

**Biochemische und molekularbiologische
Untersuchung der Magnetosomenmembran
von *Magnetospirillum gryphiswaldense***

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von

Karen Grünberg

aus Bremen

Bremen 2005

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis Juni 2004 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel, Universität Bremen
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dirk Schüler, Universität Bremen

Tag des Promotionskolloquiums: 28. April 2005

■ Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
Zusammenfassung	1
Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang	
A Einleitung	3
1 Magnetotaktische Bakterien	3
2 Biomineralisation von Magnetit	6
3 Die Magnetosomenmembran	7
4 Der Modellorganismus <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	11
5 Intrazelluläre Kompartimente in Prokaryoten	13
6 Untersuchung von subzellulären Strukturen in Bakterien	18
6.1 Methoden zur proteomischen Untersuchung	19
6.2 Proteinlokalisierung	20
7 Zielsetzung	21
B Ergebnisse und Diskussion	23
1 Biochemische Charakterisierung der Magnetosomen in <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	23
1.1 Isolierung von Magnetosomen	23
1.2 Lipidanalyse der Magnetosomenmembran sowie ganzer Zellen	25
1.3 Das Subproteom der Magnetosomenmembran	26
1.3.1 Identifizierung der Proteine in der Magnetosomenmembran	27
1.3.2 Sequenzanalyse	28
1.3.3 Identifizierung und Organisation der <i>mam</i> -Gene	29

2	Charakteristika der Magnetosomenmembran-Proteine (MMP)	30
3	Genetische Untersuchungen ausgewählter MMP (bisher unveröffentlicht)	34
3.1	Erzeugung und Charakterisierung einer $\Delta mamGFDC$ -Mutante	35
3.2	Lokalisierung von MamC	41
3.2.1	Erzeugung einer <i>mamC-egfp</i> -Genfusion	41
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung von MamC-EGFP	42
3.2.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen der Lokalisierung des MamC-EGFP-Fusionsproteins	46
4	Zusammenfassung und Ausblick	48
C	Literaturverzeichnis	51
D	Anhang	63
Teil II: Publikationen		
A	Publikationsliste mit Erläuterungen	68
B	Publikationen	69
C	Weitere Publikationen	90

■ Abkürzungsverzeichnis

ATPase	Enzym, das die Adenosin-5'-triphosphat Hydrolyse katalysiert
bp	Basenpaare
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
Fe(II)	zweiwertiges Eisenkation
Fe(III)	dreiwertiges Eisenkation
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>lacZ</i>	Gen für eine β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
<i>mam</i>	magnetosome membrane (Genbezeichnung)
Mam	magnetosome membrane (Proteinbezeichnung)
MM	Magnetosomenmembran
MMP	Magnetosomenmembran-Proteine
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MTB	Magnetotaktische Bakterien
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
Rif	Rifampicillin
<i>sacB</i>	Gen für eine Levansucrase aus <i>Bacillus subtilis</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
TOF	Time of flight
TPR	Tetratricopeptid repeat

■ Zusammenfassung

Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien stellen ein bemerkenswertes Beispiel eines subzellulären, komplexen Kompartiments in Prokaryoten dar. Der anorganische Kern aus dem magnetischen Eisenoxid Magnetit, seltener Greigit, ist von einer biologischen Phospholipidmembran umgeben, die mit einer Reihe von spezifischen Proteinen assoziiert ist. Die Biomineralisation der Magnetosomen umfasst einen komplexen Mechanismus, der die Eisenaufnahme in die Zelle, den Transport in die Vesikel, die Nukleation und Präzipitation von Eisen involviert. Die Kompartimentierung durch die Bildung der Magnetosomenmembran ermöglicht die Kontrolle des Biomineralisationsprozesses durch biochemische Vorgänge. Bislang war dieser Prozess und somit die Rolle der Magnetosomenmembran auf molekularer und biochemischer Ebene kaum verstanden.

In dieser Arbeit wurden erstmals weitgehende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Magnetosomenmembran im Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 durchgeführt. In der Magnetosomenmembran von *Magnetospirillum gryphiswaldense* wurde ein spezielles Set von 17 Proteinen identifiziert. Basierend auf Sequenzanalysen wurden diese Magnetosomenmembran-assoziierten Proteine in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst die als MMP (**M**agnetosomen**m**embran-**P**roteine) klassifizierten Proteine, für die keine Homologen in anderen nicht-magnetischen Organismen gefunden wurden. Die zweite Gruppe setzt sich aus Proteinen zusammen, die eindeutige Homologien zu weit verbreiteten und biochemisch charakterisierten Proteinen in nicht-magnetischen Organismen haben.

Fast alle der für die MMP kodierenden Gene (*mam*-Gene) konnten drei unterschiedlichen genomischen Regionen (*mms6*-Cluster, *mamDC*-Cluster, *mamAB*-Cluster) zugeordnet werden. Diese drei Operons sind zu einer Magnetosomeninsel angeordnet. Die Magnetosomeninsel umfasst wahrscheinlich ca. 150 Gene, davon haben mindestens 25 Gene Bedeutung für die Magnetitbiosynthese. 16 dieser Gene kodieren für MMP, während 9 Gene keinem der in der Magnetosomenmembran identifizierten Proteine zugeordnet werden konnten. Vergleichende Analysen der *mam*-Gene verschiedener magnetotaktischer Bakterienstämme zeigten hinsichtlich Sequenz und Anordnung mehr oder weniger starke Konservierung.

Aufgrund der Aminosäuresequenzen kann spekuliert werden, dass die identifizierten MMP eine spezielle Funktion im Biomineralisationsprozess haben. Die exakte Rolle der MMP konnte noch nicht geklärt werden, jedoch werden Funktionen in der Eisenakkumulation, der Nukleation und dem Wachstum der Kristalle sowie in der Anordnung und für die Form der Magnetosomen innerhalb der Zelle diskutiert.

In Mutagenese-Experimenten konnte durch die Deletion des *mamGFDC*-Clusters gezeigt werden, dass die Gene dieses Operons eine Funktion für die Größe, Form und Anordnung der Magnetosomen haben.

Erstmals wurde die Eignung von EGFP-Fusionen zur Lokalisierung von MMP in *Magnetospirillum gryphiswaldense* untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das häufigste MMP, MamC, ausschließlich in der Magnetosomenmembran lokalisiert ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellen die bislang umfassendste biochemische Analyse der Magnetosomenmembran in magnetotaktischen Bakterien dar. Durch die Charakterisierung des Magnetosomen-Subproteoms wurden Kandidaten für weitere biochemische und genetische Analysen zur Untersuchung der spezifischen Funktion beim Magnetosomen-Zusammenbau und der Magnetitbiomineralisation identifiziert. Außerdem könnten die Ergebnisse dieser Arbeit für zukünftige Verwendungen bakterieller Magnetosomen in biotechnologischen Anwendungen relevant sein, wie z. B. die Kopplung von Antigenen an spezifische MMP, die dann mit Hilfe von Fusionsproteinen die Lokalisierung oder auch Behandlung von Tumoren ermöglichen.

Teil I Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

■ A – Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der biochemischen und molekulargenetischen Untersuchung der Magnetosomenmembran in dem magnetischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Im folgenden sollen zunächst magnetotaktische Bakterien im allgemeinen vorgestellt werden.

1 Magnetotaktische Bakterien

Magnetotaktische Bakterien (MTB) wurden vor rund 30 Jahren von dem amerikanischen Mikrobiologen Richard P. Blakemore entdeckt (Blakemore 1975). Die beweglichen Prokaryoten sind aufgrund ihrer gerichteten Bewegung relativ leicht in Proben aus natürlichen aquatischen Habitaten zu detektieren (Moench et al. 1978). In einer Vielzahl von marinen und Süßwasserhabitaten findet man magnetotaktische Bakterien in großen Zellzahlen an der oxisch-anoxischen Übergangszone, die in vielen Gewässern an der Grenzfläche zwischen Sediment und Wasser verläuft (Bazylinski 1995; Spring und Bazylinski 2000; Flies et al. 2005, in Druck). Die meisten der kultivierten magnetotaktischen Bakterienstämme weisen ein typisches mikroaerophiles Verhalten auf.

MTB haben eine bemerkenswert vielfältige Zellmorphologie wie z. B. Kokken, Stäbchen, Vibrionen, Spirillen (Blakemore 1982; Bazylinski 1995). Trotz ihrer Diversität haben magnetotaktische Bakterien gemeinsame Eigenschaften: Alle bisher beschriebenen Arten sind Gram-negativ und durch Flagellen beweglich. Alle besitzen magnetische, intrazelluläre Partikel, die Magnetosomen (Meldrum et al. 1993a; Kimble und Bazylinski 1996; Frankel et al. 1997; Dean und Bazylinski 1999). Die meisten MTB mineralisieren Kristalle aus dem magnetischen Eisenoxid Magnetit (Fe_3O_4) (Frankel et al. 1979), weniger gut untersucht sind Kristalle aus dem Eisensulfid Greigit (Fe_3S_4) (Mann et al. 1990; Heywood et al. 1990).

Die bislang bekannten MTB lassen sich auf der Basis von vergleichenden 16S-rRNA-Analysen verschiedenen phylogenetischen Gruppen zuordnen: Die

meisten Stämme, die Magnetit-haltige Magnetosomen enthalten, gehören den α -Proteobakterien an. *Desulfovibrio magneticus* Stamm RS-1, ein Sulfat-reduzierendes magnetisches Bakterium sowie ein mehrzelliger magnetischer Prokaryot werden zu den δ -Proteobakterien gezählt (DeLong et al. 1993; Kawaguchi et al. 1995). *Magnetobacterium bavaricum*, ein magnetisches Riesen-Stäbchen, wurde dem Nitrospira-Phylum zugeordnet (Spring et al. 1993), ebenso MHB-1, ein magnetotaktisches Stäbchen aus dem Waller See (Flies et al. 2005, in Druck).

Magnetotaktische Bakterien haben die Fähigkeit zur Magnetfeldorientierung („Magnetotaxis“) (Balkwill et al. 1980). Im Unterschied zu anderen Taxis-mechanismen wie Aerotaxis und Phototaxis versteht man unter Magnetotaxis die Fähigkeit der passiven Ausrichtung und aktiven Motilität eines Organismus parallel zu den Feldlinien eines Magnetfeldes, wobei sich die Zellen wie winzige Kompassnadeln verhalten. Eine allgemein akzeptierte Hypothese für die biologische Bedeutung des zellulären Magnetismus für die Organismen ist die Wechselwirkung der Magnetosomenkette mit dem erdmagnetischen Feld zur Orientierung im natürlichen Habitat (Blakemore 1975; Bazylinski 1995).

Magnetosomen

Bereits frühe elektronenmikroskopischen und biochemische Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass Magnetosomen von einer biologischen Lipid-Doppelmembran umgeben sind, die mit Proteinen assoziiert ist (Gorby et al. 1988).

Charakteristisch für Magnetosomen ist ihre enge Größenverteilung und die spezifische Anordnung der Partikel innerhalb der Zelle (Bazylinski und Frankel 2000). Je nach Bakterienart ist die Anzahl der Partikel pro Zelle variabel und abhängig von den Wachstumsbedingungen. Magnetosomen haben eine typische Größe von 35–120 nm und entsprechen damit magnetischen Einbereichsteilchen („single domain particles“) (Frankel et al. 1998), die intrazellulär in einer oder mehreren Ketten angeordnet sind. Neben ihrer einheitlichen Größe zeichnen sich Magnetosomen durch ihre perfekte kristalline Struktur aus. Es gibt unterschiedliche Kristallmorphologien, die jedoch innerhalb einer magnetotaktischen Bakterienspezies einheitlich sind (Bazylinski et al. 1994). Basierend auf ihrer zwei-dimensionalen Projektion in der Elektronenmikroskopie wird im wesentlichen zwischen drei Kristallmorphologien unterschieden: Kubo-oktaedrisch, projektilförmig und hexagonal (Abb. 1).

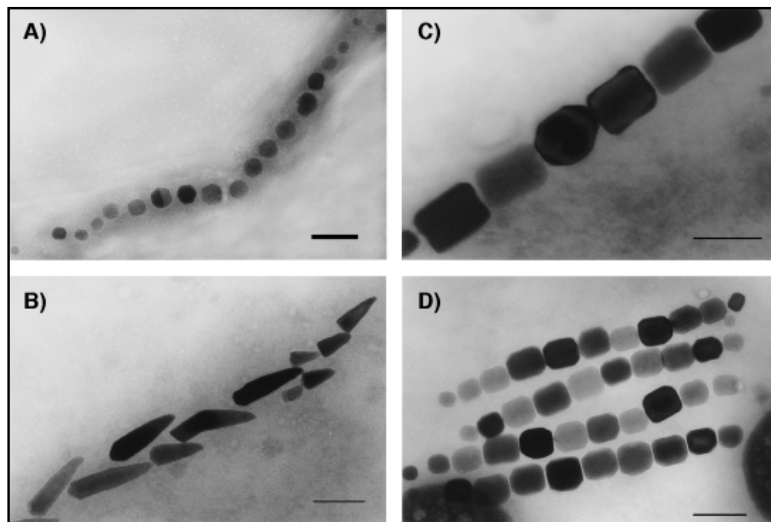


Abb. 1:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kristallmorphologien und intrazellulären Anordnung von Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien:

A) kubo-oktaedrisch, B) projektilförmig, C) und D) hexagonal. Die Magnetosomen sind in einer (C) oder mehreren (D) Ketten angeordnet. Die Länge des Balken entspricht 100 nm. (Aufnahmen von D. Schüler aus: E. Bäuerlein 2003).

Während Anordnung und Form der Magnetosomen kultivierungsunabhängig und stammspezifisch zu sein scheinen (Meldrum et al. 1993a; Meldrum et al. 1993b; Bazylinski et al. 1994; Bazylinski et al. 1995), ist die Anzahl der Partikel von den Kultivierungsbedingungen abhängig (Blakemore et al. 1995; Schüler und Bäuerlein 1998; Heyen und Schüler 2003).

Aufgrund ihrer besonderen magnetischen und kristallinen Eigenschaften stehen isolierte und gereinigte Magnetosomen auch im interdisziplinären Interesse. Sie könnten wegen ihrer magnetischen Eigenschaften eine neue Substanzklasse an eisenhaltigen Kontrastmitteln für medizinische Anwendungen darstellen. Weitere Untersuchungen sollen in Zellkulturen und Tiermodellen durch Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden. Somit könnten Magnetosomen als Markersubstanz dienen, um die Verteilung und genetische Expression molekularer therapeutischer Vektoren sichtbar zu machen (Herborn et al. 2003). Außerdem könnten Magnetosomen zur Immobilisierung von bioaktiven Substanzen, wie Enzymen und Antikörpern, angewendet werden, die dann magnetisch manipuliert werden (magnetisches „drug targeting“) (Matsunaga und Kamyia 1987).

Desweiteren wurden in einem Mars-Meteoriten Magnetitkristalle nachgewiesen, die irdischen Magnetosomen ähneln und als möglicher Beweis für extraterrestisches Leben angeführt wurden (McKay et al. 1997). Daher wurden Magnetosomen aufgrund ihrer Charakteristika als Biomarker zur Identifikation mutmaßlicher Magnetfossilien vom Mars in Betracht gezogen (Thomas-Keprta et al. 2002).

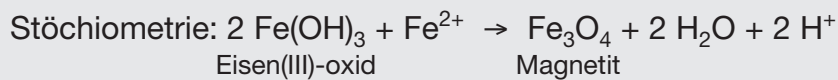
2 Biomineralisation von Magnetit

Unter Biomineralisation versteht man die Bildung definierter anorganischer Festkörper durch biologische Systeme (Lowenstamm 1981). Dabei verwenden alle Organismen Strategien wie die räumliche Kontrolle in lokalisierten Kompartimenten (z. B. Lipidvesikel, Proteine u. a.) sowie eine genaue Regulierung physikochemischer Prozesse in diesen Kompartimenten (Mann et al. 1990). Biomineralisationsvorgänge sind in der Natur weit verbreitet. Beispiele dafür sind die Bildung von Muschelschalen aus Aragonit-Calcit, Aragonit in Ohrsteinchen von Zebrafischen, die Silikatschalen der Diatomeen oder die Bildung von Zähnen und Knochen aus Calciumphosphat (Apatit) (Gotliv et al. 2003; Söllner et al. 2003; Kröger und Sumper 2000; Noll et al. 2002).

Ein faszinierendes Beispiel für biologisch kontrolliertes Kristallwachstum ist die Biomineralisation des ferromagnetischen Eisenminerals Magnetit. Biogene Magnetitpartikel kommen nicht nur in Bakterien, sondern auch in diversen anderen Organismen vor. Erstmals wurde Magnetit in der Radula mariner Schnecken nachgewiesen, inzwischen wurde das Mineral außerdem in Fischen, Vögeln, Insekten und im menschlichen Gehirn gefunden (Mann et al. 1888; Walker et al. 1984; Diebel et al. 2000; Kirschvink et al. 1992; Munro et al. 1997).

In Fischen gelang kürzlich der Nachweis eines Magnetfeldrezeptors, der mit Ketten von Magnetitkristallen assoziiert ist, die in ihrer Struktur und Größe den bakteriellen Magnetosomenpartikeln sehr ähnlich sind. Aufgrund dieser Befunde wurde über einen universellen Biomineralisationsmechanismus spekuliert (Diebel et al. 2000). Die Magnetitkristalle in magnetotaktischen Bakterien könnten somit ein Modellbeispiel für den Prozess der Biomineralisation darstellen.

Auf der Basis hochauflösender Elektronenmikroskopie und der Mößbauer Spektroskopie wurde ein Modell des komplexen Prozesses der Magnetitbiomineralisation für *Magnetospirillum* vorgeschlagen (Frankel et al. 1983; Mann et al. 1990). Dieses wird jedoch mittlerweile kontrovers diskutiert. Wie der Mechanismus im einzelnen verläuft ist noch nicht klar. Es wird jedoch vermutet, dass nach Aufnahme von Eisen Fell in die Magnetosomenvesikel, die durch die Magnetosomenmembran gebildet werden, transportiert wird. Die Kompartimentierung durch die Bildung der Magnetosomenmembran-Vesikel innerhalb der Zelle ermöglicht die Kontrolle des Biomineralisationsprozesses durch biochemische Vorgänge. Dabei wird ein Teil des Fell reoxidiert. Anschließend kommt es wahrscheinlich entweder zu einer Copräzipitation von Fell und FellII oder es wird ein Ferrihydrit als Precursor gebildet, das mit den Fell-Ionen in Lösung zu Magnetit reagiert. Die Bildung von Magnetit setzt eine lokale Übersättigung des Eisens in Lösung voraus. Außerdem werden bei diesem Prozess Protonen freigesetzt, daher bedarf die Nukleation und das Kristallwachstum einer präzisen Regulation eines optimalen pH-Wertes sowie Redoxpotentials (Cornell und Schwertmann 2003).



Welche biochemischen Komponenten daran beteiligt sind und speziell die Vesikelbildung initiieren und steuern war lange Zeit unklar. Es wurde jedoch vermutet, dass die Proteine der Magnetosomenmembran eine entscheidende Funktion bei der Biomineralisation der Magnetosomen spielen.

3 Die Magnetosomenmembran

Balkwill et al. zeigten 1980 erstmals mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie im magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum magnetotacticum* Stamm MS-1, dass der elektronendichte Teil einzelner Magnetitkristalle von einer trilaminaren Struktur umgeben ist (Balkwill et al. 1980). Acht Jahre später beschrieben Gorby et al. anhand von isolierten Magnetosomen, dass die Magnetosomenmembran in MS-1 eine ähnliche Architektur wie die Cytoplasmamembran auf-

weist und aus einer 3–4 nm dicken proteinhaltigen Phospholipid-Doppelmembran besteht. Außerdem wurden in MS-1 unter Eisen-limitierenden Wachstumsbedingungen Ketten leerer Vesikel beobachtet (Gorby et al. 1988). Diese Beobachtung konnte später auch in *Magnetospirillum* sp. Stamm AMB-1 bestätigt werden (Komeili et al. 2004). Da auch in anderen untersuchten magnetotaktischen Bakterien Membranstrukturen beobachtet wurden, die das Eisenmineral umgeben, scheint die Existenz der Magnetosomenmembran in Magnetbakterien universell zu sein (Bazylinski et al. 1994; Bazylinski 1995). Allerdings konnten Hanzlik et al. in raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen des magnetischen Riesen-Stäbchens *M. bavaricum* keine Magnetosomenmembran identifizieren. Trotzdem schienen die Magnetosomen hier physikalisch mit der zellulären Membran in Kontakt zu stehen (Hanzlik et al. 1996).

Erste biochemische Untersuchungen der Magnetosomenmembran in MS-1 wiesen in der Zusammensetzung Ähnlichkeiten zu den anderen Zellmembranen auf (Gorby et al. 1988). Die Lipidanalyse durch Dünnschicht-Chromatographie ergab, dass die Magnetosomen mit neutralen Lipiden und freien Fettsäuren, Sulfolipiden, Glykolipiden sowie Phospholipiden assoziiert sind, wie sie für eine biologische Membran typisch sind. Spätere gaschromatographische Analysen isolierter Magnetosomen ergaben im Gegensatz zu diesen vorherigen Beobachtungen (Gorby et al. 1988), dass sich das Lipidprofil der Magnetosomenmembran in *Magnetospirillum gryphiswaldense* von dem der äußeren Membranen und der Cytoplasmamembranen unterscheidet (Gassmann 1996, Schüler und Bäuerlein 1997; Bäuerlein 2000; Bäuerlein 2003). So war der relative Anteil der Phospholipide in der Magnetosomenmembran am Gesamtlipidgehalt wesentlich höher als in den anderen beiden Membranen. Zudem wurden Ornithinamid und ein unbekanntes Aminolipid nicht in der Magnetosomenmembran nachgewiesen, sondern nur in den beiden anderen Membranen. Aufgrund der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung wurde vermutet, dass die Magnetosomenmembran einen eigenen Syntheseweg verfolgt und dass sie für die Kontrolle der maximalen Größe und der uniformen Morphologie der Magnetitkristalle verantwortlich sein könnte (Bäuerlein 2003). Desweiteren könnten die unterschiedlichen Phospholipid-Zusammensetzungen der Membranen und damit der Membranoberflächen, neben den Proteinen, für die jeweilige Kristallmorphologie der Magnetitkristalle eine Rolle spielen (Bäuerlein 2003).

Das durch die 1D-Gelelektrophorese identifizierte Proteinmuster der Magnetosomenmembran schien bis auf zwei Proteine (15 kDa und 33 kDa) unspezifisch und dem der Cytoplasmamembran ähnlich (Gorby et al. 1988). Allerdings war diese Studie durch sehr geringe Mengen an verfügbarem Material sowie einer nicht ausgereiften Isolierungs- und Reinigungsmethode der Magnetosomen limitiert. Spätere Analysen extrahierter Magnetosomenmembranen aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 wurden mit einer effektiveren Methode zur Isolierung und Aufreinigung der Magnetosomen durchgeführt. Dabei wies das Proteinmuster der Magnetosomenmembran ein charakteristisches Proteinprofil auf, das sich deutlich von dem der äußeren- und Cytoplasmamembran sowie der löslichen Proteinfraction unterschied (Schüler 1999). Somit wurden neun Magnetosomenmembran-spezifische Polypeptide in unterschiedlichen Mengen identifiziert. Diese Proteine wurden, basierend auf ihrem apparenten Molekulargewicht, als MM-15 bis MM-106 bezeichnet.

Matsunaga et al. lieferten 1992 den ersten Ansatz zur Etablierung eines genetischen Systems in *Magnetospirillum* Stamm AMB-1 (Matsunaga et al. 1992). Die durchgeführten Transposonmutagenese-Experimente lieferten Hinweise auf drei Regionen, für die angenommen wurde, dass sie bei der Synthese der Magnetosomen involviert sind. Das auf einer dieser Regionen lokalisierte Gen *magA* wurde als erstes mutmaßliches Magnetosomen-Gen kloniert. MagA weist Homologie zu Kaliumtransporter-Proteinen auf, daher wurde über eine mögliche Funktion im energieabhängigen Transport des Eisens durch die Magnetosomenmembran spekuliert (Nakamura et al. 1995a; Okamura et al. 2000). Intrazelluläre Lokalisierungs-Studien von MagA mit einer Luziferase-Fusion lieferten jedoch Hinweise auf eine Lokalisierung in der Cytoplasmamembran und der Magnetosomenmembran (Nakamura et al. 1995b). MagA konnte allerdings bisher in keinem anderen untersuchten magnetotaktischen Bakterium in der Magnetosomenmembran detektiert werden (Grünberg et al. 2004). Die *magA*-Mutante wurde zudem nie komplementiert. Daher liegen keine überzeugenden Beweise dafür vor, dass MagA in der Magnetosomenmembran lokalisiert ist bzw. überhaupt im Bio-mineralisationsprozess der Magnetosomen beteiligt ist.

Okuda et al. identifizierten 1996 durch 1D-SDS-PAGE drei Proteine (12 kDa, 22 kDa und 28 kDa) in der Magnetosomenmembran in *M. magnetotacticum*. Durch reverse Genetik wurde allerdings nur ein Gen (das für das 22 kDa Protein

Mam22 kodiert) identifiziert und kloniert. Mam22 weist Homologie zu einer Reihe von Proteinen auf, die der „Tetratricopeptide repeat“ (TPR)-Familie angehören. Die Autoren schlugen aufgrund der TPR-Motive eine Funktion von Mam22 als Rezeptor vor, der mit anderen cytoplasmatischen Proteinen mit gleichen TPR-Motiven interagieren könnte (Okuda et al. 1996; Okuda und Fukomori 2001). In einer späteren Arbeit von Komeili et al. wurde aufgrund subzellulärer Lokalisierungs-Studien mit dem homologen Protein MamA in *Magnetospirillum* sp. Stamm ABM-1 ebenfalls vermutet, dass das Protein mit anderen Bereichen der Zelle interagiert (Komeili et al. 2004). Desweiteren wurde in Deletionsmutanten von MamA durch Kryo-Ultramikrotomie beobachtet, dass die $\Delta mamA$ -Mutanten zwar immer noch die gleiche Anzahl von Vesikeln produzierten, jedoch waren nicht alle zur Synthese von Magnetit funktionell. Eine verkürzte Kettenbildung stellt allerdings keinen eindeutigen Phänotyp der MamA-Mutante dar, da die Bildung der Magnetosomen von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist (Sauerstoffpartialdruck, Temperatur usw.). Trotzdem mutmaßten die Autoren aufgrund ihrer Beobachtungen eine mögliche Funktion von MamA bei der Aktivierung der Magnetosomenbildung oder beim Zusammenbau und der Erhaltung der Magnetosomen. Diese Spekulationen sind jedoch experimentell weiter zu belegen.

In AMB-1 wurden drei weitere mutmaßliche Magnetosomen-assoziierte Proteine (24,8 kDa, 35,6 kDa und 66,2 kDa) durch 1D-SDS-PAGE detektiert (Matsunaga et al. 2000). Dabei wurde das 35,6 kDa Protein (MpsA) in hohen Mengen nachgewiesen. Die Sequenz von MpsA weist Homologie zu einer Acetyl-CoA-Carboxylase (Transferase) mit einem CoA-Bindungsmotiv auf. Die Hypothese, dass die Magnetosomenmembran durch Invagination der Cytoplasmamembran gebildet wird, führte zu der Spekulation, dass MpsA durch Acetylierung diese Invagination vermitteln könnte, ähnlich wie bei membranösen Invaginationen in Eukaryoten. Lokalisierungsstudien wurden mit einer *MpsA-Luziferase*-Genfusion durchgeführt. Dabei wurde die höchste Luziferase-Aktivität in der Magnetosomenmembran nachgewiesen, in der äußeren Membran sowie der Cytoplasmamembran wurde etwa die Hälfte der Aktivität nachgewiesen. Somit war die Lokalisierung von MpsA nicht nur auf die Magnetosomenmembran beschränkt. Allerdings erscheint die funktionelle Vorhersage sowie die daraus entwickelte Hypothese aufgrund der schwachen

Sequenzähnlichkeit nicht sehr plausibel. Außerdem konnte die vorgeschlagene Funktion von MpsA bisher nicht experimentell bestätigt werden.

Obwohl die Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeiten auf mutmaßliche Magnetosomen-assoziierte Proteine und deren mögliche Funktion bei der Biomineralisation hinweisen, sind einige Aussagen jedoch zum Teil widersprüchlich. Aufgrund der lückenhaften experimentellen Beweisführung bestehen Zweifel an einigen Aussagen. Daher sollte es die Aufgabe dieser Arbeit sein, die Wissenslücken zu schließen sowie Widersprüche durch eine eingehende biochemische und genetische Charakterisierung der Magnetosomenmembran aufzuklären.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurden an dem Magnetbakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 vorgenommen, das im folgenden beschrieben wird.

4 Der Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Es gibt bislang nur wenige in Reinkultur verfügbare magnetotaktische Bakterien und die meisten der Isolate sind weitgehend uncharakterisiert (Frankel und Bazylinski 2004). Zu den kultivierten Stämmen gehören *Magnetospirillum magnetotacticum* Stamm MS-1 (Blakemore et al. 1979), *Magnetospirillum* sp. AMB-1 (Matsunaga et al. 1991) und *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (Schleifer et al. 1991). Weitere Isolate in Reinkultur sind der magnetische Vibrio MV-1 und *Magnetococcus* MC-1 (Blakemore 1975; Meldrum et al. 1993).

Magnetospirillum gryphiswaldense Stamm MSR-1, im folgenden als MSR-1 bezeichnet, wurde durch D. Schüler 1990 aus dem aquatischen Sediment des Flusses Ryck in der Nähe von Greifswald isoliert und 1991 erstmals näher beschrieben (Schleifer et al. 1991). MSR-1 ist ein Gram-negatives, bipolar monotrich begeißeltes Spirillum, das der Untergruppe der α -Proteobakterien zugeordnet ist.

Die Zellen von MSR-1 haben eine Größe von 2–3 μm mit einem Durchmesser von 0,6 μm (Abb. 2). Die Anzahl der Magnetosomen in MSR-1 ist abhängig von den Wachstumsbedingungen. Das Maximum der Magnetitbildung wurde bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 0,25 mbar beobachtet. Elektronenmikrosko-

pische Untersuchungen ließen unter diesen Bedingungen durchschnittlich 35, maximal 54 kubo-oktaedrische, ca. 42 nm große Magnetosomen pro Zelle erkennen (Heyen und Schüler 2003). Die Induktion der Magnetitbiosynthese erfolgt in MSR-1 unter mikroaeroben Bedingungen, d.h. einem Sauerstoffpartialdruck ≤ 10 mbar (Heyen und Schüler 2003). Die Eisenaufnahme aus dem Medium erfolgt nicht kontinuierlich, sondern ist zeitlich an die Magnetitsynthese gebunden. Die Magnetitbildung ist ihrerseits an niedrige Sauerstoffkonzentrationen und Eisenverfügbarkeit gekoppelt (Schüler et al. 1998). Eisen-Transportstudien in MSR-1 ergaben, dass Fe(III) in einem energieabhängigen Prozess mit hoher Rate aufgenommen wird, wobei anscheinend spezifische Proteine der äußeren Membran, jedoch keine Siderophore beteiligt sind (Schüler und Bäuerlein 1996).

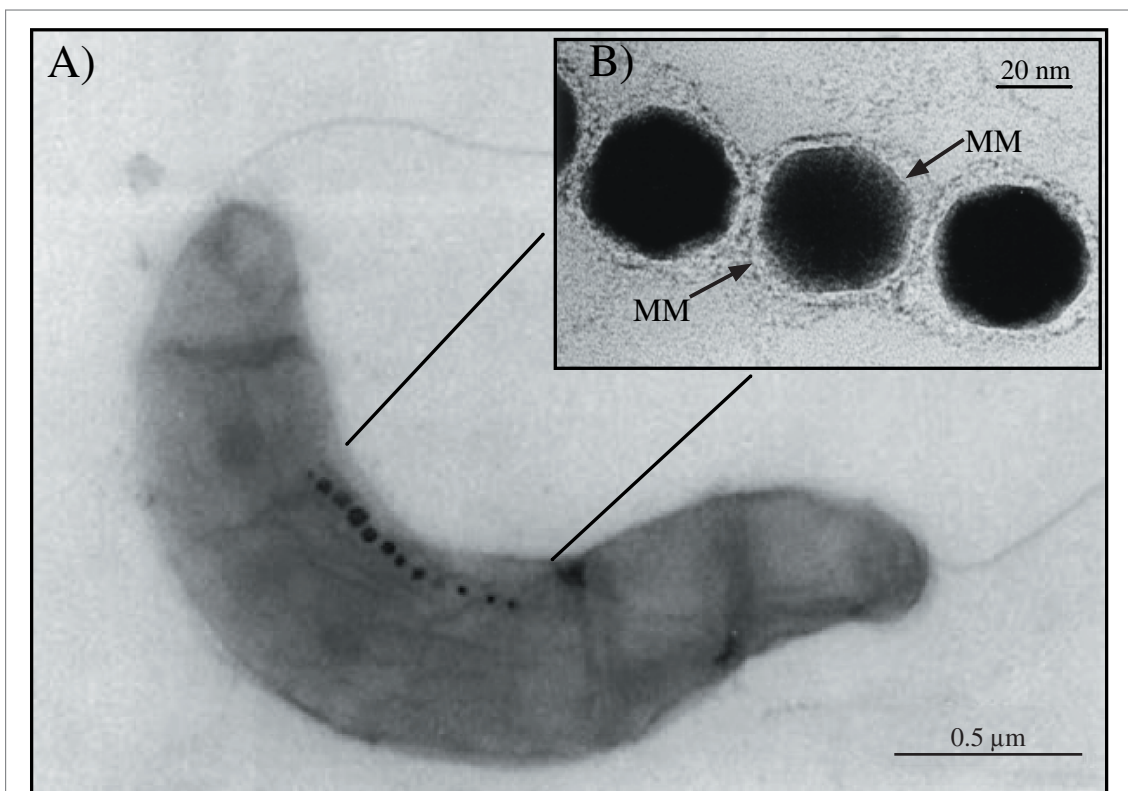


Abb. 2:

Elektronenmikroskopische Aufnahme von A) *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1, B) Darstellung und Vergrößerung der Magnetosomenkette in MSR-1. Die Pfeile weisen auf die Magnetosomenmembran (MM) hin. (Aufnahmen aus: Schüler und Frankel 1999)

MSR-1 ist unter Laborbedingungen im großen Maßstab gut zu kultivieren (Heyen und Schüler 2003). Weiterhin steht seit kurzem die fast vollständige Genomsequenz von MSR-1 zur Verfügung (Kooperation M. Kube und R. Reinhardt, MPI für molekulare Genetik, Berlin). Durch weitergehende genomische Analysen konnte eine „Magnetosomeninsel“ identifiziert werden, auf der die Gene für die Biomineralisation organisiert sind (Schübbe et al. 2003). Zudem ermöglicht ein parallel zu dieser Arbeit entwickeltes genetisches System für *M. gryphiswaldense* die genetische Manipulation des Organismus (Schultheiss et al. 2003; Schultheiss et al. 2004, Schultheiss et al. 2005, in Druck). Somit können gezielte Mutationen an Genen mit unbekanntem Funktionen eingeführt werden. Aufgrund dieser aufgeführten Eigenschaften ist *M. gryphiswaldense* Stamm MSR-1 ein geeigneter Modellorganismus zur Untersuchung der Magnetitbiomineralisation.

5 Intrazelluläre Kompartimente in Prokaryoten

Die Thematik dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung eines komplexen, subzellulären Kompartiments, den Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien. Daher soll im folgenden ein allgemeiner Überblick über das Vorkommen und die Organisation von intrazellulären Strukturen in Prokaryoten gegeben werden.

Typisch für eukaryotische Zellen sind Organellen wie z. B. Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten. Im allgemeinen werden Organellen als eigenständige und auf bestimmte Stoffwechselprozesse spezialisierte Strukturen im Cytoplasma eukaryotischer Zellen definiert, die mindestens von einer Einheitsmembran, d. h. einer Lipid-Doppelschicht, umgeben sind. In Prokaryoten wurden keine der oben genannten eukaryotischen Organellen nachgewiesen. Dennoch besitzen viele Bakterien intracytoplasmatische Membransysteme mit unterschiedlichen Funktionen. Einige Bakterien enthalten z. B. sogenannte Granula von Reservestoffen, die aus Verbindungen von Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel oder Phosphor bestehen.

In den letzten Jahren wurden in vielen Bakterien sehr komplexe, präzise positionierte, subzelluläre makromolekulare Strukturen nachgewiesen, die neuerdings auch als Zellkompartimente bezeichnet werden (Cannon et al. 2001;

van Niftrik et al. 2004; Seufferheld et al. 2003). Viele dieser prokaryotischen Kompartimente sind von einer unilaminaren Schicht umschlossen, die vollständig aus Protein besteht, während andere, ähnlich zu den Organellen der Eukaryoten, von einer lipidhaltigen Membran umgeben sind. Bei einigen handelt es sich dabei um eine Lipid-Doppelmembran, in die Proteine eingebettet sind, andere dagegen besitzen eine Lipid-Monomembran, die mit Proteinen assoziiert ist. In Tabelle 1 sind einige Beispiele für subzelluläre Strukturen sowie für verschiedene Typen bakterieller Kompartimente aufgeführt, die sich hauptsächlich in ihrer Morphologie, Funktion und Komplexität unterscheiden.

Die einfachste Form bakterieller subzellulärer Strukturen sind Speicherstoffe wie Polyphosphate, Glykogen oder elementarer Schwefel, die innerhalb der Zelle zu Granula aggregieren. Viele Sulfid-oxidierende Bakterien speichern z. B. elementaren Schwefel in Form stark lichtbrechender Granula. Volutin, auch bekannt als metachromatische Granula, sind die ersten intracytoplasmatischen Strukturen, die in Bakterien beobachtet wurden (Meyer 1904). Der Name ergab sich aufgrund der Erstbeschreibung bei *Spirillum volutans* und der charakteristischen Farbänderung, die die Granula mit einigen Farbstoffen herbeiführen. Die Volutingranula bestehen zum überwiegenden Teil aus langkettigen Phosphaten und haben die Funktion eines Polyphosphat-speichers.

