

**Untersuchungen zur molekularen Organisation und
Regulation der *mam*-Gene in *Magnetospirillum
gryphiswaldense* MSR-1**

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

dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen vorgelegt von

Sabrina Schübbe
aus Bergisch Gladbach

Bremen 2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Zeit von Oktober 2001 bis Oktober 2005 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, Max-Planck Institut Bremen

Tag des Promotionskolloquiums: 16. Dezember 2005

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
TEIL A: DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IM GESAMTZUSAMMENHANG	
2 EINLEITUNG	3
2.1 Magnetotaktische Bakterien	3
2.1.1 <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	4
2.2 Magnetosomen	5
2.3 Eisenaufnahme und Biomineralisation von Magnetit	7
2.4 Physiologische Regulation der Magnetosomensynthese	9
2.5 Die Magnetosomenmembran	10
2.6 Genetische Steuerung der Magnetosomenbiomineralisation	13
2.7 Genominseln	15
2.8 Ausgewählte Methoden zur transkriptionellen Analyse	17
2.9 Ziele der vorliegenden Arbeit	19
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
TEIL I ORGANISATION DER <i>MAM</i> -GENE	20
3.1 Genomische Organisation der <i>mam</i> -Gene	20
3.1.1 Lokalisierung des <i>mamAB</i> - und <i>mamDC</i> -Clusters innerhalb eines 50 kb genomischen DNA-Fragmentes	20
3.1.2 Identifizierung weiterer <i>mam</i> -Gene lokalisiert in drei Clustern	21
3.1.3 Charakterisierung einer 130 kb Magnetosomeninsel (MAI)	22
3.1.4 Sequenzvariationen in unterschiedlichen MSR-1 Subkulturen	24
3.2 Spontane Mutation des magnetischen Phänotyps	25
3.2.1 Isolierung spontaner Mutanten unter verschiedenen Bedingungen	25
3.2.2 Isolierte Mutanten zeigen unterschiedliche Phänotypen	26
3.2.3 Mutanten sind genetisch divers	27
3.3 Charakterisierung der spontanen unmagnetischen Mutante MSR-1B	28
3.3.1 Wachstum und Eisenaufnahme unter unterschiedlichen Eisenkonzentrationen	29
3.3.2 Deletion eines 40 kb großen DNA-Fragmentes	30
TEIL II TRANSKRIPTIONELLE ORGANISATION UND REGULATION DER <i>MAM/MMS</i> -GENE	32
3.4 Transkription und Regulation der Magnetosomengene	32
3.4.1 Transkriptionelle Organisation der <i>mam/mms</i> -Gene	33
3.4.2 Regulation der Magnetosomengene durch Eisen und Sauerstoff	35
TEIL III FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG EINES UNBEKANNTEN <i>MAM</i> -PROTEINS <i>MAMK</i> AUS <i>MAGNETOSPIRILLUM GRYPHISWALDENSE</i>	40
3.5 Kodiert das <i>mamK</i> -Gen eine cytoskeletale Struktur?	40
3.5.1 Sequenzanalyse von <i>mamK</i>	41
3.6 Funktionsuntersuchung mittels einer Gendelektion	46

3.6.1	Konstruktion einer Δ <i>mamK</i> -Deletionskassette	46
3.6.2	Nachweis der Deletion/Insertion mittels PCR und Southernblot.....	49
3.7	Rekombinante Herstellung des MamK-Proteins	51
3.7.1	Expressionsnachweis des Fusionsproteins im Westernblot	51
3.7.2	Polymerisierung des MamK-Proteins.....	53
3.8	Intrazelluläre Lokalisierung von MamK <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
3.8.1	Immunochemischer Nachweis der Expression von MamK in unterschiedlichen Zellfraktionen	56
3.8.2	Konstruktion der <i>mamK-egfp</i> Genfusionen	57
3.8.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung des Fusionsproteins	61
3.9	Perspektiven für eine künftige molekulare Charakterisierung der Magnetosomenbiomineralisation	63
4	ANHANG.....	65
4.1	Verwendete Organismen	65
4.1.1	<i>E. coli</i> Stämme.....	65
4.1.2	<i>Magnetospirillum</i> Stämme	65
4.2	Klonierungsvektoren und Plasmide.....	66
4.2.1	<i>E. coli</i> Vektoren.....	66
4.2.2	Mobilisierbare Vektoren.....	66
4.2.3	Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide	66
4.3	Oligonukleotide	67
4.4	Konstruktion einer Strep-Tag- <i>mamK</i> Fusion	67
4.5	Heterologe Überexpression des Strep-Tag fusionierten Proteins	67
4.6	Reinigung des Strep-Tag Fusionsproteins	68
4.7	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen MamK	68
4.8	Polymerisierung von MamK	68
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
TEIL B: PUBLIKATIONEN.....		81
1	Publikationsliste mit Erläuterungen	81
2	Publikationen	82
DANKSAGUNG.....		159

Abkürzungsverzeichnis

Ap	Ampicillin
BAC	bacterial artificial chromosome
C_{mag}	Koeffizient der magnetisch induzierten Lichtstreuung
<i>egfp</i>	enhanced green fluorescent protein, Genbezeichnung
EGFP	enhanced green fluorescent protein, Proteinbezeichnung
Gm	Gentamycin
Km	Kanamycin
<i>lacZ</i>	Gen für eine β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
<i>mam</i>	magnetosome membrane, Genbezeichnung
Mam	magnetosome membrane, Proteinbezeichnung
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MM	Magnetosomenmembran
MMP	Magnetosomenmembran-Protein
<i>mms</i>	magnetic particle membrane specific, Genbezeichnung
Mms	magnetic particle membrane specific, Proteinbezeichnung
<i>mob</i>	mobility
MTB	magnetotaktische Bakterien
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rif	Rifampicin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<i>sacB</i>	Gen für eine Levansucrase aus <i>Bacillus subtilis</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
TG	Trockengewicht
TPR	Tetratricopeptid repeat
<i>tra</i>	transfer

1 Zusammenfassung

Magnetotaktische Bakterien (MTB) besitzen die Fähigkeit zur Synthese von intrazellulären, membranumschlossenen Partikeln aus dem Eisenmineral Magnetit. In magnetotaktischen Bakterien sind diese Magnetosomen entlang der Zellachse in einer Kette angeordnet. Diese Organisation erfordert viele zusammenwirkende Prozesse, die die Vesikelbildung, die Eisenaufnahme, die eigentliche Biomineralisation des Magnetits sowie die Anordnung der Magnetosomen in einer Kette regulieren. Diese Prozesse werden vermutlich durch die Magnetosomenmembran-assoziierten Proteine gesteuert. Allerdings waren zu Beginn dieser Arbeit die Magnetosomengene und die Organisation dieser nur unvollständig, sowie die Funktion und eventuelle Regulation der bereits bekannten Magnetosomengene und -proteine noch unbekannt.

Ausgehend von früheren Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die genomische Organisation der Magnetosomengene in *Magnetospirillum gryphiswaldense* analysiert. Mittels Hybridisierung mit verschiedenen genomischen Markern konnte eine Lokalisation verschiedener *mam*-Gene innerhalb einer genomischen Region von < 50 kb detektiert werden. Die Sequenzanalyse eines Klons aus einer BAC-Bibliothek zeigte erstmals die Anordnung dieser und aller bisher bekannten Magnetosomengene innerhalb von 35 kb. Ein weiteres Charakteristikum dieser Region, die im Verlauf auf 130 kb der Genomsequenz ausgedehnt wurde, war eine auffallend hohe Abundanz an Insertions-Elementen, die einen Anteil von über 21 % an der Gesamtsequenz haben, sowie die Anwesenheit auffallend vieler Gene mit bisher unbekannt Funktionen. Diese genomische Region wurde deshalb als Magnetosomeninsel postuliert, und enthält Gene für die akzessorische Funktion der Magnetosomenbiomineralisation. Vor allem unter oxidativem Streß wurden häufig Mutationen innerhalb der Magnetosomeninsel beobachtet, die zum Verlust des magnetischen Phänotyps führten. Eine dieser unmagnetischen Mutanten, bezeichnet als Stamm MSR-1B, wurde hinsichtlich des Genotyps und Mutationsmechanismus näher untersucht. Die Mutation konnte erstmals exakt auf eine 40 kb große Region eingegrenzt werden, auf der alle bisher bekannten Magnetosomengene lokalisiert waren, was ein weiteres Argument für die zuvor vermutete wichtige Rolle bei der Magnetosomenbiomineralisation ist.

Die Analyse der Magnetosomeninsel hatte gezeigt, daß die Magnetosomengene in drei operonähnlichen Clustern colinear angeordnet sind. Daher wurde deren transkriptionelle Organisation mittels RT-PCR anhand der intergenischen Bereiche der drei *mam/mms*-Cluster untersucht. Für alle drei Gencluster konnte eine Operonstruktur bestätigt werden, die zu polycistronischen Transkripten von 16,4 kb (*mamAB*), 2,1 kb (*mamGFDC*) und 3,4 kb (*mms*) führte. Die Transkriptionsstartpunkte des *mamAB*-, *mamDC*- und *mms*-Operons konnten 22 bp, 52 bp bzw. 58 bp stromaufwärts des jeweils ersten Gens des Operons identifiziert werden. Die -10 und -35 Region des P_{mamAB} , P_{mamDC} und P_{mms} zeigten eine hohe Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des vegetativen Sigmafaktors σ^{70} . Die Expression dieser drei Operons wurde unter verschiedenen Bedingungen, die magnetische und unmagnetische Zellen bedingen, untersucht. Mittels RT-PCR sowie Mikroarray und „real-time“ RT-PCR zeigte sich, daß zwar unter allen untersuchten Bedingungen Transkripte nachweisbar waren, diese aber eine positive Regulation durch Eisen und eine negative durch Sauerstoff zeigen. Demnach ist die Transkription der Magnetosomengene in magnetitbiomineralisierenden Zellen erhöht.

Eines der zuvor identifizierten Magnetosomengene, das Ähnlichkeit zu *mreB*, einem aktinähnlichen Gen in Bakterien aufweist, wurde weiterhin hinsichtlich seiner Funktion untersucht. Mutageneseexperimente führten bisher nur zu Insertionsmutanten, die unmagnetisch sind. Polymerisierungsexperimente deuteten darauf hin, daß das MamK-Protein vermutlich *in vitro* polymerisieren kann. MamK-EGFP-Fusionen zeigten *in vivo* ein durchgängiges, lineares Fluoreszenzsignal, das vermutlich entlang der Magnetosomenkette lokalisiert ist. MamK-Antiseren und der direkte Nachweis in 2D Gelen zeigten dagegen eine Lokalisierung des MamK-Proteins in der löslichen Proteinfraction. Daher kann angenommen werden, daß MamK nur lose an die Magnetosomen assoziiert und für die Kettenanordnung der Partikel in der Zelle möglicherweise durch Formation eines Filamentes mitverantwortlich ist.

