infiltrated and embedded in “Spurr’s” low-viscosity resin. Ultra thin sections were cut with a diamond knife and mounted on uncoated copper grids. The thin sections were post-stained with aqueous lead citrate (100 mM, pH 13.0).

For crystal analysis, *M. gryphiswaldense* cultures were grown at microoxic conditions for 24 h at 28°C. Crystal parameters (crystal size and shape factor) were

measured from digitized TEM micrographs using ImageJ 1.36b and a self-written plugin based on source-code of the plugin Watersheds\_514 developed by M. Pinchon and N. Bonnet, which allows the semi-automatic segmentation of particles from the images (<http://helios.univ-reims.fr/Labos/INSERM514/ImageJ/>). Twinned crystals, which were occasionally observed (frequency of approximately 7 %) were omitted from analysis because the segmentation algorithm often failed to detect the correct crystal edges. Mann-Whitney significance test (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>) was used to determine the significance of difference between crystal size and between shape factor distributions.

### Acknowledgment

We are grateful to Wolfgang Heyser and Anke Toltz (University of Bremen, Germany) for support and access to the electron microscope. We thank Michael Winkelhofer (Ludwig Maximilians-University of Munich, Germany) for helpful hints on statistical analysis. The continued support of Friedrich Widdel (Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany) is greatly acknowledged. We thank René Uebe, Rita Dunker, and Frank Schreiber (MPI Bremen) for help with initial complementation experiments. This work was supported by the BMBF BioFuture program and the Max Planck Society.

### Supplementary Table 1: Primer.

Name	Sequence (5' - 3')
G/EcoRI-for	GATATCTTAAGCGAGGGCAAAGCAAT
G/PstI_rev	CTGCAGCATCTGATCTCCGGCAAGTGTA
C/PstI_for	TGCAGGCCTGAAATATTGGGCTGGTTCAC
C/XbaI_rev	TCTAGAGTTGATGGGGCGCGGAAGTTTC
AGmamCu_f/MunI	CAATTGATCTATTCTCAACTTTTTTCGC
AGmamCu_r/NdeI-2	CATATGCATCGCTGTTGTCCCTTAATTCAA
AGmamCd_f/ApaI	GGGCCCGCCTGAAATATTGGGCTGGTTCAC
AGmamCd_r/SacI	GAGCTCGCTTACCCTCGTCTCGCCG
a	CTCGAGCCCCAGGGGGCAAACCATT
b	AAGGGCATCGCCGGCGTTGGC
b*	CGCCAACGCCGGCGATGCCCTTG
c	CAGGCTGAGGCCAGCGCTGAGCCTGCTTAA
c*	TTAAGCAGGCTCAGCGCTGGCCTCAGCCTG
d	ATCGAAACTAAAACAGCTGGCGGC

Supplementary Table 1 continued.

d*	GCCGCCAGCTGTTTTAGTTTCGAT
e	TCTGCCCCTTATA <b>AAGCCAT</b> GTAGTC
e*	GACTACATGGCTTATA <b>AAGGGGC</b> CAGA
f	CTTTTTCTCGC <b>GAAGG</b> TCGAA
f*	TTCGACCTT <b>CGCGAG</b> AAAAAG
g	GGAACCGGTCAGCTT <b>GTCAT</b> GATG
g*	CATCATGACA <b>AAGCTG</b> ACCGGTTCC
h	GGCGAGGAATAAGCCTGACCCTTGAATT <b>CAGGACA</b> ACAG
h*	TTATTCCTCGCCGACAGCCGCCAG <b>CAATGCAT</b> CATCGGAAAC
i	AAGGAAGCCCGCGGTGCCGGGCTT
i*	AAGCCCGGC <b>ACCGGC</b> GCTTCCTTG
j	GCCCTAATCGCCGGT <b>GTCG</b> CCGC
j*	GCGGCGAC <b>ACCGGC</b> GATTAGGGC
k	GAGCTCGAATTCTCAGAGGCAGAGAGTGGGGC

Restriction sites are italic and mismatch nucleotides are in bold.

\*Position within the target sequence of *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1 (Sequence deposition number BX571797).

## References

1. **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**:8745-8750.
2. **Balkwill, D., D. Maratea, and R. P. Blakemore.** 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**:1399-1408.
3. **Bazylinski, D. A., and R. B. Frankel.** 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev.* **2**:217-230.
4. **Bazylinski, D. A., A. Garratt-Reed, and R. B. Frankel.** 1994. Electron-microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Res. Tech.* **27**:389-401.
5. **Blakemore, R. P.** 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* **190**:377-379.
6. **Bochicchio, B., A. Pepe, and A. M. Tamburro.** 2001. On (GGLGY) synthetic repeating sequences of lamprin and analogous sequences. *Matrix Biol.* **20**:243-250.
7. **Frankel, R. B., T. J. Williams, and D. A. Bazylinski.** 2006. Magneto-Aerotaxis, p. 1-24. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.