Tabelle 1: Beispiele für subzelluläre Strukturen bzw. Kompartimente in Prokaryoten

Name	Organismus	Funktion	Aufbau/Organisation
Volutin oder auch metachromatische Granula	viele verschiedene Bakterien	Phosphatspeicher (z. B. für ATP-Synthese) Energiegewinnung	ohne Membran
Polysaccharid-Granula	viele verschiedene Bakterien	Glycogen- und Kohlenhydratspeicher	ohne Membran
Intracytoplasmatische Membranen und Thylakoidmembran	photosynthetische Bakterien, Purpurbakterien Cyanobakterien	Energiegewinnung durch Photosynthese	Einschnürung der Cytoplasmamembran
PHB-Granula	diverse Bakterien z. B. Bacillus, Pseudomonas, Alcaligenes	Speicherung von Polymeren und Kohlenstoff	Lipid-Monomembran
Chlorosomen	grüne Schwefelbakterien, Chlorobium	Energiegewinnung durch Photosynthese	Lipid-Monomembran
Schwefeleinschlüsse	z. B. Pupurbakterien (<i>Rhodospirillineae</i>), Schwefelbakterien (<i>Chromatium</i>)	Schwefelspeicher, Energiegewinnung	Unilaminare Proteinschicht
Gasvakuolen	Cyanobakterien, anoxygene photosynthetisierende Bakterien, Halobakterien	Verringerung der Schwebedichte, Steuerung des Auftriebs	Unilaminare Proteinschicht
Carboxysomen	autotrophe Bakterien wie Cyanobakterien und nitrifizierende Bakterien	CO ₂ -Fixierung	Unilaminare Proteinschicht
Endosporen	Bacilli, Clostridien	Dauerformen bei externem Stress wie extremen Temperaturen, Strahlung	Lipid-Doppelmembran/ intrazelluläre Differenzierung
Anammoxosomen	Planctomyceten	anaerobe Ammoniumoxidation	Lipid-Doppelmembran
Acidocalcisomen	Agrobakterien, Rhodospirillen	Calciumspeicher	Lipid-Doppelmembran
Magnetosomen	magnetotaktische Bakterien	Navigation an erdmagnetischen Feldlinien	Lipid-Doppelmembran

Sehr häufig in Bakterien sind die Poly- β -hydroxybutyrat (PHB)-haltigen Granula, die als Speicher für Polymere und Kohlenstoff dienen. Diese Einschlüsse weisen eine mit Proteinen assoziierte Lipid-Monomembran auf, die das Speicherpolymer PHB umgibt (McCool et al. 1999; Pötter et al. 2002). In einer kürzlich erschienenen Arbeit über die komplexe Struktur von PHB-Granula in *Ralstonia eutropha* wurden durch 2D-SDS-PAGE und MALDI-TOF-Analysen drei Phasin-Proteine identifiziert, für die eine eindeutige Bindung an die PHB-Vesikel nachgewiesen werden konnte. Dabei ist PhaP1 die Hauptkomponente an der Oberfläche der Granula (Pötter et al. 2004).

Andere Strukturen in Bakterien resultieren aus der komplexen Faltung von intracytoplasmatischen Membranen, Einstülpungen der Cytoplasmamembran, mit unterschiedlichen Morphologien wie Tubuli, Lamellen oder Vesikel. Diese dienen zur Vergrößerung der Membranoberfläche für höhere metabolische Aktivitäten oder zur Energiegewinnung. Cyanobakterien besitzen intracytoplasmatische thylakoide Membranen (Jensen 1993). Chromatophore Membransysteme sind in den meisten photosynthetischen Bakterien wie z. B. *Rhodospirillum rubrum* zu finden (Cohen-Bazire 1963). Beide dienen der Energiegewinnung durch Atmung oder Photosynthese.

Über komplexe, von der Cytoplasmamembran unabhängige, membranumgebene Chlorosomen wurde in *Chlorobium* berichtet. Dieses subzelluläre Kompartiment besteht aus Bakterienchlorophyll-Aggregaten und ist von einer Lipid-Monomembran umgeben, die mit einem Set aus etwa zehn verschiedenen Proteinen (speziesabhängig) assoziiert ist (Chung und Bryant 1996; Bryant et al. 2002).

Weitere differenzierte, von einer reinen Proteinschicht umgebene Kompartimente sind sogenannte Gasvakuolen und Carboxysomen. Gasvakuolen bestehen aus einem spezifischen Set von etwa 14 Proteinen, wobei GvpA (das häufigste Protein, stark hydrophob) und GvpC sehr gut untersuchte Strukturproteine dieses subzellulären Kompartiments sind (Offner et al. 1998; Mlouka et al. 2004). Carboxysomen sind mit Ribulose 1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo) gefüllt, woraus auch ihr Name resultiert, sie dienen der CO₂-Fixierung (Cannon et al. 2001).

Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für intrazelluläre Differenzierung in Prokaryoten sind die Endosporen (Lai et al. 2003; Todd et al. 2003). Endosporen ermöglichen den Bakterien ein Überleben unter extremen Umweltbedingungen.

In einer Vielzahl von Arbeiten konnte der Sporulationsmechanismus und die daran beteiligten Proteine identifiziert werden (Rudner und Losick 2002; Graumann et al. 2001; Lai et al. 2003). Die zwei wesentlichen Vorgänge der Sporenbildung sind: 1. Die sporulierende Zelle teilt sich asymmetrisch durch die Bildung eines polaren Septums, wobei man die kleine gebildete Zelle als Vorspore und die größere als Mutterzelle bezeichnet. 2. In der weiteren Entwicklung wird die Vorspore von der Mutterzelle ummantelt. Dies ist ein phagocytotischer Prozess, in dem die Membranen des polaren Septums um die Vorspore migrieren und diese als Protoplast in die Mutterzelle drücken. Es wurden einige Proteine identifiziert, welche spezifisch in der äußeren Vorsporemembran lokalisiert sind, dabei ist SpoIVFB das am besten untersuchte Sporulationsprotein (Rudner et al. 2002).

Zunehmend wurden in den letzten Jahren weitere komplexe intracytoplasmatische Kompartimente gefunden und untersucht. Dazu gehören z. B. Anammoxosomen in Planctomyceten, in denen die anaerobe Ammoniumoxidation stattfindet. Anammox-Bakterien besitzen einzigartige Membranlipide, die Ladderane, die durch ihre Dichte eine schwer durchlässige Barriere für die Diffusion von chemischen Substanzen bilden und dadurch sehr wahrscheinlich Konzentrationsgradienten während des ungewöhnlich langsamen Anammox-Metabolismus erhalten (Sinninghe-Damste et al. 2002). Innerhalb der Anammoxosomen wurden Tubulstrukturen beobachtet, die in organisierten Reihen angeordnet zu sein scheinen (Lindsay et al. 2001). Es wird spekuliert, dass diese Strukturen innerhalb der Anammoxosomen Funktionen des Cytoskeletts während der Zellteilung haben könnten. Außerdem wurde häufig beobachtet, dass die DNA mit der Anammoxosomenmembran verbunden ist und diese somit bei der Segregation der Chromosomen während der Zellteilung involviert sein könnte. Aufgrund dieser Beobachtungen werden Anammoxosomen als multifunktionelle Organellen eines völlig neuen Typs diskutiert (van Niftrik et al. 2004).

Weitere neuere Untersuchungen berichten über Acidocalcisomen in *Agrobacterium tumefaciens*, die den metachromatischen Volutingranula in verschiedenen Mikroorganismen ähnlich sind. Acidocalcisomen sind elektronendichte, saure intrazelluläre Kompartimente, umgeben von einer Membran reich an Pyrophosphaten und Polyphosphaten mit gebundenem Magnesium, Kalium und Kalzium (Docampo und Moreno 2001). In der Acidocalcisomen-Membran

wurde eine Protonen-Pyrophosphatase nachgewiesen, die homolog zu der in den Acidocalcisomen in einzelligen Eukaryoten ist. Daher wird diskutiert, dass Acidocalcisomen echte Organellen sind, die bereits vor der Trennung in Pro- und Eukaryoten existierten und somit einen möglichen gemeinsamen Ursprung haben (Seufferheld et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es verschiedene subzelluläre Kompartimente in Prokaryoten gibt, wobei die meisten für die Bakterienzelle nicht essentiell sind. Dagegen erfüllen die Organellen der eukaryotischen Zelle eine lebenswichtige Funktion. Desweiteren unterscheiden sich diese bakteriellen subzellulären Strukturen hinsichtlich ihrer mehr oder weniger bezeichneten komplexen Organisationsform. Alle als Kompartimente bezeichneten komplexeren Strukturen besitzen ein spezifisches Set an Proteinen und einige besitzen spezifische Lipide (z. B. Ladderane in der Anammoxosomen-Membran). Dies weist auf eine intrazelluläre Differenzierung sowie ein spezifisches Protein-„Targeting“ hin. Die Synthese und Abstammung der meisten Kompartimente ist noch ungeklärt.

6 Untersuchung von subzellulären Strukturen in Bakterien

Durch ein zunehmendes Spektrum an zell- und molekularbiologischen Methoden wurde das Verständnis für die Struktur und Funktion der subzellulären Organisation in Bakterien revolutioniert. Durch Lokalisierungsstudien wurde u. a. bekannt, dass viele Proteine zielgerichtet mit außerordentlicher Präzision zu spezifischen Orten in der Zelle transportiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass strukturelle und funktionelle Homologe der eukaryotischen Cytoskelett-Proteine Tubulin (FtsZ) und Actin (MreB) auch in Bakterien vorhanden sind. Damit wurde widerlegt, dass ein Cytoskelett einzigartig für Eukaryoten ist (Errington 2003). Dies ist ein Beispiel neben vielen anderen. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Arbeiten publiziert, in denen proteomische Analysen einen großen Beitrag zur Aufklärung von Struktur, Funktion, Lokalisierung, Expression und Dynamik der Proteine in Bakterien leisteten. Beispiele dafür sind Untersuchungen zum Sporulationsmechanismus in *Bacillus subtilis* (Sharp und Pogliano 2002; Rudner et al. 2002; Lai et al. 2003), zur PHB-Granulabildung in *Ralstonia eutropha* (Pötter et al. 2002; Pötter et al. 2004), *Bacillus megaterium* (McCool und Cannon

1999), *Rhodospirillum rubrum* (Handrick et al. 2004), Untersuchungen zur Lokalisierung der Zellwandproteine in *Caulobacter crescentus* (Alley 2001; Figge et al. 2004) und die Charakterisierung des Cellulosomen-Komplexes in Clostridien (Sabathé et al. 2002; Kosugi et al. 2002).

In den oben genannten Studien haben sich Methoden der „Proteomic“ als ein sehr leistungsfähiges Werkzeug zur Untersuchung subzellulärer Kompartimente erwiesen. Die Untersuchung des Biomineralisationsprozesses der Magnetosomen sollte daher unter ähnlichen Fragestellungen und methodischen Durchführungen erfolgen. In diesem Zusammenhang sollen die wichtigsten Methoden zur proteomischen Analyse im folgenden diskutiert werden.

6.1 Methoden zur proteomischen Untersuchung

Als Proteom (engl. **protein complement expressed by a genome**) wird die Gesamtheit aller in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen synthetisierten Proteine bezeichnet (Wasinger et al. 1995). Die Analyse eines Proteoms stellt ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der Zusammensetzung sowie der Dynamik und Lokalisierung von Proteinen komplexer Strukturen dar. Proteomische Untersuchungen ermöglichen außerdem die Charakterisierung von Proteineigenschaften wie Abundanzen und posttranslationale Modifikation der Proteine.

Um die Komplexität der Magnetosomenmembran möglichst vollständig zu erfassen sollten verschiedene Analyse-Methoden zur Identifizierung des Magnetosomen-Subproteoms angewendet werden. Dabei wurde die Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden verglichen, um neben der 1D-SDS-PAGE zusätzliche Informationen zu erhalten. Dazu wurde die 2D-SDS-PAGE zur Identifizierung möglicher weiterer Proteine in der Magnetosomenmembran angewandt. Die 2D-Gelelektrophorese ist eine leistungsstarke Methode, die die Möglichkeit zur schnellen und hochauflösenden Trennung komplexer Proteingemische bietet. In einem Gel können, mit einem geringen Probenverbrauch, bis zu 10 000 Proteine aufgetrennt und visualisiert werden (Klose und Kobalz 1995). Heute ist es möglich in einem 2D-Gel Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (IEP) zwischen drei und zwölf und einer Größe zwischen 10 und 200 kDa darzustellen (Görg et al. 1999; Himmelreich et al. 1996). Desweiteren liefert die 2D-SDS-PAGE Informationen über die relativen Änderungen der Proteinabundanzen oder posttranslationale Modifikationen von

Proteinen. Nachteile dieser Methode sind, dass beim Transfer von der ersten zur zweiten Dimension Proteine verloren gehen, und es ergeben sich häufig Probleme bei der Auflösung von stark hydrophoben Membranproteinen und sauren Proteinen. Allerdings wurde die erste Referenzkarte von Membranproteinen in *Pseudomonas aeruginosa* mittels 2D-SDS-Page-Analysen etabliert (Nouwens et al. 2000). Dadurch konnte die Genomic durch die Proteomic und somit durch Charakterisierung der Genprodukte vervollständigt werden. Ergänzt wurde diese Methode durch die Massenspektrometrie (MS).

Massenspektrometrische Methoden stellen heute eine der wichtigsten analytischen Methoden zur Trennung komplexer Proteingemische dar. Einen wesentlichen Beitrag dazu leistete die Entwicklung der schonenden und zugleich effizienten Isolierungstechniken **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-MS (MALDI-MS)** und **Elektrospray-Ionisation-MS (ESI-MS)**. Diese Techniken in der Peptid- und Proteinanalytik ermöglichen die Bestimmung der molekularen Massen von großen Biomolekülen (Aebersold und Goodlett 2001; Mann et al. 2001).

6.2 Proteinlokalisierung

Traditionelle Ansätze zur makromolekularen Untersuchung der Lokalisierung in Bakterien sind Techniken wie Immunoblotting, Immunogold-Markierung und Immunofluoreszenz-Mikroskopie. Diese Methoden waren zur Erkennung der Lokalisierung spezifischer subzellulärer Komponenten effizient, dennoch ist ihre Anwendung durch das Erfordernis von spezifischen Antikörpern gegen das Zielprotein begrenzt (Philips 2001). Außerdem ist diese Technik nur *in vitro* möglich und neigt leicht zu Artefakten.

Eine andere Möglichkeit zur Charakterisierung der zeitlichen Dynamik der Genexpression und Proteinlokalisierung, stellt die Anwendung von Reporter-genen bzw. Genfusionen *in vivo* dar. Sie sind relativ leicht zu konstruieren und bieten im allgemeinen eine hohe Empfindlichkeit zur Detektion. Ein seit einigen Jahren sehr häufig angewandtes Gen kodiert für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP). GFP ist ein fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das durch blaues Licht angeregt, grünes Licht abstrahlt. Eine Reihe von Eigenschaften machen GFP zu einem vielseitigen Reporter-gen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten. So ist die Beobachtung der Fluoreszenz ohne zusätzliche Substrate möglich; das Protein ist nicht zelltoxisch, was eine

Lokalisierung in lebenden Zellen und somit eine Echtzeit *in-situ* Beobachtung ohne jegliche Fixierungsmethoden ermöglicht. Mit spezifischen Antikörpern lassen sich GFP und GFP-markierte Proteine immunologisch, z. B. im Western Blot, nachweisen. Das Protein lässt sich auch dann detektieren, wenn es nicht fluoresziert oder denaturiert ist (Margolin 2000).

GFP wurde seit Mitte der 90er Jahre in verschiedensten Organismen (Vertebraten, Pilze, Pflanzen, Bakterien etc.) erfolgreich exprimiert (Cubitt et al. 1995). Diese Technik hat sich in zell- und molekularbiologischen Untersuchungen als sehr leistungsfähig erwiesen und wurde daher in den letzten Jahren in vielen verschiedenen Bakterien zur Lokalisierung subzellulärer Strukturen erfolgreich angewendet. Eine der ersten Anwendungen von GFP-Fusionen in Bakterien war z. B. die Demonstration der Lokalisierung spezifischer Sporulationsproteine in *Bacillus subtilis* (z. B. Arigoni et al. 1995; Lewis und Errington 1996; Webb et al. 1995; Graumann und Losick 2001). Weitere Anwendungen von GFP zur Charakterisierung von zellulären Prozessen wie z. B. Zellteilung und Separation in *E. coli* war die Lokalisierung von Komponenten der Zellteilungsmaschinerie (Sun und Margolin 1998; Chen et al. 1999 u. a.). In *Caulobacter crescentus* wurden GFP-Fusionen zur Lokalisierung eines Chemorezeptors (McpA) angewendet (Alley 2001).

Somit erschien diese Technik auch als Werkzeug für Fragestellungen zur Lokalisierung von MMP in Magnetbakterien interessant. Folgerichtig wurde kürzlich die erste Anwendung einer GFP-Fusion mit einem Magnetosomenmembran-assoziierten Protein (MamA) zur Untersuchung der Dynamik und der Lokalisierung in *Magnetospirillum* sp. Stamm-AMB-1 gezeigt (Komeili et al. 2004).

7 Zielsetzung

Die Untersuchungen im Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 sollten zum Verständnis der biochemischen und genetischen Grundlagen der Magnetitbiomineralisation beitragen. Dabei war das Ziel dieser Arbeit, erstmals die biochemische Zusammensetzung der Magnetosomenmembran in einem Magnetbakterium umfassend zu analysieren.

Eines der Ziele stellte die Optimierung der Magnetosomenisolierung und Evaluierung für biotechnologische und biomedizinische Anwendungen dar. Dazu sollten isolierte Magnetosomen in verschiedenen Kooperationen hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften sowie Partikelgröße und Dispersionen charakterisiert werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Charakterisierung der Magnetosomenmembran und der Identifizierung des Magnetosomenmembran-Subproteoms. Nach der Identifizierung des Subproteoms sollten einzelne Magnetosomengene kloniert und später mit Hilfe der vorliegenden Genomsequenzen die korrespondierenden Gene detektiert werden. Anschließend sollten Gene von ausgewählten Magnetosomenmembranproteinen (MMP) durch Deletionsmutagenese erste Hinweise auf mögliche Funktionen einzelner MMP bei der Biomineralisation und Assemblierung der Magnetosomen liefern. Desweiteren sollten Lokalisierungsexperimente verschiedener MMP Aufschluss über die Membrangenese und Expression geben.

■ B – Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende zwei Publikationen mit Erst-Autorenschaft und eine weitere Publikation mit Co-Autorenschaft:

1. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria (Grünberg et al. 2001)
2. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Grünberg et al. 2004) und
3. Magnetosomen als biologisches Modell der Eisenbindung: Messung der Relaxivität in der MRT (Herborn et al. 2003).

Die Thematik befasst sich mit der Rolle der Magnetosomenmembran im Bio-mineralisationsprozess. Dazu wurden Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der Magnetosomen und insbesondere Analysen der Magnetosomenmembran-assoziierten Proteine in *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 durchgeführt.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Publikationen zusammengefasst und im Zusammenhang diskutiert. Dieser Abschnitt ersetzt nicht die detaillierten Diskussionen in den Publikationen, auf die deshalb hier verwiesen wird. Ausführlicher werden hier weitere Aspekte erläutert, die in den Publikationen nicht oder nur kurz behandelt werden. Außerdem werden bislang unveröffentlichte Arbeiten dargestellt und diskutiert.

1 Biochemische Charakterisierung der Magnetosomen in *Magnetospirillum gryphiswaldense*

1.1 Isolierung von Magnetosomen

Zur Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der Magnetosomen wurden diese aus magnetischen Zellen von *M. gryphiswaldense* isoliert. Durch die Anwendung einer speziellen magnetischen Separationstechnik in Kombination mit einem anschließenden Ultrazentrifugationsschritt durch ein Saccharosekissen (Grünberg et al. 2001 und 2004) lassen sich reine Suspensionen intakter Magnetosomen gewinnen (Abb. 3).

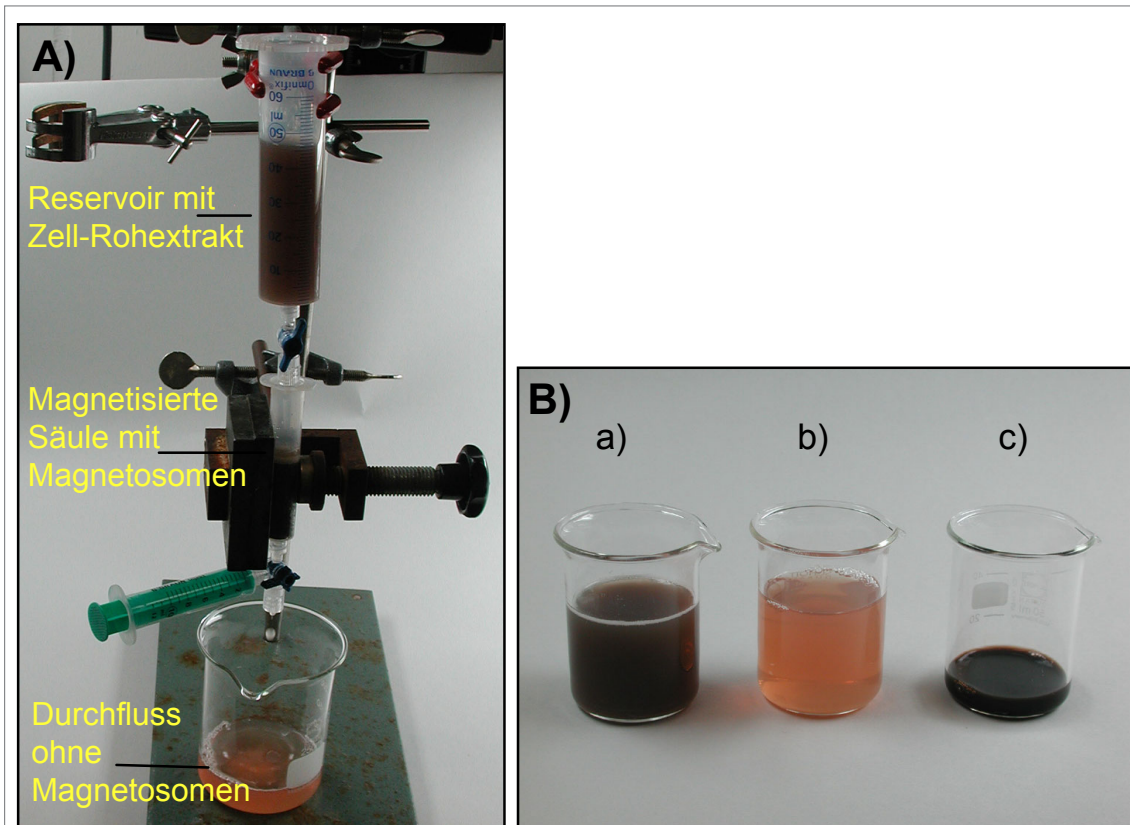


Abb. 3:

A) Technik zur Magnetosomenisolierung: Der Zellextrakt tropft aus dem Reservoir durch eine mit einer Eisenmatrix gefüllten Säule, dabei verbleiben die Magnetosomen aufgrund von magnetischer Interaktion in der Säule. Nach Entfernen des Magnetfeldes werden die Magnetosomen von der Säule gespült.

B) zeigt die quantitativ sowie qualitativ sehr effektive Isolierungsprozedur: a) Zell-Rohextrakt vor der Abtrennung der Magnetosomen, b) Durchfluss nach magnetischer Separation und c) die tiefschwarze Magnetosomensuspension.

In Kollaboration mit der Gruppe „Drug Targeting“ vom Max-Delbrück-Centrum (MDC) für molekulare Medizin in Berlin wurde der Einfluss der Präparationsbedingungen auf Membran- und Ferrofluideigenschaften hinsichtlich der medizinischen Anwendungen von Magnetosomen in der Tumordiagnostik untersucht. Zur Optimierung der Präparationsmethode in Bezug auf Reinheit und Ausbeute der Magnetosomen wurden verschiedene Parameter der Magnetosomenisolierung bzw. -aufreinigung getestet. Dabei wurde mit Zellaufschlussmethoden wie Ultraschall oder Lysozymbehandlung ein wesentlich geringerer Magnetosomenenertrag erzielt als mit Druckaufschluss mittels French-Press.

Zudem waren die Ergebnisse der alternativen Aufschlussmethoden schwer reproduzierbar. Weiter wurden Pufferart, Pufferkonzentration und pH-Wert während des Zellaufschlusses und der Magnetosomenisolierung optimiert. Während in zuvor beschriebenen Arbeiten eine wesentlich geringere Magneto-somenausbeute von 9 mg/g TG Zellen erreicht wurden (Grünberg et al. 2001), führten die neueren Untersuchungen (Grünberg et al. 2004) zu einer optimierten Technik, durch die aus 1 g Trockengewicht magnetischer Zellen 40 mg Magnetosomen gewonnen werden konnten. Der um mehr als das vierfache gesteigerte Magnetosomenenertrag resultierte aus der effektiveren Isolierungstechnik sowie der Optimierung der Sauerstoffkonzentration der mikroaeroben Kultivierung der Bakterien in einem Oxystat-Fermenter (Grünberg et al. 2004; Heyen und Schüler 2003).

1.2 Lipidanalysen der Magnetosomenmembran sowie ganzer Zellen

Bislang ist die Genese der Magnetosomenmembran unklar. Aufgrund elektronenmikroskopischer Beobachtungen und biochemischer Untersuchungen wurde vermutet, dass die Magnetosomenmembran aus einer Invagination der Cytoplasmamembran resultiert (Gorby et al. 1988; Matsunaga et al. 2000). Diese Hypothese konnte experimentell jedoch nicht belegt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Magnetosomenmembran *de novo* in der Zelle synthetisiert wird. In diesem Fall könnte vermutet werden, dass sich die Lipidzusammensetzung der Magnetosomenmembran von der Cytoplasmamembran unterscheidet. Somit könnte ein von der Cytoplasmamembran abweichendes Lipidprofil oder der Nachweis von speziellen und seltenen Lipiden in der Magnetosomenmembran ein Indiz für eine Neusynthese sein. Daher war die Untersuchung der Lipidzusammensetzung in der Magnetosomenmembran im Vergleich zu den ganzen Zellen ein interessanter Aspekt zur Beantwortung der Genese der Magnetosomenmembran.

In dieser Arbeit wurde die Lipidzusammensetzung in der Magnetosomenmembran sowie in ganzen Zellen von *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 durch Dünnschicht-Chromatographie sowie gaschromatographischer Massenspektroskopie untersucht. Die Analyse des Fettsäureprofils der Magnetosomenmembran in MSR-1 wies eine Anzahl von allgemein verbreiteten und häufigen Fettsäuren auf, die ebenfalls in der gesamten Zellfraktion identifiziert wurden (Grünberg et al. 2004). Phosphatidylethanolamin

und Phosphatidylglycerid waren die am häufigsten vorkommenden polaren Lipide sowohl in der Magnetosomenmembran als auch im gesamten Zellextrakt. Ornithinamid-Lipid und ein nicht identifizierbares Aminolipid wurden in wesentlich geringeren Mengen in der Magnetosomenmembran als in ganzen Zellen nachgewiesen. Mittels gaschromatographischer Massenspektroskopie konnten im Vergleich zum gesamten Zellextrakt in der Magnetosomenmembran keine Amid-gebundenen Fettsäuren wie 3-Hydroxyhexadecansäure (3OH 16:0), 3-Hydroxyoctadecansäure (3OH 18:0) und 2-Hydrodecensäure (2OH 18:1) nachgewiesen werden. Letztere sind typischerweise in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu finden (Ratledge und Wilkinson 1988). Somit unterschied sich das Lipid- und Fettsäuremuster der Magnetosomenmembran in MSR-1 durch die Abwesenheit von den oben genannten typischen Lipiden in der äußeren Membran und durch die relativen Mengen der einzelnen Lipide von dem Muster der gesamten Zellfraktion.

Diese Ergebnisse stimmen grundsätzlich mit den vorherigen Untersuchungen in *M. gryphiswaldense* (Gassmann 1996, Schüler und Bäuerlein 1997; Bäuerlein 2000) überein, allerdings waren in dieser Arbeit die quantitativen Unterschiede der verschiedenen Phospholipide in den jeweiligen Fraktionen kleiner. Dies könnte durch Ungenauigkeiten in der unterschiedlichen methodischen Durchführung sowie der Untersuchung ganzer Zellen zu begründen sein.

Die Frage nach der Herkunft der Magnetosomenmembran, d. h. ob sie ein Abkömmling der Cytoplasmamembran ist oder einen eigenen Syntheseweg besitzt, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht beantworten. So sind beide Thesen noch zu verfolgen und durch weitere Experimente der Magnetosomenmembran zu bestätigen oder zu verwerfen.

1.3 Das Subproteom der Magnetosomenmembran

Die Proteine in der Magnetosomenmembran spielen sehr wahrscheinlich eine entscheidende Rolle im Biomineralisationsprozess. Einen Hinweis dafür liefert die Tatsache, dass eine Reihe von Proteinen spezifisch mit der Magnetosomenmembran assoziiert und nicht in anderen Zellfraktionen nachzuweisen sind (Gorby et al. 1988; Matsunaga und Takeyama 1998; Okuda et al. 1996; Schüler 1999). Zur weiteren Untersuchung wurde in dieser Arbeit die Magnetosomenmembran aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* extrahiert und

analysiert. Ziel dabei war es, die assoziierten Proteine vollständig zu erfassen und über deren Sequenzanalysen Rückschlüsse auf mögliche Funktionen zu ziehen.

1.3.1 Identifizierung der Proteine in der Magnetosomenmembran

Die Zusammensetzung der Magnetosomenmembran-assoziierten Proteine wurde zunächst in der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) untersucht, die die Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse trennt. Je nach Gelkonzentration und Trennstrecke lassen sich Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 200 kDa, mit dem Tris-Tricin-Gelsystem niedermolekulare Proteine von 1,5–10 kDa auftrennen (Hashimoto 1983; Schägger und Jagow 1987). In Abhängigkeit von den Elektrophoresebedingungen wurden zwischen 15 und 20 Banden in der 1D-SDS-PAGE durch Coomassie-Blau-Färbung detektiert. Durch die empfindlichere Silberfärbung wurden keine weiteren Banden nachgewiesen. Die Polypeptide wiesen ein apparentes Molekulargewicht zwischen 15 und 103 kDa auf. Desweiteren wurden einige zusätzliche niedermolekulare Proteinbanden (5 kDa, 7 kDa und 9 kDa) mittels Tris-Tricin-SDS Gelelektrophorese identifiziert. Von 14 der identifizierten Banden wurden durch Edman-Abbau eindeutige N-terminale Sequenzen erhalten. Diese Proteine wurden als Mam-Proteine benannt.

Mittels 2D-SDS-PAGE wurden annähernd 30 Spots detektiert. Von den mit Coomassie-Blau detektierten Spots wurden 19 mittels tryptischen Verdau und anschließender Massenspektroskopie (MS) weiter analysiert. Alternativ wurden ganze Magnetosomen direkt einem tryptischen Verdau unterzogen und anschließend, ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung mittels Kapillar-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie-Massenspektroskopie (CapLC-MS-MS) analysiert. Durch diese Methode wurden annähernd 140 verschiedene Peptidsequenzen erhalten, die letztlich durch bioinformatische Analysen 27 verschiedenen Genprodukten zugeordnet werden konnten.

Zusammenfassend erwies sich die Kombination verschiedener Herangehensweisen zur Identifizierung der Proteinzusammensetzung der Magnetosomen als sehr geeignet und notwendig, um ein Maximum an Information zu erhalten. Anschließend wurden die erhaltenen Peptidsequenzen durch das Softwareprogramm MacVector 7.0 analysiert, Nukleinsäuresequenzen in die ORFs übersetzt sowie in verschiedenen Datenbanken ausgewertet. In der NCBI

und Swiss-Prot Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), (<http://au.expasy.org/sprot/>) wurden Sequenzen auf homologe Gene bzw. Proteine in anderen Organismen verglichen. Proteinsequenzen wurden mit dem Prosite- (<http://us.expasy.org/prosite/>) und dem PSORT-Programm (<http://psort.nibb.ac.jp/>) auf Signal-Motive untersucht.

1.3.2 Sequenzanalyse

Basierend auf den Sequenzanalysen konnten die Magnetosomenmembran-assoziierten Proteine in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Proteine, die als Magnetosomenmembranproteine (MMP) klassifiziert wurden. Kriterien dafür waren:

- a) ihre Präsenz als Hauptbande oder Spot in den 1D- und 2D-Gelen;
- b) ihr ausschließliches Vorkommen in magnetotaktischen Bakterien und
- c) keine oder nur entfernte Ähnlichkeit mit Proteinen bekannter Funktionen in anderen Organismen. Zudem sind die meisten der zugehörigen Gene in Operons mit anderen *mam*-Genen colokalisiert. Diese MMP sind MamA, MamB, MamC, MamD, MamE, MamF, MamG, MamJ, MamM, MamN, MamO, MamQ, MamR, MamS, MamT, MM22 und Mms6.

Die zweite Gruppe beinhaltet Proteine mit eindeutiger Homologie zu weit verbreiteten, biochemisch gut charakterisierten und sehr häufigen Proteinen in anderen nicht-magnetischen Organismen. Trotz einer sehr stringenten Technik zur Isolierung der Magnetosomen wurden in dieser Arbeit in der Magnetosomenmembran Proteine detektiert, die häufige Proteine in Bakterienzellen sind. Dabei handelte es sich um äußere Membranproteine, ATPase-Untereinheiten, ribosomale Proteine und Bestandteile der Atmungskette. Diese Proteine wurden nicht in die Gruppe der MMP eingeordnet. Vermutlich stellen sie Kontaminationen anderer Zellfraktionen dar, die durch Adsorption an die Magnetosomenpartikel während des Zellaufschlusses verursacht wurden. Kreuzkontaminationen durch festbindende Proteine anderer Zellfraktionen sind eine häufige Beobachtung bei Isolierung komplexer intrazellulärer Strukturen wie z. B. PHB-Granula und Endosporen (Lai et al. 2003; McCool et al. 1999; Todd et al. 2003). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass einige dieser Proteine *in vivo* tatsächlich mit der Magnetosomenmembran assoziiert sind. Es wäre durchaus vorstellbar, dass die in dieser Arbeit in der Magnetosomenfraktion

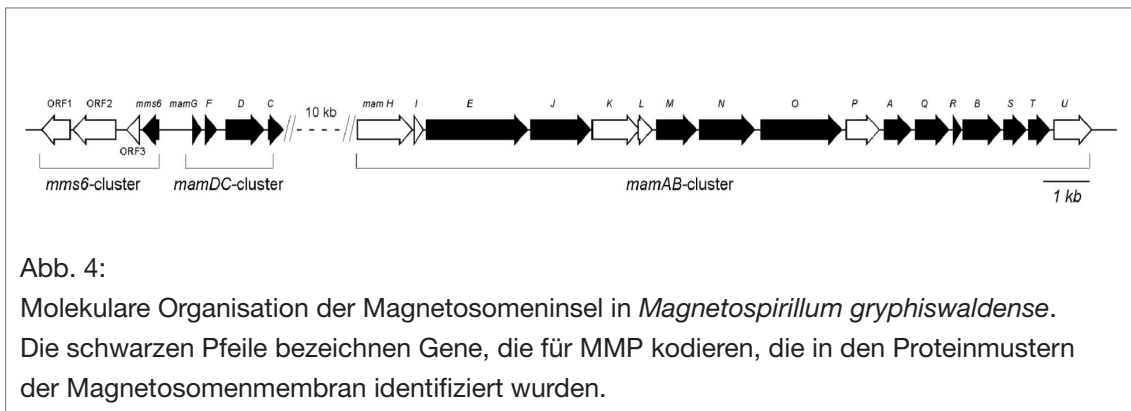
detektierte Protonen-lokalisierende ATPase z. B. eine Rolle bei der Energetisierung der Magnetosomenmembran spielen könnte.

1.3.3 Identifizierung und Organisation der *mam*-Gene

Zu Beginn dieser Arbeit stand nur sehr wenig Information über die genetische Determination der Magnetitbiomineralisation in magnetotaktischen Bakterien zur Verfügung. Daher wurden zunächst Gene in *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1, die für mutmaßliche MMP kodieren durch den mühsamen Weg der „reversen Genetik“ kloniert und anschließend analysiert. Dazu wurde genomische DNA von MSR-1 mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und Gene (mittels Sonden) im Southern Blot detektiert. Parallel dazu wurden einzelne Gene in der PCR mittels degenerierter Primer amplifiziert. Nach konventioneller Klonierung wurden die Gene sequenziert und mit Hilfe der Datenbanken bioinformatisch ausgewertet.

Allerdings änderte sich im Verlauf der Arbeit die Strategie durch die Möglichkeit des Vergleichs der *mam*-Gensequenzen in *M. gryphiswaldense* mit dem fast vollständig zusammengesetzten Genom des magnetischen α -Proteobakteriums *M. magnetotacticum* Stamm MS-1 und des magnetischen Kokkus Stamm MC-1 (USA, http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/magma/magma.home.html). Seit einiger Zeit steht zudem die fast vollständige Genomsequenz von MSR-1 zur Verfügung (Kooperation M. Kube und R. Reinhardt, MPI für molekulare Genetik, Berlin; AC-Numer: BX571782). Dadurch wurde eine wesentlich schnellere und einfachere Identifizierung homologer Gene möglich.

Alle zugehörigen Gene Magnetosomenmembran-assoziiierter Proteine konnten mit einer Ausnahme (MM22) einer einzigen genomischen Region zugeordnet werden. Diese Gene sind in drei verschiedenen Operons colokalisiert: dem 2,7 kb großen *mms6*-Operon (**mms** = **m**agnetic **p**article **m**embran-**s**pecific **p**rotein; Okamura et al. 2001), dem 2,1 kb *mamGFDC*-Operon und dem 16,5 kb großem *mamAB*-Operon. Zusammen bilden sie die mutmaßliche mindestens 35 kb große Magnetosomeninsel in *M. gryphiswaldense* (Schübbe et al. 2003) (Abb. 4).