Teil A: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

2 Einleitung

Die Biomineralisation von magnetischen Nanopartikeln (Magnetosomen) ist im interdisziplinären Interesse. Dazu haben u. a. die *in vivo*-Anwendungen mit synthetischen magnetischen Nanopartikeln in der Medizin, wie z. B. bei der Tumorzellendetektion, der gezielten Arzneimittelanwendung und der Magnetresonanztomographie (MRT) (Berry und Curtis, 2003; Gupta und Gupta, 2005), aber auch in der Biotechnologie beigetragen (Raj *et al.*, 1995; Zahn, 2001). In einigen technologischen Anwendungen, wie z. B. der DNA-Extraktion, konnten auch schon bakterielle magnetische Nanopartikel eingesetzt werden (Yoza *et al.*, 2003). Die vorteilhaften Eigenschaften der Magnetosomen sind die enge Größenverteilung verbunden mit der hochkristallinen und einheitlichen Form, die durch synthetische Herstellung nicht erreicht werden können. Außerdem eignet sich die biologische Membran der Magnetosomen hervorragend als Ausgangspunkt zu Modifikationen und Funktionalisierungen.

Für einige medizinische Anwendungen sind kleinere Partikel von 5-15 nm Größe erforderlich (Berry und Curtis, 2003; Gupta und Gupta, 2005). Allerdings fallen die bakteriellen Magnetosomen in den Größenbereich 42-45 nm. Die Aufklärung der Magnetosomenbiomineralisation könnte aber dazu verhelfen, Einfluß auf die Nukleation der Magnetitkristalle zu nehmen und es dadurch zu ermöglichen Kristalle von gewünschter Form und Größe im biologischen System zu synthetisieren.

2.1 Magnetotaktische Bakterien

Der Terminus magnetotaktische Bakterien (MTB) beschreibt Bakterien, die intrazelluläre magnetische Partikel enthalten und daher in der Lage sind, sich im Magnetfeld auszurichten (Magnetotaxis) (Blakemore, 1975). MTB bezeichnen eine heterogene Gruppe von beweglichen, ausschließlich aquatischen Prokaryoten, mit großer morphologischer Vielfalt. So werden z. B. Kokken, Stäbchen, Vibrionen und Spirillen (Bazylnski und Moskowitz, 1997; Blakemore, 1982) und sogar multizelluläre Aggregate und Riesenstäbchen zu dieser Gruppe gezählt (Flies *et al.*, 2005b; Rodgers *et al.*, 1990; Spring *et al.*, 1993).

Sie sind ubiquitär verbreitet, vorwiegend in Sedimenten limnischer, aber auch in chemisch stratifizierten Wassersäulen mariner Habitate (Bazylnski und Moskowitz, 1997; Blakemore, 1982). In diesen Habitaten liegen die magnetotaktischen Bakterien in hoher Abundanz vor (Spring *et al.*, 1993). Die größte Anzahl an MTB findet sich in der oxisch-anoxischen Übergangszone, die sich in der Regel an der Sediment-Wasser-Grenzfläche oder kurz unterhalb dieser befindet (Bazylnski, 1995a; Flies *et al.*, 2005a).

Nach phylogenetischer, auf der 16S rRNA basierender Analyse zeigte sich, daß alle bisher bekannten magnetotaktischen Bakterien zu den Gram-negativen Bakterien gehören. In diesem Phylum gliedern sich die meisten magnetitproduzierenden magnetotaktischen Bakterien in die Untergruppe der α -Proteobakterien (Delong *et al.*, 1993; Spring und Schleifer, 1995). Es konnten aber auch Vertreter der γ - und δ -Untergruppe der Proteobakterien sowie des Nitrospiraphylums identifiziert werden, die zum großen Teil jedoch unkultiviert sind (Flies *et al.*, 2005b; Kawaguchi *et al.*, 1992; Sakaguchi *et al.*, 1993; Sakaguchi *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2004; Spring *et al.*, 1995).

Allen diesen Stämmen sind die intrazellulären Magnetosomen gemeinsam, die den Bakterien die Magnetotaxis ermöglichen. Die Magnetotaxis eines schwimmenden Bakteriums resultiert aus einer passiven, durch das zelluläre Dipolmoment bestimmten Orientierung entlang der geomagnetischen Feldlinien. Allgemein anerkannt ist die Hypothese, daß die Magnetotaxis die Effizienz der Suche nach dem optimalen chemischen Gradienten durch Verringerung einer dreidimensionalen in eine eindimensionale Suche erhöht (Frankel *et al.*, 1997).

Manche der magnetotaktischen Bakterien enthalten jedoch mehr Magnetosomen, als für die Magnetotaxis notwendig sind, wie z. B. „*Magnetobacterium bavaricum*“, das bis zu 1000 Magnetosomen enthalten kann (Spring *et al.*, 1993). Deshalb werden neben der Magnetotaxis noch andere Erklärungen für die hohen intrazellulären Eisenkonzentrationen diskutiert. Das Eisen könnte als Energiespeicher, für Eisenhomöostase oder in Redox-Zyklen dienen (Mann *et al.*, 1990a; Spring *et al.*, 1993).

2.1.1 *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Bisher liegen nur wenige Arten magnetotaktischer Bakterien als Reinkultur vor. *Magnetospirillum magnetotacticum* war das erste dieser Bakterien, das isoliert und charakterisiert wurde (Blakemore *et al.*, 1979). Inzwischen wurden auch weitere

Stämme wie z. B. *M. gryphiswaldense*, *Magnetospirillum* spec. AMB-1, ein magnetischer Kokkus MC-1 und ein magnetisches Vibrio MV-1 (Bazylinski *et al.*, 1988; Kawaguchi *et al.*, 1992; Meldrum *et al.*, 1993a, 1993b; Schleifer *et al.*, 1991) isoliert und kultiviert.

Eines der am besten untersuchten magnetotaktischen Bakterien ist der Stamm *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, der in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus diente. Dieser Stamm wurde aus dem Sediment des Ryck, einem kleinen Fluß bei Greifswald, isoliert (Schüler und Köhler, 1992). Phylogenetisch gliedert es sich zu den Gram-negativen Bakterien in die Untergruppe der α -Proteobakterien. Die Zellen sind 2-3 μm lang, helikal gewunden und bipolar monotrich begeißelt. Dieser Organismus ist chemoorganoheterotroph und nutzt verschiedene organische Säuren als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle (Schleifer *et al.*, 1991). Abhängig von den Kultivierungsbedingungen kann MSR-1 bis zu 60 kubooktaedrische Kristalle des Eisenminerals Magnetit bilden, die eine Kette entlang der Longitudinalachse der Zelle bilden. Durchschnittlich haben die Magnetosomen einen Durchmesser von 45 nm. Obwohl *M. gryphiswaldense* mikroaerophil ist, kann dieses Bakterium auch anaerob und aerob wachsen und ist sowohl Katalase- als auch Oxidase-positiv (Schleifer *et al.*, 1991). Weiterhin ist es möglich *M. gryphiswaldense* unter anaeroben Bedingungen, mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu kultivieren (Heyen und Schüler, 2003; Menke, 2003).

Im Gegensatz zu vielen anderen magnetotaktischen Bakterien, ist es möglich den Stamm MSR-1, in Massenzuchten zu kultivieren (Heyen und Schüler, 2003). Die Entwicklung eines genetischen Systems für *M. gryphiswaldense* ermöglicht es außerdem diesen Stamm genetisch zu manipulieren und die Magnetosomenbiomineralisation molekularbiologisch zu untersuchen (Schultheiss und Schüler, 2003). Daher ist *Magnetospirillum gryphiswaldense* ein geeigneter Modellorganismus für genomische, transkriptionelle und vor allen Dingen funktionelle Studien.

2.2 Magnetosomen

Magnetosomen bestehen aus einem von einer Membran umschlossenen magnetischen Eisenmineral (Balkwill *et al.*, 1980). Die Magnetosomen enthalten entweder Eisenoxide, die in Form von Magnetitkristallen (Fe_3O_4) vorliegen (Frankel *et al.*, 1979; Schleifer *et al.*, 1991), oder Eisensulfide, die als Greigitkristalle (Fe_3S_4) nachgewiesen wurden (Farina *et al.*, 1990; Heywood *et al.*, 1990; Mann *et al.*, 1990b). In Reinkultur

vorliegende magnetotaktische Bakterien enthalten bisher ausschließlich Magnetit in den Magnetosomen. Chemisch handelt es sich bei Magnetit um ein Mischoxid von Fe(II) und Fe(III) ($\text{Fe}^{3+} [\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}] \text{O}_4$), mit starken ferromagnetischen Eigenschaften (Banerjee und Moskowitz, 1985).

Die Magnetosomen weisen eine hohe strukturelle Perfektion und artspezifische Kristallmorphologie auf, bei denen man kubooktaedrische, gestreckt-prismatische und projektilförmige Formen unterscheidet. Außerdem zeichnen sich Magnetosomenpartikel durch eine enge Größenverteilung von 35-120 nm aus. Dieser Größenbereich ist die Voraussetzung für stabile magnetische Einzelkristalle („single-magnetic-domain particles“), mit einem einheitlichen, permanenten maximalen magnetischen Dipol. (Denham *et al.*, 1980; Frankel *et al.*, 1998; Moskowitz *et al.*, 1988).

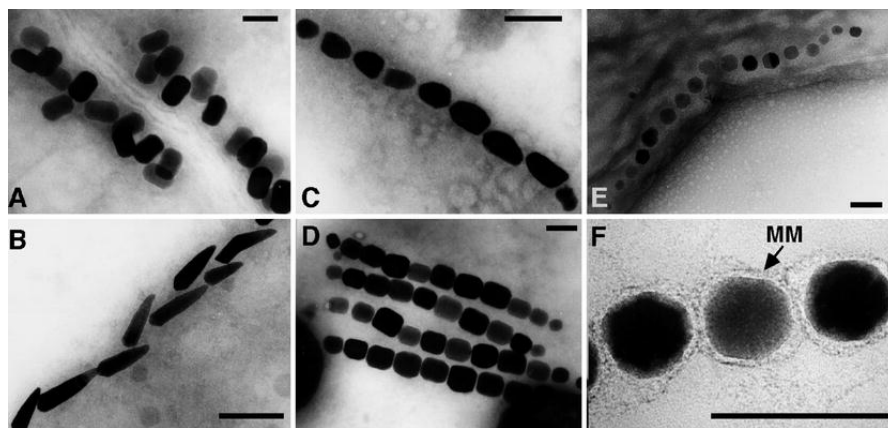


Abbildung 2-1: Unterschiedliche Kristallformen von Magnetosomen (aus Schüler, 2004)

A-D Magnetosomen mit unterschiedlicher Form und Anordnung, E Kettenform von kubooktaedrischen Magnetosomen in *M. gryphiswaldense*, F Isolierte Magnetosomen mit der charakteristischen Magnetosomenmembran. Maßbalken 100 nm

Magnetostatische Interaktionen zwischen den Einzelkristallen bedingen die parallele Anordnung entlang einer oder mehrerer Ketten (Frankel und Blakemore, 1980, 1984). Durch diese Kettenanordnung summiert sich das magnetische Moment der Einzelpartikel und wird zu einem großen permanenten Dipol (Dunin-Borkowski *et al.*, 1998). Dieser Dipol ist stark genug für eine Orientierung entlang des geomagnetischen Feldes. Die Fixierung der Magnetosomenkette innerhalb der Zelle führt zu einer Orientierung des gesamten Bakteriums im erdmagnetischen Feld.