8. **Gorby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. Blakemore.** 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**:834-841.
9. **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**:1040-1050.
10. **Grünberg, K., C. Wawer, Tebo B. M., and D. Schüler.** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4573-4582.
11. **Hergt, R., R. Hiergeist, M. Zeisberger, D. Schüler, U. Heyen, I. Hilger, and W. A. Kaiser.** 2005. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**:80-86.
12. **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.
13. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
14. **Hoell, A., A. Wiedenmann, U. Heyen, and D. Schüler.** 2004. Nanostructure and field-induced arrangement of magnetosomes studied by SANSPOLE. *Phys. B* **350**:e309-e313.
15. **Komeili, A., Z. Li, D. Newman, and G. Jensen.** 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**:242-245.
16. **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. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:3839-3844.
17. **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**:175-6.

18. **Marx, C. J., and M. E. Lidstrom.** 2002. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* **33**:1062-1067.
19. **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**:255-264.
20. **Pradel, N., C. Santini, A. Bernadac, Y. Fukumori, and L. Wu.** 2006. Biogenesis of actin-like bacterial cytoskeletal filaments destined for positioning prokaryotic magnetic organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:17485-17489.
21. **Prozorov, T., S. K. Mallapragada, B. Narasimhan, L. Wang, P. Palo, M. Nilsen-Hamilton, T. J. Williams, D. A. Bazylinski, R. Prozorov, and P. C. Canfield.** 2007. Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **17**:951-957.
22. **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 groupspecific genes with putative functions in magnetosome biomineralization and magnetotaxis. *J. Bacteriol.* **189**:4899-4910.
23. **Sambrook, J., and D. Russel, W.** 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. **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**:69-73.
25. **Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, P. L. Graumann, J. M. Pitzko, and D. Schüler.** 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature* **440**:110-115.
26. **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. Submitted to *J. Bacteriol.*

27. **Scheffel, A., and D. Schüler.** 2006. Magnetosomes in magnetotactic bacteria. *In* J. M. Shively (ed.), *Inclusions in prokaryotes*, vol. 1. Springer, Berlin / Heidelberg.
28. **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**:5757-5765.
29. **Schüler, D.** 2004. Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**:1-7.
30. **Schüler, D., R. Uhl, and E. Baeuerlein.** 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Let.* **132**:139-145.
31. **Schultheiss, D., M. Kube, and D. Schüler.** 2004. Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3624-3631.
32. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**:89-94.
33. **Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784-791.
34. **Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, and T. Takahashi.** 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**:563-564.
35. **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**:5234-5247.
36. **Taoka, A., R. Asada, H. Sasaki, K. Anzawa, L.-F. Wu, and Y. Fukumori.** 2006. Spatial localizations of Mam22 and Mam12 in the magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* **188**:3805-3812.



- 
37. **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**:7176-7184.
  38. **Winklhofer, M., and N. Petersen.** 2006. Paleomagnetism and magnetic bacteria, p. 255-273. *In* D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg.
  39. **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**:465-471.



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom Oktober 2003 bis Juni 2007 in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. F. Widdel am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich gerne einigen Menschen danken, die auf ihre ganz spezielle Weise zu dieser Arbeit und ihrem Gelingen beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. F. Widdel möchte ich danken für sein Interesse an dieser Thematik und für die Bereitstellung der materiellen Voraussetzungen diese Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren. Zudem danke ich ihm für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. D. Schüler ermöglichte mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe „Magnetotaktische Bakterien“. Ich möchte ihm ganz herzlich danken für die vielen Freiheiten, die er mir ließ, seine stete Förderung, sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die vielen anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Betreuung.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „magnetotaktische Bakterien“ danke ich für die freundschaftliche, inspirierende und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei R. Sonntag und C. Stumpf, die unermüdlich für Nachschub an Medien und sonstigen Lösungen sorgten, den fleißigen Korrekturlesern Dr. D. Faivre, C. Lang und Dr. C. Jogler und meinen Mitstreitern K. Junge und S. Ullrich für so manch spaßiges Erlebnis. Besonderer Dank gilt auch meinen ehemaligen Diplomanden A. Gärdes und E. Katzmann für die gute Zusammenarbeit.

Meine Kollegen in der Abteilung Mikrobiologie danke ich für die Einblicke in ihre Forschungsarbeiten und so manche Anregung.

Mein Dank gebührt weiterhin Dr. J.M. Plitzko und M. Gruska (beide MPI für Biochemie) für die Einblicke in die Kryo-Elektronentomographie und die fruchtbare und interessante Zusammenarbeit.

A. Toltz (Universität Bremen) für ihre Einführung am Elektronenmikroskop und die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Spezieller Dank gilt meinen Eltern für ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung sowie für ihr Verständnis. Meinem Bruder J. Scheffel möchte ich danken für die vielen Gespräche über die Wissenschaft im Allgemeinen sowie für seine fundierten Anmerkungen zu dieser Arbeit. Herzlichst danken möchte ich D.A. Kroos für ihr Verständnis, ihre Aufmunterungen, ihr gewissenhaftes Korrekturlesen sowie für die schönen Erlebnisse und Momente in der ach so knappen Freizeit.