Insgesamt konnten 25 Gene in den drei Operons der Magnetosomeninsel identifiziert werden; davon kodieren 16 für MMP, während 9 Gene keinem der in der Magnetosomenmembran identifizierten Proteine zugeordnet werden konnten. Dennoch könnten diese Gene innerhalb der Cluster ebenfalls für bisher nicht identifizierte MMP kodieren. So könnten Proteine, die aufgrund schwacher Wechselwirkungen nur lose an die Magnetosomenmembran binden, bei Isolierung und Reinigung der Magnetosomen solubilisiert und somit nicht erfasst worden sein. Das die Gene auf der Magnetosomeninsel essentiell für den Biomineralisationsprozess sind, beweist eine Mutante von MSR-1, der Stamm MSR-1B. In MSR-1B liegt eine spontane Deletion von annähernd 80 kb vor, die alle bekannten *mam*-Gene beinhaltet. Diese große chromosomale Deletion resultiert in einem nicht-magnetischen Phänotyp (Schübbe et al. 2003).

2 Charakteristika der Magnetosomenmembran-Proteine (MMP)

Alle identifizierten Magnetosomenmembran-Proteine, mit Ausnahme von MM22, haben sehr ähnliche Homologe im Genom anderer magnetotaktischer Bakterien. Das mit der Magnetosomenmembran assoziierte Protein Mms16 hat starke Sequenzähnlichkeit zu Phasin-ähnlichen, PHB-Granula assoziierten Proteinen in einigen anderen Bakterien (Schultheiss et al. 2004). In der Arbeit von Schultheiss et al. wurde für Mms16 durch eine GFP-Genfusion gezeigt, dass es nicht mit der Magnetosomenmembran, sondern mit den PHB-Partikeln in MSR-1 assoziiert ist (Schultheiss et al. 2005, in Druck).

Die Magnetosomenmembran-Proteine MamC, MamD, MamF, MamG, MamJ, MamR, MamS, MamT und Mms6 haben keine Homologie zu bekannten Proteinen nicht-magnetischer Organismen und scheinen daher speziell auf magnetotaktische Bakterien beschränkte Proteine zu repräsentieren, während andere MMP wie MamA, MamB, MamE, MamM, MamN, MamO, MamP und MamQ Ähnlichkeit mit Proteinen diverser oder unbekannter Funktionen in nicht-magnetischen Organismen aufweisen.

Nachfolgend werden Besonderheiten verschiedener MMP herausgestellt bzw. zusammenfassend dargestellt. Weitere Details sind den Publikationen (Grünberg et al. 2001; Grünberg et al. 2004) zu entnehmen.

MamA gehört zu den TPR (Tetratricopeptid repeat)-Proteinen und wurde in der Magnetosomenmembran verschiedener Magnetospirillum Arten nachgewiesen (Okuda et al. 1996). MamA besitzt 4–5 Kopien des „Tetratricopeptid-repeats“-Motivs, das in vielen Organismen vorkommt. Das wiederholte Tetratricopeptid-Motiv scheint in Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen (Blatch und Lasse 1999). TPR-Proteine können zahlreiche biologische Funktionen ausüben, die von der Transkriptionskontrolle über den Proteintransport bis zur Proteinfaltung reichen. MamA hat im Gegensatz zu typischen Membranproteinen keinen hydrophoben Membrananteil, daher ist anzunehmen, dass es elektrostatisch an die Magnetosomenmembran gebunden ist.

Obwohl MamA eines der häufigsten MMP (10%) ist, ist es kein essentielles Protein für die Magnetosomen-Synthese. In anderen Arbeiten werden allerdings Funktionen für MamA vorgeschlagen wie z. B. als Rezeptor in der Magnetosomenmembran, der mit cytoplasmatischen Proteinen interagiert (siehe Einleitung Seite 10; Okuda et al. 1996; Okuda und Fukumori 2001; Komeili et al. 2004).

MamB und **MamM** weisen eine signifikante Sequenzhomologie mit Proteinen der Cation Diffusion Facilitator (CDF)-Familie auf. Die CDF-Familie umfasst Proteine, die eine Funktion als Effluxpumpen toxischer divalenter Kationen wie Zink, Cadmium, Kobalt und anderen Schwermetallen haben. In anderen Bakterien sind sie für die Resistenz gegen bestimmte Schwermetalle verantwortlich.

MamB und MamM haben eine Ähnlichkeit von 48% zueinander sowie starke Ähnlichkeit zur CDF3-Unterfamilie, die mutmaßliche Eisentransporter umfasst

(Nies 2003). Aufgrund neuer genetischer Untersuchungen in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 scheinen MamB und MamM für den Eisentransport in die Magnetosomenvesikel verantwortlich zu sein (Schultheiss und Junge, unveröffentlicht; Grünberg et al. 2004). In Mutagenese-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten von MamB und MamM keine Magnetosomen mehr bildeten. Durch Komplementation der $\Delta mamB$ -Mutante mit MamB und MamM konnte dieser Phänotyp bestätigt werden (K. Junge 2003).

MamE und **MamO** haben eine relativ geringe Sequenzähnlichkeit von 31% zueinander. Beide Proteine weisen außerdem Sequenzähnlichkeiten zu HtrA-ähnlichen Serin-Proteasen auf, obwohl MamO keine PDZ-Domäne enthält. HtrA-ähnliche Proteine besitzen eine konservierte Trypsin-ähnliche Protease-Domäne und ein oder zwei PDZ-Domänen. Sie fungieren als molekulare Chaperone und Hitzeschock-induzierte Proteasen, die fehlgefaltete Proteine im Periplasma degradieren. Außerdem unterstützen Chaperone die korrekte Faltung, indem sie fehlerhafte intermolekulare Wechselwirkungen ausschalten (Clausen et al. 2002).

MamJ ist reich an sauren Aminosäureresten (14% Glutamat (E), 4,75% Aspartat (D)), die in repetitiven Motiven organisiert sind. Dieses Sequenzcharakteristikum könnte bei der Magnetitbiomineralisation von potentieller Relevanz sein. Polyelektrolytische Peptid-Domänen sind in Proteinen häufig zu finden, die in anderen Biomineralisations-Systemen wie z. B. in Muschelschalen, Coccolithophoriden (Kalkflagellaten) involviert sind (Bäuerlein 2003; Gotliv et al. 2003). Weiter ist bekannt, dass Carboxyl-Gruppen (aus Aspartat und Glutamat) eine starke Affinität zu Metallionen haben und häufig bei der Initiation von Kristallnukleationen durch Bindung von Metallliganden involviert sind (Mann et al. 2000; Arakaki et al. 2003).

In neueren Untersuchungen wurden Deletionsmutanten von MamJ in MSR-1 erzeugt und analysiert. Elektronenmikroskopisch wurde beobachtet, dass die Magnetosomen nicht mehr in ihrer ursprünglichen Kettenform vorliegen, sondern *in vivo* Aggregate bilden. Daher wird spekuliert, dass MamJ als ein filamentöses Protein entlang der Zellachse lokalisiert sein könnte oder eine Funktion bei der Kettenbildung durch elektrostatische Interaktion zwischen den Magnetosomen haben könnte (A. Scheffel, persönliche Mitteilung).

Die Funktion der Proteine **MamQ**, **MamR**, **MamS** und **MamT** ist bislang unbekannt. **MamN** weist Ähnlichkeiten zu einigen Transportprotein-Familien

auf. **MamQ** und **MamS** sind hydrophobe Proteine und daher vermutlich membrangebunden, während **MamR** ein hydrophiles Protein ist. Für **MamT** wurden zwei konservierte CytochromC Häm-Bindungsstellen (Cys-X-X-Cys-His) identifiziert, die auch in MamT von MS-1 und MC-1 zu finden sind. Die Identifizierung von Redox-Proteinen, wie z. B. Cytochromen, könnte auf eine Funktion von MamT bei der Oxidation oder Reduktion von Eisen während der Bildung des Eisenoxids Magnetit hinweisen.

Mms6 weist ausschließlich Homologie zu Proteinen in anderen magnetotaktischen Bakterien auf, insbesondere zu Mms6 in *Magnetospirillum* Stamm AMB-1. Kürzlich wurde dieses Protein in AMB-1 als ein fest gebundenes Magnetosomenmembran-Protein beschrieben, das am C-Terminus saure Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) und solche mit Hydroxylgruppen aufweist (Arakaki et al. 2003). Die Autoren vermuteten, dass diese Strukturen direkt mit der Mineraloberfläche interagieren. In Blotting-Experimenten mit radioaktivem Eisen wurde Eisenbindungsaktivität von Mms6 nachgewiesen. Daher schlugen Arakaki et al. zwei Funktionen des Proteins vor: 1. Die Initiation der Kristallnukleation und 2. Die Inhibition und Regulation des Kristallwachstums und somit Bestimmung der Morphologie.

Für eine Reihe von Proteinen, die im Biomineralisationsprozess involviert sind wurde beobachtet, dass sie glykosyliert sind. So gibt es Hinweise auf Oligosaccharidketten, die mit Biomineralien interagieren könnten (Mann et al. 2000). Die proteomischen Analysen dieser Arbeit in *Magnetospirillum gryphiswaldense* ergaben allerdings keine Hinweise auf glykosylierte Proteine. Außerdem konnten bislang für keines der MMP Sequenzmotive für Sortierungssignale oder Signalpeptide gefunden werden.

Im folgenden wird in Kapitel 3 auf die MMP **MamG**, **MamF**, **MamD** und **MamC** im experimentellen Zusammenhang eingegangen.

3 Genetische Untersuchungen ausgewählter MMP (bisher unveröffentlicht)

Nachdem die spezifisch an die Magnetosomenmembran gebundenen Proteine weitgehend identifiziert werden konnten, sollten sich erste Untersuchungen zur Funktion und Lokalisierung ausgewählter MMP anschließen. Besonders interessant waren MamG, MamF, MamD und MamC, weil sie die häufigsten Proteine (> 35% der gesamten MMP) in der Magnetosomenmembran sind. Aufgrund dieser hohen Abundanz wurde vermutet, dass diese Proteine eine essentielle Rolle im Bio-mineralisationsprozess spielen. Sie sind in allen bislang untersuchten magnetotaktischen Bakterien konserviert, während in anderen Organismen keine Homologen gefunden wurden. Außerdem werden diese Proteine durch das kleine *mamGFDC*-Operon kodiert, welches genetisch leicht manipulierbar erscheint. Die Gefahr der polaren Effekte bei der Deletion eines kleinen Operons scheint geringer als z. B. bei dem langen *mamAB*-Operon. Zudem befinden sich in Transkriptionsrichtung sehr wahrscheinlich keine weiteren Gene.

Hydrophathie-Plots der Aminosäuresequenz von **MamD** deuten auf ein hydrophobes Protein mit einem kurzen hydrophilen Bereich nahe des C-Terminus hin. Interessanterweise haben **MamD** und **MamG** Leucin-Glycin-reiche repetitive Sequenzmotive mit Ähnlichkeiten wie sie z. B. in Seiden-ähnlichen Proteinen (Zurovec und Sehnal 2002), in Muschelschalenproteinen (Sudo et al. 1997) und im Knorpelprotein Elastin (Bochicchio et al. 2001) gefunden wurden. Es ist bekannt, dass diese Proteine eine Tendenz zur Selbstaggregation haben und einige von ihnen sind in verschiedenen Biomineralisationsprozessen involviert. Da auch Mms6 ähnliche Leucin-Glycin-reiche Sequenzmotive aufweist, könnte für MamD und MamG ebenfalls eine Funktion bei der Nukleation und Morphologie der Magnetosomen vermutet werden (siehe Seite 33).

Für **MamF** wurden drei Banden in der 1D-Analyse detektiert. Während die 15-kDa-Bande mit dem monomeren Protein zu korrespondieren scheint, handelt es sich bei den beiden großen Banden (92 kDa und 103 kDa) mutmaßlich um undissoziierte Oligomere (Hepta- oder Hexamere) von MamF. Die drei Banden zusammen repräsentieren das zweithäufigste MMP nach

MamC. Hydropathie-Plots von MamF sagen ein stark hydrophobes Protein mit drei putativen Transmembranhelices vorher.

MamC ist mit einer Abundanz von fast 20% das häufigste Protein in der Magnetosomenmembran. Auch hier sagen Hydropathie-Plots ein stark hydrophobes Protein mit zwei Transmembranhelices voraus. Typisch für hydrophobe

Tabelle 2: Vorhergesagte Eigenschaften der Proteine des *mamGFDC*-Operons mittels Sequenzanalyse („MacVector“ 7.0)

Protein	Anzahl der Aminosäurereste	Molekulare Masse (kDa)	Isoelektrischer Punkt pI	Apparente molekulare Masse im SDS-Gel (kDa)	Vorhergesagte Lokalisierung
MamD	314	30,2	9,68	23,2	Membran
MamC	125	12,4	4,88	16,1	Membran
MamF	112	12,3	9,57	103,3; 91,9; 11,8	Membran
MamG	85	7,7	9,28	9	Membran

Membranproteine ist auch der Unterschied des berechneten zum apparenten Molekulargewicht (Tabelle 2).

Zur experimentellen Überprüfung der Funktion der Proteine sollte zunächst das ganze *mamGFDC*-Cluster deletiert werden. Desweiteren sollten Expressionsanalysen sowie Lokalisierungsexperimente von einzelnen Genen (*mamG*, *mamF*, *mamD* und *mamC*) Aufschluss über die Genese der Magnetosomenmembran geben.

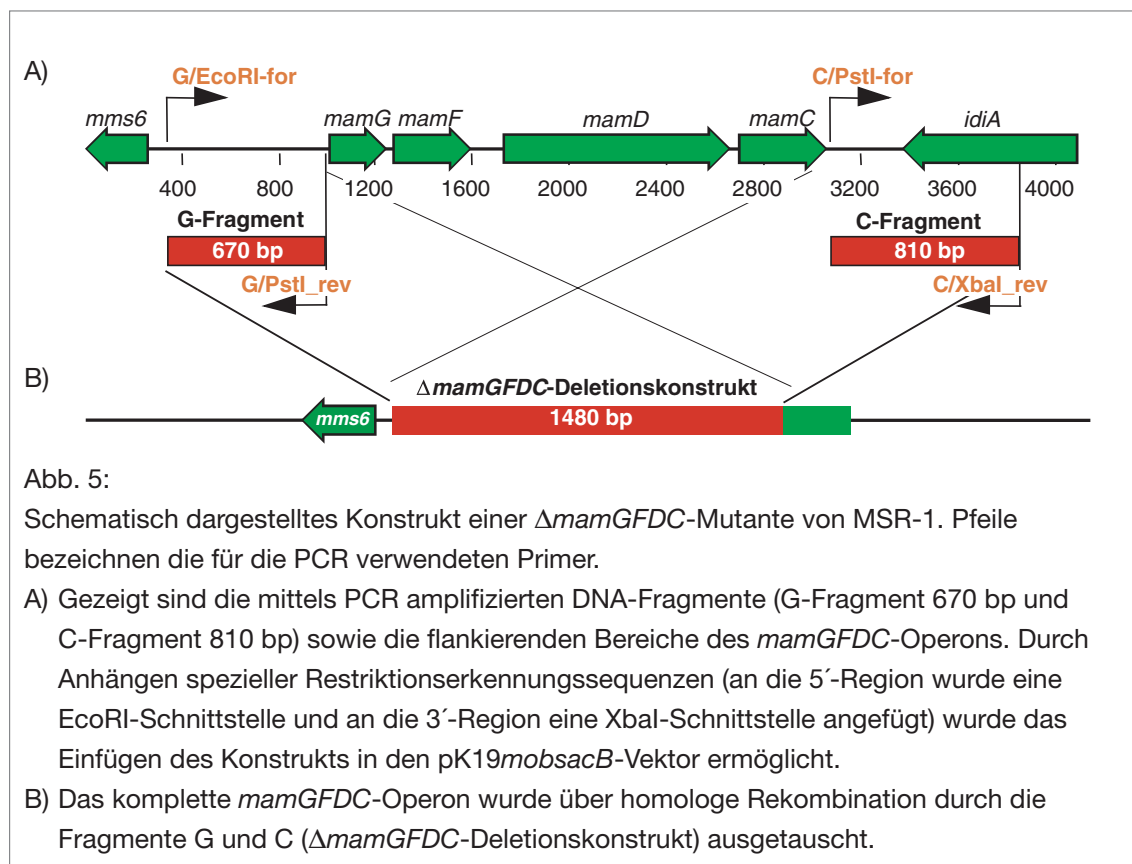
3.1 Erzeugung und Charakterisierung einer Δ *mamGFDC*-Mutante

Das für *M. gryphiswaldense* entwickelte genetische System (Schultheiss et al. 2003; Schultheiss et al. 2004) ermöglicht eine spezifische Manipulation im Genom des Organismus. Diese Technik sollte daher für die Erzeugung von Deletionsmutanten angewendet werden.

Konstruktion einer $\Delta mamGFDC$ -Mutante

Die Erstellung eines Deletionskonstrukts des *mamGFDC*-Operons in einem in MSR-1 nicht-replizierenden Vektor erfolgte mittels PCR und über mehrfache Klonierungsschritte (siehe D – Anhang). Das Deletionskonstrukt ($\Delta GFDC$ -Konstrukt) bestand aus den 670 bp und 810 bp langen 5'- und 3'-flankierenden Bereichen des *mamGFDC*-Operons und dem Stopcodon von MamG sowie dem Startcodon von MamC (Abb. 5). Nach Ligation in den in MSR-1 nicht-replizierenden, mobilisierbaren Vektor pK19*mobsacB* wurde das Konstrukt in den Donorstamm *E. coli* S17-1 transformiert. Anschließend wurde der Vektor aus dem Donorstamm mittels Konjugation in den Wildtyp MSR-1 (Stamm MSR-1R/S) übertragen und das Deletionskonstrukt über homologe Rekombination in das Zielgenom integriert.

Mutanten mit einem doppelten Rekombinationsereignis (Doppel-Crossover) sollten nicht mehr auf Kanamycin wachsen können. Über Replika-Plattierung wurden daher 300 Transkonjuganten auf den Verlust der Kanamycin-Resistenz überprüft. Nur drei Klone waren sensitiv gegenüber dem Antibiotikum, diese wurden weiter charakterisiert.



Genotypische Charakterisierung der $\Delta mamGFDC$ -Mutante

Um die mutmaßlichen Doppel-Crossover-Transkonjuganden genotypisch zu charakterisieren, wurde der Verlust der Gene des *mamGFDC*-Operons mittels PCR überprüft (Abb. 6). Diese drei Kanamycin-sensitiven Transkonjuganden, die nach einem doppelten Rekombinationsereignis nur das Konstrukt tragen sollten, werden im folgenden als $\Delta DC4$, $\Delta DC5$ und $\Delta DC6$ bezeichnet. Zum Vergleich wurden die Kanamycin-resistenten Transkonjuganden ($\Delta DC7$, $\Delta DC8$ und $\Delta DC9$) in der PCR mitgeführt, die nach einem einfachen Rekombinationsereignis im Genom den Vektor mit Konstrukt inseriert sowie das native Operon haben.

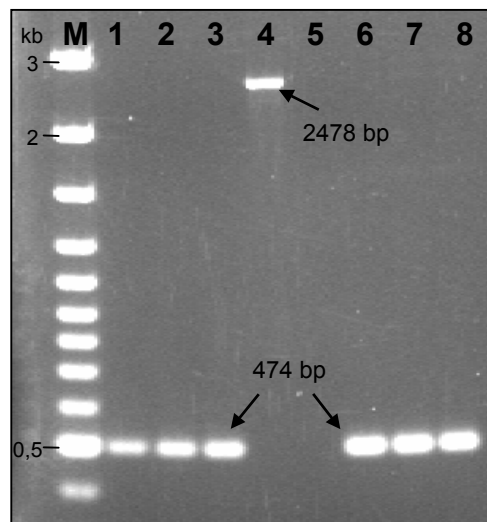


Abb. 6:

PCR zur Identifizierung von $\Delta mamGFDC$ -Mutanten.

Dargestellt sind die Amplifikate (Primer zur Amplifikation in der PCR: GK_for und C2K_rev) des *mamGFDC*-Operons nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Positivkontrolle wurde das Wildtypallel aus der genomischen DNA von MSR-1 (Spur 4, 2478 bp) und als Negativkontrolle die unmagnetische Mutante MSR-1B (Spur 5) mitgeführt. PCR-Produkte aus genomischer DNA von: Spur 1–3: $\Delta DC4$, $\Delta DC5$ und $\Delta DC6$ (474 bp) Spur 6–8: $\Delta DC7$, $\Delta DC8$ und $\Delta DC9$; M: DNA-Marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

Die aus den drei Mutantenstämmen $\Delta DC4$, $\Delta DC5$ und $\Delta DC6$ isolierte DNA mit einem Doppel-Crossover konnte nur ein Amplifikat erhalten werden, das veränderte Allel mit einer Größe von 474 bp. DNA aus den Transkonjuganden $\Delta DC7$, $\Delta DC8$ und $\Delta DC9$ wiesen jedoch ebenfalls nur ein Amplifikat auf, obwohl

PCR-Produkte mit 474 bp (entsprechend dem deletierten Operon) sowie mit 2578 bp (entsprechend dem kompletten Operon) erwartet wurden. Vermutlich wurden die beiden verschieden großen Fragmente nicht mit der gleichen Effizienz amplifiziert, da kleinere Fragmente bevorzugt amplifiziert werden. Die Deletionsmutanten mit einem mutmaßlichen Doppel-Crossover wurden daher zusätzlich durch einen Southern Blot verifiziert. Dazu wurde chromosomale DNA der Deletionsmutanten mit den Restriktionsenzymen SspI und EcoRV verdaut. Die im Blot verwendete DNA-Sonde (639 bp) wurde so konstruiert, dass sie zur Hälfte an MamC und zur Hälfte stromabwärts hinter der SspI Schnittstelle bindet. Somit wurde für die DNA von den Mutanten Δ DC4, Δ DC5 und Δ DC6 ein Hybridisierungs-Fragment mit einer Größe von 2955 bp nachgewiesen. Für die DNA des MSR-1 Wildtyps mit dem vollständigem Operon ergaben sich folglich zwei hybridisierende Fragmente (3589 bp und 2955 bp). Exemplarisch ist in Abb. 7 der Southern Blot mit der Mutante Δ DC4 dargestellt, für Δ DC5 und Δ DC6 ergab sich das gleiche Hybridisierungsmuster.

Somit konnte mittels Replika-Plattierung, PCR und Southern Blot bestätigt werden, dass die drei Transkonjuganden Δ DC4, Δ DC5 und Δ DC6 nur das Konstrukt tragen, den Vektor verloren hatten und somit das *mamGFDC*-Operon im Genom deletiert war.

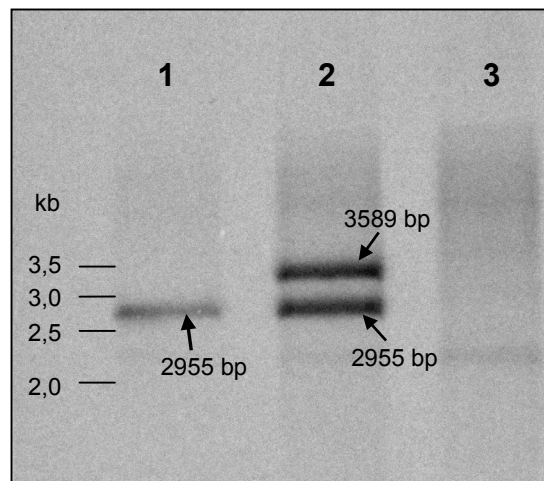


Abb. 7:

Southern Blot zur Identifizierung eines doppelten Rekombinationsereignisses (Details siehe Text). Genomische DNA aus: Spur **1**: Δ DC4, ein Fragment hybridisiert (2955 bp); Spur **2**: MSR-1 Wildtyp, zwei Fragmente hybridisieren (3589 bp und 2955 bp); Spur **3**: MSR-1B (Negativkontrolle); **M**: DNA-MarkerGeneRuler™ 100bp DNA Ladder

Phänotypische Charakterisierung der $\Delta DC4$ -Mutante

Aufgrund des Verlustes der vier häufigsten Proteine in der Magnetosomenmembran wurde ein unmagnetischer Phänotyp für die $\Delta DC4$ -Mutante erwartet. Allerdings war bereits bei lichtmikroskopischer Betrachtung zu erkennen, dass sich die Zellen beim Anlegen eines Magneten ausrichteten. Somit waren die Zellen der $\Delta DC4$ -Mutante überraschenderweise noch magnetisch. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Gene des *mamGFDC*-Clusters für die Bildung der Magnetosomen nicht essentiell sind. Obwohl der photometrisch ermittelte Magnetismus (Schüler et al. 1995) der $\Delta DC4$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur unwesentlich geringer war, bildeten die Transkonjuganden im Gegensatz zum Wildtyp anstatt dunkelbraune, graue bis hellbraune Kolonien. Diese Beobachtung deutete auf eine veränderte Magnetosomenbildung hin, die elektronenmikroskopisch bestätigt wurde. Elektronenmikroskopisch war zu beobachten, dass die Tendenz der Magnetosomen zur Kettenbildung *in vivo* geringer schien als beim Wildtyp (Abb. 8 A). Außerdem waren die Magnetosomenpartikel in der Mutante im Vergleich zu den reifen Partikeln (42 nm) im Wildtyp wesentlich kleiner, ähnlich den unreifen Partikeln (20–30 nm). Interessanterweise war zudem zu erkennen, dass die Deletionsmutanten eine abweichende Morphologie der Magnetosomen im Vergleich zu den kubooktaedrischen Magnetosomen im Wildtyp aufwiesen (Abb. 8 B). Die Magnetosomen waren zwar noch kubisch, aber der oktaedrische Körper schien nicht vollständig entwickelt.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass mindestens eines der durch das *mamGFDC*-Operon kodierten Proteine für Form und Größenverteilung verantwortlich ist. Die gestörte kettenförmige Anordnung könnte in der Deletionsmutante jedoch auch eine Konsequenz aufgrund der geringeren Größe der Magnetosomen sein. Die magnetischen Eigenschaften sind nämlich extrem abhängig von Größe und Form der Magnetosomen. Kleinere Partikel (< 30 nm) weisen Superparamagnetismus auf, d.h. sie haben kein permanentes magnetisches Dipolmoment. Für die Kettenbildung der einzelnen Partikel untereinander könnte neben der magnetischen Anziehung auch eines der deletierten Proteine verantwortlich sein.

Um Rückschlüsse auf die Funktion jedes einzelnen Gens des *mamGFDC*-Operons ziehen zu können, wurden Deletionskonstrukte von *mamG*, *mamD* und *mamC* erzeugt. Diese Versuche waren jedoch nicht erfolgreich. Zum einen gab

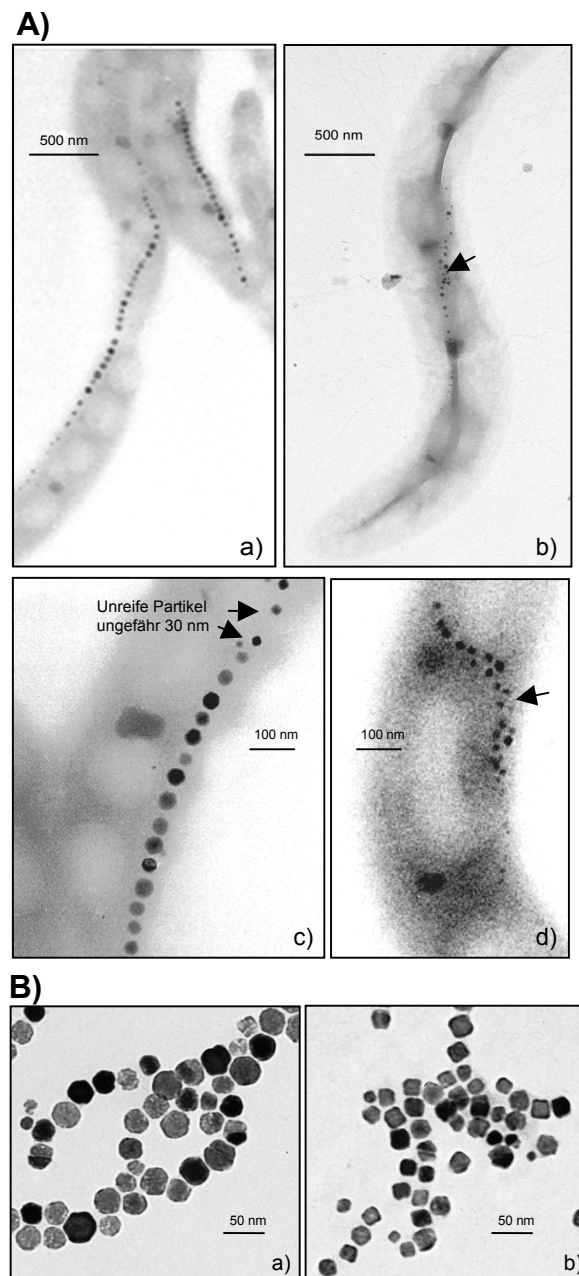


Abb. 8:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Δ DC4-Mutante (Aufnahmen von D. Schüler und A. Scheffel).

A) Vergleich der Anordnung der Magnetosomen *in vivo*:

a+c) MSR-1 Wildtyp und

b+d) Δ DC4-Mutante. Die Pfeile weisen auf die gestörte Kettenbildung in der Mutante hin.

B) Isolierte Magnetosomen aus:

a) Wildtyp, kubo-oktaedrische Morphologie und

b) Δ DC4-Mutante, abweichende Morphologie (kubisch, aber nicht oktaedrisch)

es Probleme bei der Ligation des *mamG*-Deletionskonstrukts in den Vektor pK19*mobsacB*, zum anderen gab es Probleme bei der Integration der *mamD*- und *mamC*-Deletionskonstrukte in das Genom des Wildtyps Stamm MSR-1 R1/S3. Dies könnte an der mangelnden Rekombinationseffizienz gelegen haben, die von Gen zu Gen verschieden sein kann. Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten gelang es im Rahmen einer Diplomarbeit mit dem sogenannten *Cre-loxP*-System (Sternberg 1981) eine MamC-Deletionsmutante zu erzeugen (A. Gärdes 2004). Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen *in vivo* keine Veränderungen der Magnetosomen im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich Form, Größe und Anordnung auf. Da kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp beobachtet wurde, könnte dennoch über eine Funktion von MamC z. B. in regulatorischen Prozessen spekuliert werden.

3.2 Lokalisierung von MamC

Zur weiteren Funktionsanalyse sollten neben dem Mutagenese-Ansatz die Expression und Lokalisierung verschiedener MMP mit spezifischen Antikörpern *in vitro* sowie mit Genfusionen *in vivo* untersucht werden. Dazu bot sich die Erstellung von Genfusionen mit dem „**Green Fluoreszenz Protein**“ (GFP) an (siehe auch Einleitung Kapitel 6.2).

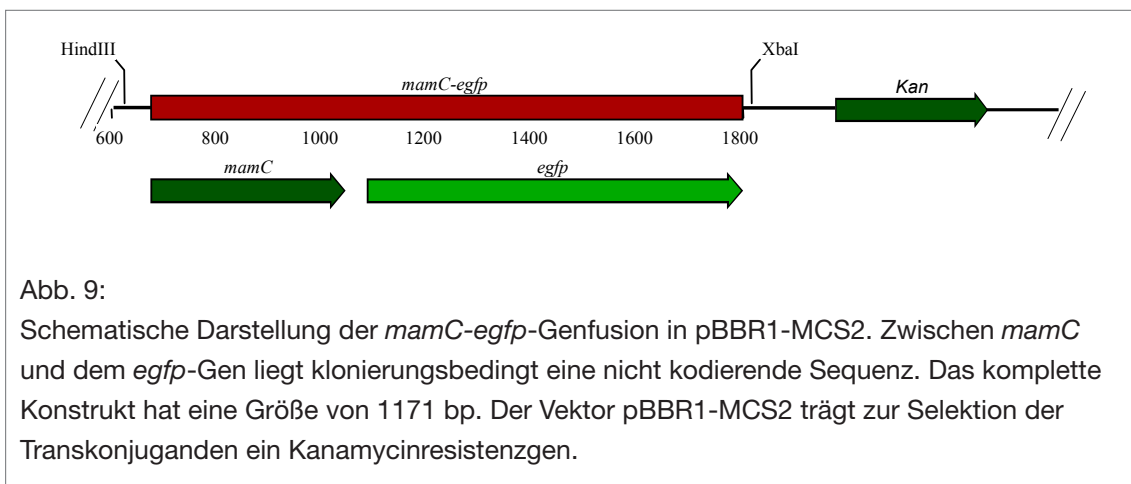
In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob sich GFP-Fusionen zur Lokalisierung der Magnetosomen-assoziierten Proteine in *M. gryphiswaldense* eignen. Im folgenden wird die Erzeugung einer GFP-Fusion mit dem häufigsten MMP MamC dargestellt und diskutiert.

3.2.1 Erzeugung einer *mamC-egfp*-Genfusion

Zur Erstellung der Genfusion wurde *mamC* (375 bp) mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde das Stopcodon durch spezifische Nukleotide ausgetauscht, so dass bei der Translation kein Leseabbruch stattfinden konnte. Das Amplifikat (*mamC* + flankierende Regionen 418 bp) wurde in den pEGFP-N3-Vektor mit dem *egfp*-Gen (720 bp) unter Berücksichtigung des korrekten Leserahmens fusioniert, woraus das Plasmid pABC2 resultierte. Da es sich bei MamC um ein stark hydrophobes Protein handelte, wurde eine C-terminale Fusion am vorhergesagten hydrophilen Bereich erstellt. Nach Überprüfung der korrekten Sequenz wurde das komplette Konstrukt *mamC-egfp* (1171 bp) (Abb. 9) in den replizierenden und mobilisierbaren Vektor pBBR1-MCS2 umkloniert (pABC3), in

E.coli Stamm S17-1 transformiert und per Konjugation in MSR-1 R1/S3 (resultierend in Stamm ABC5) bzw. MSR-1B R1/S3 (resultierend in Stamm ABC6) übertragen (siehe D – Anhang). Außerdem wurde zum Vergleich des Lokalisierungsmusters das unfusionierte *egfp*-Gen (auf dem Plasmid pAB4) in MSR-1 (resultierend in Stamm AB1) und MSR-1B (resultierend in Stamm AB2) transkonjugiert.

Kanamycin-resistente Transkonjuganden wurden anschließend mittels PCR auf die korrekte Übertragung des Vektors mit dem Fusionsprotein überprüft.



In die unmagnetische Mutante MSR-1B wurde ebenfalls das *mamC-egfp*-Fusion tragende Plasmid pABC3 eingeführt, um das Lokalisierungsmuster vergleichen zu können. Aufgrund einer spontanen Deletion von ca. 80 kb, die alle Gene der Magnetosomeninsel betrifft, enthält der Stamm keine Magnetitpartikel. Ob MSR-1B jedoch auch keine MM-Vesikel enthält, wurde noch nicht abschließend geklärt (Schübbe 2003). Da die Gene der Magnititbiomineralisation deletiert sind, könnte dieser Stamm Aufschluss darüber geben, ob für eine Lokalisierung von MMP wie MamC weitere Gene erforderlich sind.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung von MamC-EGFP

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde nun untersucht, ob das Fusionsprotein exprimiert wurde und wo es lokalisiert (fluoresziert). Fluoreszenzmikroskopisch war zu beobachten, dass Stamm AB1 und Stamm AB2 mit dem unfusionierten *egfp*-Gen leuchtenden (Abb. 10 A). Die Fluoreszenz erstreckte sich über das gesamte Cytoplasma, es war keine Lokalisierung des EGFP-Proteins zu

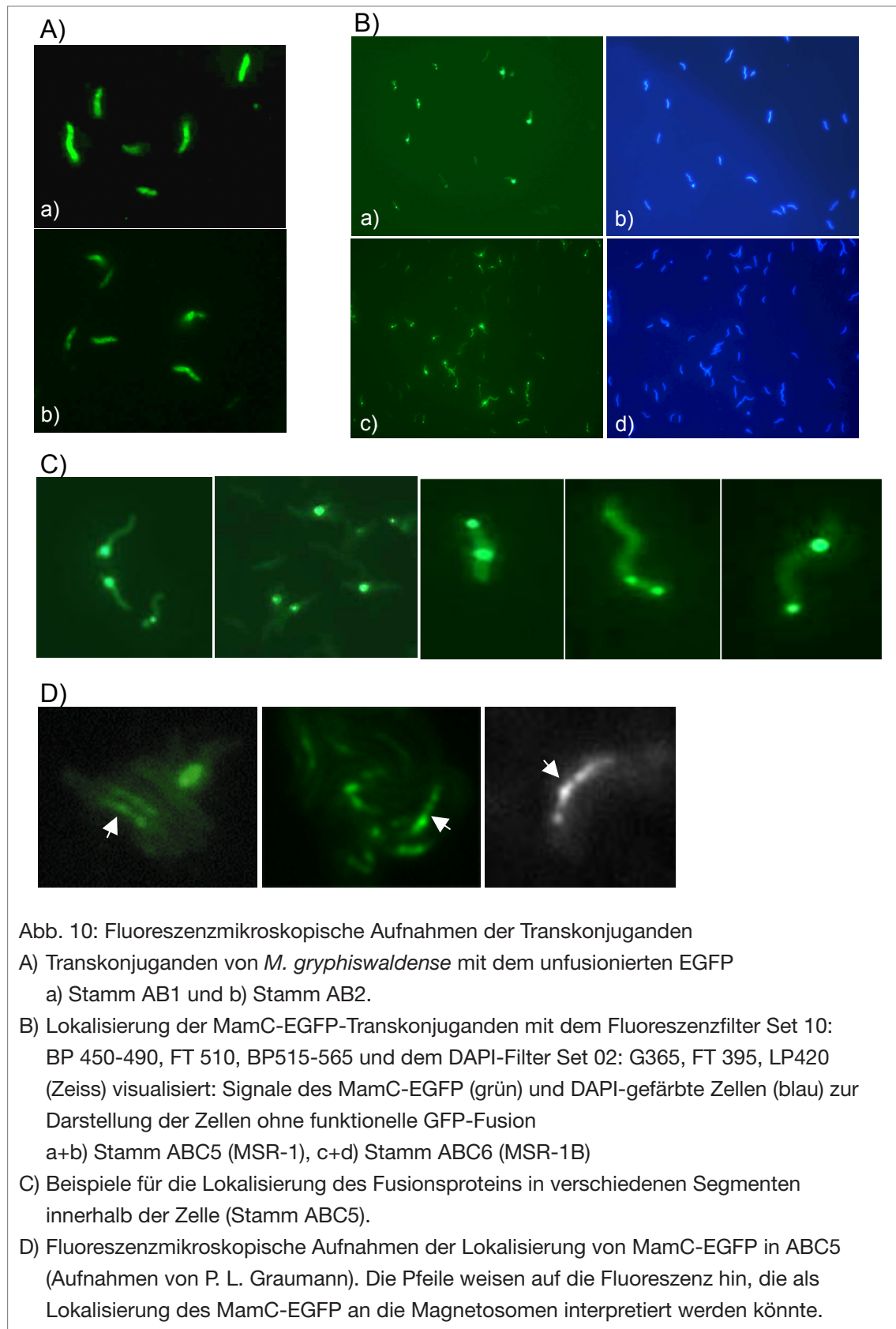
beobachten. Dieses Ergebnis belegte zum einen, dass das EGFP-Protein funktionell war und zum anderen, dass es im Cytoplasma exprimiert wurde. Die Zellen waren weiterhin magnetisch, auch elektronenmikroskopisch wurde kein Effekt des Fusionsproteins auf die Magnetosomenbildung beobachtet.