Metabolische Aktivitäten dissimilatorischer eisen- und sulfatreduzierender Bakterien (Lovley, 1993) können zu der Bildung von extrazellulärem Magnetit bzw. Greigit führen. Ähnlich wie die Eisenminerale aus anorganischen Synthesen, weisen diese jedoch eine normale Größenverteilung sowie uneinheitliche Kristallformen auf

(Sparks *et al.*, 1990). Die regelmäßige Form, Größenverteilung und Anordnung von Magnetit ist nur aus magnetotaktischen Bakterien bekannt, weshalb vermutet wird, daß dieses durch eine exakte biologische Kontrolle des Mineralisationsprozesses reguliert wird.

2.3 Eisenaufnahme und Biomineralisation von Magnetit

Eisen ist das vierthäufigste Element dieser Erde, es spielt nicht nur eine wichtige Rolle als Elektronendonator bzw. -akzeptor, sondern ist auch ein wichtiger Bestandteil für Hämproteine, Eisen-Schwefel-Zentren und in den aktiven Zentren vieler Enzyme. Nicht magnetotaktische Bakterien wie z. B. *E. coli* nehmen bis zu 0,025 % Eisen mg TG⁻¹ auf (Hartmann und Braun, 1981), hingegen können magnetotaktische Bakterien bis zu 2,2 % Eisen mg TG⁻¹ enthalten (Heyen und Schüler, 2003). Daher wird vermutet, daß magnetotaktische Bakterien ein sehr viel effizienteres Eisenaufnahmesystem besitzen, als übrige Bakterien. Obwohl Eisen ubiquitär verbreitet ist, ist es nicht immer biologisch verfügbar, da nur die reduzierte Fe(II) Form löslich ist. Das oxidierte Fe(III) geht unlösliche Verbindungen wie z. B. mit Karbonaten ein. Daher haben viele Bakterien die Fähigkeit, Fe(III) komplexierende Substanzen, die Siderophore, zu synthetisieren, die das Eisen verfügbar machen.

Welche Form des Eisens von magnetotaktischen Bakterien aufgenommen wird, ist bisher immer noch unklar, da in den Wachstumsmedien in der Regel sowohl die reduzierte Fe(II)-, als auch die oxidierte Fe(III)- Form auftreten. Die Eisenaufnahme im Stamm *M. gryphiswaldense* MSR-1 verläuft ohne die Synthese von Siderophoren, jedoch ist in Zellsuspensionsexperimenten verbrauchtes Kulturmedium erforderlich um die Eisenaufnahme in eisengehungerten Zellen zu stimulieren. Fe(III) wird durch einen aktiven energieabhängigen Prozeß aufgenommen, der der Michaelis-Menten Kinetik folgt (Schüler und Baeuerlein, 1996). Neuere Untersuchungen ergaben, daß das Fe(III) des Mediums sehr schnell reduziert wird und überwiegend in der reduzierten Fe(II) Form vorliegt. Somit ist MSR-1 auch in der Lage reduziertes Fe(II) aufzunehmen (Heyen und Junge, persönliche Mitteilung).

In dem magnetotaktischen Stamm MV-1 konnte ein kupferabhängiges Eisentransportsystem nachgewiesen werden, das dem aus *Saccharomyces cerevisiae* ähnelt (Dubbels *et al.*, 2004). Dieses stellt eine periplasmatische Fe²⁺-Oxidase dar, die es dem Stamm MV-1 ermöglicht, auch reduziertes Eisen aufzunehmen, das im Cytoplasma wieder in der oxidierten Fe(III)-Form vorliegt (Dubbels *et al.*, 2004). Ein

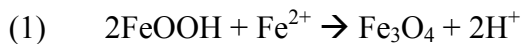
Cytochrom *cd₁* mit einer Fe(II):Nitrit-Oxidoreduktaseaktivität konnte in *M. magnetotacticum* nachgewiesen werden. Dieses Enzym könnte aufgenommenes Fe(II) wieder in Fe³⁺-Ionen oxidieren (Yamazaki *et al.*, 1995). Eine cytoplasmatische Fe(III) Reduktase, die aus *M. magnetotacticum* isoliert wurde, ist vermutlich auch an der Magnetitsynthese beteiligt, indem aufgenommenes oder reoxidiertes Fe(III) zu Fe(II) reduziert wird (Noguchi *et al.*, 1999). Eine cytoplasmatische Fe(III)-Reduktaseaktivität konnte auch im Stamm MV-1 nachgewiesen werden (Dubbels *et al.*, 2004).

Nachdem das Eisen in die Zelle aufgenommen wurde, und im Cytoplasma in der oxidierten Fe(III) oder reduzierten Fe(II) Form vorliegt, muß es in die Magnetosomenvesikel transportiert werden, damit dort Magnetit präzipitieren kann. In *M. gryphiswaldense* wurden auf dem *mamAB*-Cluster zwei Gene identifiziert *mamB* und *mamM*, die für Proteine kodieren, die Homologie zu CDF („cation diffusion facilitator“) Transportern aufweisen. Diese Proteine übernehmen in anderen Bakterien die Funktion, Schwermetalle aus der Zelle hinaus zu transportieren. Nach einer gegenwärtigen Hypothese gewährleisten diese Proteine MamB und MamM den Transport von Eisen aus dem Cytoplasma in die Magnetosomen. In anderen magnetotaktischen Stämmen wie *Magnetospirillum* AMB-1 wurden noch andere Proteine nachgewiesen, die eine solche Rolle übernehmen könnten. Es wird spekuliert, daß das MagA Protein, das sowohl in der Cytoplasma-, als auch an der Magnetosomenmembran nachgewiesen wurde, einen H⁺/Fe(II) Antiporter in der Magnetosomenmembran im Stamm AMB-1 darstellen könnte (Nakamura *et al.*, 1995a; Nakamura *et al.*, 1995b). Eine unmagnetische *magA*-Mutante wurde jedoch nie komplementiert. Somit liegen keine überzeugenden Beweise vor, daß MagA tatsächlich an der Eisenaufnahme in die Magnetosomen beteiligt ist.

Für die Kristallbildung sind vermutlich wiederum andere Proteine verantwortlich. Das Mms6 Protein aus dem Stamm AMB-1 besitzt *in vitro* die Fähigkeit Eisen zu binden. Bei der chemischen Synthese von Magnetit werden in der Gegenwart von Mms6 nicht nur morphologisch einheitliche kubooktaedrische Magnetitkristalle, sondern auch Kristalle einheitlicher enger Größenbereiche von 20 – 30 nm gebildet, ähnlich wie es in magnetotaktischen Bakterien beobachtet wurde (Arakaki *et al.*, 2003). Da für diesen Kristallisationsversuch jedoch keine Kontrollen gezeigt wurden, ist dieses Ergebnis eher kritisch zu betrachten. Zwei MMP MamC und MamD aus *M. gryphiswaldense* zeigen Ähnlichkeit zu zwei anderen Proteinen Mms13 und Mms7 aus dem Stamm AMB-1, die beschrieben wurden, an die Magnetosomen gebunden zu sein

(Arakaki *et al.*, 2003). Eine mögliche Rolle in der Kristallisation wäre auch bei diesen Proteinen denkbar.

Wie die Magnetitbiomineralisation im Einzelnen abläuft, ist bisher noch unklar. Es wird jedoch vermutet, daß Eisen in den Magnetosomen als Fe(II) und Fe(III) copräzipitiert, oder das zunächst ein Ferrihydrit als Vorstufe gebildet wird. Bei diesem Mechanismus ist es wahrscheinlich, daß lösliches Fe(II) an die Oberflächen des Ferrihydrit adsorbiert und sich Magnetit bildet (vgl. Stöchiometrische Reaktion (1)) (Cornell und Schwertmann, 2003).



2.4 Physiologische Regulation der Magnetosomensynthese

Je nach Wachstumsbedingung ist die Größe sowie die Anzahl der Magnetosomen, die zwischen Null und 60 variieren kann, in *M. gryphiswaldense* unterschiedlich. In erster Linie zeigen die Sauerstoff- und Eisenkonzentration des Mediums einen Einfluß auf die Magnetosomensynthese.

Die Sauerstoffkonzentration spielt sowohl für die Magnetitsynthese, als auch für das Wachstum eine Rolle. Alle bisher untersuchten MTB-Stämme sind mikroaerob, oder fakultativ anaerob. So zeigen MTB neben der Magnetotaxis auch eine Aerotaxis, die, wie verschiedene Versuche gezeigt haben, zusammenwirken und daher als Magneto-aerotaxis bezeichnet wird (Frankel *et al.*, 1997). Experimente mit radioaktivem Sauerstoff zeigten, daß nicht molekularer Sauerstoff für die Magnetitsynthese benötigt, sondern der Sauerstoff des Wassers in Fe₃O₄ eingebunden wird (Mandernack *et al.*, 1999). *M. magnetotacticum* ist dazu fähig, mikroaerob mit Sauerstoffkonzentrationen von 0,1 – 21 % O₂ zu wachsen. Die Bildung von Magnetosomen konnte jedoch nur in einem Konzentrationsbereich von 0,5–5 % O₂ detektiert werden, wobei eine maximale Magnetitsynthese bei 1 % Sauerstoff erfolgte (Blakemore *et al.*, 1985). Auch bei *Magnetospirillum* spec. AMB-1 zeigte eine Reduzierung der Sauerstoffkonzentration zu mikroaeroben Bedingungen eine erhöhte Bildung von Magnetosomen (Yang *et al.*, 2001). Unter sauerstoffgesättigten Bedingungen bildet *M. gryphiswaldense*, wie die anderen Stämme auch, kein Magnetit (Schüler und Baeuerlein, 1998). Die Magnetitsynthese wird erst unterhalb einer Sauerstoffkonzentration von 20 mbar O₂ induziert, wobei optimale Bedingungen für die Magnetosomenbiosynthese bei einem pO₂ von 0,25 mbar nachgewiesen wurden (Heyen

und Schüler, 2003). Experimente zur Induktion der Magnetitsynthese durch einen Sauerstoff-„Shift“ von 20 mbar auf 2 mbar während der exponentiellen Wachstumsphase zeigte eine Verzögerung der Magnetitbildung. Vier Stunden nach der Induktion konnte der zelluläre Magnetismus detektiert werden. Demnach synthetisieren alle bisher untersuchten Stämme nur unter bevorzugten mikroaeroben Sauerstoffkonzentrationen Magnetit.

Eisen wird direkt für die Magnetitsynthese benötigt, daher ist unabhängig von einer eventuellen Regulation der Magnetosomengene ein Effekt, abhängig von der Eisenkonzentration, auf die Magnetitsynthese zu erwarten. So zeigten Experimente zur Eisenaufnahme in *M. gryphiswaldense*, daß auch kleinste Mengen an Eisen (1 μM) zur Magnetitbildung führten und bereits ab einer Konzentration von 15 – 20 μM Eisen das Maximum der Magnetitbildung erreicht wurde (Schüler und Baeuerlein, 1996). Höhere Eisenkonzentrationen könnten demnach toxisch wirken und eine Detoxifikation initiieren, so daß hierbei andere Regulatoren eine Rolle spielen könnten. Im Gegensatz zu dem Sauerstoff-„Shift“ Experiment zeigte die Magnetitsynthese in *M. gryphiswaldense* bei einem Eisen-„Shift“ von eisenlimitierenden zu eisengesättigten Bedingungen keine verzögerte Induktion (Heyen und Schüler, 2003). Dies verdeutlicht, daß dieser Organismus und vermutlich auch MTB im Allgemeinen, über ein hocheffizientes Eisenaufnahmesystem verfügen, mit vermutlich hochsensiblen Sensoren, so daß keine Verzögerung der Magnetitsynthese erkennbar ist.