Die Transkonjuganden-Stämme ABC5 und ABC6 mit dem fusionierten MamC-EGFP fluoreszierten ebenfalls (Abb. 10 B). Hier konnte eine Lokalisierung des Fusionsproteins MamC-EGFP beobachtet werden. Diese Lokalisierung stellte sich als punktförmiges Signal dar, wobei innerhalb einer Zelle ein bis drei zentral bzw. peripher angeordnete Signale zu beobachten waren (Abb. 10 C). Die Signalmuster in den beiden Stämmen wiesen keinen Unterschied zueinander auf.

Zur Darstellung des Anteils der Zellen ohne (funktionelle) GFP-Fusion wurden diese parallel mit dem DNA-markierenden Farbstoff DAPI angefärbt (Bartel 2003). Dabei fiel auf, dass etwa die Hälfte der Zellen keine fluoreszierenden Signale aufwies. Ursache dafür könnte z. B. die heterogene Zellpopulation sein, da sich in einer nicht-synchronisierten Population jüngere und ältere sowie tote Zellen befinden. Zudem könnte MamC-EGFP zu verschiedenen Zeitpunkten während des Zellzyklus an unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisieren. Daher wurden Zellen von ABC5 sowie von ABC6 aus verschiedenen Wachstumsphasen einer Batchkultur fluoreszenzmikroskopisch begutachtet. Dabei war zu keiner Zeit ein Unterschied in der Lokalisierung des Fusionsproteins zu erkennen.

Das *in trans* in die Zellen eingeführte MamC-EGFP wird vom *lacZ*-Promotor auf dem Plasmid konstitutiv abgelesen und gegenüber dem nativen MamC im Genom in mehrfacher Ausführung exprimiert. Da dies zu einem artifiziell hohem Expressionslevel geführt haben könnte, sollten die Ergebnisse durch eine chromosomale Insertion des *mamC-egfp* Konstrukts überprüft werden, denn *in cis* wird das Fusionsprotein vom nativen Promotor abgelesen und liegt in einer niedrigeren Kopienzahl vor. Erste Ergebnisse einer chromosomalen Insertion von *mamC-egfp*, die über ein doppeltes Rekombinationsereignis erzeugt wurde, zeigten jedoch, dass die Zellen nicht fluoreszierten. Möglicherweise wurde das Fusionsprotein durch die Insertion ins Genom nicht mehr exprimiert.

Aufgrund der starken bzw. der teils überstrahlten Fluoreszenzsignale war nicht eindeutig zu erkennen, ob sich das Signal dort befindet, wo man die



Magnetosomenmembran erwarten würde. Daher wurden Aufnahmen der MamC-EGFP-Fusion in Stamm ABC5 an einem anderen Modell eines Fluoreszenzmikroskops und mit einer geringeren Beleuchtungsintensität erstellt. Darauf ließ sich eine Fluoreszenz entlang der Position der Magnetosomen erkennen, entsprechend könnte es sich dabei um die Lokalisierung von MamC-EGFP in der Magnetosomenmembran handeln (Abb. 10 D). Diese Beobachtung müsste allerdings eingehender untersucht werden.

Erstaunlich war das identische Signalmuster von MamC-EGFP in den Transkonjuganden-Stämmen ABC5 und ABC6. In der unmagnetischen Mutante wurde keine spezifische Lokalisierung erwartet, weil sie keine Magnetosomen besitzt und *mamC* neben allen anderen bekannten Magnetosomen-Genen deletiert ist. Daher wäre eine Fluoreszenz der ganzen Zellen ähnlich wie beim unfusioniertem GFP zu erwarten gewesen. Unklar war jedoch, ob in der Zelle bereits Strukturen vorliegen, an die MamC bindet. Dies könnte einerseits bedeuten, dass Komponenten, die außerhalb der Magnetosomeninsel determiniert werden, die zentrale Lokalisierung von MamC bestimmen. Andererseits ist nicht völlig auszuschließen, dass es sich bei den Signalen um Artefakte wie z. B. um denaturierte, präzipitierte Fusionsproteine („inclusion bodies“) handeln könnte. In diesem Fall ließe sich das identische Fluoreszenzmuster in beiden Stämmen erklären: Expressionsstudien mit hydrophoben Membranproteinen sind häufig problematisch. So wurde in Arbeiten mit GFP-Fusionen überexprimierter Membranproteine in *E. coli* über die Bildung von „inclusion bodies“ berichtet. Allerdings wurde beobachtet, dass die Bildung von „inclusion bodies“ oft zum Verlust der GFP-Funktionalität führt und das GFP nicht mehr fluoresziert. Erst nach korrekter Faltung entwickelt das Protein seine Fluoreszenz (Drew et al. 2001). Dies spricht dann jedoch gegen ein Artefakt, da das Fusionsprotein MamC-EGFP fluoreszierte.

Zur Klärung der Befunde wurden weitere C-terminale Genfusionen von *mamA*, *mamG* und *mamF* mit *egfp* *in trans* erstellt. Bei MamA handelt es sich um ein hydrophiles MMP, MamG und MamF sind hydrophobe MMP. Transkonjuganden mit der MamF-EGFP-Fusion fluoreszierten nicht. Die Untersuchungen der Lokalisierung von MamA und MamG ergaben das gleiche Bild wie die MamC-EGFP Fusion. Somit konnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung allein nicht geklärt werden, wo genau MamC-EGFP lokalisiert. Daher sollten weitere biochemische Untersuchungen erfolgen.

3.2.1 *In vitro* Untersuchungen der Lokalisierung des MamC-EGFP

Um weitere Informationen über die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins MamC-EGFP zu erhalten, wurde die Expression in den beiden Transkonjuganden-Stämmen ABC5 und ABC6 in verschiedenen Zellfraktionen im Western Blot immunochemisch untersucht. Dazu wurden Proteine des Rohextrakts, lösliche Proteine, Membranproteine sowie Magnetosomenproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde eine Immunodetektion mit Antikörpern sowohl gegen EGFP als auch gegen MamC durchgeführt (Abb. 11).

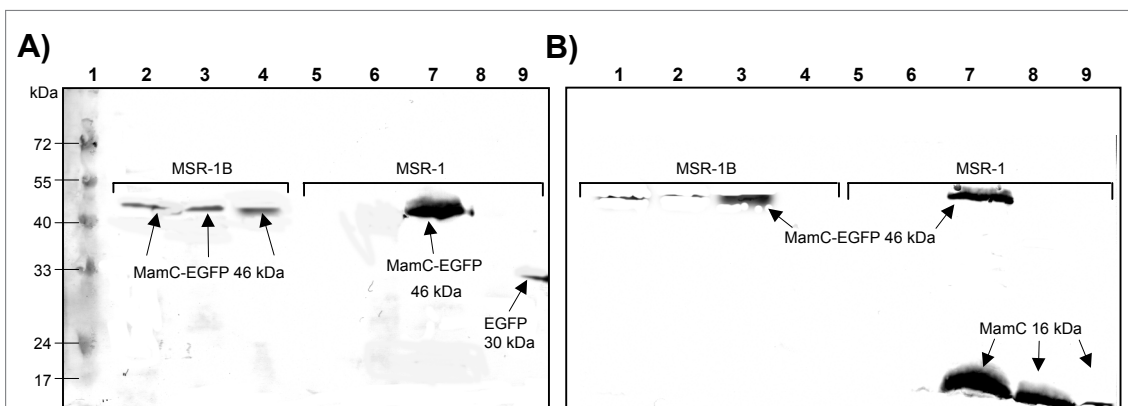


Abb. 11:

Immunoblot verschiedener Zellfraktionen der Transkonjuganden-Stämme ABC5 und ABC6 mit dem Antikörper A) gegen GFP; B) gegen MamC. Das MamC-EGFP Protein hat eine Größe von 46 kDa, während das native MamC ein apparentes Molekulargewicht von 16,1 kDa aufweist.

A) Spuren: **1** Marker, **2** MSR-1B lösliche Proteinfraction, **3** MSR-1B Membranprotein, **4** MSR-1B Zellextrakt, **5** MSR-1 lösliche Proteinfraction, **6** MSR-1 Membranprotein, **7** MSR-1 Magnetosomenmembran (MM), **8** Negativkontrolle: MSR-1 Wildtyp (WT) Magnetosomenmembran, **9** Positivkontrolle: EGFP unfusioniert.

B) Spuren: **1** MSR-1B lösliche Proteinfraction, **2** MSR-1B Membranprotein, **3** MSR-1B Zellextrakt, **4** Negativkontrolle: MSR-1B WT Zellextrakt, **5** MSR-1 lösliche Proteinfraction, **6** MSR-1 Membranprotein, **7** MSR-1 MM, **8** Positivkontrolle: MSR-1 WT MM, **9** MSR-1 WT Zellextrakt.

Mit dem Antikörper gegen GFP wurde MamC-EGFP (46 kDa) in Stamm ABC5 ausschließlich in der Magnetosomenmembran detektiert. In Stamm ABC6 dagegen wurde MamC-EGFP in allen untersuchten Fraktionen (in der löslichen Proteinfraction, Membranfraction und im Zellextrakt) nachgewiesen. Dies

könnte an der höheren Empfindlichkeit der biochemischen Methode gelegen haben, denn fluoreszenzmikroskopisch war nur ein Signal innerhalb der Zellen zu erkennen.

Immunoblots mit dem MamC-Antikörper zeigten das gleiche Ergebnis. Das native MamC wurde zusätzlich zur MamC-EGFP-Fusion in der Magnetosomenmembran der Transkonjuganden sowie in der Magnetosomenmembran des MSR-1 Wildtyps und im gesamten Zellextrakt in unterschiedlichen Mengen detektiert. Zudem konnte mit dem Antikörper gegen MamC gezeigt werden, dass in MSR-1B wie erwartet kein natives MamC exprimiert wird, sondern nur das Fusionsprotein.

Die Western-Blot-Analysen sowie die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wiesen darauf hin, dass das Fusionsprotein in MSR-1 ausschließlich in der Magnetosomenmembran lokalisiert ist. Allerdings konnten mit dieser Methode für die untersuchten Genfusionen keine abschließenden Aussagen über den Ort der Magnetosomenmembran-Genese gemacht werden. Dennoch können Fusion von MMP mit dem EGFP-Protein vielversprechende Ergebnisse liefern, scheinen aber nicht für alle Proteine gleichermaßen geeignet, um deren Lokalisierung in der Zelle zu untersuchen.

Gleichzeitig mit dieser Studie in *Magnetospirillum gryphiswaldense* wurde in *Magnetospirillum* sp. Stamm AMB-1 die Lokalisierung von einem Magnetosomenprotein untersucht (Komeili et al. 2004). Die funktionelle Insertion eines Fusionsgens mit GFP wurden mit dem hydrophilen Membranprotein MamA durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ergaben ein unterschiedliches Lokalisierungsmuster von MamA-GFP während der Wachstumsphasen. Dabei erstreckte sich die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase als dünne Linie in der Zelle von einem zum anderen Ende. Zeitweise wurde eine Lokalisierung von MamA-GFP in der Zellmembran beobachtet. Dies wurde jedoch nicht belegt und bleibt zweifelhaft. In der stationären Phase wurde ein punktförmiges Lokalisierungsmuster beobachtet, indem die Zellen am Ende des Wachstums ein bis vier Spots des Fusionsproteins beinhalteten. Diese Beschreibung deckt sich teilweise mit den Beobachtungen der EGFP-Fusionen mit MamC, MamA und MamG, wobei in dieser Arbeit jedoch keine Dynamik der Lokalisation der Proteine beobachtet werden konnte.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Magnetosomenmembran in *Magnetospirillum gryphiswaldense* biochemisch und molekulargenetisch untersucht. Die Magnetosomenmembran ist eine biologische Phospholipid-Doppelmembran, die die Magnetosomen in der Zelle abgrenzt. Sie ist mit einem spezifischen Set von 17 Proteinen assoziiert, die sich von denen der anderen Zellfraktionen unterscheiden. Magnetosomen haben somit eine eigenständige Funktion als intrazelluläre Reaktionsräume der Biomineralisation von Magnetit. Aufgrund dieser Kriterien stellen Magnetosomen ein subzelluläres Kompartiment in Prokaryoten dar, das jedoch für die Zelle nicht essentiell ist.

Zur Entstehung der Zellkompartimente besteht die allgemeine Theorie einer Invagination der Zellmembran. Die molekulare Maschinerie der Vesikelbildung in Eukaryoten ist mittlerweile recht gut verstanden (Schmid und Damke 1995). Dagegen gibt es bislang nur wenige Studien zur Vesikelbildung in Prokaryoten. In einigen Prokaryoten werden die Vesikel durch Einstülpung der Cytoplasmamembran gebildet, so wie es auch für die Magnetosomenmembran vermutet wurde. Jedoch konnten die Ergebnisse der Lokalisierungsexperimente in dieser Arbeit keinen Aufschluss über die Genese der Magnetosomenmembran geben. In MSR-1 konnte keine Lokalisierung der MMP in der Cytoplasmamembran beobachtet werden. Daher ist durchaus denkbar, dass magnetotaktische Bakterien einen Mechanismus zur Vesikelbildung verwenden, der ähnlich zu dem in Eukaryoten ist, wobei die Membran im Cytoplasma *de novo* synthetisiert wird.

Die Komponenten der Magnetosomenmembran kontrollieren die Biomineralisation von Magnetit. Die genaue Funktion der meisten MMP konnte zwar nicht eindeutig gezeigt werden, dennoch sollen im folgenden noch einmal die potentiellen Kandidaten und deren spekulative Rolle beim Zusammenbau und Erhalt der Magnetosomen zusammenfassend dargestellt werden.

Häufig beobachtete Charakteristika für Proteine, die in Biomineralisationsprozessen involviert sind, sind repetitive Sequenzmotive, spezielle polyelektrolytische Polypeptid-Domänen mit ungefalteten offenen Konformationen (Evans 2003). Die MMP in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamG, MamD und Mms6 sowie MamJ weisen diese genannten Eigenschaften teilweise auf. Für **MamG**, **MamF**, **MamD** und **MamC** konnte durch die

Ergebnisse der Deletionsmutagenese gezeigt werden, dass mindestens ein Gen dieses Operons Funktionen in der Formgebung, Größe und Anordnung der Magnetosomen hat. Diese Proteine könnten in der Magnetosomenmembran asymmetrisch verteilt sein und so das Kristallwachstum in eine bestimmte Richtung erleichtern und in andere Richtungen hemmen. Für **Mms6** wird aufgrund der eisenbindenden Region angenommen, dass eine direkte Interaktion mit der mineralischen Oberfläche der Magnetitkristalle stattfindet. Ähnliche Motive sind in MamD und MamG zu finden, was die Beobachtung der Ergebnisse der Mutagenese-Experimente unterstützt, dass diese Proteine eine Funktion in Wachstum und Formgebung der Magnetosomenvesikel haben. Deletionsmutanten von **MamJ** zeigen phänotypisch eine Störung der Kettenbildung, was auf ein „Scaffold“-Protein hinweisen könnte (A. Scheffel, persönliche Mitteilung).

Während viele MMP typische Charakteristika von Membranproteinen aufweisen, erscheinen andere hydrophil mit einer vorhergesagten Lokalisierung im Cytoplasma. Daher könnte vermutet werden, dass die Bindung der MMP nicht nur auf hydrophober Interaktion beruht, sondern bei einigen MMP andere Arten von Interaktion stattfinden, wie Protein-Protein-Interaktion durch TPR-Domänen wie sie z. B. in **MamA** zu finden sind. Dabei könnte MamA durch Bindung der Magnetosomen an die Innenseite der Cytoplasmamembran die Kettenbildung stabilisieren. **MamE** könnte durch die Kontrolle der richtigen Faltung und intermolekularen Wechselwirkungen z. B. bei der Entwicklung und Zielsteuerung der MMP während des Zusammenbaus der Membran involviert sein. PDZ-Domänen sind an einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und vermitteln den Zusammenbau von spezifischen Multi-Proteinkomplexen. Für MamA und MamE könnte man sich somit die Organisation um ein PDZ- oder TPR-basierendes Gerüst vorstellen, das eine stabile Lokalisation interagierender Proteine während des Magnetosomenzusammenbaus erlaubt.

MamB und **MamM** sind im Eisentransport evtl. durch Erleichterung der Diffusion des Eisens in die Magnetosomenvesikel involviert, während **MamT** aufgrund der CytochromC Hämbindungsstelle bei Redoxprozessen des Eisens zu Magnetit beteiligt sein könnte.

Diese oben aufgeführten Spekulationen könnten als Hypothese dienen, die in künftigen Arbeiten durch genetische Analysen überprüft werden könnten. Ist

der Prozess der Magnetosomenbildung in *M. gryphiswaldense* auf molekularer Ebene verstanden, könnte dies als ein allgemeines Modell von Biomineralisationsprozessen dienen, das Einblick in den evolutionären Ursprung anderer bakterieller Kompartimente sowie eukaryotischer Organellen liefern könnte.

■ C – Literaturverzeichnis

- Aebersold, R. und D. R. Goodlett.** 2001. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 101(2): 269-95.
- Alley, M. R.** 2001. The highly conserved domain of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is required for its polar localization. *Mol. Microbiol.* 40(6): 1335-43.
- Arakaki, A., J. Webb und T. Matsunaga.** 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* 278: 8745-50.
- Arigoni, F., K. Pogliano, C. D. Webb, P. Stragier und R. Losick.** 1995. Localization of Protein Implicated in Establishment of Cell Type to Sites of Asymmetric Division. *Science* 270(5236): 637-640.
- Bäuerlein, E.** 2000. Single magnetic crystals of magnetite (Fe₃O₄) synthesized in intracytoplasmic vesicles of *Magnetospirillum gryphiswaldense*, p. 61-80. In: E. Bäuerlein (ed.), *Biom mineralization*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bäuerlein, E.** 2003. Biom mineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 614-41.
- Balkwill, D., D. Maratea und R. Blakemore.** 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* 141: 1399-1408.
- Bartel, A.** 2004. Expression und Lokalisierung eines Magnetosomenmembran-assoziierten Proteins aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* mittels einer GFP-Fusion. Diplomarbeit, Hochschule Bremen.
- Bazylnski, D. A., A. Garratt-Reed und R. B. Frankel.** 1994. Electronmicroscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Res. Tech.* 27(5): 389-401.
- Bazylnski, D. A.** 1995. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* 61: 337-343.
- Bazylnski, D. A. und R. B. Frankel.** 2000. Biologically controlled mineralization of magnetic iron minerals by magnetotactic bacteria. *Environmental microbe-metal interactions*. D. R. Lovley. Washington, DC, ASM Press:109-143.
- Bazylnski D. A. und R. B. Frankel.** 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* Mar; 2(3): 217-30.

- Benning, C., J. T. Beatty, R. C. Prince und C. R. Somerville.** 1993. The sulfolipid *sulfoquinovosyldiacylglycerol* is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1561-5.
- Blakemore, R. P.** 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* 190: 377-9.
- Blakemore, R. P., D. Maratea und R. S. Wolfe.** 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 140: 720-729.
- Blakemore, R. P.** 1982. Magnetotactic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 217-238.
- Blatch G. L. und M. Lasse.** 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays.* Nov; 21(11): 932-9.
- Bochicchio, B., A. Pepe und A. M. Tamburro.** 2001. On (GGLGY) synthetic repeating sequences of lamprin and analogous sequences. *Matrix Biol.* 20: 243-50.
- Bryant, D. A., E. V. Vassilieva, N. U. Frigaard und H. Li.** 2002. Selective protein extraction from *Chlorobium tepidum* chlorosomes using detergents. Evidence that CsmA forms multimers and binds bacteriochlorophyll a. *Biochemistry* 41: 14403-11.
- Cannon, G. C., C. E. Bradburne, H. C. Aldrich, S. H. Baker, S. Heinhorst und J. M. Shively.** 2001. Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5351-61.
- Chen, J. C., D. S. Weiss, J. M. Ghigo und J. Beckwith.** 1999. Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181(2): 521-30.
- Chung, S. und D. A. Bryant.** 1996. Characterization of *csmB* genes from *Chlorobium vibrioforme* 8327D and *Chlorobium tepidum* and overproduction of the *Chlorobium tepidum* CsmB protein in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 166: 234-244.
- Clausen, T., C. Southan und M. Ehrmann.** 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* 10(3): 443-55.
- Cohen-Bazire, G. und R. Kunisawa.** 1963. The fine structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Cell Biol.* 16: 401-19.
- Cornell, R. M. und U. Schwertmann.** 2003. *The Iron Oxides.* Wiley-VHC-Verlag.

- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross und R. Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20(11): 448-55.
- DoCampo, R. und S. N. J. Moreno. 2001. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114(2): 151-9.
- DeLong, E. F., R. B. Frankel und D. A. Bazylinski. 1993. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* 259(5096): 803-806.
- Diebel, C. E., Proksch, R., Green, C. R., P. Neilson und M. M. Walker. 2000. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* 406: 299-302.
- Errington, J. S. 2003. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell Biol.* 5(3): 175-8.
- Evans, J. 2003. Apples and oranges: Comparing the structural aspects of biomineral- and ice-interaction proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface. Science* 8: 48-54.
- Figge, R. M., A. V. Divakaruni und J. W. Gober. 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 51(5): 1321-32.
- Flies, C., H. Jonkers, D. deBeer, K. Bosselmann, M. Böttcher und D. Schüler. 2005. Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* In press.
- Frankel, R. B., R. P. Blakemore und R. S. Wolfe. 1979. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* 203: 720-729.
- Frankel, R. B., G. C. Papaefthymiou, R. P. Blakemore und W. O'Brien. 1983. Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 763: 147-159.
- Frankel, R. B., D. A. Bazylinski und D. Schüler. 1998. Biomineralization of magnetic iron minerals in bacteria. Proc. 11th Toyota conference: Nanostructured materials in biological and artificial systems.
- Frankel, R. B., D. A. Bazylinski, M. S. Johnson und B. L. Taylor. 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* 73: 994-1000.
- Fukumori, Y., H. Oynagi, K. Yoshimatsu, Y. Noguchi und T. Fujiwara. 1997. Enzymatic iron oxidation and reduction in magnetite synthesizing *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Phys. IV* 7: 659-662.

- Gärdes, A.** 2004. Deletionsmutagenese eines Magnetosomenproteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense* unter Etablierung des *Cre-loxP*-Systems. Diplomarbeit, Fachhochschule Oldenburg.
- Gassmann, M.** 1996. Untersuchungen zur Aufnahme von Kupfer und Eisen und Lipidanalyse der Magnetosomen-, Cytoplasma- und Außenmembran in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Diplomarbeit. Tübingen/München.
- Gorby, Y. A., T. J. Beveridge und R. P. Blakemore.** 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* 170: 834-841.
- Goerg, A., C. Obermaier, G. Boguth und W. Weiss.** 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20(4-5): 712-717.
- Gotliv, B. A., L. Addadi und S. Weiner.** 2003. Mollusk shell acidic proteins: In search of individual functions. *Chem. Biochem.* 4: 522-9.
- Graumann, P. L. und R. Losick.** 2001. Coupling of asymmetric division to polar placement of replication origin regions in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183(13): 4052-60.
- Handrick, R., S. Reinhardt, P. Kimmig und D. Jendrosseck.** 2004. The "Intracellular" Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a Periplasm-Located Protein with Specificity for Native PHB and with Structural Similarity to Extracellular PHB Depolymerases. *J. Bacteriol.* 186(21): 7243-7253.
- Hanzlik, M., M. Winkelhofer und N. Petersen.** 1996. Spatial Arrangement of Chains of Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria. *Earth & Planetary Science Letters* 145(1-4): 125-134.
- Hashimoto F., T. Horigome, M. Kanbayashi, K. Yoshida und H. Sugano.** 1983. An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 15;129(1): 192-9.
- Herborn, C. U., N. Papanikolaou, R. Reszka, K. Grünberg, D. Schüler und J. F. Debatin.** 2003. Magnetosomes as biological model for iron binding: Relaxivity determination with MRI. *Rofo Fortschr. Geb. Rontgenstr. Neuen. Bildgeb. Verfahr.* 175: 830-4.

- Heyen, U. und D. Schüler.** 2003. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermenter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 536-544.
- Hilgenfeldt, K.** 2000. Diagenetic dissolution of biogenic magnetite in surface sediments of the Benguela upwelling system. *International Journal of Earth Sciences* 88(4): 630-640.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B. C. Li und R. Herrmann.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24(22): 4420-49.
- Jensen, T. E.** 1993. Cyanobacterial ultrastructure. P. 7-51. In: *Ultrastructure of Microalgae.* (T. Berner, ed.) CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
- Junge, K.** 2003. Konstruktion und Charakterisierung von Insertionsmutanten des Gens für einen Magnetosomen-assoziierten CDF-Transporter. Diplomarbeit. Fachhochschule Oldenburg.
- Kawaguchi, R., J. G. Burgess, T. Sakaguchi, H. Takeyama, R. H. Thornhill und 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(3): 277-282.
- Kimble, L. K. und D. A. Bazylinski.** 1996. Chemolithoautotrophy in the marine magnetotactic bacterium, strain MV-1. In: *Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., Vol. Abstr. K-147.*
- Klose, J. und U. Kobalz.** 1995. Two-dimensional Electrophoresis of Proteins: An Updated Protocol and Implications for a Functional Analysis of the Genome. *Electrophoresis* 16: 1034-1059.
- Komeili, A., H. Vali, T. J. Beveridge und D. K. Newman.** 2004. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(11): 3839-3844.
- Kosugi, A., K. Murashima und R. H. Doi.** 2002. Characterization of two noncellulosomal subunits, ArfA and BgaA, from *Clostridium cellulovorans* that cooperate with the cellulosome in plant cell wall degradation. *J. Bacteriol.* 184(24): 6859-65.
- Kirschvink, J. L., A. Kobayashi-Kirschvink und B. J. Woodford.** 1992. Magnetite Biomineralization in the Human Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 7683-7687.

- Kröger, N., R. Deutzmann und M. Sumper. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* 5; 286(5442): 1129-32.
- Kröger, N. und M. Sumper. 2000. The biochemistry of silica formation in diatoms. In: *Biom mineralization* (ed.: Bäuerlein, E.), Wiley-VCH, Weinheim.
- Lai, E. M., N. D. Phadke, M. T. Kachman, R. Giorno, S. Vazquez, J. A. Vazquez, J. R. Maddock und A. Driks. 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 185: 1443-54.
- Lewis, P. J. und J. Errington. 1996. Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 142 (Pt4): 733-40.
- Lindsay, M. R, R. I. Webb, M. Strous, M. S. M. Jetten, M. K. Butler, R. J. Forde und J. A. Fuerst. 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* 175: 413-429.
- Lowenstam, H.A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1130.
- Lück, M., B. R. Paulke, W. Schröder, T. Blunk und R. H. Müller. 1998. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 478-85.
- Mann, S, N. H. Sparks, M. M. Walker und 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.
- Mann, S., N. H. Sparks und R. G. Board. 1990. Magnetotactic bacteria: Microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology. *Adv. Microbiol. Physiol.* 31: 125-181.
- Mann, K., I. M. Weiss, S. Andre, H. J. Gabius und M. Fritz. 2000. The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *Eur. J. Biochem.* 267(16): 5257-64.
- Mann, M., R. C. Hendrickson und A. Pandey. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 437-473.

- Margolin, W., R. Wang und M. Kumar.** 1996. Isolation of an *ftsZ* homolog from the archaeobacterium *Halobacterium salinarium*: implications for the evolution of FtsZ and tubulin. *J. Bacteriol.* 178(5): 1320-7.
- Margolin, W.** 2000. Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells. *Methods* 20: 62-72.
- Matsunaga, T. und S. Kamiya.** 1987. Use of Magnetic Particles Isolated From Magnetotactic Bacteria For Enzyme Immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(4): 328-332.
- Matsunaga, T., T. Sakaguchi und F. Tadokoro.** 1991. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 651-655.
- Matsunaga, T., N. C. Nakamura, J. G. Burgess und S. Sode.** 1992. Gene transfer in magnetic bacteria: transposon mutagenesis and cloning of genomic DNA fragments required for magnetosome synthesis. *J. Bacteriol.* 174(9): 2748-2753.
- Matsunaga, T. und H. Takeyama.** 1998. Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramolecular Science* 5(3-4): 391-394.
- Matsunaga, T., N. Tsujimura, H. Okamura und 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. Comm.* 268: 932-937.
- McCool, G. J. und M. C. Cannon.** 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 181: 585-92.
- McKay, D. S., E. K. Jr. Gibson, K. L. Thomas-Keprta, H. Vali, C. S. Romanek, S. J. Clemett, X. D. Chilliier, C. R. Maechling und R. N. Zare.** 1996. Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science* 273(5277): 924-30.
- Meldrum, F. C., S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel und D. A. Bazylinski.** 1993a. Electron microscopy study of magnetosomes in two cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 251(1332): 237-242.
- Meldrum, F. C., S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel und D. A. Bazylinski.** 1993b. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 251(1332): 231-236.

- Meyer, A.** 1904. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. *Bot. Zeit.* 62, 113-152.
- Mlouka, A., K. Comte, A. M. Castets, C. Bouchier und N. Tandeau de Marsac.** 2004. The Gas Vesicle Gene Cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA Rearrangements That Lead to Loss of Cell Buoyancy. *J. Bacteriol.* 186(8): 2355-2365.
- Moench, T. T. und W. A. Konetzka.** 1978. A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* 119: 203-212.
- Munro, U., J. A. Munro, J. B. Phillips, R. Wiltshko und W. Wiltshko.** 1997. Evidence for a magnetite-based navigational “map” in birds. *Naturwissenschaften* 84: 26-28.
- Nakamura, C., T. Kikuchi, J. G. Burgess und T. Matsunaga.** 1995a. Iron-regulated expression and membrane localization of the *magA* protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biochemistry* 118: 23-27.
- Nakamura, C., J. G. Burgess, K. Sode und T. Matsunaga.** 1995b. An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* 270(N47): 28392-28396.
- Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313-39.
- Noll, F., M. Sumper und N. Hampp.** 2002. Nanostructure of Diatom Silica Surfaces and of Biomimetic Analogs. *Nano Letters* 2: 91-95.
- Nouwens, A. S., S. J. Cordwell, M. R. Larsen, M. P. Molloy, M. Gillings, M. D. P. Willcox und B. J. Walsh.** 2000. Complementing genomics with proteomics: The membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* 21: 3797-3809.
- Offner, S., U. Ziese, G. Wanner, D. Typke und F. Pfeifer.** 1998. Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology* 144: 1331-42.
- Okamura, Y., H. Takeyama und 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.
- Okamura, Y., H. Takeyama und T. Matsunaga.** 2001. A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* 276: 48183-48188.

- Okuda, Y., K. Denda und 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.
- Okuda, Y. und Y. Fukumori. 2001. Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing MAM22, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 491(3): 169-73.
- Phillips, G. J. 2001. Green fluorescent protein-a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 9-18.
- Pötter, M., M. H. Madkour, F. Mayer und A. Steinbüchel. 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148(Pt 8): 2413-2426.
- Pötter, M., H. Müller, F. Reinecke, R. Wieczorek, F. Fricke, B. Bowien, B. Friedrich und A. Steinbüchel. 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*, *Microbiology* 150: 2301-2311.
- Ratledge, C. und S. G. Wilkinson. 1988. *Micobial Lipids*, Academic Press ed, Vol. 1. London.
- Reszka, R. 2000. Applications for magnetosomes in medical research, p. 81-92. In: E. Bäuerlein (ed.), *Biom mineralization*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Rudner, D. Z. und R. M. Losick. 2002. Sporulation membrane protein tethers the pro-sigmaK processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes Dev.* 16(8): 1007-18.
- Rudner, D. Z., Q. Pan und R. M. Losick. 2002. Evidence that subcellular localization of a bacterial membrane protein is achieved by diffusion and capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(13): 8701-6.
- Sabathe, F., A. Belaich und P. Soucaille. 2002. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 217(1): 15-22.
- Schägger, H. und G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-79.
- Schleifer, K., D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig und M. Köhler. 1991. The genus *Magnetospirillum* gen. nov., description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* 14: 379-385.

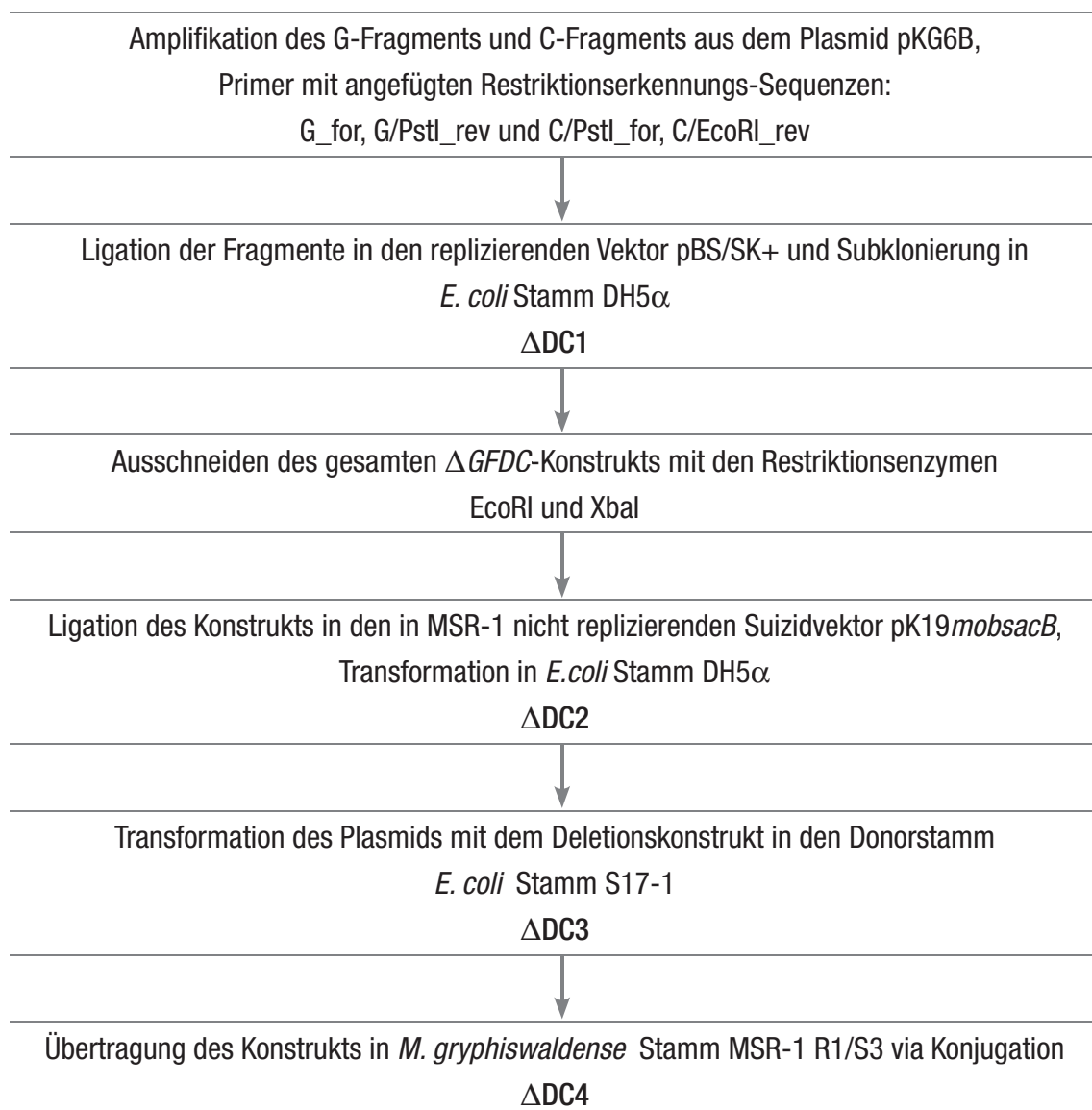
- Schmid, S. L. und H. Damke. 1995. Coated Vesicles: A Diversity of Form and Function. *FASEB J.* 9: 1445-1453.
- Schübbe, S., M. Kube, A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdierks, M. Madkour, F. Mayer, R. Reinhardt und D. Schüler. 2003. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* 185: 5779-5790.
- Schüler, D. 1994. Isolierung und Charakterisierung magnetischer Bakterien - Untersuchungen zur Magnetitbiomineralisation in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Dissertation. München, TU München.
- Schüler, D., R. Uhl und E. Bäuerlein. 1995. A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 132(N1-2): 139-145.
- Schüler, D. und E. Bäuerlein. 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* 166: 301-307.
- Schüler, D. und E. Bäuerlein. 1997. Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Phys. IV* 7(C1): 647-650.
- Schüler, D. und E. Bäuerlein. 1998. Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* 180: 159-162.
- Schüler, D. 1999. Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 79-86.
- Schüler, D. und R. B. Frankel. 1999. Bacterial magnetosomes: Microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 464-473.
- Schüler, D. 2002. The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* 5: 09-14.
- Schultheiss, D. und D. Schüler. 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. of Microbiol.* 179: 89-94.
- Schultheiss, D., M. Kube und D. Schüler. 2004. Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *Magnetospirillum gryphiswaldense* results in nonmagnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6): 3624-3631.