2.5 Die Magnetosomenmembran

Alle bisher untersuchten magnetotaktischen Bakterien scheinen Magnetosomen zu bilden, die von einer Lipiddoppelmembran umschlossen sind (Gorby *et al.*, 1988; Matsunaga, 1991; Schüler und Baeuerlein, 1997). Die Magnetosomenmembran (MM) ist vermutlich der Ausgangspunkt der Regulation der Eisenaufnahme sowie der Größe, Form und Kristallisation der Eisenkristalle.

Analysen der MM-Zusammensetzung zeigte, daß diese ähnlich wie andere Membranen auch aus Proteinen, Fettsäuren, Glykolipiden, Sulfolipiden und Phospholipiden, dabei vorwiegend aus Phosphatidylserin bzw. -glycerin und Phosphatidylethanolamin besteht, jedoch in anderen Mengenverhältnissen (Gorby *et al.*, 1988; Grünberg *et al.*, 2004). Ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der MM und der Gesamtzellmembranen verdeutlichte, daß charakteristische Fettsäuren der äußeren Membran wie 3-Hydroxyhexadecansäure, 3-Hydroxyoctadecansäure und 2-

Hydroxydekansäure nicht in der MM enthalten sind. Zudem traten die anderen Fettsäuren meistens in einem anderen Verhältnis als in der Gesamtzellmembran auf (Grünberg *et al.*, 2004).

Auch das Proteinprofil extrahierter MM zeigte deutliche Unterschiede zu anderen Zellfraktionen sowohl in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* MS-1 als auch in *Magnetospirillum* spec. AMB-1 (Gorby *et al.*, 1988; Grünberg *et al.*, 2001; Okamura *et al.*, 2000). Ein Vergleich der MM-Proteinprofile zwischen den verschiedenen *Magnetospirillum* Stämmen zeigte einen Unterschied der Muster von MS-1 und AMB-1 im Vergleich zu *M. gryphiswaldense* (Grünberg *et al.*, 2004). Mittels der 1D- bzw. 2D- SDS- Gelelektrophorese war es möglich im Stamm MS-1 vier spezifische (Gorby *et al.*, 1988) und im Stamm AMB-1 fünf spezifische (Okamura *et al.*, 2000) MM-Proteine zu identifizieren. In einer späteren Studie wurden zwei weitere niedermolekulare Proteine, Mms13 und Mms7 in AMB-1 nachgewiesen (Arakaki *et al.*, 2003). Diese beiden Proteine sind homolog zu MamC bzw. MamD aus *M. gryphiswaldense*. In MSR-1 war es sogar möglich 16 spezifische MMP (Grünberg *et al.*, 2004), darunter auch MamC und MamD, zu identifizieren. Diese 16 MMP aus *M. gryphiswaldense* wurden als MamG, F, D, C, E, J, M, N, O, A, Q, R, B, S, T, U und Mms6 bezeichnet. Nur wenige dieser MMP zeigten Homologie zu bekannten Proteinen. Mam22 aus *M. magnetotacticum*, das homolog ist zu MamA aus *M. gryphiswaldense*, weist Sequenzähnlichkeit zu TPR („tetratricopeptide repeat“) Proteinen auf und könnte an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein (Okuda *et al.*, 1996; Okuda und Fukumori, 2001). Spätere Funktionsstudien von MamA im Stamm AMB-1 lassen ebenfalls vermuten, das dieses Protein mit anderen interagiert (Komeili *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, daß MamA-Deletionsmutanten eine verkürzte Magnetosomenkette aufweisen. Daher wurde spekuliert, daß MamA die Magnetosomenvesikel aktiviert. Es sind jedoch weitere Studien nötig um diese Funktion von MamA zu bestätigen. MamB und MamM zeigten eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Schwermetall transportierenden Proteinen der CDF- Familie. Dies legt eine Rolle beim Transport von Eisen in die Magnetosomen nahe. MamE und MamO wiesen Sequenzähnlichkeiten zu HtrA ähnlichen Serin Proteasen auf. MamN zeigte Ähnlichkeit zu Transportproteinen und MamT wies zwei mutmaßliche Cytochrom C Häm-Bindungsstellen auf. In der Magnetosomenmembran sind neben Proteinen für die Aktivierung, Eisenaufnahme und Kristallisation auch Proteine für den Prozeß der Kettenbildung lokalisiert. Funktionsstudien eines sauren Proteins, MamJ, in *M. gryphiswaldense* zeigten, daß eine

Deletion des *mamJ* Gens zu einer Clusterbildung der Magnetosomen führt. Da Lokalisationsstudien dieses Proteins gezeigt haben, daß es ein lineares Signal in der Zelle zeigt, wird spekuliert, daß MamJ die Magnetosomen an eine filamentöse Struktur in der Zelle bindet, wodurch eine Kettenbildung gewährleistet wird (Scheffel *et al.*, eingereicht). Bei einem weiteren Magnetosomen gen *mamK* wird spekuliert, daß es ebenfalls mit an der Kettenbildung der Magnetosomen beteiligt ist. Dieses Gen zeigt Homologie zu MreB, einem aktinähnlichen Protein aus Bakterien. Aktin war lange Zeit nur in eukaryotischen Zellen als Bestandteil des Zytoskeletts bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Prokaryoten ähnliche zytoskeletale Strukturen enthalten, die durch die zu Aktin nahe verwandten Proteine MreB, Mbl und ParM gebildet werden (Carballido-Lopez und Errington, 2003a; Jones *et al.*, 2001; van den Ent *et al.*, 2001a; van den Ent *et al.*, 2002). In *B. subtilis* und *E. coli* konnte gezeigt werden, daß MreB helikale dynamische Strukturen bildet (Figge *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2001). Somit könnte es möglich sein, daß *mamK* in *M. gryphiswaldense* für die Bildung ähnlicher zytoskeletaler Strukturen zur Stabilisierung der Kettenstruktur verantwortlich ist.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Zusammensetzung der MM im Vergleich zu den anderen Zellmembranen wurde ein eigener Syntheseweg der MM vermutet (Baeuerlein, 2003). Eine direkte Nachbarschaft der Magnetosomen zu der Cytoplasmamembran ließ eine Verbindung zwischen diesen Membranen vermuten, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden konnten (Gorby *et al.*, 1988). Daher wird auch diskutiert, ob die MM durch Invagination der Cytoplasmamembran entstehen könnte.

Es war lange Zeit unklar, ob die Magnetosomenmembranvesikel vor der Synthese der anorganischen Partikel synthetisiert werden und als Leervesikel in der Zelle vorliegen, oder die Membran erst nachträglich um die Partikel gebildet wird. Gorby *et al.* (1988) konnte in eisengehungerten Zellen im Stamm MS-1 Leervesikel und nur z. T. mit Magnetit gefüllte Vesikel zeigen. Dieses konnte später auch im Stamm AMB-1 bestätigt werden (Komeili *et al.*, 2004). Neuere Methoden der kryoelektronenmikroskopischen Tomographie verdeutlichen, daß nicht nur eisengehungerte Zellen von *M. gryphiswaldense* eine Vielzahl an Leervesikeln in der Zelle enthalten. (Scheffel *et al.*, eingereicht).

Es wird diskutiert, daß die MM als eine Abgrenzung zu toxischen Eisenkonzentrationen dient (Blakemore, 1982). Die MM könnte aber auch zur Abgrenzung eines differenzierten Redox- und pH-Bereichs in der Zelle dienen. Es wird

vermutet, daß die Proteine, die spezifisch in bzw. an der MM lokalisiert sind, eine Rolle bei der Biomineralisation der Magnetitkristalle durch Transport, Akkumulation, Nukleation und Kristallisation von Eisen einnehmen (Gorby *et al.*, 1988; Mann *et al.*, 1990a).

2.6 Genetische Steuerung der Magnetosomenbiomineralisation

Lange Zeit waren die Gene, die die Prozesse der Magnetosomenbiomineralisation regulieren unbekannt. Bereits 1988 konnten erstmals Gene eines magnetotaktischen Bakteriums heterolog in auxotrophen *E. coli*-Stämmen exprimiert werden (Waleh, 1988). Jedoch konnte erst drei Jahre später ein DNA Fragment aus *M. magnetotacticum* MS-1 identifiziert werden, das die Eisenaufnahme durch *aroD* in *E. coli* komplementiert und auch in den Eisenaufnahmeprozess im Stamm MS-1 mit involviert sein könnte (Berson *et al.*, 1991).

Durch die Entwicklung genetischer Systeme für magnetotaktische Bakterien (Matsunaga *et al.*, 1992; Schultheiss und Schüler, 2003) war es dann auch möglich, andere Methoden für die Identifizierung an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligten Gene zu nutzen. Die Transposonmutagenese ermöglicht es mittels ungerichteter Mutationen unmagnetische Klone magnetotaktischer Bakterien zu isolieren, wie es für *Magnetospirillum* spec. AMB-1 in großem Umfang durchgeführt wurde (Komeili *et al.*, 2004; Matsunaga *et al.*, 1992; Matsunaga *et al.*, 2005). Mittels des Transposons mutierte Gene können dann analysiert werden. Durch Komplementation der Mutantenstämme mit dem jeweiligen identifizierten Gen, ist der Nachweis der Beteiligung an der Magnetosomenbiomineralisation erbracht. Es wurden zwar einige mittels Transposonmutagenese identifizierte Gene genauer analysiert, wie z. B. *magA* und *mpsA*, jedoch wurden bisher keine Komplementationen durchgeführt. Daher sind die bisher vermuteten Funktionen dieser Gene eher zweifelhaft.

Ein vielversprechenderer Ansatz stellt die reverse Genetik dar. Durch aufgetrennte Proteinextrakte der Magnetosomenmembran ist es möglich, die N-terminale Aminosäuresequenz zu bestimmen und daraus eine degenerierte DNA-Sequenz abzuleiten. In *M. gryphiswaldense* konnte mittels dieser Methode die N-terminale Sequenz von fünf Magnetosomenmembranproteinen bestimmt werden und von vier dieser Proteine die Gensequenzen identifiziert werden. Zwei dieser identifizierten Gene konnten einer ca. 7,55 kb großen DNA-Sequenz zugeordnet werden. Diese beiden Gene wurden als *mamA* und *mamB* bezeichnet (Abbildung 2). Die zwei anderen Gene,

bezeichnet als *mamC* und *mamD* lagen auf einer kürzeren Sequenz mit einer Länge von 4,3 kb. Die Gene *mamA* und *mamB* sind colinear mit sechs weiteren Genen und zwei fragmentierten Leserahmen an den 5' und 3' Enden angeordnet. Diese Sequenz bildete das *mamAB*-Cluster und das *mamDC*-Cluster umfasste zu Beginn dieser Arbeit nur die colinear angeordneten Gene *mamC* und *mamD*.

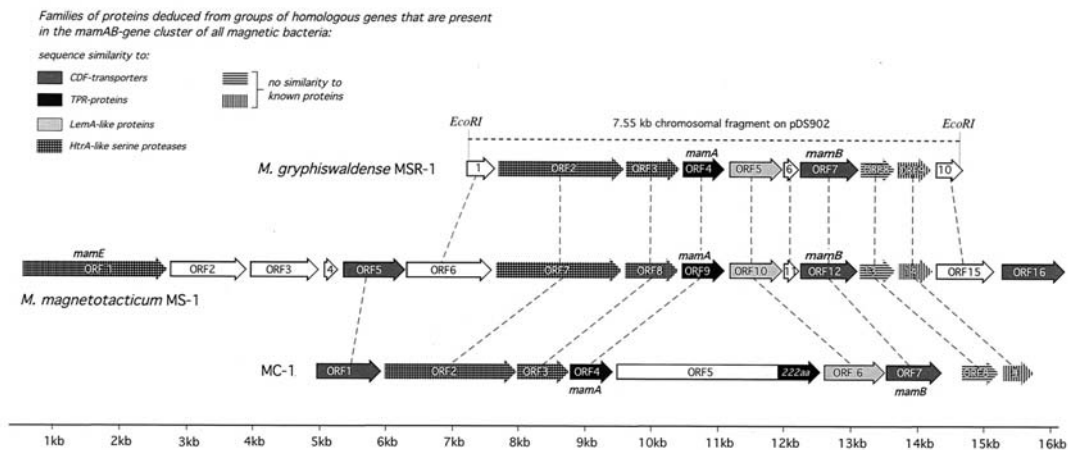


Abbildung 2-2: Genomische Organisation des *mamAB*-Clusters in den drei magnetotaktischen Bakterienstämmen *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* und MC-1 (aus Grünberg *et al.*, 2001)
Die Anordnung der *mam*-Gene stellt die Organisation dar, wie sie zu Beginn dieser Arbeit bekannt war.

Ein Vergleich der identifizierten Gene mit den Genomsequenzen der magnetotaktischen Stämme *M. magnetotacticum* und dem magnetischen Kokkus Stamm MC-1 zeigte eine hohe Homologie der Sequenzen dieser Gene. Nicht nur die Gensequenzen, sondern auch die Anordnung der Gene in den Clustern legte zu Beginn dieser Arbeit nahe, daß diese zumindest in den Stämmen MS-1 und MSR-1 hoch konserviert ist. Die Genomsequenz vom Stamm MS-1 zeigte ein längeres *mamAB*-Cluster mit sechs zusätzlichen Genen. Im Stamm MC-1 hingegen konnten neun Gene des *mamAB*-Clusters identifiziert werden, wobei das als „ORF5“ bezeichnete Gen keine Homologie zu den *Magnetospirillum* Stämmen zeigte (vgl. Abbildung 2). Das *mamDC*-Cluster liegt auf einem anderen DNA-Fragment als das *mamAB*-Cluster. Die genomische Lokalisierung dieser Cluster zueinander war bis zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Im Stamm MS-1 ist die Anordnung der *mamDC*-Gene identisch mit der in *M. gryphiswaldense*. Im magnetischen Kokkus MC-1 sind die Gene offensichtlich nicht colinear angeordnet. Die operonähnliche Anordnung des *mamAB*-Clusters ließ darauf schließen, daß auch die anderen Gene des Clusters mit an der Synthese der Magnetosomen beteiligt sind. Die Anordnung in den Genclustern führte zu der

Vermutung, daß neben den *mamAB*- und *mamDC*-Clustern weitere Genomregionen in die Magnetosomenbiomineralisation involviert sind (Grünberg *et al.*, 2001).

Weitere Sequenzierungen der Genome unterschiedlicher magnetotaktischer Bakterienstämme kann dazu beitragen alle Genomregionen, die an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligt sind, zu identifizieren. Vor einer Sequenzierung des Genoms kann mittels Pulsfeldgelelektrophorese die Genomgröße abgeschätzt werden. Mit dieser Technik wurden die Genome verschiedener magnetotaktischer Bakterien untersucht und verglichen. Alle untersuchten Stämme besitzen ein einzelnes zirkuläres Chromosom mit einer Größe von ca. 4 Mb. Die *Magnetovibrio* Stämme MV-1 und MV-2 haben die kleinsten Genome mit 3,7 Mb und 3,6 Mb. Der magnetische Kokkus Stamm MC-1 besitzt ein größeres Chromosom mit 4,5 Mb. Die Genomgröße vom Stamm MS-1 wurde auf 4,3 Mb geschätzt (Bertani *et al.*, 2001; Dean und Bazylinski, 1999). Die Genome von zwei magnetotaktischen Stämmen *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 und dem magnetischen Kokkus MC-1 wurden im „Joint Genome Institute“ nahezu vollständig sequenziert (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html). Seit kurzem ist die vollständige Genomsequenz von *Magnetospirillum spec.* AMB-1 (AP007255) verfügbar, mit einer Größe von 4,9 Mb (Matsunaga *et al.*, 2005). Diese Sequenzdaten bieten nun die Möglichkeit nicht nur mittels ungerichteter, sondern auch gerichteter Mutagenese die Steuerung der Magnetosomenbiomineralisation weiter aufzuklären.

2.7 Genominseln

Da in dieser Arbeit Hinweise auf eine Magnetosomeninsel gefunden wurden, soll hier auf einige Aspekte von Genominseln und Insertions-Elemente näher eingegangen werden.

Zunächst waren nur Pathogenitätsinseln aus pathogenen Bakterienstämmen bekannt, die in nicht pathogenen Bakterien der gleichen Art nicht vorhanden waren. Die Pathogenitätsinseln und auch andere Genominseln, wie sich später herausstellte, sind durch bestimmte Charakteristika gekennzeichnet, die sie vom Kerngenom unterscheiden (Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker und Kaper, 2000). Das Kerngenom kodiert für essentielle Gene mit „housekeeping“ Funktion, ist sehr stabil und gekennzeichnet durch einen homogenen G+C-Gehalt. Dagegen kodieren Genominseln häufig für Gene mit akzessorischen Funktionen, die den Bakterien weitere Fähigkeiten verleihen. Es sind große genomische Regionen von 10-200 kb. Kleinere werden als „Inselchen“

bezeichnet (Hacker und Kaper, 2000). Häufig sind diese Inseln durch einen G+C-Gehalt gekennzeichnet, der sich vom Kerngenom unterscheidet. Ein Ende wird in 75 % der Genominseln durch tRNA Gene flankiert, die häufig als Integrationsstelle für Bakteriophagen dienen. Die Enden der Genominseln werden durch „direct repeats“ flankiert, die eine Länge von 9 bp bis 135 bp haben. Durchschnittlich weisen sie jedoch nur eine Länge von 16-20 bp auf (Hacker und Kaper, 2000). Diese kurzen Wiederholungssequenzen sind Zielsequenzen von mobilen DNA-Elementen in Rekombinationsereignissen, die RecA-unabhängig sind. Hierbei unterscheidet man Integrasen und IS-Elemente, die häufig nicht mehr funktionstüchtig sind. Integrasen spielen vor allen Dingen eine Rolle in der Mobilisierung der Genominseln und sind maßgeblich an der Integration dieser beteiligt. Transposasen sind auf Transposons oder IS Elementen lokalisiert. Die Transposase katalysiert das Transpositionereignis dieser „springenden Gene“. Die Transposons können neben der Transposase auch Antibiotikaresistenzen und andere Eigenschaften tragen, sie sind durch „inverted repeats“ flankiert. Auch die IS-Elemente sind durch „inverted repeats“ flankiert, kodieren jedoch nur das Transposasegen. Die DNA-Rekombinationen werden durch Transpositionereignisse und homologe Rekombination zwischen den identischen Kopien der IS-Elemente innerhalb eines Genoms gewährleistet. Man unterscheidet hierbei die konventionelle Transposition, bei der die Transposase eine neue Integrationsstelle sucht. Bei der nicht replizierenden Transposition wird die Transposase durch Doppelstrangbrüche aus dem Genom herausgetrennt. Bei der replizierenden Transposition wird eine Kopie der Transposase neu in das Genom integriert. Diese Translokationen finden unabhängig von der im Genom ablaufenden homologen Rekombinationen statt (Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker *et al.*, 1997; Hacker und Kaper, 2000).

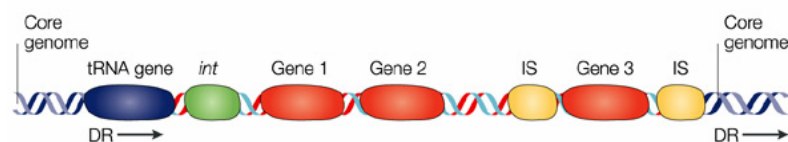


Abbildung 2-3: Charakteristika einer Genominsel

Genominseln werden häufig in der Nähe von tRNAs inseriert. Charakteristisch für Genominseln sind die „direct repeats“ (DR) und Gene, die den Organismen akzessorische Funktionen verleihen (dargestellt durch die Gene 1-3). Genominseln enthalten zusätzlich viele IS-Elemente und andere Mobilitätsgene wie z. B. Integrasen (*int*). Aus Dobrindt *et al.* 2004.

IS-Elemente sind Teil eines jeden bakteriellen Genoms und können bis zu 2 % der Genomsequenz einnehmen. Es gibt mehr als 600 verschiedene IS-Elemente, die in

Eubakterien- und Archaeenarten identifiziert wurden und in 20 Gruppen gegliedert werden können. IS-Elemente sind im Wesentlichen an den Rekombinationen im Genom, als auch an Plasmidintegrationen beteiligt. So kann es zu einer Mobilisierung von DNA-Bereichen kommen, die von zwei Kopien von gemeinsam agierenden IS-Elementen flankiert werden („compound transposons“). Dadurch sind diese genomischen Regionen sehr instabil und die IS-Elemente zeigen im Genom eine mosaikartige Struktur. Diese spezifischen Verteilungsmuster der IS-Elemente eignen sich als Marker in Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus Studien für die Artentypisierung und epidemiologische Studien (Mahillon und Chandler, 1998; Mahillon *et al.*, 1999).

IS-Elemente spielen zudem eine entscheidende Rolle beim horizontalen Gentransfer. Dieser ereignet sich zwischen verschiedenen Organismen innerhalb eines Ökosystems, wie z. B. zwischen Parasiten und Symbionten sowie zwischen Archaeen und Eubakterien. Die akzessorischen Fähigkeiten geben dem Organismus die Möglichkeit, sich besser an die Bedingungen des Ökosystems anzupassen. Der horizontale Gentransfer ist maßgeblich für die Flexibilität des Genpools. Dabei können die Veränderungen innerhalb langer oder kurzer Zeiträume auftreten und führen nach evolutionärer Selektion zur vorteilhaften Anpassung an die äußeren Bedingungen der Stressoren.

2.8 Ausgewählte Methoden zur transkriptionellen Analyse

Da sich ein Teil meiner Arbeit mit der transkriptionellen Analyse beschäftigt, soll im Folgenden auf einige hierfür erforderliche Methoden eingegangen werden.

Die fortgesetzte Sequenzierung verschiedenster mikrobieller Genome stellte eine große Datenmenge zur Verfügung. Die computergestützte Analyse dieser Sequenzen kann jedoch nur Vorhersagen für mögliche Gene treffen. So sind weitere experimentelle Untersuchungen nötig, um einen Hinweis auf die Transkription und Regulation unbekannter Gene zu erhalten.