- Schultheiss, D., R. Handrick, D. Jendrossek, M. Hanzlik und D. Schüler. 2005. The presumptive magnetosome protein Mms16 is a PHB-granule bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. J. Bacteriol. In press.
- Seufferheld, M., M. C. Vieira, F. A. Ruiz, C. O. Rodrigues, S. N. Moreno und R. Docampo. 2003. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. J. Biol. Chem. 278: 29971-8.
- Sharp, M. D. und K. Pogliano. 2002. MinCD-dependent regulation of the polarity of SpoIIIE assembly and DNA transfer. EMBO J. 21(22): 6267-74.
- Sinninghe-Damste, J. S., M. Strous, W. I. Rijpstra, E. C. Hopmans, J. A. Geenevasen, A. C. van Duin, L. A. van Niftrik und M. S. Jetten. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. Nature 419(6908): 708-12.
- Söllner, C., M. Burghammer, E. Busch-Nentwich, J. Berger, H. Schwarz, C. Riekkel und T. Nicolson. 2003. Control of crystal size and lattice formation by starmaker in otolith biomineralization. Science 302(5643): 282-6.
- Spring, S., R. Ahmann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, H. V. Gemerden und N. Petersen. 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2397-2403.
- Spring, S. und K. H. Schleifer. 1995. Diversity of Magnetotactic Bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 18(2): 147-153.
- Sternberg, N. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at *loxP* sites. J. Mol. Biol. 150(4): 603-8.
- Sudo, S., T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima und T. Takahashi. 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. Nature 387: 563-4.
- Sun, Q. und W. Margolin. 1998. *FtsZ* dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. J. Bacteriol. 180(8): 2050-6.
- Thomas-Keprta, K. L., S. J. Clemett, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson Jr. und C. S. Romanek Jr. 2002. Magnetofossils from ancient Mars: a robust biosignature in the martian meteorite ALH84001. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3663-72.
- Todd, S. J., A. J. Moir, M. J. Johnson und A. Moir. 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. J. Bacteriol. 185: 3373-8.

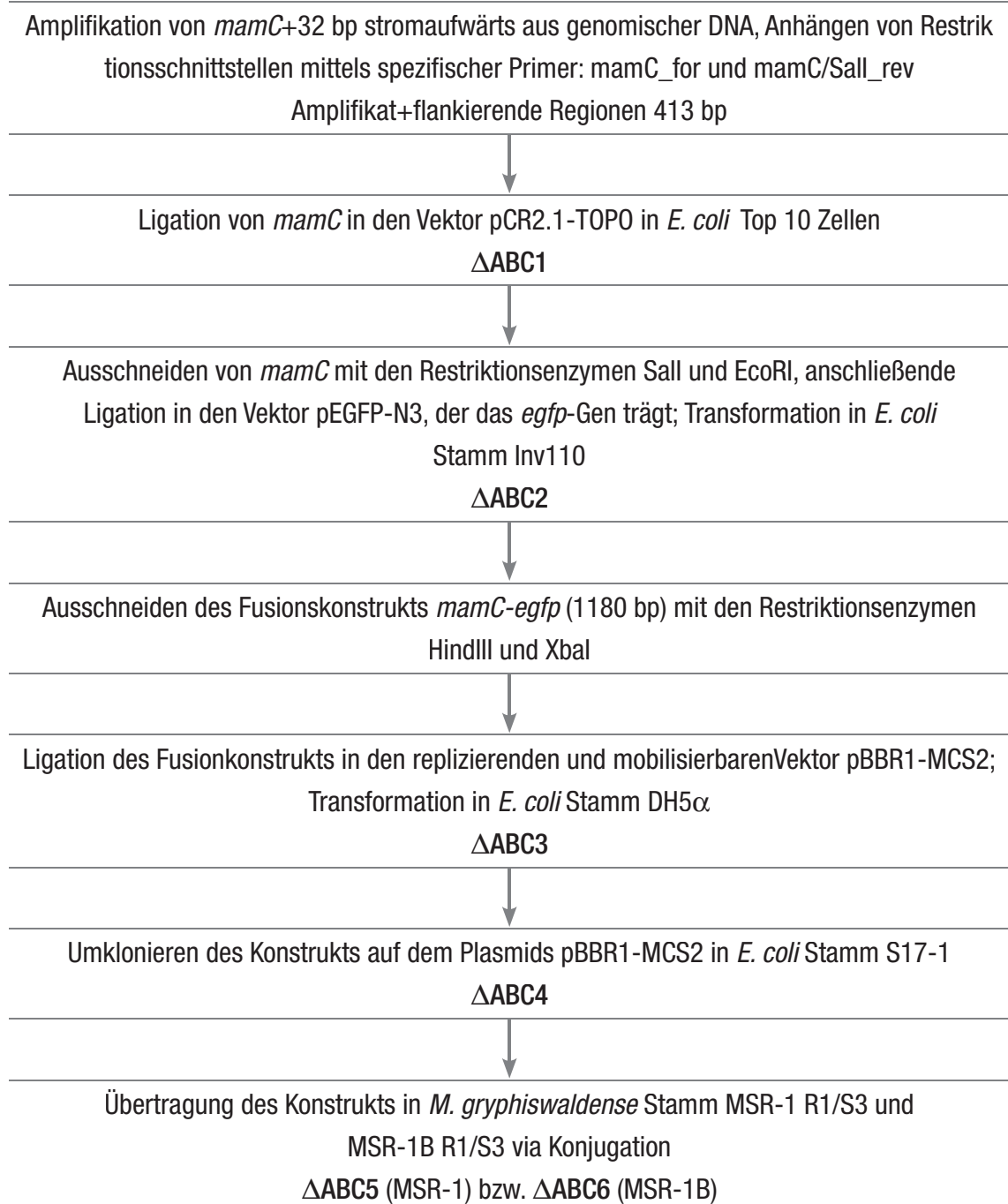
- van Niftrik, L. A., J. A. Fuerst, J. S. Sinninghe-Damste, J. G. Kuenen, M. S. Jetten und M. Strous. 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233(1): 7-13.
- Walker, M. M., J. L. Kirschvink, S.-B. R. Chang und A. E. Dizon. 1984. A candidate magnetic sense organ in the yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Science* 224: 751-753.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams und I. Humphery-Smith. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16(7): 1090-4.
- Webb, C. D., A. Decatur, A. Teleman und R. Losick. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177(20): 5906-11.
- Zurovec, M. und F. Sehnal. 2002. Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*. *J. Biol. Chem.* 277: 22639-47.

D – Anhang**I Arbeitsschemata**

Arbeitsschritte zur Erstellung der $\Delta mamGFDC$ -Deletionsmutanten:



**Arbeitsschritte zur Erstellung des *mamC-egfp*-Fusionkonstrukts in *Magneto-
spirillum gryphiswaldense*:**



II Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>suoE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan (1985)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>pro</i> <i>thi</i> <i>hsdR</i> Tra ⁺ <i>recA</i> ⁻ Tr ^r Sm ^r Ω RP4-Tc::Mu-Kn::Tn7	Simon et al. (1983)
<i>Escherichia coli</i> Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Grant et al. (1990)
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>		
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 R1/S3 (DSMZ 6361)	Rif ^r , Sm ^r , spontane Mutante	Schultheiss, (2004)
MSR-1B R1/S3	Rif ^r , Sm ^r , Mutante mit spontaner Deletion	Schultheiss, (2004)
Konstruierte Mutantenstämme		
Δ DC4 - 9	MSR-1 R1/S3 Deletionsmutanten des <i>mamGFDC</i> -Clusters	
ABC5	MSR-1 R1/S3 <i>mamC-egfp</i>	
ABC6	MSR-1B R1/S3 <i>mamC-egfp</i>	
AB1	MSR-1 R1/S3 <i>egfp</i>	
AB2	MSR-1B R1/S3 <i>egfp</i>	
Plasmid		
Plasmid	Merkmale	Hersteller, Referenz
pBlueskript SK-	Ap ^R , <i>mob</i> ; 3,0 kb	Stratagene
pBBR1-MCS 2	Km ^R , <i>mob</i> ; 5,14 kb	Kovach et al. (1995)
pK19 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>mob</i> , <i>oriV</i> , <i>lacZ</i> α , <i>ptac</i> -, <i>tac</i> - Promotor, <i>sacB</i> ¹⁾	Schäfer et al. (1994)
pCR2.1-TOPO	Ap ^R , Km ^R , <i>lacZ</i> α , T7-Promotor; 3,9 kb	Invitrogen
pEGFP-N3	Kan ^R , Neo ^R ; 4,7 kb	BD Biosciences Clontech

¹⁾ Gen für eine Levansucrase

Konstruierte Plasmide	Ausgangsplasmid	Insert
pDC1	pBS/SK+	PCR-Produkt des Deletion-konstrukts bestehend aus G- und C-Fragment 1480 bp
pDC2	pK19mobsacB	Deletionskonstrukt <i>ΔmamGFDC</i> -Operon
pABC1	pCR2.1-TOPO	375 bp PCR-Produkt + 32 bp der 5' flankierenden Region; amplifiziert aus genomischer DNA von MSR-1 Wildtyp
pABC2	pEGFP-N3	418 bp insert <i>mamC</i> + flankierende Regionen
pABC3	pBBR-MCS2	1171 bp Konstrukt <i>mamC/egfp</i>
pAB4	pBBR-MCS2	Trägt das <i>egfp</i> -Gen

III Primer

Name/Orientierung	Sequenz
G_for	→ AGC AGG CAC CAG AGT TCT CCT T
G/EcoRI_F	→ GAT ATC TTA AGC GAG GGC AAA GCA AT
G/PstI_rev	← CTG CAG CAT CTG ATC TCC GGC AAG TGT A
C/PstI_for	→ CTG CAG GCC TGA AAT ATT GGG CTG GTT CAC
C/EcoRI_rev	← GAA TTC TCA GGC CAA TTC TTC CCT CAG AA
C/XbaI_rev	← TCT AGA GTT GAT GGG GGC GCG GAA GTT TC
MamC_for	→ TAA GCC TGA CCC TTG AAT
MamC/ Sall_rev	← GTC GAC GGC CAA TTC CCT CA
GK_for	→ CCA CGA CAG CAT AAG GAA TAA CTC
C2K_rev	← GGA GAT TTC AAG GAG GAG AC
MamC_F/HindIII	→ AAG CTT ATG AGC TTT CAA CTT GCG CCG TAC T
MamC_rev/EcoRI	← GAA TTC TCA GGC CAA TTC TTC CCT CAG AA
EGFP_rev	← TAG AAT CGA TAC CGT CGA
AGmamC_f/Sonde	→ CAA GAA TGC CCG GCT TTT G
AGmamC_r/Sonde	← CGG AGA TTT CAA GGA GGA CG

IV Antikörper

- Primäre Antikörper:
1. Anti EGFP, Verdünnung 1:10000; polyklonal aus Kaninchen (Abcam, Cambridge)
 2. Anti MamC, Verdünnung 1:100; synthetisch hergestelltes Peptid von MamC; polyklonal aus Kaninchen (Pineda Antikörperservice)
- Sekundärer Antikörper: Goat Anti Rabbit IgG AP (alkaline Phosphatase), Verdünnung 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology)

Teil II Publikationen

■ A – Publikationsliste mit Erläuterungen

Die Dissertation beruht zum großen Teil auf folgenden zwei Publikationen. Die angefügten Erläuterungen sollen meinen Beitrag an der jeweiligen Arbeit aufzeigen.

1. **A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria**

Karen Grünberg, Cathrin Wawer, Bradley M. Tebo, Dirk Schüler

Biochemische Analysen der Magnetosomen. Durchführung aller mikrobiologischen und molekularbiologischen Versuche, aufbauend auf den Arbeiten von D. Schüler. Redaktionelle Mitarbeit beim Erstellen des Manuskripts mit D. Schüler.

2. **Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense***

Karen Grünberg, Eva-Christina Müller, Albrecht Otto, Regina Reszka, Dietmar Linder, Michael Kube, Richard Reinhardt, Dirk Schüler

Gemeinsame Entwicklung des Konzepts mit D. Schüler. Durchführung der biochemischen Analysen der Proteine und Lipide. Bioinformatische Sequenzanalysen in Zusammenarbeit mit D. Schüler. Erstellung des Manuskripts mit D. Schüler.

■ B – Publikationen

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 2001, p. 4573–4582
0099-2240/01/\$04.00+0 DOI: 10.1128/AEM.67.10.4573-4582.2001
Copyright © 2001, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 67, No. 10

A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria

KAREN GRÜNBERG,¹ CATHRIN WAWER,¹ BRADLEY M. TEBO,² AND DIRK SCHÜLER^{1*}

Max Planck Institute for Marine Microbiology, 28359 Bremen, Germany,¹ and Marine Biology Research Division and Center for Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, La Jolla, California 92093-0202²

Received 27 April 2001/Accepted 1 August 2001

In magnetotactic bacteria, a number of specific proteins are associated with the magnetosome membrane (MM) and may have a crucial role in magnetite biomineralization. We have cloned and sequenced the genes of several of these polypeptides in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* that could be assigned to two different genomic regions. Except for *mamA*, none of these genes have been previously reported to be related to magnetosome formation. Homologous genes were found in the genome sequences of *M. magnetotacticum* and magnetic coccus strain MC-1. The MM proteins identified display homology to tetratricopeptide repeat proteins (MamA), cation diffusion facilitators (MamB), and HtrA-like serine proteases (MamE) or bear no similarity to known proteins (MamC and MamD). A major gene cluster containing several magnetosome genes (including *mamA* and *mamB*) was found to be conserved in all three of the strains investigated. The *mamAB* cluster also contains additional genes that have no known homologs in any nonmagnetic organism, suggesting a specific role in magnetosome formation.

The ability of magnetotactic bacteria to migrate along magnetic field lines is based on specific intracellular structures, magnetosomes that, in most magnetotactic bacteria, are nanometer sized, membrane-bound magnetic particles consisting of the iron mineral magnetite (Fe₃O₄) (3, 42). The unique characteristics of bacterial magnetosomes have attracted broad interdisciplinary research interest. Their superior crystalline and magnetic properties make them potentially useful as a highly ordered biomaterial in a number of applications, e.g., in the immobilization of bioactive compounds, in magnetic drug targeting, or as a contrast agent for magnetic resonance imaging (24, 29, 45). Recently, the characteristics of bacterial magnetosomes have been used as biosignatures to identify presumptive Martian magnetofossils (15, 51).

The narrow size distributions and uniform, species-specific crystal morphologies of bacterial magnetosomes imply a high degree of biological control over the mineralization process. The biomineralization of magnetosome particles is achieved by a complex mechanism that involves the uptake and accumulation of iron and the deposition of the mineral particle with a specific size and morphology within a specific compartment provided by the magnetosome membrane (MM). In bacteria of the genus *Magnetospirillum* (40), the MM consists of a bilayer containing phospholipids and proteins (16, 41; D. Schüler, K. Grünberg, and B. M. Tebo, Abstr. 100th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2000, abstr H-111, p. 373, 2000). A number of proteins were identified as specifically associated with the MM in *Magnetospirillum magnetotacticum* and *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 (16, 25, 32). The exact role of these magnetosome-specific proteins has not been elucidated, but it has been suggested that they have specific functions in iron accumula-

tion, nucleation of minerals, and redox and pH control (4, 16, 42). Although several genes putatively related to magnetosome formation have been identified (25, 28, 32), the genetic basis of magnetite biomineralization has remained mostly unknown. Recently, the almost complete genome sequences of two magnetotactic alpha-proteobacteria, *M. magnetotacticum* strain MS-1 and magnetic coccus strain MC-1, have become available (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html), which now allows the study of magnetosome formation at the genomic level. *M. magnetotacticum* is a microaerophilic spirillum producing cubo-octahedral magnetite particles that are 42 nm in size (8, 40). The size of its genome is about 4.3 Mb (6). Magnetic coccus strain MC-1, which has a genome size of about 3.7 Mb (12), was reported to form pseudohexagonal prismatic magnetite crystals about 70 nm in diameter (13, 26).

The magnetotactic bacterium *M. gryphiswaldense*, which was isolated from a freshwater sediment (40, 46), produces up to 60 cubo-octahedral magnetosome particles that strongly resemble those found in *M. magnetotacticum* and other *Magnetospirillum* species (3, 10, 47). *M. gryphiswaldense* can be cultivated more readily than most other magnetotactic bacteria, which has facilitated its physiological and biochemical analysis (41, 43, 44, 48).

In this study, we have cloned and analyzed several genes encoding magnetosome proteins from *M. gryphiswaldense*. Except for MamA, none of these proteins have been previously reported to be related to magnetosome formation in any magnetotactic bacterium. We report here the identification and preliminary analysis of a major gene cluster that encodes a number of these magnetosome proteins and is conserved in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum*, and magnetic coccus strain MC-1.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. *M. gryphiswaldense* strain MSR-1 (DSM 6361) was grown microaerobically at 30°C in a growth medium containing 100 μM ferric citrate as described before (44). The batch culture was exposed to air in 100-ml, 1-liter, and 10-liter bottles containing 50 ml, 500 ml, and 5 liters of

* Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, 28 359 Bremen, Germany. Phone: 49-(0)421-2028-746. Fax: 49-(0)421-2028-580. E-mail: dschuele@mpi-bremen.de.

medium, respectively, and agitated at 100 rpm on a New Brunswick incubation shaker. An inoculum of 10% of the culture volume was used. Microaerobic conditions arose in the medium at higher cell densities by oxygen consumption of cells (43). *Escherichia coli* DH5 α (GIBCO BRL) was used as the host strain for cloning experiments with pBluescriptSKII (Stratagene). For cloning of PCR products using pCR-TOPO, *E. coli* TOP10 (Invitrogen) was used. For *E. coli* strains, the culture conditions used were those described by Sambrook et al. (38).

Isolation of magnetosomes. Approximately 10 g (wet weight) of *M. gryphiswaldense* cells suspended in 100 ml of 20 mM HEPES–4 mM EDTA, pH 7.4, was disrupted by three passes through a French pressure cell (20,000 lb/in²). All of the buffers used for magnetosome isolation contained 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a protease inhibitor. Unbroken cells and cell debris were removed from the sample by centrifugation (10 min, 680 \times g). The cell extract was passed through a MACS magnetic separation column (Miltenyi Biotec). Columns were placed between two Sa-Co-magnets generating a magnetic field gradient inside the column, which caused the magnetic particles to bind to the column matrix. The absence of any black, magnetosome-like material in the cell extract after passage through the column indicated that the separation of magnetosome particles was complete. To eliminate electrostatically bound contamination, magnetic particles attached to the column were rinsed first with 50 ml of 10 mM HEPES–200 mM NaCl, pH 7.4, and subsequently with 100 ml of 10 mM HEPES, pH 7.4. After removal of the column from the magnets, magnetic particles were eluted from the column by flushing with 10 mM HEPES buffer. Finally, the magnetosome suspension was loaded on top of a sucrose cushion (55% [wt/wt] sucrose in 10 mM HEPES, pH 7.4) and subjected to ultracentrifugation (280,000 \times g, 8 h, 4°C) in a swinging-bucket rotor. The magnetic particles sedimented at the bottom of the tube, whereas residual contaminating cellular material was retained by the sucrose cushion.

Isolation of nonmagnetic subcellular fractions. After separation of magnetosomes, an aliquot of the cell extract was subjected to ultracentrifugation (330,000 \times g, 1 h, 4°C). The supernatant fluid from this high-speed centrifugation contained the soluble proteins. The membrane fraction contained in the pellet was further separated by isopycnic centrifugation as described by Osborn and Munson (34).

Analytical methods. The iron content of whole cells and isolated magnetosome particles was determined by using a Perkin-Elmer 3110 atomic absorption spectrometer. Air-acetylene flame spectroscopy was used under the following conditions: wavelength, 248.6 nm; bandwidth, 0.2 nm; lamp current, 30 mA. For iron determination, the dried samples were incubated in concentrated nitric acid until digestion of the material was complete (18). The protein concentration of samples was determined by using the bicinchoninic acid protein microassay kit (Pierce) in accordance with the manufacturer's instructions.

Electron microscopy. Purified magnetosomes were adsorbed on carbon-coated copper grids and negatively stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate. Samples were viewed and recorded with a Philips CM10 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and determination of N-terminal and internal amino acid sequences. Gels were prepared and run in accordance with the Laemmli procedure (20). An amount of magnetosomes equivalent to approximately 20 μ g of protein was resuspended in electrophoresis sample buffer containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol. After boiling for 5 min, the samples were centrifuged for 3 min to pellet the magnetite particles. The supernatant was loaded on a 10 to 16% gradient polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie brilliant blue after running. Digitized gels were analyzed by the ImageMaster 1D software (v.3.0; Amersham-Pharmacia). Amino-terminal protein sequence analysis was performed on an Applied Biosystems 470A amino acid sequencer by F. Lottspeich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany) as previously described (14). Internal sequences were determined after cleavage with AspN protease (as described in reference 50).

Recombinant DNA techniques. Total DNA of *M. gryphiswaldense* was isolated as described by Marmur (23). Plasmid isolation, transformation, and DNA manipulations in *E. coli* were essentially carried out by standard methods (38). Long oligonucleotides for hybridization used in Southern hybridization experiments were DS24 (5'-AAGCCCTCGAACATGCTGGACGAGGTGACCCTGTATACCACTATGGCCTGTCGGTGGCC-3') and DS33 (5'-ATGAAGTTCGAGAACTGCCGGGACTGCCGGAAGAGGTGGTCTGGTGGGCGTTC-3'). Plasmid vectors used for cloning were pCR2.1-TOPO (Invitrogen) and pBluescriptSKII (Stratagene).

PCR amplification and DNA sequencing. Degenerate primers for PCR amplification of a 240-bp *mamC* fragment were DS15F4 (5'-GCCGCBCTSGCBAAGAAYGC-3') and DS15RV3 (5'-CGSAGYTCCTTYTCRATGAARTC-3'). For the amplification of a 960-bp *mamD* fragment, the primers were 1KGVDF

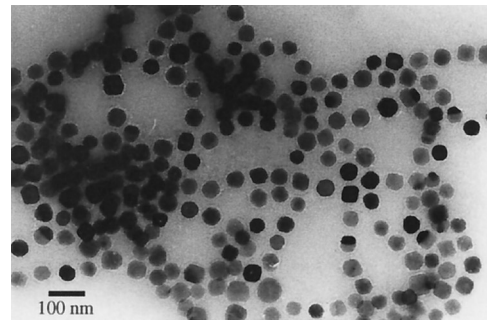


FIG. 1. Transmission electron micrograph of purified magnetosomes from *M. gryphiswaldense*. Note that individual magnetosome particles are enclosed by a membrane and appear to remain attached to each other.

and 4KGCRC. 1KGVDF (5'-ATGTGGAGCGTCTGGCCATG-3') was deduced from the DNA sequence upstream of the homologous region in the genome of *M. magnetotacticum*. 4KGCRC (5'-GCCTCAGGTTGGTGGCGAT-3') was deduced from the cDNA sequence close to the 3' end of the *mamC* gene of *M. gryphiswaldense*. PCR amplification was performed with the Mastercycler Gradient (Eppendorf) by using standard protocols. Automatic sequencing of both strands of the plasmid DNA was carried out by primer walking (primers not shown).

Analysis of DNA sequence data. Assembly of DNA sequences, identification and translation of open reading frames (ORFs), and calculation of the molecular masses of the proteins were done by the MacVector 6.5.3 software package (Oxford Molecular Ltd.). Sequence alignments were carried out by using the ClustalW algorithm (52), which is part of the same software. Protein sequences were compared to the GenBank, EMBL, and SwissProt databases by using the BLASTP program (1). Motif searches were carried out by using the Prosite program (17). Protein location was determined by the PSORT program (27). Preliminary sequence data for *M. magnetotacticum* MS-1 and magnetic coccus strain MC-1 was obtained from the DOE Joint Genome Institute at http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html (status, 04/20/01). The amino acid sequences of the identified Mam proteins from *M. gryphiswaldense* were used in TBLASTN similarity searches to identify genes encoding homologous proteins in the preliminary baseline genomic assemblies of these bacteria. The identified regions of sequence homology on the respective contigs were analyzed for ORFs and translated into protein sequences.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequence of the *M. gryphiswaldense mamAB* gene cluster has been deposited in the GenBank, EMBL, and DDBJ libraries and assigned accession number AF374354. The nucleotide sequence of the *M. gryphiswaldense mamCD* region has been deposited under accession number AF374355.

RESULTS

Analysis of magnetosome particles. The magnetosome purification protocol resulted in 9 mg of clean magnetosomes from 1 g of magnetic cells on a dry-weight basis. Approximately 0.04 mg (dry weight) of protein was associated with 1 mg of isolated magnetosomes. The amount of MM-associated protein was equivalent to 0.07% of the total cellular protein content. Magnetosome-bound iron constituted approximately 93% of the total intracellular iron. Transmission electron microscopy indicated that isolated individual magnetite crystals were enclosed by an electron-thin layer representing the MM and were apparently free of contaminating cellular material (Fig. 1). Individual particles remained attached but were separated from each other by the membrane.

One-dimensional SDS-PAGE of solubilized proteins from purified magnetosome particles revealed 13 distinct polypeptide bands in various amounts (Fig. 2). The characteristics of

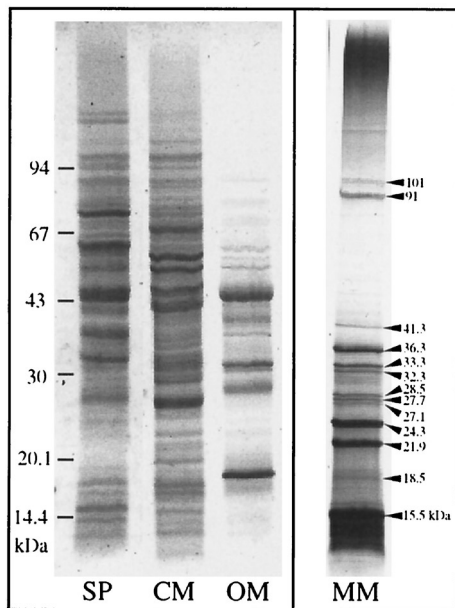


FIG. 2. SDS-PAGE of the MM-associated proteins from *M. gryphiswaldense* compared to soluble proteins (SP) and the cytoplasmic membrane proteins (CM) and outer membrane proteins (OM). The bands were visualized by staining with Coomassie blue. Thirteen MM-specific proteins were identified in various amounts (arrowheads).

the MM-specific polypeptides are shown in Table 1. According to their estimated molecular weights, they were designated MM15.5 to MM101. The most prominent polypeptide band was MM15.5. This band was prone to smearing on electrophoresis, and minor bands were frequently observed running closely below it, possibly indicating proteolytic degradation.

Cloning and sequence analysis of genes encoding MM proteins in *M. gryphiswaldense*. (i) *mamA* and *mamB*. Based on the codon usage bias found in previously analyzed genes from *Magnetospirillum* species, long (50 to 65 bases), nondegenerate oligonucleotides were designed from N-terminal amino acid sequences of several major MM-specific polypeptides. These oligonucleotides were labeled and directly used as probes for hybridization. Two probes (DS24 and DS33), corresponding to the amino acid sequences of MM24.3 and MM33.3, respectively, recognized the same genomic 7.55-kb *EcoRI* DNA fragment in Southern blotting experiments. It was cloned into plasmid pBluescriptSKII, resulting in pDS902. Sequence analysis by primer walking of the complete 7.55-kb fragment identified eight complete and two truncated consecutive ORFs. The deduced amino acid sequences of two ORFs matched the N-terminal sequences of MM24.3 and MM33.3, respectively. Consequently, these ORFs were designated *mamA* and *mamB* (*mam* for MM).

The *mamA* gene of *M. gryphiswaldense* encodes the second most abundant MM protein (MM24.3). Its predicted molecular mass of 24.01 kDa is consistent with the apparent molecular mass of 24.3 kDa estimated by gel electrophoresis. Its amino acid sequence is 91% identical to that of the magnetosome-associated MAM22 protein that has been previously reported

in *M. magnetotacticum* (32, 33). The hydropathy plot of the amino acid sequence (not shown) was indicative of a relatively hydrophilic protein that has been suggested to be electrostatically bound to the MM in *M. magnetotacticum* (32).

The *mamB* gene encodes a protein that corresponds to the N-terminal amino acid sequence of an MM-associated polypeptide band in SDS-PAGE. The 31.96-kDa molecular mass calculated from the amino acid sequence is slightly lower than that estimated by gel electrophoresis, as is frequently observed with membrane proteins. The MamB protein exhibits significant sequence similarity to members of the ubiquitous cation diffusion facilitator (CDF) family, which are involved in the transport of various heavy metals. According to secondary-structure predictions (data not shown), the MamB protein exhibits the characteristic topology of bacterial CDF family members (six transmembrane helices) and contains the family-specific signature sequence (36).

(ii) *mamC* and *mamD*. Since long, nondegenerate oligonucleotide probes derived from the MM15.5 N-terminal amino acid sequences failed to identify specific chromosomal DNA fragments in hybridization experiments, a pair of oligonucleotide primers for PCR were deduced from the N-terminal and internal amino acid sequences of this polypeptide. By using these primers, a single 240-bp fragment was amplified from genomic DNA and cloned into pCR2.1-TOPO, generating pMT1. By using the cloned 240-bp fragment as a probe, a 4.3-kb chromosomal *EcoRI*-fragment was identified by Southern hybridization and cloned into pBluescriptSKII, generating plasmid pKG2. Sequence analysis of the insert identified an ORF that contained the N-terminal and internal peptide sequences of the MM15.5 protein. It was designated *mamC*. The *mamC* gene encodes the most abundant polypeptide in the MM of *M. gryphiswaldense* (MM15.5). The calculated molecular mass of 12.24 kDa was lower than the apparent molecular mass of 15.5 kDa estimated by SDS-PAGE, as is frequently the case with hydrophobic proteins.

An incomplete ORF lacking the N-terminal portion of its corresponding protein was found on pKG2 immediately upstream of the *mamC* gene, suggesting a putative operon-like

TABLE 1. Summary of protein characteristics of magnetosome-associated polypeptides separated by SDS-PAGE (Fig. 2)

Molecular mass (kDa)	Relative amt (% of total MM protein) ^a	N-terminal and internal amino acid sequences
101.0	0.8	
91.0	3.0	
41.8	2.4	
36.3	7.2	MFNGDVEDGRR-S/E-NV SXGKD
33.3	2.7	MKFENCRDCREEV VVWAF TAD
32.3	2.3	
28.5	1.6	
27.7	1.3	
27.1	1.3	
24.3	11.2	KPSNMLDEV TLYTHYGLSVA
21.9	10.0	M-Q/A-D-L/A-F/A-L
18.5	2.2	
15.5	52.4 ^b	SFQLAPYLAKSVPGI GILGGIVGGAALAKN A-DLGVDFIEKELRHGKSAEAT-DILRDEA

^a Calculated from band intensities of a densitometric scan of a Coomassie-stained gel.

^b Including amounts of bands representing putative degradation products.

TABLE 2. Summary of features of proteins deduced from ORFs identified in chromosomal *mamAB* gene clusters of *M. magnetotacticum*, *M. gryphiswaldense*, and strain MC-1

Bacterium	ORF ^a	Size (amino acids)	% Identity/similarity ^b	Molecular mass (kDa)	Predicted location ^c	Best BLASTP hit (accession no.) ^d	E-value	Putative function of BLAST homolog
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF1 (<i>mamE</i>)	726	100	73.2	MM	HtrA <i>H. infl.</i> (A64113) ^e	9e-35	Serine protease
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND ^f							
Strain MC-1	<i>mamE</i> ^f	803	34/48	84.4	MM	HtrA <i>R. prow.</i> (B71722) ^g	2e-35	
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF2	390	100	40.3	IM			Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	Not found							
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF3	347	100	37.6	Cytoplasm	EnvB <i>M. therm.</i> (F69003) ^j	1e-15	Rod shape determination
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	ORF10 ^f	346	50/70	37.6	Cytoplasm	MreB <i>T. marit.</i> (E72359) ^j	4e-07	Rod shape determination
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF4	78		8.36	IM			Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	Not found							
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF5	296	100	34.55	IM	<i>ydbO B. subt.</i> (B69772) ^k	2e-28	Cation transport (CDF)
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	ORF1	332	23/43	36.29	IM	MTH1893 <i>M. therm.</i> (F69119) ^j	1e-30	Cation transport (CDF)
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF6	437	100	45.8	IM	PH1912 <i>P. horik.</i> (F71205) ^l	6e-33	Cation transport
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF1 (fragment)	>147	92/94	NA ^m	IM	PH1912 (F71205) ^{lm}		Cation transport
MC-1	Not found							
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF7	637	100	66.26	IM	HtrA <i>S. sonnei</i> (BAA92745) ⁿ	4e-14	Serine protease
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF2	632	88/95	65.38	IM	HtrA (BAA92745) ⁿ	5e-12	Serine protease
MC-1	ORF2	671	34/52	71.8	IM	HtrA <i>H. pyl.</i> (C64647) ^o	1e-12	Serine protease
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF8	275	100	28.89	IM	OrfE0 <i>R. caps.</i> (CAA72164) ^p	0.008	Serine protease
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF3	270	79/85	28.36	IM	OrfE0 (CAA72164) ^p	0.04	Serine protease
MC-1	ORF3	261	37/48	27.56	IM	HtrA <i>B. hens.</i> (P54925) ^q	0.002	Serine protease
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF9 (<i>mamA</i>)^r	217	100	23.97	MM	MTH83 <i>M. therm.</i> (F69210) ^{s,t}	3e-09	TPR protein
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF4 (<i>mamA</i>)	217	91/97	24.01	MM	MTH83 (F69210) ^{s,t}	3e-09	TPR protein
MC-1	ORF4 (<i>mamA</i>)	219	37/58	25.08	MM	MTH83 (F69210) ^{s,t}	1e-36	TPR protein
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF10	272	100	29.95	IM	LemA <i>T. marit.</i> (F72311) ^j	9e-18	Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF5	272	80/90	30.00	IM	LemA (F72311) ^j	3e-16	Unknown
MC-1	ORF6	308	32/49	34.85	IM	LemA (F72311) ^j	3e-17	Unknown
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF11	84	100	9.26	IM			Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF6	84	83/93	9.24	Uncertain			Unknown
MC-1	Not found							
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF12 (<i>mamB</i>)	297	100	31.87	MM	<i>ydfM B. subt.</i> (C69781) ^k	9e-34	Cation transport (CDF)
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF7 (<i>mamB</i>)	297	93/96	31.96	MM	<i>ydfM</i> (C69781) ^k	1e-38	Cation transport (CDF)
MC-1	ORF7 (<i>mamB</i>)	285	44/67	30.03	MM	<i>ydfM</i> (C69781) ^k	4e-34	Cation transport (CDF)
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF13	180	100	18.74	IM			Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF8	175	71/78	18.20	IM			Unknown
MC-1	ORF8	190	29/44	20.58	IM			Unknown
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF14	174	100	19.03	Periplasm			Unknown
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF9	174	83/92	18.88	IM			Unknown
MC-1	ORF9	154	35/49	17.2	Periplasm			Unknown
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF15	297	100	30.9	Cytoplasm	BmrU <i>B. subt.</i> (F69595) ^k	1e-05	Multidrug resistance
<i>M. gryphiswaldense</i>	ORF10 (fragment)	>144	74/84	NA	Cytoplasm	BmrU (F69595) ^{k,m}		Multidrug resistance
MC-1	Not found							
<i>M. magnetotacticum</i>	ORF16	331	100	34.5	IM	<i>ydfM B. subt.</i> (C69781) ^k	6e-26	Cation transport (CDF)
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	Not found ^r							
<i>M. magnetotacticum</i>	Not found ^u							
<i>M. gryphiswaldense</i>	ND							
MC-1	ORF5	1,025		112.3	Cytoplasm	MAM22 (BAA11643) ^v	2e-05	TPR protein

^a ORFs are listed according to their order on *M. magnetotacticum* contig 3824, together with equivalent genes (closest homologs) of *M. gryphiswaldense* and strain MC-1. Genes that were experimentally shown to encode MM proteins are in boldface.

^b Identity and similarity values are with respect to the equivalent protein in *M. magnetotacticum*.

^c Location was determined by the PSORT program (27). Localization in the MM was predicted based on homology to identified MM proteins. IM, inner membrane.

^d Only BLASTP hits with E-values of <0.01 are shown.

^e ND; not determined. The N terminus of MM protein MamE of *M. gryphiswaldense* is homologous (16 and 18 out of 20 residues identical and similar, respectively) to the N-terminal amino acid sequence of the predicted MamE protein of *M. magnetotacticum*. The nucleotide sequence of the corresponding gene in *M. gryphiswaldense* was not determined.

^f A homologous gene (ORF10) is present in the genome of strain MC-1 (contig 369), but it is located outside the *mamAB* cluster.

^g From *Haemophilus influenzae*.

^h From *Rickettsia prowazekii*.

ⁱ From *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Footnotes continued on following page

organization of additional genes together with *mamC*. To obtain the complete sequence of this ORF, a 960-bp DNA fragment was amplified by PCR using genomic DNA as the template and primers 1KGVDF and 4KGCR. The forward primer used for amplification (1KGVDF) was deduced from the DNA sequence upstream of the homologous region in the genome of *M. magnetotacticum*, which was previously found to be identically organized. Sequencing of the PCR product revealed that it contained the missing portion of a 942-bp-long ORF. The N terminus of its predicted protein was in close agreement with the ambiguous N-terminal amino acid sequence derived from MM21.9. We therefore concluded that another major MM polypeptide is encoded by this gene, which was designated *mamD*. The observed difference between the molecular mass of 29.9 kDa calculated for the predicted *mamD* gene product and the apparent mass of the corresponding 21.9-kDa band in SDS-PAGE might be explained by proteolytic cleavage of a substantial part of the C terminus. Hydropathy plots of the amino acid sequence (not shown) predicted a hydrophobic protein with a short hydrophilic stretch close to the C terminus. Similarity searches of databases gave no indication of the existence of known proteins homologous to MamC and MamD.

Identification and sequence analysis of genes encoding putative MM proteins in the genomes of *M. magnetotacticum* MS-1 and magnetic coccus strain MC-1. Genes with significant similarity to *mamA*, *mamB*, *mamC*, and *mamD* of *M. gryphiswaldense* were identified in the genome sequences of both *M. magnetotacticum* and strain MC-1. The characteristics of the predicted *mam* gene products of *M. magnetotacticum* and strain MC-1, together with gene products of ORFs from adjacent regions, are shown in Tables 2 and 3. Generally, the homologous genes have sizes comparable to those of their respective counterparts in *M. gryphiswaldense* and encode proteins with characteristics very similar to theirs. Secondary-structure predictions for the equivalent genes using various algorithms gave similar results (data not shown). The alignments of Mam protein sequences are shown in Fig. 3.

In addition to *mamA* to *mamD*, similarity searches of the genome sequence of *M. magnetotacticum* using the N-terminal amino acid sequence of the MM36.3 protein of *M. gryphiswaldense* as the query identified an ORF that encodes a predicted protein with an N terminus sharing 16 identical and 2 similar amino acids out of 20 residues with the N terminus of MM36.3 from *M. gryphiswaldense*. Based on the significant homology and the fact that this ORF was found to be colocalized together with the *mamA* and *mamB* genes (Fig. 4), we conclude that another MM

TABLE 3. Characteristics of proteins encoded by the *mamC* and *mamD* genes of *M. gryphiswaldense* and their homologs in the genomes of *M. magnetotacticum* and strain MC-1

Bacterium	Gene	Size (amino acids)	% Identity/ similarity ^a	Molecular mass (kDa)
<i>M. gryphiswaldense</i>	<i>mamC</i>	125	100	12.4
<i>M. magnetotacticum</i>	<i>mamC</i>	124	80/90	12.4
Strain MC-1	<i>mamC</i>	133	50/65	13.6
<i>M. gryphiswaldense</i>	<i>mamD</i>	314	100	30.2
<i>M. magnetotacticum</i>	<i>mamD</i>	314	81/92	29.9
Strain MC-1	<i>mamD</i>	340	31/46	34.4

^a Identity and similarity values are with respect to the equivalent protein in *M. gryphiswaldense*.

polypeptide of *M. magnetotacticum* is encoded by this gene, which was designated *mamE*. Given the high overall similarity shared by the identified *mam* genes of *M. magnetotacticum* and *M. gryphiswaldense*, a gene very similar to *mamE* is likely to occur in *M. gryphiswaldense*. However, the predicted molecular mass of 73.2 kDa of MamE from *M. magnetotacticum* contrasts with the apparent molecular mass of 36.3 kDa of the corresponding MM protein in *M. gryphiswaldense*, which might be the result of proteolytic cleavage of the C-terminal part of the MamE protein. A homologous gene was identified in the genome of strain MC-1. Similarity searches of databases revealed that the putative MamE proteins of *M. magnetotacticum* and strain MC-1 bear sequence similarity to HtrA-like serine proteases (35).

Molecular organization of the *mamAB* gene cluster in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* MS-1, and magnetic coccus strain MC-1. The *mamB* gene of *M. gryphiswaldense* MSR-1 was found to be located 1,120 bp downstream of *mamA*. As mentioned above, both genes are part of a region containing several ORFs of colinear orientation. Likewise, genes homologous to *mamA* and *mamB* were both found in the same chromosomal region in *M. magnetotacticum* (contig 3824) and strain MC-1 (contig 431). Since this finding was suggestive of the clustering of several genes possibly related to magnetite formation, the organization of the *mamA* and *mamB* genes, as well as the ORFs adjacent to them, was characterized in more detail. The arrangement of ORFs in the chromosomal *mamAB* gene clusters of *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum*, and strain MC-1 is shown in Fig. 4, and the characteristics of the corresponding predicted proteins are given in Table 2.

In *M. gryphiswaldense*, *mamA* and *mamB*, together with at least eight other ORFs, are arranged in a colinear fashion, implying an operon-like structure. An identical organization is

^j From *Thermotoga maritima*.

^k From *Bacillus subtilis*.

^l From *Pyrococcus horikoshii*.

^m BLASTP searches using the incomplete sequence of *M. gryphiswaldense* yielded the same hit as the complete sequence of the equivalent protein of *M. magnetotacticum* but with an E-value of >0.01.

ⁿ From *Shigella sonnei*.

^o From *Helicobacter pylori*.

^p From *Rhodobacter capsulatus*.

^q From *Bartonella henselae*.

^r ORF9 (*mamA*) is identical to the *mam22* gene (accession no. BAA11643) of *M. magnetotacticum*, which was previously described (32).

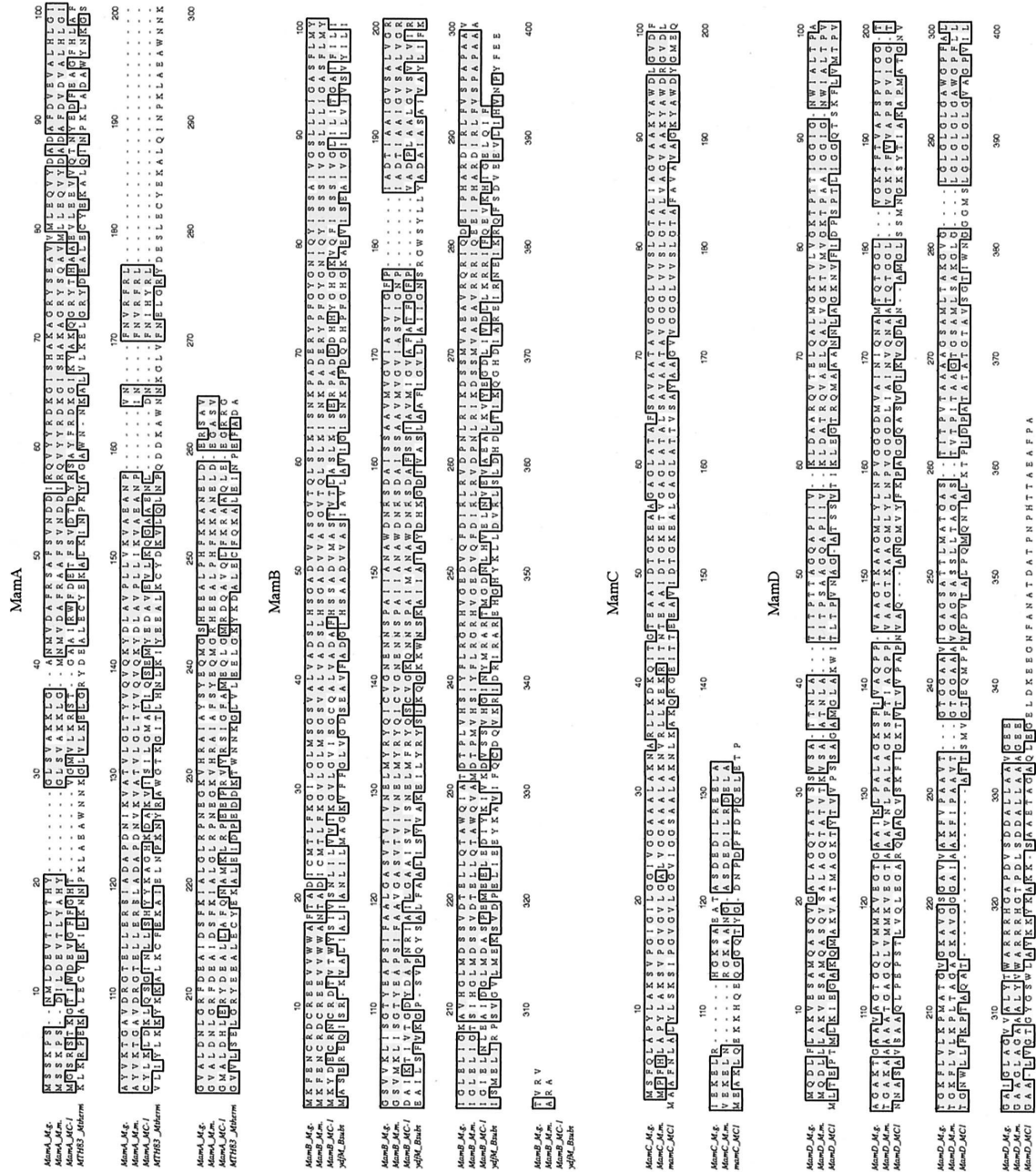
^s The best BLASTP hit was *mam22* of *M. magnetotacticum* (BAA11643); therefore, the second-best hit is shown.

^t Has (34% identity and 51% similarity) to ORF7 (*mamB*) of strain MC-1.

^u The 222 C-terminal amino acids of ORF5 of strain MC-1 are 19% identical and 37% similar to ORF9 (*mamA*) of *M. magnetotacticum*.

^v From *M. magnetotacticum*.

^w NA, not applicable.



present in *M. magnetotacticum*, which is part of a larger cluster comprising 16 consecutive ORFs with the same direction of transcription. In both organisms, the *mamB* gene and the two ORFs preceding it overlap by a single nucleotide, respectively.

A similar organization of *mamA* and *mamB*, together with seven consecutive ORFs extending over 11 kb, is present in magnetic coccus strain MC-1. The chromosomal *mamAB* clusters in the three strains are characterized by the presence of one or several members of various classes of homologous genes. Several of these classes correspond to proteins with homology to one of the following families:

(i) **TPR proteins.** The *mamA* genes of all three strains display similarity to genes encoding TPR (tetratricopeptide repeat) proteins. The *mamA* gene of strain MC-1 (ORF4) is followed by ORF5, which encodes a deduced protein of 1,025 amino acids. Its C-terminal domain (222 amino acids) was also found to be similar to MAM22 of *M. magnetotacticum* (32, 33) (identical to MamA [this study]) and other members of the TPR family (21).

(ii) **CDF transporters.** Besides *mamB*, two more genes (ORF5 and ORF16) in the *mamAB* gene cluster of *M. magnetotacticum* and one more in strain MC-1 (ORF1) display significant similarity to members of the CDF protein family (36). Pairwise sequence alignments revealed that ORF5 of *M. magnetotacticum* and ORF1 of strain MC-1 are equivalent to each other, whereas the *mamB* genes of the two bacteria form a group of distinct similarity (data not shown).

(iii) **HtrA.** The *mamE* gene (ORF1) is located at the 5' end of the *mamAB* gene cluster in *M. magnetotacticum* and is most similar to the *mamE* gene of strain MC-1. However, in strain MC-1, this gene is located outside the *mamAB* cluster. Additional genes with similarity to *htrA* genes were identified in the *mamAB* regions of *M. gryphiswaldense* (ORF2), *M. magnetotacticum* (ORF7), and strain MC-1 (ORF2). In all three organisms, it is immediately followed by an ORF that also bears weak similarity to *htrA*-like genes.

(iv) **lemA.** In all three magnetotactic strains, an ORF with sequence similarity to *lemA*-like genes (*M. gryphiswaldense*, ORF5; *M. magnetotacticum*, ORF10; strain MC-1, ORF6) is situated between the *mamA* and *mamB* genes. *lemA*-like genes have been identified in the genomes of a number of bacteria and are of unknown function. The LemA protein was first identified as an epitope in the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* (22).

Two more classes of genes have counterparts in the *mamAB* cluster of each of the magnetotactic strains (*M. gryphiswaldense*, ORF8 and ORF9; *M. magnetotacticum*, ORF13 and ORF14; strain MC-1, ORF8 and ORF9), but their predicted products display no significant sequence similarity to any known proteins from databases. In addition, there is a set of genes that are part of the *mamAB* cluster in *M. gryphiswaldense* (ORF1, ORF6, and ORF10) and *M. magnetotacticum* (ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF6, ORF11, and ORF15) but are absent from the homologous chromosomal region in strain MC-1. Respective homologs to ORF1 and ORF3 of *M. magnetotacticum* were identified in a different region of the strain MC-1 chromosome (contig 369),

while no genes with similarity to ORF2, ORF4, ORF6, ORF11, and ORF15 of *M. magnetotacticum* and ORF1, ORF6, and ORF10 of *M. gryphiswaldense* could be detected in strain MC-1.

Organization of the *mamC* and *mamD* genes in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum*, and strain MC-1. The genes encoding MM proteins MamC and MamD in *M. gryphiswaldense* and their respective homologs in *M. magnetotacticum* and strain MC-1 are not closely linked to the *mamAB* gene cluster. In *M. gryphiswaldense* and *M. magnetotacticum*, *mamD* is immediately followed by *mamC* (Fig. 5). In the genome of strain MC-1, the identified homologous genes are not linked (*mamC*, contig 369; *mamD*, contig 431).

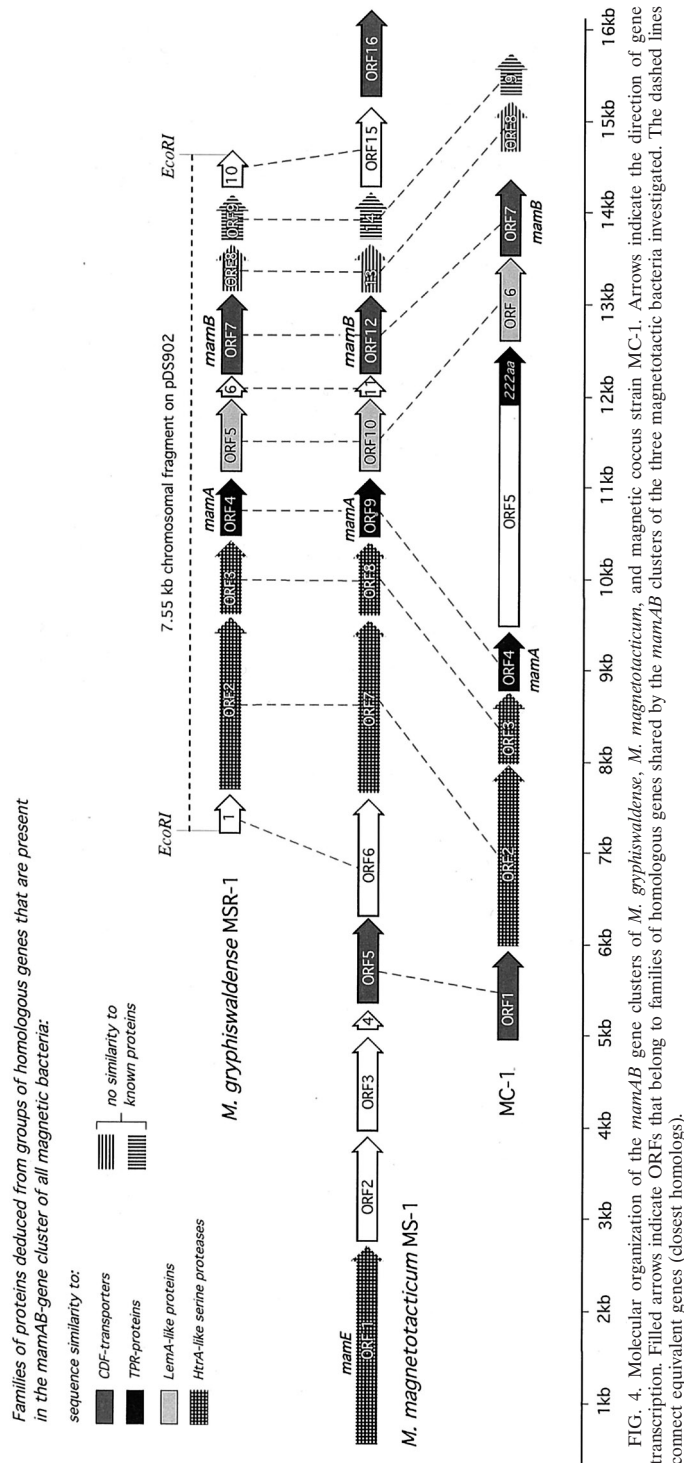
DISCUSSION

The purification protocol reported in this study allowed the efficient isolation of magnetosome particles from *M. gryphiswaldense*. The isolated magnetosomes of *M. gryphiswaldense* exhibited characteristics (i.e., size, morphology, presence of the membrane, etc.) similar to those of the magnetosomes from *M. magnetotacticum* and *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1, as previously described (16, 29). The tendency of isolated magnetosome particles to maintain their chainlike alignment might suggest that individual particles are attached to each other by specific interactions. A total of 13 polypeptide bands could be identified in Coomassie-stained SDS-polyacrylamide gels of the solubilized MM of *M. gryphiswaldense*, although the possibility cannot be excluded that proteins loosely attached to the MM were lost during preparation or that additional proteins are present below the level of detection by Coomassie staining.

In this study, the genes for four major MM proteins from *M. gryphiswaldense* were cloned and analyzed. In addition, a gene encoding a putative MM protein in *M. magnetotacticum* was identified based on sequence data from a homologous MM protein in *M. gryphiswaldense*. Four of the newly identified genes (*mamB*, *mamC*, *mamD*, and *mamE*) have not been previously reported to encode MM-specific proteins in other magnetotactic bacteria. None of these genes or neighboring genes from the *mamAB* cluster in the three magnetotactic bacteria investigated display substantial similarity to the *magA* and *mpsA* genes of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1, which were previously reported to encode MM-associated proteins (25, 28). Genes sharing homology with *magA* and *mpsA* of strain AMB-1 were identified in different chromosomal regions of both *M. magnetotacticum* and strain MC-1 in a preliminary analysis (unpublished data), indicating that these genes are not linked to chromosomal regions comprising the *mamAB* or *mamCD* genes. Likewise, the bacterioferritin-encoding gene (*bfr*) of *M. magnetotacticum*, which has been speculated to be involved in magnetite biomineralization (5), is also located in a distant genomic region. These findings suggest that the genetic determination of magnetosome formation is complex and involves several different genomic sites in addition to the *mamAB* and *mamCD* chromosomal regions identified in this study.

Comparative analysis of the *mam* gene sequences from

FIG. 3. Sequence alignments of identified magnetosome proteins of *M. gryphiswaldense* (*M.g.*) and their homologs from *M. magnetotacticum* (*M.m.*) and magnetic coccus strain MC-1. If applicable, the most similar homolog from a nonmagnetic organism was included. Identical amino acids are shown on a solid background, and similar amino acid are shaded. *Mtherm*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; *Bsubt*, *Bacillus subtilis*.



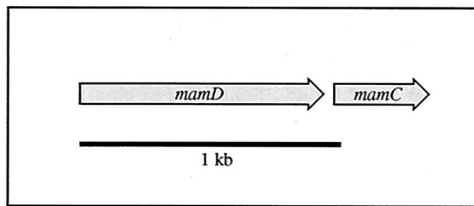


FIG. 5. Molecular organization of the *mamC* and *mamD* genes of *M. gryphiswaldense*. An equivalent arrangement of genes is present in *M. magnetotacticum*.

M. gryphiswaldense with the almost completed genomic assemblies of *M. magnetotacticum* and strain MC-1 allowed us to identify homologous genes in the latter organisms. Generally, the Mam proteins of *M. gryphiswaldense* and *M. magnetotacticum* have nearly identical sequences (91 to 97% similarity) while the amino acid sequence similarity between the *Magnetospirillum* species and strain MC-1 is 46 to 67%. Although the biochemical composition of the MM remains to be analyzed in the latter bacterium, the extensive sequence similarity shared by the Mam proteins of all three of these magnetotactic bacteria implies that they are likely to be functionally equivalent. For Mam proteins with homology to known protein families from databases, namely, MamA, MamB, and MamE, the similarity between the equivalent proteins from the magnetotactic bacteria was generally found to be significantly higher than to database homologs from other organisms.

The arrangement of the *mamAB* genes, as well as the genetic organization of the flanking regions, was found to be conserved in all three magnetotactic strains. In bacteria, functionally related genes are often located close to each other. Therefore, the operon-like arrangement of genes in the conserved *mamAB* region suggests that the neighboring genes might be related to the formation of magnetosomes. Interestingly, most of the genes identified in the *mamAB* cluster encode putative membrane proteins, several of them with sizes consistent with the molecular masses of protein bands observed in MM preparations from various *Magnetospirillum* species (this study; 16, 31, 32). Hence, several of the products of genes from the *mamAB* cluster might correspond to these unidentified proteins but also could have other functions related to magnetite biomineralization, such as the uptake and transport of iron into the cell and intracellular differentiation during MM formation. In addition to genes that are specific for either the *Magnetospirillum* species or strain MC-1, the *mamAB* cluster is characterized by a set of genes found in all three magnetotactic bacteria. These genes can be assigned to six different homology classes. In addition to two unknown classes, four classes of genes correspond to proteins with homology to one of the following families: (i) TPR proteins, (ii) CDF transporters, (iii) HtrA-like serine proteases, and (iv) LemA-like proteins.

TPR motifs, which have been identified across the biological kingdom in a large number of proteins with diverse functions, are known to mediate protein-protein interactions (for a review, see reference 21). Proteins with multiple copies of TPR motifs function as scaffolding proteins and coordinate the assembly of proteins into multisubunit complexes (11, 49). TPR proteins are represented by the *mamA* genes in all three strains

and ORF5 of strain MC-1. MamA of *M. gryphiswaldense* shares extensive similarity with the previously identified MAM22 protein of *M. magnetotacticum* (32). Since the nomenclature of this protein does not reflect its actual molecular mass of 24 kDa and its gene was found to be part of a putative operon containing additional *mam* genes, we propose to reassign the *mam22* gene to *mamA* as in *M. gryphiswaldense*. By analogy to TPR function in many eukaryotic proteins, Okuda et al. suggested that MAM22 localized in the MM may act as a receptor interacting with proteins from the cytoplasm (32, 33). Alternatively, the function of the MamA proteins in the MM may involve the formation of multiprotein complexes within the MM or between the individual magnetosome particles.

CDF proteins occur ubiquitously in eukaryotes, bacteria, and archaea and are involved in the transport of various heavy metals. CDF proteins are represented by the MamB protein and additional CDF homologs present in the *mamAB* region of *M. magnetotacticum* and strain MC-1. Several members of this family are known to confer resistance to Cu, Cd, and Zn (30, 36). Although members of the CDF protein family have not yet been demonstrated to be involved in iron transport, its specific location in the MM suggests that MamB might participate in the transport of iron into the MM vesicle.

Members of the HtrA protein family are widely distributed in nature. In *E. coli* and other bacteria, they are heat shock-induced serine proteases that are active in the periplasm, where their main function is the degradation of misfolded proteins. Different HtrA proteins have distinct regulatory and house-keeping functions in the cell (9, 35). Besides *mamE*, several additional, highly divergent genes with sequence similarity to *htrA*-like genes were identified in the *mamAB* regions of all three magnetotactic bacteria. The reported N terminus of the 66.2-kDa MM protein from *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 (25) has no homology to predicted products of the *mamAB* gene cluster identified in this study but does bear similarity to HtrA-like proteins (unpublished data). Although these findings suggest that HtrA-like proteins are constituents of the MM in several magnetotactic bacteria, their role is not apparent. In addition to the presence of a catalytic domain characteristic of trypsin-like serine proteases, profile searches of the Prosite database with each of the two homologous MamE sequences identified two PDZ domains characteristic of HtrA proteins in the MamE sequences of *M. magnetotacticum* and strain MC-1, respectively (data not shown) (37, 39). It is generally believed that the role of PDZ domains is to position ion channels, receptors, or other signaling molecules in the correct spatial arrangement (7). Hence, it might be speculated that HtrA-like proteins fulfill similar functions in the MM.

Since magnetosome formation in magnetotactic bacteria is under strict biological control, it has been assumed that a number of different gene functions are involved in this complex process (19). Our data suggest that several of these functions might be contributed by genes with homology to ubiquitous families. In addition to those, there is a set of genes represented by *mamC*, *mamD*, and ORF8 and ORF9 of the *mamAB* cluster of *M. gryphiswaldense*, whose predicted products lack recognizable homology to any prokaryotic or eukaryotic proteins from databases but are present in all magnetotactic bacteria. Hence, it can be speculated that genes of unknown function are involved in magnetosome formation. Functional

studies are required to elucidate the specific role of these candidate genes in bacterial magnetite biomineralization.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the DFG and the BMBF. We thank F. Lottspeich for determination of N-terminal amino acid sequences, M. Bauer for advice on sequence analysis, and E. Bäuerlein and M. Hildebrand for helpful discussions. Preliminary sequence data for *M. magnetotacticum* MS-1 and magnetic coccus strain MC-1 was obtained from the DOE Joint Genome Institute at http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Amann, R., R. Rossello-Mora, and D. Schüler. 2000. Phylogeny and *in situ* identification of magnetotactic bacteria, p. 47–60. *In* E. Bäuerlein (ed.), *Biomining*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Balkwill, D., D. Maratea, and R. P. Blakemore. 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**:1399–1408.
- Bazylnski, D. 1995. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**:337–343.
- Bertani, L. E., J. S. Huang, B. A. Weir, and J. L. Kirschvink. 1997. Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **201**:31–36.
- Bertani, L. E., J. Weko, K. V. Phillips, R. F. Gray, and J. L. Kirschvink. 2001. Physical and genetic characterization of the genome of *Magnetospirillum magnetotacticum*, strain MS-1. *Gene* **264**:257–263.
- Bezprozvanny, I., and A. Maximov. 2001. PDZ domains: more than just a glue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:787–789.
- Blakemore, R. P., D. Maratea, and R. S. Wolfe. 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetite spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **140**:720–729.
- Boucher, J. C., J. Martinez-Salazar, M. J. Schurr, M. H. Mudd, H. Yu, and V. Deretic. 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* **178**:511–523.
- Burgess, J. G., R. Kawaguchi, T. Sakaguchi, R. H. Thornhill, and T. Matsunaga. 1993. Evolutionary relationships among *Magnetospirillum* strains inferred from phylogenetic analysis of 16S-rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **175**:6689–6694.
- Das, A. K., P. W. Cohen, and D. Barford. 1998. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**:1192–1199.
- Dean, A. J., and D. A. Bazylnski. 1999. Genome analysis of several marine, magnetotactic bacterial strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* **39**:219–225.
- DeLong, E. F., R. B. Frankel, and D. A. Bazylnski. 1993. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* **259**:803–806.
- Eckerskorn, C., W. Mewes, H. Goretzki, and F. Lottspeich. 1988. A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur. J. Biochem.* **176**:509–519.
- Friedmann, E. I., J. Wierzbos, C. Ascaso, and M. Winkhofer. 2001. Special feature: chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: evidence of biological origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:2176–2181.
- Gorby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. P. Blakemore. 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**:834–841.
- Hofmann, K., P. Bucher, L. Falquet, and A. Bairoch. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:215–219.
- Hubbard, J. A., K. B. Lewandowska, M. N. Hughes, and R. K. Poole. 1986. Effects of iron-limitation of *E. coli* on growth, the respiratory chains and gallium uptake. *Arch. Microbiol.* **146**:80–86.
- Kirschvink, J. L., and J. W. Hagadorn. 2000. A grand unified theory of biomineralization, p. 139–149. *In* E. Bäuerlein (ed.), *Biomining*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Lamb, J. R., S. Tugendreich, and P. Hieter. 1995. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* **20**:257–259.
- Lenz, L. L., B. Dere, and M. J. Bevan. 1996. Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* **5**:63–72.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208–218.
- Matsunaga, T., and H. Takeyama. 1998. Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramol. Sci.* **5**:391–394.
- 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. Commun.* **268**:932–937.
- Meldrum, F. C., S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, and D. A. Bazylnski. 1993. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* **251**:231–236.
- Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* **11**:95–110.
- Nakamura, C., J. G. Burgess, K. Sode, and T. Matsunaga. 1995. An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **270**:28392–28396.
- Nakamura, N., K. Hashimoto, and T. Matsunaga. 1991. Immunoassay method for the determination of immunoglobulin G using bacterial magnetic particles. *Anal. Chem.* **63**:268–272.
- Nies, D. H., and S. Silver. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**:186–199.
- 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.
- 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.
- Okuda, Y., Y., and Fukumori, H. 2001. Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing MAM22, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **491**:169–173.
- Osborn, M. J., and Munson, R. 1974. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **XXXI**:642–652.
- Pallen, M. J., and B. W. Wren. 1997. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* **26**:209–221.
- Paulsen, I. T., and M. H. Saier. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**:99–103.
- Ponting, C. P. 1997. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and fungi. *Protein Sci.* **6**:464–468.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sassoon, N., J. P. Arie, and J. M. Betton. 1999. PDZ domains determine the native oligomeric structure of the DegP (HtrA) protease. *Mol. Microbiol.* **33**:583–589.
- 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.
- Schüler, D. 2000. Characterization of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*, p. 109–118. *In* E. Bäuerlein (ed.), *Biomining*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Schüler, D. 1999. Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:79–86.
- Schüler, D., and E. Bäuerlein. 1998. Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**:159–162.
- Schüler, D., and E. Bäuerlein. 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**:301–307.
- Schüler, D., and R. B. Frankel. 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:464–473.
- Schüler, D., and M. Köhler. 1992. The isolation of a new magnetic spirillum. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**:150–151.
- Schüler, D., S. Spring, and D. A. Bazylnski. 1999. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**:466–471.
- Schüler, D., R. Uhl, and E. Bäuerlein. 1995. A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:139–145.
- Tang, Y. P., M. M. Dallas, and M. H. Malamy. 1999. Characterization of the *Bal* (Bacteroides aerotolerance) operon in *Bacteroides fragilis*: isolation of a *B. fragilis* mutant with reduced aerotolerance and impaired growth in *in vivo* model systems. *Mol. Microbiol.* **32**:139–149.
- Tempst, P., A. J. Link, L. R. Riviere, M. Fleming, and C. Elicone. 1990. Internal sequence analysis of proteins separated on polyacrylamide gels at the submicrogram level: improved methods, applications and gene cloning strategies. *Electrophoresis* **11**:537–553.
- Thomas-Keppta, K. L., S. J. Clemett, D. A. Bazylnski, J. L. Kirschvink, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson, M. F. McKay, and C. S. Romanek. 2001. Special feature: truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:2164–2169.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.

Biochemical and Proteomic Analysis of the Magnetosome Membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Karen Grünberg,¹ Eva-Christina Müller,² Albrecht Otto,² Regina Reszka,² Dietmar Linder,³ Michael Kube,⁴ Richard Reinhardt,⁴ and Dirk Schüler^{1*}

Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, 28359 Bremen,¹ Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, 13122 Berlin,² Biochemisches Institut des Fachbereichs 11 Medizin, Justus-Liebig-Universität, 35392 Giessen,³ and Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, 14195 Berlin,⁴ Germany

Received 12 August 2003/Accepted 4 November 2003

We analyzed the biochemical composition of the magnetosome membrane (MM) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Isolated magnetosomes were associated with phospholipids and fatty acids which were similar to phospholipids and fatty acids from other subcellular compartments (i.e., outer and cytoplasmic membranes) but were present in different proportions. The binding characteristics of MM-associated proteins were studied by selective solubilization and limited proteolysis. The MM-associated proteins were further analyzed by various proteomic approaches, including one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Edman and mass spectrometric (electrospray ionization-mass spectrometry-mass spectrometry) sequencing, as well as capillary liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry of total tryptic digests of the MM. At least 18 proteins were found to constitute the magnetosome subproteome, and most of these proteins are novel for *M. gryphiswaldense*. Except for MM22 and Mms16, all bona fide MM proteins (MMPs) were encoded by open reading frames in the *mamAB*, *mamDC*, and *mms6* clusters in the previously identified putative magnetosome island. Eight of the MMPs display homology to known families, and some of them occur in the MM in multiple homologues. Ten of the MMPs have no known homologues in nonmagnetic organisms and thus represent novel, magnetotactic bacterium-specific protein families. Several MMPs display repetitive or highly acidic sequence patterns, which are known from other biomineralizing systems and thus may have relevance for magnetite formation.

Many prokaryotes build more or less complex subcellular structures, such as intracellular membranes or structures generally described as inclusions. Analysis of many examples of these structures has revealed a remarkable degree of intracellular differentiation and association with distinct subsets of proteins, including in structures such as endospores (27, 58), chlorosomes (13), gas vesicles (34), carboxysomes (14), acidocalcisomes (52), and polyhydroxybutyrate (PHB) granules (30).

Among the most intriguing examples of subcellular structures are magnetosomes, which are formed by magnetotactic bacteria (MTB) (5, 10). Magnetosomes are nanometer-size magnetic particles which are arranged in a bacterial cell in chain-like structures that are thought to serve as a navigational device in bacterial magnetotaxis (7, 17).

The superior crystalline and magnetic characteristics of bacterial magnetosomes make them potentially useful in a number of biotechnological applications, such as in immobilization of bioactive compounds, as contrast agents for magnetic resonance imaging, and in magnetic drug targeting (21, 42, 49). The characteristics of bacterial magnetosomes have recently even been considered for use as biosignatures to identify presumptive Martian magnetofossils (56).

The magnetosome particles consist of crystals of a magnetic iron mineral which are enclosed within membrane vesicles. Although the biomineralization of magnetosomes is poorly understood at the molecular and biochemical levels, it has

been generally assumed that the magnetosome membrane (MM) is crucial in the biological control of mineral formation (3, 4, 7, 18). In addition to phospholipids associated with isolated magnetosome particles, Gorby and coworkers in an initial study detected two of the numerous proteins in the MM that have not been found in other cell fractions (18). In other studies, several genes encoding magnetosome-associated proteins were identified by reverse genetics in *Magnetospirillum magnetotacticum* and *Magnetospirillum* strain AMB-1 (29, 35, 36, 37). In a recent study the workers identified two low-molecular-mass proteins which were tightly bound to the MM in strain AMB-1 along with other proteins (3). One of these low-molecular-mass proteins (Mms6) had an effect in *in vitro* magnetite nucleation. All the previous approaches, however, were focused on analysis of individual proteins or a limited number of proteins, and the overall biochemical composition of the MM in different MTB has for the most part remained elusive.

Magnetospirillum gryphiswaldense produces up to 60 cubo-octahedral magnetosomes which are approximately 45 nm in diameter and consist of membrane-bound crystals of magnetite (Fe₃O₄) (44, 46). Because *M. gryphiswaldense* is genetically tractable (51) and can be readily grown by microaerobic mass cultivation (22), it has been used as a model for investigation of magnetosome formation in a number of studies (47, 48, 50). Recently, an initial analysis of isolated magnetosomes led to identification of at least 13 MM-specific protein bands (20). Cloning of the genes encoding four of the most abundant MM-associated proteins revealed that these genes are arranged in several operon-like gene clusters which are highly

* Corresponding author. Mailing address: MPI für Marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany. Phone: 49-(0)421-2028-746. Fax: 49-(0)421-2028580. E-mail: dschuele@mpi-bremen.de.

conserved in different MTB. Identified MM proteins (MMPs) were found to exhibit homology to tetratricopeptide repeat proteins (MamA), cation diffusion facilitators (MamB), and HtrA-like serine proteases (MamE) or to exhibit no similarity to known proteins (MamC and MamD). In another study, three operons encoding MMPs were identified as parts of a larger putative magnetosome island. This apparently unstable 35- to 80-kb genomic region was functionally linked to magnetosome biosynthesis in a deletion mutant and seemed to encode many other functions required for biomineralization. The presence of additional MTB-specific open reading frames (ORFs) in this region led to the conclusion that the specific subset of MMPs is more complex, and many of the previously identified *mam* and *mms* genes were predicted to encode additional MM-associated proteins (45).

In this study, we examined the biochemical characteristics of the MM by using different approaches and analyzed its protein composition. A number of proteins constituting the MM sub-proteome were detected, and their genes were identified in a preliminary genome analysis of *M. gryphiswaldense*. Most of the bona fide MMPs were assigned to ORFs in the *mamAB*, *mamDC*, and *mms* clusters in the putative magnetosome island.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *M. gryphiswaldense* MSR-1 (= DSM 6361), *M. magnetotacticum* MS-1 (= ATCC 31632), and *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 (= ATCC 700264) were used in this study. The strains were grown under microaerobic conditions in an oyster fermentor as described previously (22).

Isolation and biochemical analysis of magnetosomes. The protocol used for magnetosome isolation was the protocol described previously (20), with minor modifications. Briefly, 10 g (wet weight) of *M. gryphiswaldense* cells suspended in 50 ml of 50 mM HEPES–4 mM EDTA (pH 7.4) was disrupted by three passes through a French pressure cell (20 000 lb/in²). All buffers used for magnetosome isolation contained 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a protease inhibitor. Unbroken cells and cell debris were removed from the sample by centrifugation (5 min, 680 × g). The cell extract was passed through a MACS magnetic separation column (Miltenyi Biotec). Columns were placed between two Sm-Co magnets, which generated a magnetic field that magnetized the column wire matrix and produced strong magnetic field gradients near the wires that resulted in trapping of the magnetic particles in the matrix. Bound magnetic particles were rinsed first with 50 ml of 10 mM HEPES–200 mM NaCl (pH 7.4) and then with 100 ml of 10 mM HEPES (pH 7.4). After the column was removed from the magnet, magnetic particles were eluted from the column by flushing it with 10 mM HEPES buffer. Finally, the magnetosome suspension was loaded on top of a sucrose cushion (55% [wt/wt] sucrose in 10 mM HEPES [pH 7.4]) and subjected to ultracentrifugation in a swinging bucket rotor. The magnetic particles were completely pelleted after centrifugation for 12 h at 280,000 × g and 4°C.

For analysis of protein binding characteristics, the isolated magnetosomes of MSR-1 were subjected to two different treatments, as follows.

For selective solubilization, aliquots (50 µg, wet weight) of isolated magnetosomes were resuspended in either 2% (wt/vol) Triton X-100, 2% (wt/vol) Tween 20, 500 mM octylglucoside (zwitterionic), 5% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS) (cationic), 5 M urea, or 2 M NaCl. After they were shaken at room temperature for 2 h, the suspensions were centrifuged for 30 min at 13,000 × g. The pellets were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) after extensive washing.

For limited proteolytic digestion, aliquots (50 µg) of isolated magnetosomes were resuspended in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) and were separately treated with 40 µg of trypsin (20 min), proteinase K (5 min), or pronase (5 min) per ml and incubated at 37°C with slight shaking. Digestion was stopped by addition of either trypsin inhibitor or trichloroacetic acid for proteinase K. Pronase was removed by extensive washing with 10 mM Tris-HCl. After centrifugation for 10 min at 13,000 × g, the pellets were analyzed by SDS-PAGE.

Gel electrophoresis. Protein concentrations were measured with a BCA-Protein Micro assay kit (Pierce) used according to the manufacturer's instructions. For one-dimensional (1D) SDS-PAGE of magnetosome-associated proteins we used the procedure of Laemmli (26). An amount of magnetosome particles or solubilisate equivalent to 20 µg of protein was mixed with electrophoresis sample buffer containing 2% (wt/wt) SDS and 5% (wt/vol) 2-mercaptoethanol. After the samples were boiling for 5 min, they were centrifuged for 3 min. The supernatants were loaded onto polyacrylamide gels containing various concentrations of polyacrylamide (8 to 16%). Tricine-SDS-PAGE was performed as described by Schägger and von Jagow (43).