Eine wichtige Technik ist der DNA- oder RNA-Mikroarray, der es ermöglicht das gesamte Transkriptom, d. h. die Gesamtheit aller mRNAs, die zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet werden, zu erfassen. Dazu werden genspezifische Oligonukleotide auf einem Objektträger fixiert. Dadurch kann das gesamte Genom des untersuchten Organismus oder eine bestimmte Auswahl an Genen auf dem Array präsentiert werden. Hybridisiert werden die so erhaltenen DNA- oder RNA-Mikroarrays entweder mit

fluoreszenzmarkierten cDNA- oder RNA-Proben. Dabei können zwei oder drei verschieden markierte Nukleinsäurepopulationen gleichzeitig eingesetzt werden. Jede dieser Populationen wurde aus Zellen isoliert, die unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen angezogen wurden. Somit können Expressionsunterschiede die aus verschiedenen physiologischen Zuständen resultieren direkt miteinander verglichen werden (Ye *et al.*, 2001).

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz der „real-time“ RT-PCR. Dabei wird nicht das Transkriptom als Ganzes betrachtet, sondern es können einzelne Gene im Hinblick auf ihre Regulation untersucht werden. Die mRNA wird zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese wird anschließend durch PCR exponentiell amplifiziert. Mit jedem Replikationszyklus verdoppelt sich die Menge der PCR-Produkte, bis schließlich eine Sättigung erreicht wird. Die Menge der Produkte ist während der exponentiellen Phase proportional zur Menge an Ausgangsmaterial (Ginzinger, 2002). Die Produktmenge kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen nach jedem Zyklus gemessen werden. Hierzu ist es möglich die DNA während der PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch zu markieren oder durch den Einsatz verschiedener Sonden, wie z. B. Molecular Beacon oder Taqman, spezifische Fluoreszenzsignale zu erhalten (Bustin, 2000, 2002; Ginzinger, 2002).

2.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Magnetosomenbiomineralisation in magnetotaktischen Bakterien setzt sich aus mehreren Prozessen zusammen, die auf biochemischer und molekularer Ebene bisher kaum verstanden sind. Die Untersuchungen im Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense* sollten die genomische und transkriptionelle Grundlage der Magnetosomenbiomineralisation aufklären. Mit Hilfe eines molekularbiologischen und genetischen Ansatzes sollten weitere *mam*-Gene identifiziert sowie ihre genomische Organisation und die transkriptionelle Regulation untersucht werden.

Ausgehend von den bisher bekannten *mam*-Genen sollte die Lage der Magnetosomengene im Genom und zueinander aufgeklärt werden. Weitere Sequenzanalysen sollten klären, ob noch weitere Magnetosomengene innerhalb der bisher bekannten Gencluster oder in der näheren genomischen Umgebung lokalisiert sind. Da der magnetische Phänotyp offensichtlich nicht stabil war, sollte am Beispiel einer spontanen unmagnetischen Mutante der Genotyp und der Mechanismus der Mutationen analysiert werden.

Untersuchungen zur transkriptionellen Organisation sollte zeigen, inwieweit die Magnetosomengene cotranskribiert, aber auch coreguliert werden. Da der magnetische Phänotyp von Sauerstoff- und Eisenkonzentrationen abhängig ist, sollte mittels Mikroarray und „real-time“-RT-PCR untersucht werden, inwieweit diese physiologischen Faktoren Einfluß auf die Regulation haben.

Am Beispiel eines ausgewählten Gens sollten funktionelle Untersuchungen durch eine Gendeletion sowie eine Reporterengenfusion mit GFP erfolgen. Hierzu sollte ein Magnetosomen gen gewählt werden, dessen Funktion zwar unbekannt ist, aber vermutet wird, an der Kettenbildung beteiligt zu sein, und damit einen Prozeß der Magnetosomenbiomineralisation möglicherweise weiter aufklären zu können.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Publikationen/Manuskripte im Zusammenhang dargestellt und diskutiert. Für eine detaillierte Betrachtung aller Einzelergebnisse dieser Arbeit sei auf die angefügten Veröffentlichungen verwiesen. Ausführlich werden an dieser Stelle Aspekte dargestellt, die in den Veröffentlichungen nicht oder nur im begrenzten Umfang behandelt wurden.

Teil I Organisation der *mam*-Gene

3.1 Genomische Organisation der *mam*-Gene

Die Magnetosomen der magnetotaktischen Bakterien werden durch einen komplexen Biomineralisationsmechanismus synthetisiert. Dieser Mechanismus kontrolliert die Aufnahme und die Akkumulation von Eisen sowie die Präzipitation von Magnetit. Die Biomineralisation ist bisher jedoch auf molekularer und auf biochemischer Ebene kaum analysiert. Es war bereits bekannt, daß die *mam*-Gene für Magnetosomenmembran assoziierte Proteine kodieren, die vermutlich an der Biomineralisation der Magnetosomen beteiligt sind. Die bisherige Klonierung und Sequenzierung hat gezeigt, daß die *mam*-Gene in zwei operonähnlichen Clustern lokalisiert sind. Diese *mamAB*- und *mamDC*-Cluster sind auch in anderen magnetotaktischen Bakterien wie *M. magnetotacticum* MS-1 und einem magnetischen Kokkus Stamm MC-1 zu finden und sind konserviert (Grünberg *et al.*, 2001). In *M. gryphiswaldense* waren bisher nur 10 Gene des *mamAB*-Clusters identifiziert. Die Gene *mamD* und *mamC* bildeten das *mamDC*-Cluster. Die Lokalisierung dieser beiden Cluster zueinander sowie die vollständige Größe der Gencluster war bisher noch unbekannt. Durch Aufklärung der genomischen Organisation der *mam*-Gene könnte weiter geklärt werden, welche Genprodukte mit an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligt sind.

3.1.1 Lokalisierung des *mamAB*- und *mamDC*- Clusters innerhalb eines 50 kb genomischen DNA-Fragmentes

Um die genomische Region des *mamAB*- und des *mamDC*-Clusters zu lokalisieren, wurde enzymatisch verdaute genomische DNA von *M. gryphiswaldense* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit Sonden gegen die Gene *mamB* und *mamD*

konnten die jeweiligen Fragmente im Southernblot ermittelt werden. Bei *ScaI* verdauter genomischer DNA von MSR-1 hybridisierten die Sonden mit ein- und demselben Fragment und zeigten ein Signal bei ca. 50 kb (Abbildung 3-1). Dies bedeutete, daß die beiden Cluster *mamAB* und *mamDC* innerhalb von weniger als 50 kb lokalisiert sind.

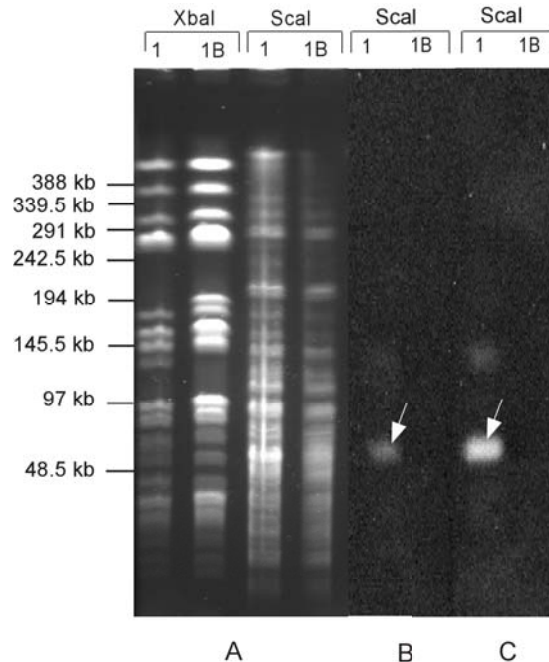


Abbildung 3-1: Southernblot der mittels Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennten genomischen DNA von MSR-1 und MSR-1B

Mit *XbaI* und *ScaI* verdauter genomischer DNA der Stämme MSR-1 und MSR-1B wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt (A). Anschließend wurde gegen *ScaI* verdauter und aufgetrennte DNA mit Digoxigenin markierter genspezifischer Sonde gegen *mamB* (B) bzw. *mamD* (C) hybridisiert. Die Pfeile kennzeichnen ein 50 kb *ScaI* Fragment, das gegen *mamB* und *mamD* cohybridisiert. 1 MSR-1; 1-B MSR-1B.

3.1.2 Identifizierung weiterer *mam*-Gene lokalisiert in drei Clustern

Aufgrund der engen Lokalisierung der beiden *mam*-Gencluster wurde eine „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) Bibliothek angelegt und diese Klone mittels Koloniehybridisierung mit der Sonde gegen *mamA* getestet. Die positiven Klone wurden danach mit PCR auf die Anwesenheit der übrigen bekannten *mam*-Gene überprüft. Vier Klone zeigten für alle getesteten *mam*-Gene ein Signal. Einer dieser Klone mit dem Plasmid pSS18, das ein 68 kb Fragment enthält, auf dem sowohl das *mamAB*- als auch das *mamDC*-Cluster lokalisiert sind, wurde für eine Sequenzanalyse ausgewählt. Diese zeigte, daß die bisher bekannten *mam*-Gene innerhalb von 35 kb lokalisiert sind (Manuskript 1, Abbildung 6). Die Gene, die für die Magnetosomenmembranproteine kodieren, ordnen sich in drei Genclustern. Das *mamAB*-Cluster enthält 17 kolinear angeordnete Gene *mamHIEJKLMNOAPQBRSTU*

und umfaßt 16,4 kb. Die Anordnung der Gene ist zu der in den magnetotaktischen Stämmen MS-1 und MC-1 stark konserviert. Im Stamm MS-1 wurden drei CDF-Transporter identifiziert, von denen der dritte, *mamV*, in der Sequenz von MSR-1 nicht detektiert werden konnte. Die zusätzliche Sequenzinformation zeigte in MSR-1 zwei weitere ORFs, die colinear mit den bereits bekannten Genen des *mamAB*-Clusters angeordnet sind. Diese beiden Gene wurden als *mamH* und *mamI* annotiert. 9,2 kb stromaufwärts gelegen ist das *mamGFDC*-Cluster lokalisiert mit einer Länge von 2,1 kb. Es umfaßt zwei weitere Gene *mamG* und *mamF*, die 5' von *mamD* mit diesem colokalisiert sind. Das 630 bp stromaufwärts gelegene *mms*-Cluster enthält 5 Gene und überspannt eine Länge von 3,4 kb. Dieses Cluster enthält ein Gen, das 78 % Ähnlichkeit zu *mms6* aus *Magnetospirillum* spec. AMB-1 zeigt (Arakaki *et al.*, 2003). Auch hämerythrinähnliche Gene sowie zwei weitere CDF-Transporter und ein *ftsZ*-Gen wurden detektiert.

Die Sequenzierung der vollständigen Genomsequenz von *M. gryphiswaldense*, in Zusammenarbeit mit M. Kube und R. Reinhardt, konzentrierte sich daraufhin auf die flankierenden Regionen der *mam*-Cluster, wodurch diese Region auf eine durchgehende, 482 kb lange Sequenz erweitert werden konnte. Viele der 77 konserviert hypothetischen Proteine zeigten Homologie zu ORFs aus den Stämmen *M. magnetotacticum* MS-1 und MC-1. Dies könnte darauf hinweisen, daß es sich dabei um Gene handelt, die spezifisch für magnetotaktische Bakterien sind und deshalb eine Rolle in der Magnetosomenbiomineralisation einnehmen könnten.