Two-dimensional (2D) PAGE was carried out as described previously (9, 15, 28). Approximately 60 µg of magnetosome protein was used for isoelectric focusing. Carrier ampholytes (BDH Laboratory Supplies, Poole, United Kingdom) were used to generate a pH gradient from 3.5 to 10 with a model 175 chamber from Bio-Rad (Munich, Germany). For the second dimension, Tris-SDS-PAGE was used (9 to 16% acrylamide gradient gels; Bio-Rad Protean II). 1D and 2D gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Serva) or with silver.

Digitized gels were analyzed with the Image Master 1D software (v.3.0; Amersham-Pharmacia) or with the Melanie II software package (2D gels) (2).

After electrophoresis, the proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (ProBlott; Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions by using a semidry blot apparatus (Hoefer).

N-terminal amino acid sequence analysis. Proteins (20 to 50 pmol) were sequenced after blotting onto a polyvinylidene difluoride membrane by automated N-terminal Edman degradation with an Applied Biosystems (Foster City, Calif.) pulsed liquid-phase sequencer (model 477A) under standard conditions. Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified with an on-line analyzer (model 120A; Applied Biosystems) with a repetitive yield of 92 to 95%.

Total tryptic digest of whole magnetosomes. An aliquot of a magnetosome suspension equivalent to approximately 40 µg of protein was pelleted with a Dynal magnet (Dynal A.S., Oslo, Norway). The isolated wet magnetosomes were resuspended in 50 µl of degassed 6 M guanidine hydrochloride–0.5 M Tris-HCl–2 mM EDTA (pH 7.5) and reduced for 1 h at 37°C with 2 µl of an aqueous solution containing 2 µmol of dithiothreitol. Alkylation was performed by adding of 20 µl (20 µmol) of a 1 M solution of iodoacetamide in 6 M guanidine hydrochloride for 30 min. The alkylated magnetosomes were pelleted again and washed three times with 200 µl of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0). After resuspension in 50 µl of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 10% acetonitrile, the magnetosome-associated proteins were digested with 5 µg of trypsin (Promega) overnight. The magnetite moiety was separated with a magnet, and the supernatant was used for mass spectrometric (MS) experiments.

MS analysis. Samples were identified after chromatographic separation of the peptide mixture on an LC Packings 75-m PepMap C₁₈ column (Dionex, Idstein, Germany) by using a capillary liquid chromatography (CapLC) system delivering a gradient of from 5.7 to 80% acetonitrile and 0.1% formic acid at 200 nl/ml. The eluting peptides were ionized by electrospray ionization by using a Q-TOF hybrid mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom). This instrument, in automated switching mode, selected precursor ions based on intensity for peptide sequencing by collision-induced fragmentation tandem MS. The MS-MS analyses were conducted by using collision energy profiles that were chosen based on the *m/z* value, the charge state of the parent ion, and the fragment ion masses and intensities, and the results were correlated with the preliminary MSR-1 nucleic acid databases by using the Mascot software (38). The results were validated manually.

Analytical methods. The iron content of magnetosomes was determined as described previously (20, 22). Lipids were extracted from the magnetosomes and whole cells as previously described (8, 11). Quantitative determination of phospholipids was performed as described by Kates (25). Fatty acids were analyzed as the methyl ester derivatives prepared from 10 mg of dry cell material. Cells were subjected to differential hydrolysis in order to detect ester-linked and non-ester-linked (amide-bound) fatty acids (B. Tindall, unpublished data). Fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography by using a nonpolar capillary column (0.2 µm by 25 m; film thickness, 0.33 µm; internal column diameter, 0.2 mm; Hewlett-Packard Ultra 2) and flame ionization detection. The conditions used were as follows: injection and detector port temperature, 300°C; carrier gas, hydrogen at an inlet pressure of 60 kPa; split ratio, 50:1; injection volume, 1 µl; and a temperature program in which the temperatures was increased from 130°C (held for 2 min) to 310°C at a rate of 4°C min⁻¹.

The unambiguous position of double bonds and the presence of hydroxy fatty acids were confirmed by gas chromatography-MS by using a Finnigan MAT GCQ as described previously (24). Hydroxy fatty acids were detected by their characteristic fragments at *m/z* 103 for 3-OH fatty acids and at *m/z* M⁺-59 for

2-OH fatty acids. Thin-layer chromatography and detection of polar lipids were carried out as described by Skipski and Barlday (53).

Heme and glycostaining. Isolated magnetosomes (approximately 20 µg of protein) were suspended in sample buffer containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol and were separated by 1D SDS-PAGE by using 16% polyacrylamide gels as described above; however, boiling of protein samples before electrophoresis was omitted. Heme staining was performed by using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as described by Thomas et al. (55) before Coomassie blue staining.

Protein glycosylation was assayed with an ECL glycoprotein detection module (Amersham-Pharmacia) used according to the manufacturer's instructions.

Electron microscopy. Preparation and negative staining of magnetosomes were performed as described previously (20). Micrographs were taken with a Philips EM301 electron microscope at an acceleration voltage of 80 kV.

Analysis of DNA and protein sequence data. Genome sequence data from *M. gryphiswaldense* MSR-1 were used from the whole genome shotgun in progress (45), at the present stage of eightfold sequencing coverage. The assembled shotgun sequences have a constant total contig length approaching 4.6 Mb; hence, they represent nearly the genome size of *M. gryphiswaldense* MSR-1 as estimated by pulsed-field gel electrophoresis.

Peptide sequences determined in this study were compared to the translated preliminary genome of MSR-1 and to the partial sequence encoded by the magnetosome island of MSR-1 (45) (accession number BX571797) by using the BLAST algorithm (1). Basic analyses of DNA and protein sequences were performed by using the MacVector 7.0 software package (Oxford Molecular Ltd.). Sequence alignment was carried out by using the ClustalW algorithm (57), which is part of the same software. Protein sequences were compared to the GenBank, EMBL, and SwissProt databases. Motif searches were carried out by using the Prosite program (23). Protein location was analyzed by the PSORT program (31).

Sequences of all bona fide magnetosome genes were finished to satisfy the Bermuda Rules (<http://www.ornl.gov/hgmis/research/Bermuda.html#1>). Sequences of proteins that represented putative contaminants (see Table 3) were analyzed by high-throughput genome annotation (40).

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences of proteins that represented putative contaminants have been deposited in the GenBank, EMBL, and DDJB data libraries as draft sequences for the whole genome shotgun under accession number BX640510. The MM22 sequence has been deposited under accession number BX640511.

RESULTS

Isolation and biochemical analysis of magnetosomes from *M. gryphiswaldense*. Using the procedure described in Material and Methods section, we obtained 40 mg of purified magnetosomes from 1 g (dry weight) of magnetic cells, which included approximately 99.5% of the total cell-bound iron. The higher magnetosome yields in this study than in a previous study (20) were due to the improved cultivation of bacteria in an oxystat fermentor, which resulted in a vastly increased intracellular magnetosome content (22).

The profile of MM-associated fatty acids is shown in Table 1. A number of common fatty acids were identified both in the whole cells and in the MM fraction. However, the amide-linked fatty acids 3-hydroxyhexadecanoic acid (3 OH 16:0), 3-hydroxyoctadecanoic acid (3OH 18:0), and 2-hydroxydecanoic acid (2OH 18:1), which are typically present in the outer membrane of gram-negative bacteria (41), were not detected in the MM fraction. The results of thin-layer chromatography in this study essentially confirmed the previous gas chromatographic analysis of polar lipids (4). Specifically, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol were identified as the most abundant polar lipids both in whole-cell extracts and MM, whereas ornithinamid lipid and an unidentified amino lipid were less abundant in the MM than in the fraction of lipids from whole cells (data not shown).

Analysis of MM-associated proteins from *M. gryphiswaldense* by 1D SDS-PAGE. To investigate the effect of the prep-

TABLE 1. Fatty acid compositions of whole cells and magnetosomes of *M. gryphiswaldense* MSR-1 as determined by gas chromatography-MS

Fatty acid	Relative amt (%)	
	Whole-cell polar lipids	Magnetosome polar lipids
16:1ω7c	21.384	21.707
16:0	8.947	11.860
ND ^a	0.411	1.671
3 OH 16:0	2.694	
18:1ω9c	0.508	2.299
18:1ω7c	55.972	57.734
18:1	0.882	2.724
2OH 18:1	2.636	
3OH 18:0	1.909	
2OH 19:1/cy 19:0	3.083	2.005

^a ND, fatty acid could not be identified by gas chromatography-MS due to an overlap with antifoam peaks.

aration protocol on the protein composition of the MM, the conditions used for magnetosome purification were varied; the method used for cell disruption, the buffer composition, the pH, the ionic strength, and other parameter were varied in numerous experiments. In summary, the standard procedure yielded the optimum results in terms of protein yield, reproducibility, and specificity (data not shown). For example, alternative methods used for cell disruption, including ultrasonication and lysozyme treatment, resulted in poor magnetosome yields and poor reproducibility. Both ultracentrifugation and subsequent magnetic separation were found to be crucial, as the omission of purification steps resulted in a complex, highly nonspecific protein pattern.

Depending on the electrophoresis conditions, between 15 and 20 major bands were detected by Coomassie blue staining in 1D PAGE gels (Fig. 1A). Several additional low-molecular-mass proteins, including band 17, were identified in Tris-Tricine-SDS gels (Fig. 1B and C) (43). With the exception of bands 4, 5, and 17, which yielded poor results, unambiguous N-terminal amino acid sequences were derived from 14 proteins.

MM-associated proteins were tested for the presence of covalently bound heme by SDS-PAGE, followed by detection of heme-associated peroxidase activity (55). Two major positive bands at approximately 25 and 16 kDa, as well as several minor bands, were detected (Fig. 1D). Likewise, 1D PAGE-resolved MMPs were tested for glycosylation. However, no bands reacting with the glycostaining kit were detected in the MM.

The characteristics of the MM-associated proteins were further analyzed by treating purified magnetosomes with various solubilizing agents (Fig. 2A). Treatment with hot (95°C) 1% SDS readily removed all proteins, whereas solubilization was less effective with cold (room temperature) 5% SDS. Several of the smaller bands (e.g., bands at 16 and 19 kDa) apparently were more resistant to solubilization, indicating that they are relatively tightly bound to the MM. While cationic denaturing detergents like SDS completely solubilized the MM, treatment with nonionic detergents (Triton X-100, Tween 20), as well as with zwitterionic detergents like octylglycosid, was less effective. A 24-kDa protein that was identified as MamA by N-terminal amino acid sequence analysis could be selectively

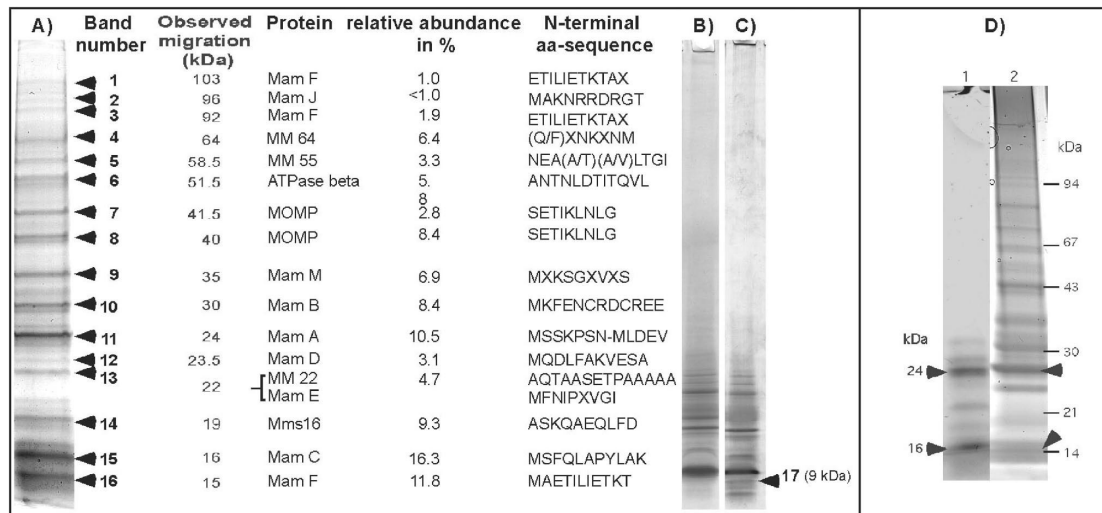


FIG. 1. Separation of MM-associated proteins by 1D PAGE. (A) Summary of MMPs detected by Coomassie blue staining in 1D SDS-16% PAGE gels. (B and C) Coomassie blue-stained (B) and silver-stained 16% SDS-Tricine gels of MMPs. The heterogeneous band at 9 kDa (band 17) revealed an ambiguous N-terminal amino acid sequence, M(G/Y/F/I)(P/Q/T/K)(L/I/V)(K/A)(M/G/V)(A/T/V/I), which partially contains the N terminus of MamG. (D) Heme staining of MMPs (lane 1), which were subsequently stained with Coomassie blue (lane 2). The arrowheads indicate the positions of heme-positive bands. aa, amino acid.

solubilized by Tween 20. The apparently loose binding of this protein to the MM is consistent with its suggested peripheral association (37). Treatment with 5 M NaCl and urea had virtually no effect on the solubilization of MMPs.

While pronase and proteinase K treatment caused total degradation of MM-associated proteins (data not shown), bands at molecular masses of 19, 16, and 15 kDa remained associated

with the MM after limited tryptic digestion (Fig. 2B). These bands were identified as MamC, MamF, and Mms16. The incomplete digestion of these proteins suggests that they are partially protected against proteolytic degradation, perhaps because of their integral membrane localization. Protease treatment of magnetosomes resulted in macroscopic agglomeration of the isolated magnetosome particles, as observed after solu-

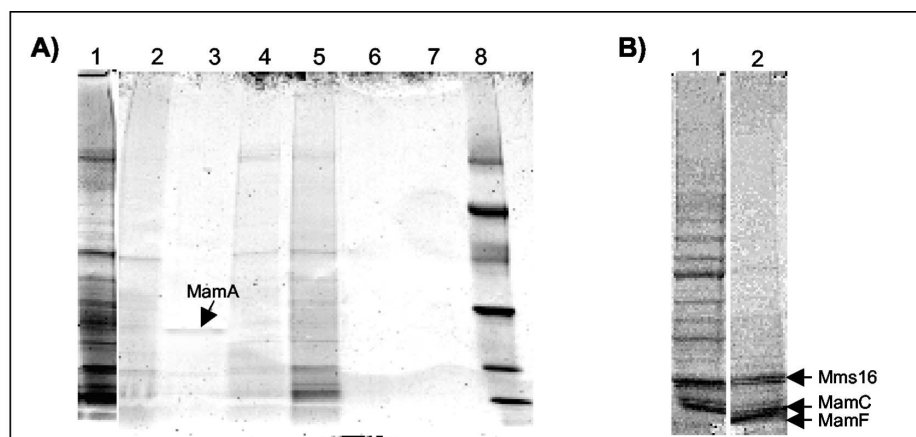


FIG. 2. Binding characteristics of the MM-associated proteins. (A) SDS-PAGE of proteins solubilized from the MM after treatment with various agents. Lane 1, 1% hot SDS (5 min); lane 2, Triton X-100 (2%); lane 3, Tween 20 (2%); lane 4, octylglucoside (500 mM); lane 5, SDS (5%); lane 6, urea (5 M); lane 7, NaCl (2 M); lane 8, low-molecular-weight marker. The arrow indicates the position of a 24-kDa band which was selectively solubilized by Tween 20 and was identified as MamA by its N-terminal amino acid sequence (MSSKPSN). (B) Lane 1, proteins from untreated magnetosomes; lane 2, proteins from magnetosomes after tryptic digestion. The arrows indicate the positions of protein bands resistant to partial tryptic digestion, which were identified as Mms16 (ASKQAEQLFD), MamC (MSFQLAPYLAK), and MamF (MAETILLETKT).

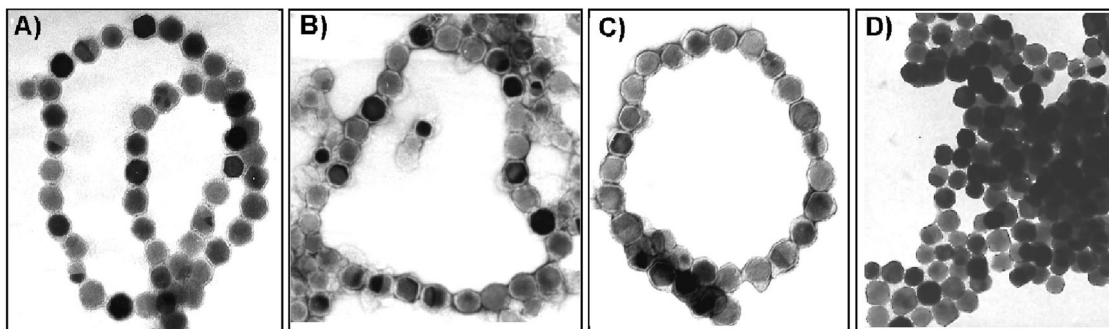


FIG. 3. Electron micrographs of isolated magnetosome particles. (A) Untreated magnetosomes; (B) magnetosomes after treatment with Triton X-100; (C) magnetosomes after tryptic digestion; (D) magnetosomes after boiling with 1% SDS.

bilization of the MM with detergents. This indicates that the presence of proteins is crucial for maintaining the integrity of the MM vesicles. Under these conditions, however, the membrane structure enveloping the crystals apparently was not entirely removed. Even after boiling with 1% SDS, which led to instant agglomeration of particles, traces of organic material remained attached to the crystals and a residual tendency to form chains was observed, although the particles were tightly spaced due to the MM solubilization (Fig. 3).

Comparison of MM-associated proteins from *M. magnetotacticum* and *Magnetospirillum* strain AMB-1. The closely related *Magnetospirillum* strains produce magnetite crystals which are virtually identical in terms of size, alignment, and crystal morphology. However, preliminary biochemical analysis of the MM by using different protocols with *M. magnetotacticum* MS-1 and *Magnetospirillum* strain AMB-1 revealed divergent protein patterns of the MM for strains MS-1, AMB-1, and MSR-1 (3, 18, 35–37). To clarify whether the observed differences were due to differences in the isolation procedure, magnetosome particles were purified from *M. magnetotacticum* and strain AMB-1 by using the same protocol that was used for *M. gryphiswaldense* MSR-1. The protein profiles of the solubilized MM from the three strains are shown in Fig. 4. Approximately 20 to 25 bands were identified in magnetosome preparations from MS-1 and AMB-1. While the protein patterns of AMB-1 and MS-1 were similar to each other and shared a number of bands, their composition was clearly distinct from that of MSR-1.

Identification of MM-associated proteins by MS analysis. Results of the 2D analysis are shown in Fig. 5. Proteins were excised from 19 major spots on the Coomassie blue-stained gel and subjected to tryptic digestion and subsequent MS analysis. Several horizontal chains of spots with nearly identical molecular weights but different pIs were detected, which may be attributed to mistranslation, artificial chemical modification during protein preparation, or posttranslational modification.

Alternatively, proteins from magnetosome preparations were directly subjected to complete tryptic digestion and subsequent CapLC-MS-MS analysis without prior separation by electrophoresis. Overall, approximately 140 different spectra were identified, which could be assigned to at least 27 different proteins (Tables 2 and 3).

Identification and analysis of genes encoding MM-associated proteins. ORFs corresponding to all of the peptide sequences determined were identified in the unfinished genome assembly of MSR-1. The majority of these ORFs could be assigned to genes in the previously identified putative magnetosome island of *M. gryphiswaldense* (BX571797) (45).

Based on sequence analysis, the MM-associated proteins can be divided into two groups. The first group comprises proteins classified as bona fide MMPs based on (i) their presence in major bands or spots in 1D and 2D gels, (ii) no or only remote similarity to proteins in organisms other than MTB, and (iii)

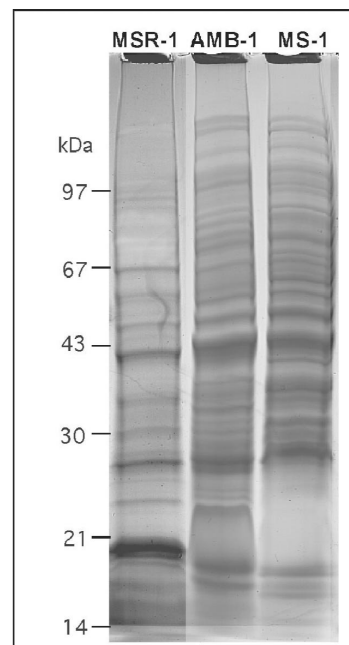


FIG. 4. SDS-16% PAGE of MMPs from *M. gryphiswaldense* MSR-1, *Magnetospirillum* strain AMB-1, and *M. magnetotacticum* MS-1.

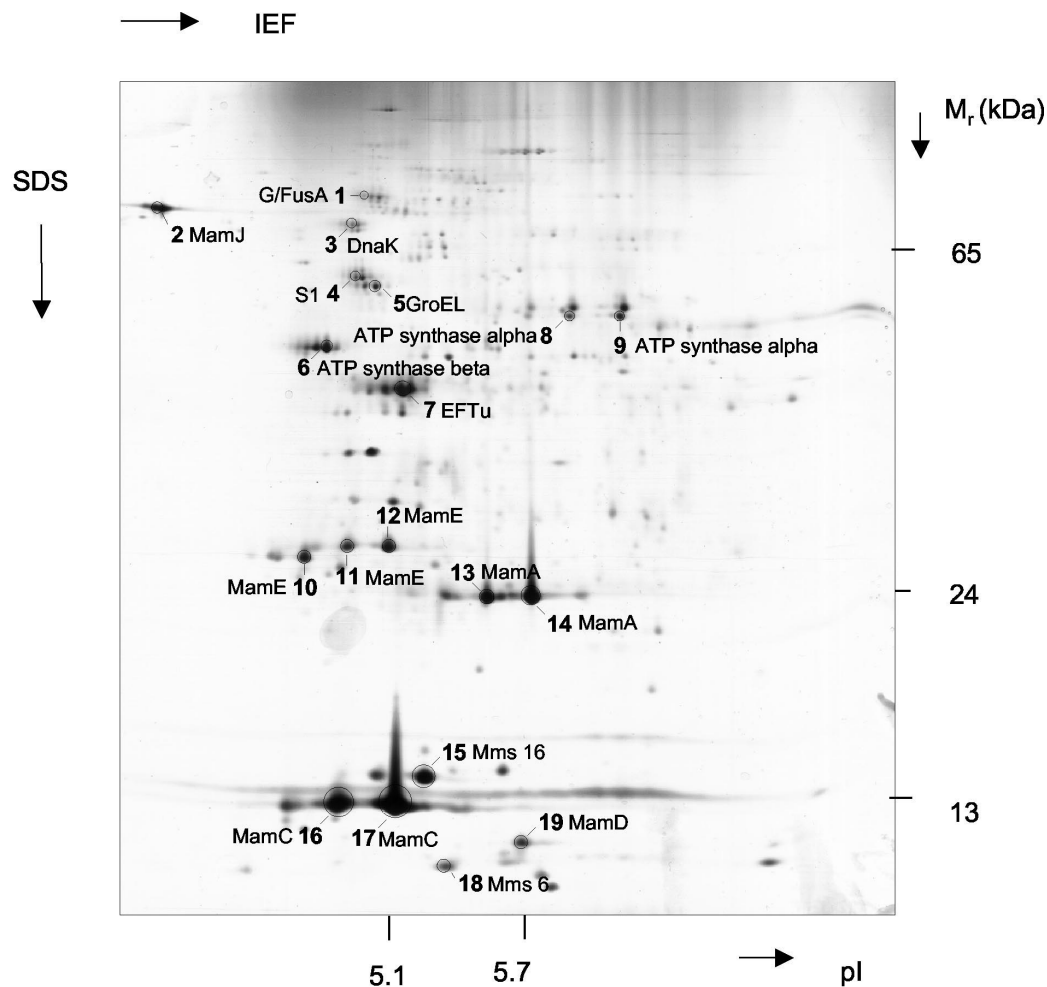


FIG. 5. Silver-stained 2D PAGE of MMPs from *M. gryphiswaldense*. Proteins from marked spots were excised from the corresponding Coomassie blue-stained gel and identified by electrospray ionization-MS-MS after tryptic digestion. IEF, isoelectric focusing.

colocalization in operons together with other genes encoding known MMPs. These known MMPs include MamA, MamB, MamC, MamD, MamE, MamF, MamG, MamJ, MamM, MamN, MamO, MamQ, MamR, MamS, MamT, MM22, Mms6, and Mms16 (Table 2). While MamA, MamB, MamC, MamD, and MamE were previously identified in the MM of *M. gryphiswaldense* (20), the rest of the MMPs are new for this organism and are described below.

The second group comprises proteins with unequivocal homology to ubiquitous, biochemically well-characterized, and very abundant proteins in other (nonmagnetic) organisms (Table 3). They most likely do not represent true MMPs, but their association with the MM is due to nonspecific adsorption during cell disruption.

Characteristics of bona fide MMPs. (i) Mms16. Spot 15 and band 14 correspond to a protein that exhibits 80% identity to

Mms16 of *Magnetospirillum* strain AMB-1 (SwissProt accession number Q93UW2), which was the most abundant protein associated with the magnetosomes in this strain (35). Because of its observed *in vitro* GTPase activity, it has been suggested that this protein is involved in the formation of MM vesicles. Genes with similarity to *mms16* are present in the genomes of a number of nonmagnetic bacteria. For instance, in *Rhodospirillum rubrum*, a similar protein (Apd; 70% similarity) seems to be involved in the activation of a depolymerase for hydrolysis of PHB (R. Handrick and D. Jendrossek, unpublished data). This protein also displays weaker sequence similarity to phasin-like, PHB granule-associated proteins from several bacteria.

(ii) Mms6 and MamG. The apparent molecular mass of the Mms6 protein of *M. gryphiswaldense* (spot 18) is significantly less than 12.7 kDa, as calculated from the full-length gene, potentially due to proteolytic cleavage of a premature propep-

TABLE 2. Summary of features of bona fide MMPs of *M. gryphiswaldense* identified by various sequencing methods

Protein	Edman sequencing ID band no.	2D spot no.	2D PAGE + MS-MS		Total tryptic digestion + MS-MS	Length (amino acids)	Predicted molecular mass (kDa)	pI	Best Blast hit (accession no.) ^a	E value	Putative function
			Coverage (%)	No. of peptides							
MamA (O93DY9)	11	13,14	35	7	40.6	217	24.01	MM2348 of <i>Methanosarcina</i> (AE013478)	3e-15	Tetrapeptide repeat protein	
MamB (O93DY6)	10	13,8		4	13.8	31.96	12.40	YdfM of <i>Bacillus subtilis</i> (C69781)	1e-37	CDF transporter	
MamC (O93DY1)	15	16,17	38.7	4	54.8	125	4.88			Unknown	
MamD (O93DY2)	12	19	6.1	2	14.3	314	30.20			Unknown	
MamE	13	10	14.5	8	6.7	772	78.00	MLL5022 of <i>Rhizobium loti</i> (O98CS8)	9e-35	Serine protease	
MamF	1, 3, 16			3	26.8	111	12.30			Unknown	
MamG	17			84	7.70	9.28	7.70			Unknown	
MamJ	2	2	12.7	5	16.3	466	48.51	BH 1238 of <i>Bacillus halodurans</i> (F83804)		Unknown	
MamM	9			3	12.9	318	34.50	TM0934 of <i>Tharmitoga maritima</i> (AE001757)	1e-33	CDF transporter	
MamN				2	6.4	437	46.14	CC1282 of <i>Carlobacter crescentus</i> (CS7408)	6e-30	Inorganic ion transport	
MamO				7	17.5	632	65.40	<i>T. maritima</i> (AE001759)	6e-15	Serine protease	
MamQ				2	10.3	272	30.00		3e-16	Unknown	
MamR				2	27.4	72	8.10			Unknown	
MamS				1	7.7	180	18.71			Unknown	
MamT				1	5.7	174	18.88			Heme binding	
Mms6	18	15	17.5	2		136	14.26	ApM of <i>Rhodospirillum rubrum</i> (ZP_00014946) ^b	Unknown	Iron binding	
Mms16	14	15	67.6	9		145	16.35	<i>Enterococcus faecalis</i> V583 (NP_816281)	6e-28	Activator for PHB depolymerase	
MM22	13			196		196	20.00			Conserved hypothetical protein	

^a Only BlastP hits with E values of <0.01 are shown. Hits to other MTB were not included.^b Similar to Mms6 of *Magnetospirillum* strain AMB-1 (O83VL7).^c Similar to Mms16 of *Magnetospirillum* strain AMB-1 (O93UW2); putative GTPase.

tide. It displays homology only to other proteins found exclusively in MTB, especially Mms6 of *Magnetospirillum* strain AMB-1 (O83VL7; 67% identity). Recently, Mms6 was described in the latter strain as a tightly bound constituent of the MM, which exhibited in vitro iron binding activity (3).

The ambiguous N-terminal amino acid sequence obtained from heterogeneous band 17 partially matches the N terminus of the deduced polypeptide encoded by the *mamG* gene (45) and thus seems to represent the MamG protein that is similar to Mms5 from AMB-1 (O83VL6) (3). Interestingly, MamG and MamD exhibited extensive sequence identity with each other (Fig. 6A) and had the hydrophobic sequence motif KGX XLGLGL/MGLGAWGPXXLG in common with Mms6. This motif exhibits an intriguing similarity to LG-rich repetitive sequences found in silk-like (fibroin) proteins (59) and mollusk shell framework proteins (54), as well as elastins and cartilage proteins (12), which are known to have a remarkable tendency for self-aggregation; several of these proteins are involved in other biomineralization processes.

(iii) **MamJ.** MamJ was identified by 1D and 2D PAGE, as well as in the MMP digest. The apparent mass (approximately 96 kDa) in 1D PAGE suggests that this band may represent an undissociated homodimer of MamJ. The MamJ protein exhibits extensive self-similarity and is particularly rich in acidic residues (14% E, 4.75% D), which are organized in several conspicuous repetitive motifs (Fig. 6B).

(iv) **MamM.** Band 9 and three peptide fragments from the MM tryptic protein digest correspond to a protein encoded by the *mamM* gene of the *mamAB* cluster in *M. gryphiswaldense* (45). The MamM protein exhibits sequence similarity (47%) to the previously identified MamB protein of MSR-1 and represents another MMP with significant homology to cation diffusion facilitator (CDF) transporters (20).

(v) **MamF.** The considerable difference between the calculated masses and the molecular masses of the two large bands (92 and 103 kDa) in 1D PAGE gels is consistent with the occurrence of undissociated oligomers (hepta- or hexamers) of the MamF protein, while the 15-kDa band seems to correspond to the monomeric protein. Altogether, the three bands (bands 1, 3, and 16) represent the second-most-abundant protein (14.8%) in the MM after MamC (16.3%). Hydropathy plots of MamF predict that it is a highly hydrophobic protein with two transmembrane helices. An integral membrane location would be also consistent with the observed resistance of this protein to limited tryptic digestion. BLAST searches failed to identify homologues of MamF except for hypothetical proteins in magnetotactic strains MS-1 and MC-1.

(vi) **MM22.** An ORF encoding the N-terminal sequence of band 13 was identified, and this sequence is preceded by five additional amino acid residues, including the initial methionine. The MM22 protein is likely to be associated with the membrane and exhibits similarity with conserved hypothetical proteins from various bacteria. No homologues were identified in other MTB.

(vii) **MamN, MamO, MamQ, MamR, MamS, and MamT.** The MamN, MamO, MamQ, MamR, MamS, and MamT proteins were identified only in tryptic digests of the total MM, while no corresponding bands or spots were detected in 1D and 2D PAGE gels. With the exception of MamN and MamO, there is no similarity or only a low level of similarity with

TABLE 3. Summary of features of presumed protein contamination of the MM of *M. gryphiswaldense* identified by various sequencing methods

Protein	1D band no.	2D spot no.	No. of peptides		Best Blast hit (accession no.) ^a	E value
			2D PAGE + MS-MS	Total tryptic digestion + MS-MS		
Outer membrane protein	7, 8			4	<i>Bracella melitensis</i> (Q44662)	4e-54
ATP synthase alpha		8, 9	6		<i>Rhodospirillum rubrum</i> (PO5036)	3e-11
ATP synthase beta	6	6	6	1	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (PO5038)	0.0
Ribosomal protein S1		4	4		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (NP_767380)	0.0
EF-Tu		7	4	2	<i>Mesorhizobium loti</i> BAC50667 (NP_102118)	1e-07
FusA		1	5		<i>Rickettsia bellii</i> (AAM90927)	0.0
DnaK		3	6		<i>Rhodopseudomonas</i> sp. (O05700)	0.0
GroEL		5	10		<i>Rhizobium meliloti</i> (NP_437546)	0.0
Cytochrome c1				1	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (P23135)	1e-63
cb-type cytochrome c oxidase CcoO subunit				1	<i>Brucella melitensis</i> (NP_540482)	1e-90
Cytochrome b				2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (NP_769126)	1e-140

^a Excluding hits to other MTB.

well-characterized proteins in organisms other than MTB. Both MamO and the previously identified MamE protein exhibit sequence similarity to HtrA-like serine proteases, although MamO apparently does not contain a highly conserved PDZ domain and the two proteins exhibit only relatively weak (31%) sequence similarity to each other. MamN exhibits some similarity to several transport proteins. MamT contains two putative cytochrome *c* heme binding sites (Cys-X-X-Cys-His), which are conserved in the predicted MamT proteins from MS-1 and MC-1 (data not shown). As the deduced mass of MamT (19 kDa) differs from the masses of the MM heme-positive bands in 1D SDS-PAGE gels (Fig. 1D), it is not clear that MamT corresponds to one of these bands.

DISCUSSION

Whereas the lipid and fatty acid patterns were similar for the MM and other subcellular compartments and mainly differed in the relative proportions, the subproteome of the MM is complex and distinct, as revealed by different approaches.

While 1D analysis has limited resolving power, it has several

advantages over 2D analysis, such as the ability to separate highly hydrophobic membrane proteins and a tolerance for higher protein loads. Accordingly, 11 MMPs were identified by 1D analysis, compared with the 7 proteins identified by 2D analysis, while one protein (Mms6) found in the 2D analysis was absent from 1D patterns. The highest number of MMPs was identified in unresolved, tryptic digests of the entire MM by CapLC-MS-MS, and these proteins included all of the proteins found by 1D and 2D analyses except Mms6. For some proteins, total sequence coverage of more than 50% was obtained. Due to its high sensitivity, MS analysis also detected a high proportion of putative contaminants. Other advantages of liquid chromatography-MS-MS methods are that they can handle extremely complex peptide mixtures and the sample remains in solution throughout preparation and subsequent analysis. Hence, losses associated with poor recovery from gels are eliminated. In conclusion, the combination of the different approaches is likely to provide the maximum amount of information.

Although the procedure for magnetosome isolation was

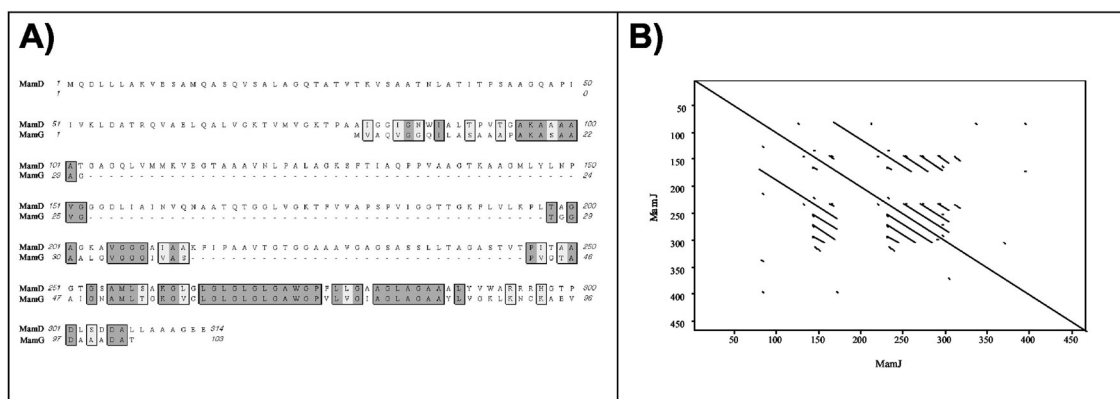


FIG. 6. Selected sequence characteristics of several MMPs. (A) Sequence alignment of MamG and MamD of *M. gryphiswaldense*. (B) Dot blot analysis of MamJ by Pustell protein matrix analysis (39) (pam 250 matrix).

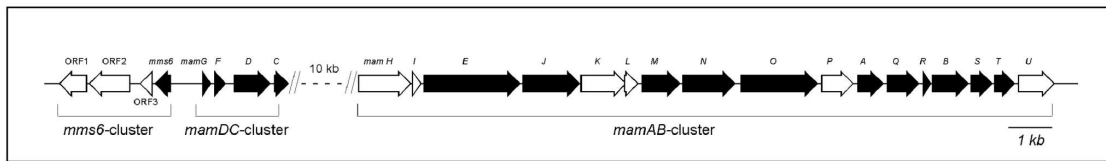


FIG. 7. Molecular organization of a region from the putative magnetosome island of *M. gryphiswaldense* comprising the entire *mms6*, *mamDC*, and *mamAB* gene clusters (45). The solid arrows indicate genes encoding MMPs, which were identified in this study.

quite stringent, we found a number of proteins associated with preparations of the MM which apparently are not bona fide MMPs. Most of these proteins were only minor constituents of the MM and escaped detection by Coomassie blue staining. They mostly included very abundant and ubiquitous cellular constituents, such as outer membrane proteins, ATPase subunits, ribosomal proteins, and respiratory chain constituents. Thus, they are likely to represent contamination originating from other subcellular compartments, which became adsorbed to the particles during cell disruption. Cross-contamination by tightly bound proteins from other cell fractions is a common observation that has also been reported for isolation of other complex intracellular structures, such as PHB granules and endospores (27, 30, 58). However, the classification of putative contaminants is somewhat arbitrary, and we cannot entirely exclude the possibility that some of these proteins are associated with the MM in vivo. For example, it could be envisioned that proton-translocating ATPase enzymes, which were among the putative contaminants, might play a role in the energetization of the MM. On the other hand, we classified Mms16 of *M. gryphiswaldense* MSR-1 as a bona fide MMP based on its high level of identity to the AMB-1 protein, which was reported to be essential in magnetosome formation (35). However, because of the striking homology to proteins involved in PHB metabolism, the specific role of this protein in biomineralization requires further clarification.

Of the 18 bona fide MMPs that were identified in this study, 13 are novel for MSR-1, and 11 have not been identified in other MTB previously. With the exception of MM22, all MMPs have highly similar homologues in other MTB. Mms16 appears to be restricted to magnetospirilla and is absent from strain MC-1. MamC, MamD, MamF, MamG, MamJ, MamR, MamS, MamT, and Mms6 exhibit no homology to known proteins in nonmagnetic organisms and therefore seem to represent MTB-specific protein families. Other MMPs (MamA and MamQ) have homologues with diverse or unknown functions in nonmagnetic organisms. The other MMPs can be assigned to the HtrA-like serine protease family (MamE and MamO) and to the ion-transporting protein group (MamN, MamB, and MamM). Identification of MamM as a second MM-specific CDF transporter in addition to MamB lends further support to the hypothesis that these proteins belonging to the CDF3 subfamily of putative iron transporters (33) are involved in the magnetosome-directed transport of iron. Likewise, the MamO sequence predicts that there is an additional MM-bound serine protease in addition to MamE and corroborates the speculated function of HtrA-like proteins in magnetosome formation (e.g., in the processing and maturation of MMPs during MM assembly). At least one MMP (MamT) was found to contain

conserved heme binding sites. The identification of redox proteins may extend the range of putative biochemical functions associated with the MM to redox cycling of iron during the formation of the iron oxide magnetite (Fe_3O_4).

One noticeable feature common to several MMPs is the presence of repetitive motifs. Examples are found in MamD, Mms6, and MamG, all of which have a hydrophobic LG-rich motif known from other biomineralizing proteins. Another sequence pattern with potential relevance for magnetite biomineralization is found in the acidic protein MamJ; in this protein 18.7% of the acidic amino acid residues are glutamate and aspartate that occur in multiplets. A number of additional conspicuous genes predicting proteins with highly repetitive and/or acidic sequence motifs are found in the genome assemblies of MSR-1 and other MTB (data not shown). Clusters of acidic groups are commonly found in proteins and polysaccharides involved in other biomineralizing systems, such as those in mollusk shells, coccolithophorids, and other organisms (6, 19). Acidic groups have a strong affinity for metal ions and are often involved in the initiation of crystal nucleation by binding of metal ligands. It is therefore tempting to speculate that MamJ and other acidic or repetitive proteins are directly involved in the control of the biomineralization process by providing iron binding activity.

In an effort to clarify the existence of multiple bands for individual gene products, we considered the possibility of post-translational modification by glycosylation. However, we failed to identify reacting bands in the MM by glycostaining. This finding is of particular interest, as glycoproteins are common constituents of other biomineralization systems (19).

With the exception of Mms16 and MM22, all bona fide MMPs could be assigned to previously identified genes in MSR-1, which are organized in the *mms6*, *mamDC*, and *mamAB* gene clusters located in the putative magnetosome island (20, 45). A scheme for the assignment of MMP-encoding genes and their organization is shown in Fig. 7. Of the 25 identified genes in these three operon-like clusters, 16 now can be assigned to proteins associated with the MM, thereby confirming previous speculation that these clusters encode other magnetosome proteins (20, 45). Nevertheless, we were unable to assign 9 of the 25 genes from this region to identified MMPs. Despite the high sensitivity of our method, some of the proteins might have escaped detection, might have resisted efficient solubilization, or might have been lost during purification due to their loose association with the MM. Other proteins might play different roles related to magnetosome biomineralization, such as roles in regulation or intracellular differentiation, which are not necessarily associated with localization at the MM. Further experiments, such as in situ localization stud-

ies, are required to analyze the expression of these gene products.

Although their genes are present in the *M. gryphiswaldense* MSR-1 genome, we also failed to detect homologues of MpsA and MagA, which were previously found to be associated with isolated magnetosomes in strain AMB-1 (32, 36). Analysis of the MMP patterns for other magnetospirilla revealed a remarkable dissimilarity between MSR-1 and the two other strains analyzed. This was somewhat surprising, because a close genetic similarity between MSR-1 and MS-1 can be inferred from available genome data. Moreover, several MMPs (MamA, MamD, MamC, Mms6, and Mms16) were previously reported to be present in strain AMB-1 (3, 35, 36).

With the emerging picture of the astonishingly complex protein composition of the MM, the following questions arise: How is such a macromolecular structure assembled, and how are the MMPs targeted specifically to the MM? Several bands and spots (e.g., MamE and Mms6) had an apparent mass that was substantially lower than that predicted on the basis of their genes, which might have been due to posttranslational cleavage at presumptive signal sequences during maturation and MM insertion. However, in a preliminary analysis we failed to detect any obvious sequence motifs or sorting signals universal to all MMPs. While PSORT analysis predicted an inner membrane localization for most of the MMPs, for others (e.g., MamA, MamR, and Mms16) a cytoplasmic localization was presumed. Consistent with this, most MMPs have the characteristics of typical membrane proteins based on hydrophobicity plots and structural predictions, whereas other MMPs are hydrophilic. This means that the binding to the MM cannot be exclusively by hydrophobic interactions but for some proteins may involve other types of interactions, such as protein-protein interactions or direct interactions with the mineral surface of magnetite crystals. Alternatively, it might be speculated that assembly of the MM is mediated by scaffolding proteins, which are often required for proper assembly of macromolecular complexes, such as virus capsids and other complex subcellular structures (16). Involvement of similar functions might be envisaged during MM assembly.

In conclusion, our study was the most comprehensive biochemical analysis of the MM in an MTB so far. Identification of the magnetosome subproteome provided candidates for further biochemical and genetic analysis to elucidate their specific functions in magnetosome assembly and magnetite biomineralization. In addition, our findings have relevance for future uses of bacterial magnetosomes in biotechnological applications.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by DFG grant SPP 1104 and by the BMBF Biofuture Program.

We thank Udo Heyen (Max-Planck-Institut, Bremen, Germany) for help with fermentor cultivation and Jana Richter (Max-Delbrück-Centrum, Berlin, Germany) and Katja Schmidt (Max-Planck-Institut, Bremen, Germany) for excellent technical assistance. We are grateful to Brian Tindall (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) for his help with fatty acid and lipid analysis and to Mohamed Madkour and Frank Mayer (Universität Göttingen) for help with electron microscopy. Cathrin Wawer (Max-Planck-Institut, Bremen, Germany) is gratefully acknowledged for critical reading of the manuscript and helpful discussions.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Appel, R. D., P. M. Palagi, D. Walther, J. R. Vargas, J. C. Sanchez, F. Ravier, C. Pasquali, and D. F. Hochstrasser. 1997. Melanie II-A third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images. I. Features and user interface. *Electrophoresis* **18**:2724–2734.
- Arakaki, A., J. Webb, and T. Matsunaga. 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**:8745–8750.
- Bauerlein, E. 2000. Single magnetic crystals of magnetite (Fe₃O₄) synthesized in intracytoplasmic vesicles of *Magnetospirillum gryphiswaldense*, p. 61–80. In E. Bauerlein (ed.), *Biomineralization*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Balkwill, D., D. Maratea, and R. Blakemore. 1980. Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**:1399–1408.
- Bauerlein, E. 2003. Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**:614–641.
- Bazyliński, D. 1995. Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**:337–343.
- Benning, C., J. T. Beatty, R. C. Prince, and C. R. Somerville. 1993. The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodospirillum rubrum* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:1561–1565.
- Bjellqvist, B., C. Pasquali, F. Ravier, J. C. Sanchez, and D. Hochstrasser. 1993. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* **14**:1357–1365.
- Blakemore, R. 1975. Magnetotactic bacteria. *Science* **190**:377–379.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911–917.
- Bochicchio, B., A. Pepe, and A. M. Tamburro. 2001. On (GGLGY) synthetic repeating sequences of lamprin and analogous sequences. *Matrix Biol.* **20**:243–250.
- Bryant, D. A., E. V. Vassilieva, N. U. Frigaard, and H. Li. 2002. Selective protein extraction from *Chlorobium tepidum* chlorosomes using detergents. Evidence that CsmA forms multimers and binds bacteriochlorophyll a. *Biochemistry* **41**:14403–14411.
- Cannon, G. C., C. E. Bradburne, H. C. Aldrich, S. H. Baker, S. Heinhorst, and J. M. Shively. 2001. Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5351–5361.
- Diederichs, J. E., D. Groth, and R. Reszka. 1998. Plasma protein adsorption patterns onto cationic liposomes and lipoplexes—Influence of cationic lipid head group. *J. Liposome Res.* **8**:52–53.
- Dokland, T. 1999. Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**:580–603.
- Frankel, R. B., D. A. Bazyliński, M. S. Johnson, and B. L. Taylor. 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* **73**:994–1000.
- Goerby, Y. A., T. J. Beveridge, and R. P. Blakemore. 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**:834–841.
- Gotliv, B. A., L. Addadi, and S. Weiner. 2003. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chem. Biochem.* **4**:522–529.
- Grünberg, K., C. Wawer, B. M. Tebo, and D. Schüler. 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4573–4582.
- Herborn, C. U., N. Papanikolaou, R. Reszka, K. Grünberg, D. Schüler, and J. F. Debatin. 2003. Magnetosomes as biological model for iron binding: relaxivity determination with MRI. *Rofo Fortschr. Geb. Röntgenstr. Neuen. Bildgeb. Verfahren.* **175**:830–834.
- 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.
- Hofmann, K., P. Bucher, L. Falquet, and A. Bairoch. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:215–219.
- Hougardy, A., B. J. Tindall, and J. H. Klemme. 2000. *Rhodospseudomonas rhodobacensis* sp. nov., a new nitrate-reducing purple non-sulfur bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:985–992.
- Kates, M. 1972. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 3. American Elsevier Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Lai, E. M., N. D. Phadke, M. T. Kachman, R. Giorno, S. Vazquez, J. A. Vazquez, J. R. Maddock, and A. Driks. 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **185**:1443–1454.
- Lück, M., B. R. Paulke, W. Schröder, T. Blunk, and R. H. Müller. 1998. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**:478–485.
- Matsunaga, T., N. Tsujimura, H. Okamura, and H. Takeyama. 2000. Cloning and characterization of a gene, *mgsA*, encoding a protein associated with

- intracellular magnetic particles from *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**:932–937.
30. **McCool, G. J., and M. C. Cannon.** 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **181**:585–592.
 31. **Nakai, K., and M. Kanehisa.** 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* **11**:95–110.
 32. **Nakamura, C., T. Kikuchi, J. G. Burgess, and T. Matsunaga.** 1995. Iron-regulated expression and membrane localization of the *magA* protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biochem.* **118**:23–27.
 33. **Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:313–339.
 34. **Offner, S., U. Ziese, G. Wanner, D. Typke, and F. Pfeifer.** 1998. Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology* **144**:1331–1342.
 35. **Okamura, Y., H. Takeyama, and T. Matsunaga.** 2001. A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* **276**:48183–48188.
 36. **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.
 37. **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.
 38. **Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**:3551–3567.
 39. **Pustell, J., and F. C. Kafatos.** 1984. A convenient and adaptable package of computer programs for DNA and protein sequence management, analysis and homology determination. *Nucleic Acids Res.* **12**:643–655.
 40. **Rabus, R., M. Kube, A. Beck, F. Widdel, and R. Reinhardt.** 2002. Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **178**:506–516.
 41. **Ratledge, C., and S. G. Wilkinson.** 1988. *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London, United Kingdom.
 42. **Reszka, R.** 2000. Applications for magnetosomes in medical research, p. 81–92. In E. Bauerlein (ed.), *Biomining. Wiley-VCH*, Weinheim, Germany.
 43. **Schägger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368–379.
 44. **Schleifer, K., 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.
 45. **Schübbe, S., M. Kube, A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdieks, 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.
 46. **Schüler, D.** 2002. The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* **5**:209–214.
 47. **Schüler, D., and E. Bauerlein.** 1998. Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**:159–162.
 48. **Schüler, D., and E. Bauerlein.** 1996. Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**:301–307.
 49. **Schüler, D., and R. B. Frankel.** 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:464–473.
 50. **Schüler, D., R. Uhl, and E. Bauerlein.** 1995. A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:139–145.
 51. **Schultheiss, D., and D. Schüler.** 2003. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**:89–94.
 52. **Seufferheld, M., M. C. Vieira, F. A. Ruiz, C. O. Rodrigues, S. N. Moreno, and R. Docampo.** 2003. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **278**:29971–29978.
 53. **Skipsi, V. P., and M. Barlday.** 1969. Detection of lipids on thin-layer chromatograms. *Methods Enzymol. Lipids* **14**:541–548.
 54. **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.
 55. **Thomas, P. E., D. Ryan, and W. Levi.** 1976. An improved staining procedure for the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **75**:168–176.
 56. **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.
 57. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
 58. **Todd, S. J., A. J. Moir, M. J. Johnson, and A. Moir.** 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *J. Bacteriol.* **185**:3373–3378.
 59. **Zurovec, M., and F. Sehnal.** 2002. Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*. *J. Biol. Chem.* **277**:22639–22647.

■ **C – Weitere Publikationen**

Magnetosomen als biologisches Modell der Eisenbindung: Messung der Relaxivität in der MRT

C. U. Herborn, N. Papanikolaou, R. Reszka, K. Grünberg, D. Schüler,
J. F. Debatin

Magnetosomen als biologisches Modell der Eisenbindung: Messung der Relaxivität in der MRT

Magnetosomes as Biological Model for Iron Binding: Relaxivity Determination with MRI

C. U. Herborn¹
N. Papanikolaou²
R. Reszka³
K. Grünberg⁴
D. Schüler⁴
J. F. Debatin¹

Zusammenfassung

Ziel: Die Durchführung von *In-vitro*-Untersuchungen zur Charakterisierung eisenhaltiger bakterieller Partikel (Magnetosomen) als superparamagnetisches Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT). **Material und Methoden:** Unterschiedliche Konzentrationen an Magnetosomen wurden mit einem klinischen 1,5 T Ganzkörper MR-Tomographen unter Verwendung der Extremitätenspule als Signal- und Empfangsspule untersucht. Longitudinale und transversale Relaxivität (R1 und R2) von Magnetosomen wurden mittels einer inversion recovery snapshot gradient recall echo-Sequenz (IR_FLASH) mit unterschiedlichen Inversionszeiten und einer Multi-Echo Spin-Echo Sequenz bestimmt. Als Referenzmethode galten Atom-Absorptionsspektrometrie (AAS) und Elektronenmikroskopie. **Ergebnisse:** Die bei 21 °C auf einem 1,5 T MR-Scanner berechneten Werte für die longitudinale und transversale Relaxivität der Magnetosomen lagen bei $R1 = 7,688 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $R2 = 147,67 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In sämtlichen Verdünnungen konnte eine korrespondierende Eisenkonzentration mittels AAS gemessen werden. Mit Elektronenmikroskopie wurden die Eisenpartikel bildlich dargestellt. **Schlussfolgerung:** Mit Magnetosomen steht eine neue Substanzklasse an eisenhaltigen Kontrastmitteln zur Verfügung, deren weitere Untersuchung in Zellkultur und später an Tiermodellen erfolgen soll. Magnetosomen könnten geeignet sein, als Markersubstanz, die Verteilung und genetische Expression molekularer therapeutischer Vektoren sichtbar zu machen.

Abstract

Purpose: *In vitro* characterization of iron-containing bacterial particles (magnetosomes) as superparamagnetic contrast agents for MRI. **Material and Methods:** Different concentrations of magnetosomes were examined with a 1.5 T clinical whole-body MR system at 21 °C using the transit/receive extremity coil. Both longitudinal and transversal relaxivities (R1 and R2) of the magnetosomes were determined by an inversion recovery snapshot gradient recall echo (IR FLASH) with various inversion times and a multi echo spin echo sequence. Atomic absorption spectrometry (AAS) and electron microscopy were used as reference standard. **Results:** Longitudinal and transverse relaxivities of the magnetosomes were calculated to be $R1 = 7.688 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $R2 = 147.67 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The corresponding iron concentrations were determined in all dilutions using AAS, while the magnetosomes were morphologically delineated by electron microscopy. **Conclusion:** Magnetosomes represent a new and interesting class of iron-containing contrast agents warranting further evaluation in cellular cultures and animal models. Magnetosomes may be suited for displaying the vector distribution and gene expression of new molecular therapies.

Key words

MRI · contrast agents · magnetosomes · experimental radiology

Institutsangaben

¹ Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Essen

² Department of Radiology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

³ Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin

⁴ Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen

Korrespondenzadresse

Dr. med. Christoph U. Herborn · Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Essen · Hufelandstraße 55 · 45122 Essen · Tel.: ++49/201/7231527 · Fax: ++49/201/7231526 · E-mail: christoph.herborn@uni-essen.de

Bibliografie

Fortschr Röntgenstr 2003; 175: 830–834 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 1438–9029

Einleitung

Die rasante Erforschung molekulargenetischer Ursachen verschiedener Erkrankungen eröffnet unbestritten große Möglichkeiten für neue diagnostische wie therapeutische Verfahren in der modernen Bildgebung [1,2]. Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms vor weniger als zwei Jahren erlaubt bereits heute tiefe Einblicke in die molekulare Genese diverser Pathologien und wird zunehmend die Entwicklung innovativer Gentherapien vorantreiben [3,4].

Aktuell werden weltweit ca. 400 gentherapeutische Studien durchgeführt, bei denen Radiologen sowohl bei der Applikation therapeutischer Vektoren als auch bei der bildlichen Dokumentation von Therapieeffekten wesentlich beteiligt sind. Zu diesem Zweck sind mehrere Verfahren entwickelt worden, welche die Darstellung von Genexpression *in vivo* ermöglichen. Neben bildgebenden Techniken, die im Wesentlichen auf die präklinische Anwendung beschränkt sind (z.B. near-infrared fluorescence, NIRF), haben sich nuklearmedizinische Verfahren genauso wie die Magnetresonanztomographie (MRT) durch eine gute Sensitivität und Spezifität bei der Detektion entsprechend markierter Proben ausgezeichnet [5,6]. Das Fehlen jeglicher Nebenwirkungen sowie die komplette Vermeidung ionisierender Strahlung in Kombination mit hoher räumlicher Auflösung sowie die Möglichkeit, unterschiedliche quantitative Parameter zu evaluieren, prädisponieren die MRT für den Einsatz in der molekularen Radiologie.

Vielversprechende MRT-basierte Strategien zur Bestimmung therapeutischer Effekte auf molekularer Ebene beinhalten die Überexpression von besonderen Transferrin-Rezeptoren (ETR, engineered transferrin receptor) und die anschließende intravenöse Injektion von monokristallinen Eisenoxidpartikeln (MION, monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles), welche zu einem sichtbaren Signalverlust im Zielgewebe führen [7]. Ein alternativer Ansatz zur Detektion genetisch veränderter Gewebe mittels MRT könnte mit bakteriellen Mikroorganismen gelingen, welche superparamagnetische Partikel exprimieren. Magnetotaktische Bakterien sind Prokaryonten, die membrangebundene Kristalle aus superparamagnetischem Magnetit (Fe_3O_4) produzieren, so genannte Magnetosomen [8]. Solche winzigen Magnetosomen führen zu einer nahezu homogenen Ausrichtung der Bakterien entlang eines magnetischen Feldes. Die Bildung von Magnetosomen ist das Ergebnis eines komplexen Biomineralisationsprozesses, der zur Anreicherung von umhüllten Mineralpartikel in der Zelle führt [9]. Aufgrund der einzigartigen kristallinen Beschaffenheit und der herausragenden magnetischen Eigenschaften sowie der geringen Größe und guten Verteilung der Partikel ist die technologische Anwendung von Magnetosomen durchaus vorstellbar [8].

Ziel dieser *In-vitro*-Studie war die Bestimmung der magnetischen Eigenschaften von Magnetosomen in unterschiedlicher Konzentration mittels eines klinischen MR-Tomographen unter Berücksichtigung potenzieller Anwendungen als Kontrastmechanismus für die molekulare Bildgebung.

Material und Methoden

Die Magnetosomen wurden vom Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen zur Verfügung gestellt. Die Partikel wurden dort vom magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* mittels einer kombinierten Technik aus magnetischer Separation und Ultrazentrifugation isoliert, im Wesentlichen wie unter [10] beschrieben. Isolierte Magnetosomen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt und auf Eis unter Argon-Belüftung versandt. Die Stock-Lösung hatte eine Eisen-Konzentration von 1,28 mg/ml (23 $\mu\text{mol/ml}$).

MR Tomographie

Die MR-Bildgebung wurde auf einem klinischen 1,5 Tesla Ganzkörper-Tomographen (Magnetom Sonata, Siemens, Erlangen) mit ultraschnellem Gradientensystem durchgeführt (40 mTm^{-1} , 200 ms Anstiegsgeschwindigkeit; 63 MHz). Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde eine dedizierte hochauflösende Kniegelenks-Sende-Empfangsspule für die Bildgebung benutzt. Sämtliche Proben wurden in einem wassergefüllten Plastik-Container untersucht, der zwischen zwei großen, mit je 5 Liter destilliertem Wasser gefüllten Plastikflaschen positioniert wurde, um das Signal zu erhöhen und Suszeptibilitätsartefakte aus der umgebenden Luft während der Akquisition zu verringern. Referenzproben mit absteigender Konzentration an Magnetosomen (1:50; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1000 von der Stock-Lösung in Salzpuffer) dienen zur Optimierung der Pulssequenz und der anschließenden Berechnung von T1- und T2-Relaxationszeiten.

Eine Inversion-Recovery-Snapshot-FLASH-Sequenz wurde mit 8 unterschiedlichen Inversionszeiten (22, 50, 150, 300, 600, 1200, 2400 und 5000 ms) akquiriert, um die T1-Relaxationszeiten der verschiedenen Magnetosomen-Suspensionen zu berechnen, wogegen eine Multi-Echo Spin-Echo-Sequenz mit 32 gleich langen Echos (initiales Echo: 7 ms, Echo spacing: 7 ms) zur Messung der T2-Relaxationszeiten benutzt wurde. Beide Sequenzen wurden mit einem Gesichtsfeld (field of view, FOV) von 200×230 mm, einer Matrix von 128×256 und einer Schichtdicke von 5 mm akquiriert. Die longitudinale Relaxivität (R1) wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{1}{T1} = \frac{1}{T1_0} + R1 * [C]$$

wobei $1/T1$ der Relaxationsrate gemessen mit der Inversion-Recovery-Turbo-FLASH-Sequenz, $1/T1_0$ der Relaxationsrate ohne Magnetosomen, R1 der longitudinalen Relaxivität und [C] der Konzentration an Magnetosomen entspricht. Die transversale Relaxivität wurde mittels der gleichen Formel (1) berechnet, nachdem T1, $T1_0$ und R1 durch T2, $T2_0$ und R2 ersetzt wurden. Die T2-Werte für die unterschiedlichen Magnetosomen-Konzentrationen wurden durch mono-exponentielles Auftragen der Signalintensitäten aus jedem der 32 Echos über die jeweiligen Echozeiten ebenfalls berechnet. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (21°C) durchgeführt.

Spektrometrie

Die Quantifizierung der Eisen(Fe)-Konzentration jeder Magnetosomen-Suspension mit der zugeordneten Verdünnung erfolgte durch atomare Absorptionsspektrometrie (AAS) mit einem pola-

rierten Zeeman-Effekt-Graphit-Spektrophotometer (PerkinElmer Instruments, model 4100 ZL, Shelton, CT, USA.), welches mit AA WinLab Software ausgestattet war. Sämtliche Magnetosomen-Suspensionen wurden mit 65%iger Salpetersäure (HNO_3) verdünnt. Zur Fe-Messung wurde das Spektrophotometer auf eine Wellenlänge von 248,3 nm eingestellt und mittels einer eisenhaltigen Standardlösung kalibriert (1000 $\mu\text{g/ml}$; N9300126, PerkinElmer Fluid Science, Beltsville, MD, USA.). Die Qualitätskontrolle erfolgte bei jeder einzelnen Untersuchung mittels einer weiteren Standardlösung aus 21 definierten Elementen mit einer jeweiligen Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ in HNO_3 (N9300281, PerkinElmer Fluid Science, Beltsville, MD, USA.).

Elektronenmikroskopie

Purifizierte Magnetosomen wurden auf Kohlenstoff-beschichteten Kupferplatten absorbiert und mit 2% (w/v) Uranylacetat dunkel gefärbt. Die Proben wurden mit einem Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV betrachtet und bildlich dokumentiert. Sämtliche mikroskopische Untersuchungen wurden von demselben Autor durchgeführt (D.S.).

Ergebnisse

Magnetresonanztomographie

Die Relaxationszeiten unterschiedlicher Magnetosomen-Konzentrationen sind in Tab. 1 zusammengefasst. Bei erhöhten Konzentrationen an Magnetosomen konnten moderate T_1 -verkürzende Effekte nachgewiesen werden, die sich im R1-Wert widerspiegeln, während T_2 -verkürzende Effekte durch den hohen R2-Wert dargestellt wurden. Dementsprechend dienten Magnetosomen in niedriger bis mittlerer Konzentration (1:1000–1:100) als ein biphasischer Kontrastmechanismus, mit einem hellen Signal auf T_1 -gewichteten Bildern und dunkel auf T_2 -gewichteten Bildern (Abb. 1). Bei höheren Konzentrationen bedingte der zunehmende T_2 -verkürzende Effekt die totale Signalauslöschung auch bei ultrakurzen TR/TE Gradienten-Echo-Sequenzen. In solch hohen Konzentrationen erscheinen Magnetosomen als ein diffus negativer Kontrastmechanismus sowohl auf T_1 - als auch T_2 -gewichteten Bildern. Die longitudinale und transversale Relaxivität bei 21°C und 63 MHz, berechnet als linearer Anstieg aus Formel (1), betrug $R_1 = 7,688 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $R_2 = 147,67 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tab. 1 Vergleich von Eisen-Konzentrationen von fünf unterschiedlichen Magnetosomen-Verdünnungen, die mittels AAS gemessen wurden, und den korrespondierenden T_1 - und T_2 -Zeiten in einem klinischen 1,5T MR-Tomographen (63 MHz, 21°C)

Verdünnung	Fe-Konz. ($\mu\text{mol/ml}$)	T_1 (msec)	T_2 (msec)
1: 50	0,45	32,2	15,62
1: 100	0,24	498,5	25,21
1: 200	0,16	720,3	41,48
1: 500	0,09	1199,2	85,07
1:1000	0,06	1567,7	148,02

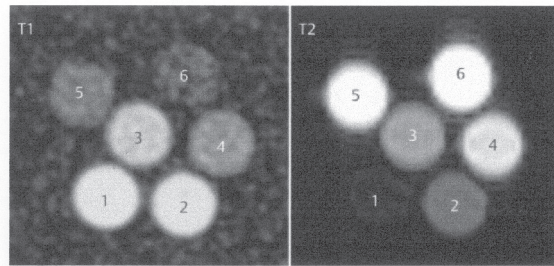


Abb. 1 Signalintensitäten von verschiedenen Magnetosomen-Konzentrationen in T_1 -gewichteten und T_2 -gewichteten Puls-Sequenzen. Die Proben-Nummern erklären sich wie folgt: 1 = 1:50; 2 = 1:100; 3 = 1:200; 4 = 1:500; 5 = 1:1000; 6 = Salzpuffer. Während die höchste Eisen-Konzentration in Probe „1“ zu einem kräftigen Signal in der T_1 -Wichtung führt, stellt sich ein vollständiger Signalverlust derselben Probe auf der T_2 -gewichteten Sequenz dar.

Spektrometrie

Die Stock-Lösung von Magnetosomen hatte eine Eisen-Konzentration von 23 $\mu\text{mol/ml}$ (1,28 mg/ml). Die Ergebnisse für die verdünnten Proben sind in Tab. 1 aufgelistet.

Elektronenmikroskopie

Isolierte Magnetosomen stellten sich als kubo-oktaedrische Kristalle dar, die von einer Membran umhüllt wurden. Die Größe der einzelnen Partikel lag im Durchschnitt bei 45 nm. Gereinigte Partikel zeigten die Tendenz, sich kettenförmig auszurichten (Abb. 2).

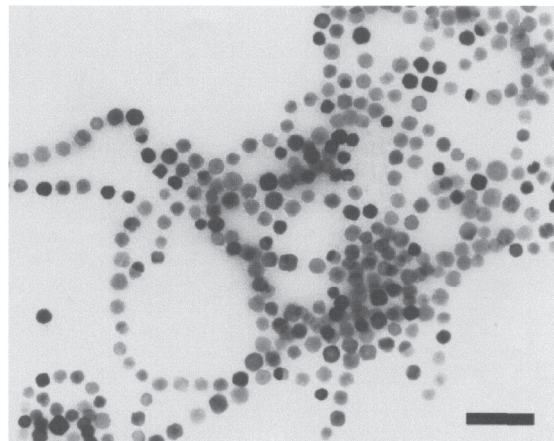


Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Magnetosomen des magnetischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Balken entspricht 200 nm).

Diskussion

Die vorliegende *In-vitro*-Studie präsentiert eine neue MR-Kontrast-verstärkende Substanz aus kleinen superparamagnetischen Partikeln, welche aus Bakterien gewonnen wurden und deren Anwendung als Marker für molekulare Bildgebung in Zu-

kunft denkbar erscheint. R1- und R2-Relaxivitäten, die bei Raumtemperatur (21°C) und 63 MHz auf einem klinischen 1.5 T Ganzkörper-MR-Tomographen bestimmt wurden, sind mit den Werten anderer Eisenpartikel zur medizinischen Bildgebung vergleichbar. Zu diesen gehören monokristalline Eisenoxid-Nanopartikel (MION) [11] genauso wie Ultrakleine Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel (USPIO) [12]. Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen aus Untersuchungen mittels MRT, AAS und Elektronenmikroskopie erscheint es vorstellbar, Magnetosomen langfristig als ein Eisen-basiertes Kontrastmittel zu verwenden, vergleichbar mit anderen Eisenpartikeln, die mittlerweile in großen Studien einer ausgedehnten klinischen Erprobung zugeführt worden sind [13–15].

Magnetosomen haben superparamagnetische Eigenschaften, die bereits geringe Konzentrationen in einem klinisch eingesetzten MR-Ganzkörper-tomographen nachweisbar machen (Abb.1). Diese Eigenschaften lassen mögliche Rückschlüsse auf zukünftige Anwendungen für Magnetosomen zu: Weissleder et al. konnten sowohl in Tumorzellen als auch in Makrophagen eine vergleichsweise hohe Eisenaufnahme durch Phagozytose nach Inkubation mit kleinen Eisenpartikeln nachweisen. Eine solche Aufnahme war bei 1,5 T noch bei einer geringen Anzahl von lediglich einigen 100 Zellen durch die Akquisition von T₁- und T₂-gewichteten Pulssequenzen nachweisbar [16]. Aus diesem Grund sollen sich zukünftige Untersuchungen mit Magnetosomen darauf fokussieren, solche Zellen durch Phagozytose von Magnetosomen für das MR-Experiment zu markieren. Obwohl die Möglichkeit einer konzentrationsabhängigen zellulären Toxizität von Magnetosomen berücksichtigt werden muss, erscheint dieses Problem nicht allzu gewichtig – einige superparamagnetische Partikel sind bereits bei der Darstellung markierter Zellen *in vivo* erfolgreich zum Einsatz gekommen [17].

Über die einfache Zellmarkierung durch Phagozytose hinaus haben jüngste wissenschaftliche Aktivitäten die bildliche Erfassung von Genterapien in den Mittelpunkt gerückt. Die ersten Versuche zielen dabei auf die Visualisierung der Verteilung therapeutischer Vektoren in Zielorganen, beispielsweise bösartigen Tumoren, genauso wie die Detektion und Charakterisierung lokaler Therapie-induzierter Effekte [1,18,19]. Zu diesem Zweck konnten bereits Liposomen mit therapeutischen Genen in Kombination mit Eisenpartikeln erfolgreich entwickelt werden. Nach genetischer Expression des Vektors sind die Eisenpartikel mittels MRT sichtbar [20]. Eine solche indirekte Methode zur Darstellung genterapeutischer Effekte stellt ein zuverlässiges und nicht-invasives Werkzeug zur Beurteilung vielversprechender therapeutischer Ansätze dar [7]. Vor dem Hintergrund ihres superparamagnetischen Verhaltens könnten auch Magnetosomen für solche Zwecke geeignet sein.

Allerdings ist das Wissen über die genetische Kodierung des Herstellungsprozesses von Magnetosomen immer noch äußerst begrenzt. Erste Versuche, die Formation von Magnetosomen molekulargenetisch zu entschlüsseln, sind bisher sowohl am Mangel an ausreichenden Mengen magnetotaktischer Bakterienstämme als auch an der ausgesprochen anspruchsvollen Technik zur Kultivierung dieser Bakterien im Labor gescheitert, um nur zwei Gründe zu nennen. Jüngste Untersuchungen weisen darauf hin, dass die genetische Grundlage für die Biomineralisation von

Magnetosomen sehr komplex ist und eine Vielzahl unterschiedlicher Gene beinhaltet, die wiederum in mehreren Genombezirken organisiert sind [10]. Der genaue Prozess der Identifizierung und Zusammenfassung der Gensequenz für Magnetosomen könnte durch ausgewählte gentechnische Manipulationen, die vor kurzem an verschiedenen magnetischen Bakterienstämmen etabliert wurden, zukünftig erleichtert werden (Schultheiss und Schuler, zur Publikation eingereicht).

Sicherlich bleibt die Wertigkeit dieser Arbeit zu großen Teilen hypothetisch. Schließlich konnten lediglich *In-vitro*-Ergebnisse präsentiert werden und Aussagen über die mögliche *In-vivo*-Toxizität sind noch nicht verfügbar. Darüber hinaus müssen Magnetosomen zur definitiven Charakterisierung weiteren Untersuchungen unterzogen werden, beispielsweise Mossbauer-Studien zur Sättigung des inneren magnetischen Feldes und Analysen mittels Röntgen-Diffraktion und Laser-Licht-Streuung. Jedoch ist die Aussicht, die Herstellung von Magnetosomen genetisch zu steuern und die Partikel somit als direkten Marker für den Nachweis von Vektordistribution und Genexpression einzusetzen, ein mehr als ausreichender Motivator zur schnellstmöglichen Durchführung dieser Arbeiten.

Die Ergebnisse dieser Studie zusammenfassend halten wir Magnetosomen für einen vielversprechenden Eisen-basierten MR-Kontrastmechanismus, der zu weiteren *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen berechtigt.

Literatur

- Bremer C, Weissleder R. In vivo imaging of gene expression. *Acad Radiol* 2001; 8: 15–23
- Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001; 219: 316–333
- Pennisi E. Human genome. Finally, the book of life and instructions for navigating it. *Science* 2000; 288: 2304–2307
- Marshall E. Human genome. Rival genome sequencers celebrate a milestone together. *Science* 2000; 288: 2294–2295
- Schellingerhout D, Bogdanov Ajr, Marecos E, Spear M, Breakefield X, Weissleder R. Mapping the in vivo distribution of herpes simplex virions. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1543–1549
- Bogdanov Ajr, Weissleder R. The development of in vivo imaging systems to study gene expression. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 5–10
- Weissleder R, Moore A, Mahmood U, Bhorade R, Benveniste H, Chiocca EA, Basilion JP. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* 2000; 6: 351–355
- Schuler D, Frankel RB. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 52: 464–473
- Bazyliński DA. Synthesis of the bacterial magnetosome: the making of a magnetic personality. *Int Microbiol* 1999; 2: 71–80
- Grunberg K, Wawer C, Tebo BM, Schuler D. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4573–4582
- Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov Ajr, Brady TJ. Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 1993; 29: 599–604
- Chambon C, Clement O, Le Blanche A, Schouman-Claeys E, Fria G. Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence. *Magn Reson Imaging* 1993; 11: 509–519
- Harisinghani MG, Saini S, Weissleder R, Hahn PF, Yantiss RK, Tempany C, Wood BJ, Mueller PR. MR lymphangiography using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in patients with primary abdominal and pelvic malignancies: radiographic-pathologic correlation. *Am J Roentgenol* 1999; 172: 1347–1351

- ¹⁴ Laniado M, Kopp AF. [Current status of the clinical development of MR contrast media]. *Rofo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1997; 167: 541 – 550
- ¹⁵ Sharma R, Saini S, Ros PR, Hahn PF, Small WC, de Lange EE, Stillman AE, Edelman RR, Runge VM, Outwater EK, Morris M, Lucas M. Safety profile of ultrasmall superparamagnetic iron oxide ferumoxtran- 10: phase II clinical trial data. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 291 – 294
- ¹⁶ Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A Jr. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7: 258 – 263
- ¹⁷ Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C. In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med* 1995; 33: 200 – 208
- ¹⁸ Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology* 2001; 221: 523 – 529
- ¹⁹ Allport JR, Weissleder R. In vivo imaging of gene and cell therapies. *Exp Hematol* 2001; 29: 1237 – 1246
- ²⁰ Pauser S, Reszka R, Wagner S, Wolf KJ, Buhr HJ, Berger G. Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carriers. *Anticancer Drug Des* 1997; 12: 125 – 135

■ Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form hätte entstehen können.

Herr Prof. Dr. Widdel hat mir die Arbeit am Institut ermöglicht und das Erstgutachten übernommen, hierfür herzlichen Dank.

Einen großen Dank an Priv. Doz. Dr. Dirk Schüler für die Betreuung meiner Arbeit, Unterstützung und unzähligen konstruktiven Ideen und Denkanstöße sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Einen ganz besonderen Dank an Dr. Cathrin Wawer. Danke Cathrin für Dein stets offenes Ohr und die psychologisch aufbauenden, motivierenden Krisengespräche, fachtechnischen Inspiration und das „anstrengende“ Korrekturlesen dieser Arbeit!

Auch dem leider erst so spät zu den Magnetos gestossenen André Scheffel möchte ich für seine Hilfsbereitschaft und kritischen Kommentare danken.

Ekaterina „Katja“ Schmidt, auch Dir sei gedankt für die stets freundliche praktische Unterstützung am Ende der Laborarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, die/der eine oder andere hat durch supernette Hilfsbereitschaft einiges erleichtert.