Außerhalb dieses Sequenzbereichs konnten auch mutmaßlich essentielle Gene wie z. B. für die Synthese von Ribosomen und Flagellen ebenso wie für den Harnstoff- und Phosphor- Zyklus und die Nitratreduktion annotiert werden. Damit sind auf einer Region von 130 kb nur Gene der Magnetosomenbiomineralisation, jedoch keine essentiellen Gene für das Überleben der Zelle positioniert.

3.1.3 Charakterisierung einer 130 kb Magnetosomeninsel (MAI)

IS-Elemente finden sich in hoher Frequenz in der Region bis 30 kb stromaufwärts des *mms*-Clusters und 50 kb stromabwärts des *mamAB*-Clusters. Innerhalb dieser 130 kb Region repräsentieren die 42 IS-Elemente über 21 % der DNA Sequenz. In der näheren Umgebung der *mam*-Gene befinden sich hauptsächlich IS-Elemente der IS21 und IS66 Familien. Die IS-Elemente scheinen in dieser Region eine ähnlich wichtige Komponente, wie in Genominseln darzustellen (Mahillon und Chandler, 1998; Mahillon

et al., 1999). Ebenso charakteristisch für Genominseln sind tRNA-Gene an den Enden der Insertionen, die als Adhäsionspunkte für Integrasen dienen können (Blum *et al.*, 1994; Reiter und Palm, 1990). Etwa 35 kb stromaufwärts des *mms*-Clusters konnten drei tRNA^{Ala, Ile, Met} Gene, detektiert werden. Weiterhin konnten einige Pseudogene, wie das *idiA*-Fragment („iron deficiency induced“), ein eisenbindendes Gen, auch außerhalb der magnetotaktischen Bakterien, wie z. B. in *Synechococcus spec.*, identifiziert werden (Tölle *et al.*, 2002).

Die erhaltenen Daten ließen darauf schließen, daß es sich bei dieser Region um eine Genominsel handeln könnte. Die Genominseln tragen Gene mit akzessorischen Funktionen, wie in *M. gryphiswaldense* die Funktion der Magnetosomenbiomineralisation. Diese Genominseln umfassen Regionen, die 10 – 500 kb groß sein können und eine Vielzahl an funktionellen und fragmentierten Insertionssequenz (IS)-Elementen und anderen Mobilitätsgenen enthalten, die an der Mobilisierung der DNA-Fragmente beteiligt sind (Mahillon und Chandler, 1998; Mahillon *et al.*, 1999).

Die ähnliche Organisation der *mam*- und *mms*-Gene in den Clustern könnte bedeuten, daß diese Gene durch einen horizontalen Gentransfer übertragen wurden. Für einen horizontalen Gentransfer spricht ein heterogener G+C Gehalt (Hacker und Kaper, 2000) wie er in dem DNA-Bereich, der die tRNAs, IS-Elemente und die drei *mam/mms*-Cluster überspannt vorkommt. Der horizontale Gentransfer stellt einen Mechanismus in der Evolution der mikrobiellen Genome dar (Dobrindt *et al.*, 2004), bei dem Genominseln ein entscheidendes Element sind. So könnte die Übertragung von Genominseln bei der Evolution der magnetotaktischen Bakterien eine wichtige Rolle gespielt haben. Eine andere Möglichkeit, die diskutiert wird, ist der parallele evolutionäre Ursprung der Magnetosomenbiomineralisation in mehreren Organismen (DeLong *et al.*, 1993).

Diese Daten zeigen, daß die *mam*-Gene in einer 130 kb Region liegen, die charakteristische Eigenschaften einer Genominsel aufweist und deshalb zukünftig als Magnetosomeninsel (MAI) bezeichnet wird. (Abbildung 3-2).

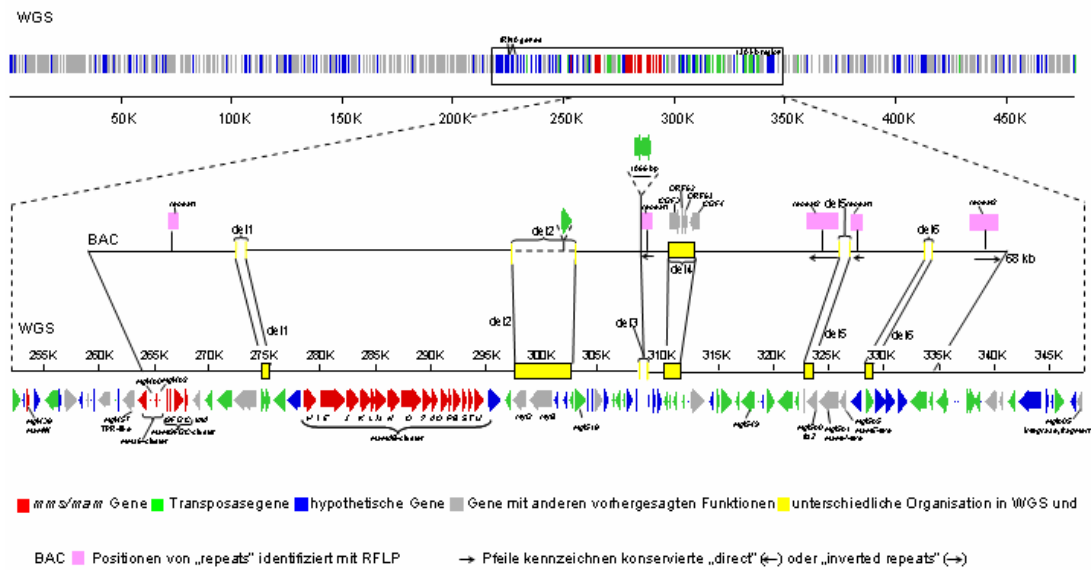


Abbildung 3-2: Genomische Organisation der Magnetosomeninsel

Dargestellt ist die „whole genome shotgun“ (WGS)-Sequenz im Vergleich zu der BAC-Sequenz. Die Hauptunterschiede sind mit del1-6 in gelb gekennzeichnet. Die *mam/mms*-Gene, Transposasegene, hypothetische Gene und andere Gene sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Wiederholungssequenzen, die mit RFLP untersucht wurden sind in rosa dargestellt. (Nach Ullrich *et al.*, 2005)

3.1.4 Sequenzvariationen in unterschiedlichen MSR-1 Subkulturen

Ein Vergleich der zuvor analysierten 68 kb großen BAC-Sequenz und des 482 kb Fragmentes der Genomsequenz machte einige Unterschiede deutlich. Die DNA dieser beiden Sequenzierungsansätze stammen aus Kulturen unterschiedlicher Passagen des Archetyps MSR-1A. Welche Sequenz die ursprüngliche ist, läßt sich jedoch nicht bestimmen. Bei einem näheren Vergleich der beiden Sequenzen zeigen sich insgesamt sechs wesentliche Unterschiede, die sich durch Deletionen, Insertionen und Substitutionen in der BAC- oder der Genomsequenz auszeichnen (Abbildung 4). So konnten z. B. einige Gene wie die zusätzlichen CDF-Transporter, die stromabwärts des *mamU*-Gens in der BAC-Sequenz identifiziert wurden, in der DNA-Sequenz, die für die Genomsequenzierung herangezogen worden war, nicht analysiert werden. Dabei war auffällig, daß diese Mutationsereignisse in unmittelbarer Nähe eines IS-Elementes, eines Repeats oder einer Kombination aus beiden liegen, bzw. diese direkt betreffen. Hypervariable Regionen wie diese wurden bereits für *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* beschrieben, bei denen diese Regionen auch an IS-Elemente gebunden waren (Bishop *et al.*, 2005). Eine Konsensussequenz, die 5' und 3' die Deletion umranden konnte daraus abgeleitet werden (CCGCCT...CTAA/G) (Manuskript 2 Tabelle 2).

3.2 Spontane Mutation des magnetischen Phänotyps

Bei der Kultivierung von *M. gryphiswaldense* MSR-1 und anderen magnetischen Isolaten fiel auf, daß es häufig zum Verlust des magnetischen Phänotyps kam. Dies äußerte sich vor allen Dingen in Stammkulturen aus Flüssigmedium, die keine Ausrichtung im magnetischen Feld mehr zeigten. Ebenso zeigten sich bei Plattierungen immer wieder weiß gefärbte Kolonien im Gegensatz zur dunkelbraunen Färbung der Wildtypkolonien.

Zur Bestimmung der Frequenz des spontanen Verlustes bzw. der Veränderung der Magnetosomen, wurden magnetische *M. gryphiswaldense* Kulturen unterschiedlich inkubiert. Unterschiede der Kulturbedingungen sollten Rückschlüsse auf Induktion und Mechanismus der spontanen Mutagenese zulassen.

3.2.1 Isolierung spontaner Mutanten unter verschiedenen Bedingungen

Bei einem kontinuierlichen Transfer magnetischer Kulturen, die aerob bzw. mikroaerob in Flaschen angezogen wurden, konnte nach 14 Tagen bzw. 46 Generationen keine Mutation des magnetischen Phänotyps detektiert werden. Hingegen zeigten aerobe und mikroaerobe Flüssigkulturen, die für drei bis vier Wochen bei 4 °C gelagert wurden eine Mutationsfrequenz von bis zu 10^{-3} . Diese Ergebnisse konnten in der Diplomarbeit von S. Ullrich bestätigt werden (Ullrich, 2004). Die Variabilität im Genom ist auch für andere Bakterien, wie z. B. *Xanthomonas oryzae* und *E. coli* bekannt und wird als Variation in der stationären Phase beschrieben. Diese wird vor allen Dingen durch Insertionssequenz-Elemente hervorgerufen (Naas *et al.*, 1994, 1995; Rajeshwari und Sonti, 2000). Es werden viele Faktoren spekuliert, die während der Inkubation in der stationären Phase einwirken und Mutationen hervorrufen (Finkel und Kolter, 1999). Zur Simulation potentiell mutagen wirkender Lagerbedingungen, wurden in der Arbeit von S. Ullrich die Kulturen unterschiedlichen Streßfaktoren (Hitze, Kälte, Nährstofflimitation) ausgesetzt, die jedoch zu keiner Stimulierung der Mutation des magnetischen Phänotyps führte. Erhöhte Eisen- und insbesondere erhöhte Sauerstoffkonzentrationen in Form von H_2O_2 hingegen bewirkte eine erhöhte Mutationsrate bis zu 10^{-2} und zeigten demnach den größten Einfluß auf eine Mutation in *M. gryphiswaldense*.

3.2.2 Isolierte Mutanten zeigen unterschiedliche Phänotypen

Ein Verlust des magnetischen Phänotyps bedeutet nicht zwangsläufig das Fehlen der Magnetosomen. Es konnten noch verschiedene andere Mutantenphänotypen beobachtet werden.

Typ A Mutanten sind unmagnetisch und haben weiße Kolonien. Ihnen fehlt die Fähigkeit zur Synthese von Magnetosomen. Ein aus der Lagerung hervorgegangener unmagnetischer Stamm von *A. Scheffel* konnte in Flüssigkultur den Wildtypstamm MSR-1 überwachsen. Dieser Stamm wurde als MSR-1B bezeichnet und wird im Weiteren noch näher untersucht. Das Vorkommen weißer Kolonien unmagnetischer Mutanten auf festem Medium wurde bereits für andere magnetotaktische Stämme wie MV-1 beschrieben (Dubbels *et al.*, 2004). Mutationsereignisse dieser Art scheinen charakteristisch zu sein für magnetotaktische Bakterien.

Zum Typ B zählen Mutanten, die eine graue Koloniefarbe aufweisen. Diese Zellen haben eine reduzierte Magnetosomenzahl (18-29 Partikel pro Zelle). Damit einhergehend, zeigten diese Zellen eine schwächere Ausrichtung im Magnetfeld (C_{mag} 0,1-1,6) als der Wildtyp (C_{mag} 1,8-2,0) wie es mittels differentieller Lichtstreuung detektiert werden konnte (Schüler *et al.*, 1995).

Mutanten, die braune spiegeleiförmige Kolonien aufweisen, zählen zum Typ C. Sie zeigen keine weiteren Unterschiede zum Wildtyp außer der Kolonimorphologie. Ein weiterer Mutantentyp, von dem lediglich eine Kolonie isoliert werden konnte wurde als MSR-1K bezeichnet. Dieser Stamm hat hellbraune Kolonien und weist weniger Magnetosomen pro Zelle auf, als der Wildtyp. Zudem haben die Magnetosomen mit 15-25 nm einen kleineren Durchmesser als der Wildtyp ($\text{\O} 42 \text{ nm}$).

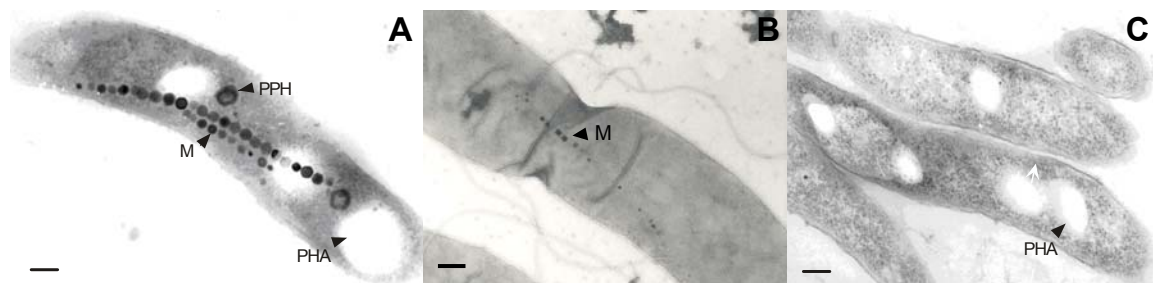


Abbildung 3-3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

A Ultradünnschnitt des Wildtyps MSR-1 mit der charakteristischen Magnetosomenkette (Maßbalken 100 nm), B Elektronenmikroskopische Aufnahme vom Stamm MSR-1K. Die Zelle zeigt eine kürzere Kette mit kleineren Magnetosomen (Maßbalken 500 nm), C Ultradünnschnitt der unmagnetischen Mutante MSR-1B. Es sind keine elektronendichten Partikel sichtbar. (Maßbalken 100 nm); M Magnetosomenkette, PHA Polyhydroxyalkanoat, PPH Polyphosphat

3.2.3 Mutanten sind genetisch divers

Nachdem die Analyse der BAC-Sequenz und der Genomsequenz gezeigt hat, daß genetische Variationen häufig an IS-Elemente gebunden sind, sollte ein Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus (RFLP) mit IS-Elementen als Sonde in einer Southernblot-Analyse, anhand der unterschiedlichen Phänotypen, ermittelt werden. Eine Bandenverschiebung eines Elementes kann durch eine Punktmutation in einer Restriktionsstelle, einer Insertion, einer Inversion, einer Duplikation, einer Transposition oder einer Deletion hervorgerufen werden. Eine Abnahme der Kopienzahl eines IS-Elementes kann die Deletion des IS-Elementes oder der DNA-Sequenz, auf der das Element lokalisiert war, als Ursache haben.

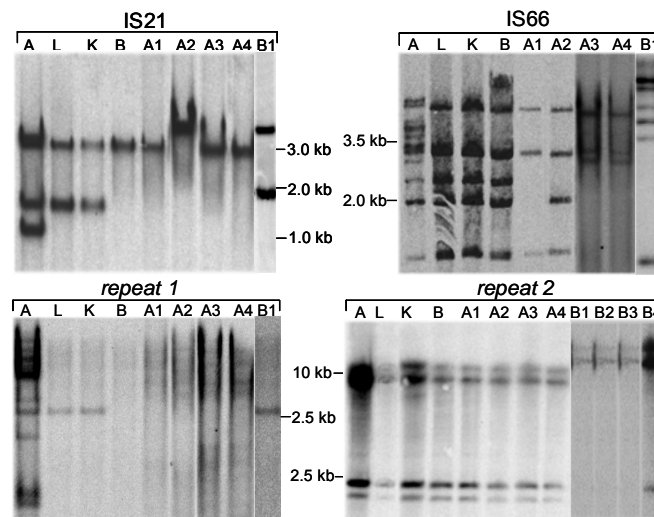


Abbildung 3-4: RFLP-Analyse unterschiedlicher MSR-1 Subkulturen und TypA und TypB Mutantenstämmen

RFLP Analyse von *EcoRI*, *EcoRV* und *MunI* verdauter genomischer DNA verschiedener MSR-1 Subkulturen und Mutantenstämmen. Die Restriktionsfragmente wurden mit $\alpha^{33}\text{PdATP}$ markierten Sonden gegen IS21, IS66, repeat1 und repeat2 hybridisiert. A MSR-1A; L MSR-1L; K- MSR-1K; B MSR-1B; A1, A2, A3, A4 TypA Mutanten; B1, B2, B3, B4 TypB Mutanten. (Nach Ullrich *et al.*, 2005)

In den benachbarten Regionen der *mam*-Gene treten insbesondere die IS-Elemente der IS21- und IS66-Familie auf. Daher wurden Sonden korrespondierend zu konservierten Bereichen dieser IS-Familien für die RFLP-Analyse eingesetzt. Der Archetyp *M. gryphiswaldense* MSR-1A trägt drei Kopien des IS21-Elements und 11 Kopien des IS66-Elements. Hingegen zeigte der Elternstamm MSR-1L, auf den die unmagnetischen Mutanten zurückgehen, nur zwei Fragmente der IS21-Familie und fünf der IS66-Familie. Während MSR-1K und die Mutanten vom Typ B sich diesbezüglich nicht vom Stamm MSR-1L unterscheiden, zeigten die unmagnetischen Mutanten vom Typ A eine Reduzierung der Kopienzahl auf ein IS21-Element und drei bis fünf IS66-

Elemente. Bei den Fragmenten der IS66-Familie zeigte sich außerdem auch eine Größenverschiebung der Fragmente (Abbildung 3-4). Da vermutet wurde, daß auch Wiederholungssequenzen, sogenannte „repeats“ rekombinatorische Ereignisse beeinflussen (Albertini *et al.*, 1982; Faure *et al.*, 2004), wurden auch zwei „repeats“, bezeichnet als repeat1 und repeat2, in der Arbeit von S. Ullrich auf ihre Verteilung im Genom hin untersucht. Der Archetyp MSR-1A enthält zehn Kopien des repeat1 Fragmentes und vier Kopien des repeat2 Fragmentes. Der Elternstamm MSR-1L wie auch die Mutantenstämme Typ B und Typ A zeigen eine reduzierte Kopienzahl auf eins bzw. null des repeat1 und auf drei des repeat2 Fragments, wobei einige Typ B Mutanten sogar nur zwei Fragmente des repeat2 aufwiesen (vgl. Abbildung 3-4). Dies verdeutlicht, daß eine Reduzierung der Genkopien durch Deletionen im Genom von *M. gryphiswaldense* vorliegen und es nur selten zu Transpositionen oder Inversionen kommt. Duplikationen im Genom konnten bei diesen Untersuchungen nicht beobachtet werden.

3.3 Charakterisierung der spontanen unmagnetischen Mutante MSR-1B

Der unmagnetische Stamm *M. gryphiswaldense* MSR-1B konnte auch nach mehreren Passagen den magnetischen Phänotyp nicht wieder herstellen. Da es sich hierbei anscheinend um eine stabile, spontane, unmagnetische Mutante handelt, sollte diese näher charakterisiert werden.

Die Koloniefarbe dieser Mutante ist wie bei allen Typ A Mutanten weiß im Gegensatz zur dunkelbraunen des Wildtyps. Das Zellpellet erscheint als rostrot ebenfalls heller. Nur etwa 0,1 % der Population des Stammes MSR-1B ist beweglich. Daher sind diese Zellen auch nicht in der Lage, die typische mikroaerotaktische Bande in Weichagarröhrchen zu bilden. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder zeigten, daß diese Zellen keine Magnetosomen produzieren. Die reduzierte Beweglichkeit geht mit dem Fehlen der Geißeln einher. Die Sequenzanalyse der 16S rDNA von MSR-1B bestätigte die Identität als *M. gryphiswaldense* und zeigte 100 % Identität zum Wildtyp MSR-1.

Auch in anderen magnetotaktischen Stämmen wie im Stamm MV-1 wurden spontane unmagnetische Mutanten beschrieben (Dubbels *et al.*, 2004). Diese wiesen jedoch einen anderen Genotyp auf als der Stamm MSR-1B. Das könnte bedeuten, daß nicht nur die Magnetosomeninsel Modifikationen unterliegt, sondern auch andere

genomische Regionen davon betroffen sind, auf denen Gene lokalisiert sind, die auch in die Magnetosomenbiomineralisation mit involviert sind.

3.3.1 Wachstum und Eisenaufnahme unter unterschiedlichen Eisenkonzentrationen

Unter mikroaeroben ($0,25 \text{ mbar O}_2$) und eisengehungerten ($<1 \mu\text{M Fe}$) Bedingungen wuchs die unmagnetische Mutante nicht signifikant langsamer. Die unmagnetische Mutante wurde jedoch unter eisengesättigten Bedingungen in ihrem Wachstum gehemmt, während das Wachstum des Wildtyps verstärkt wurde. Der intrazelluläre Eisengehalt zeigt einen signifikanten Unterschied von $1,3 \%$ des TG beim Stamm MSR-1 und $0,4 \%$ des TG bei der Mutante MSR-1B unter eisengesättigten Bedingungen. Diese Werte zeigen, daß selbst die Mutante immer noch über eine effiziente Eisenaufnahme verfügt, im Vergleich z. B. zu *E. coli* dessen Eisengehalt maximal $0,025 \%$ des TG beträgt (Hartmann und Braun, 1981).

Es wurde eine Eisenaufnahmekinetik aufgenommen, die zeigen sollte, ob der Stamm MSR-1B in der Eisenaufnahme inhibiert ist. Der Mutantenstamm MSR-1B zeigte eine deutlich reduzierte Eisenaufnahme mit $V_{\max} 0,18 \text{ nmol Fe min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ und $K_m 11,6 \mu\text{M Fe}$ im Vergleich zum Wildtypstamm $V_{\max} 0,46 \text{ nmol Fe min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$ und $K_m 21,6 \mu\text{M Fe}$. Obwohl die Produktion von Siderophoren durch *M. gryphiswaldense* nicht nachgewiesen werden konnte (Schüler und Baeuerlein, 1996), war es nicht möglich eine Eisenaufnahme in frischem Kulturmedium zu messen. Lediglich verbrauchtes Kulturmedium war, wie auch schon bei früheren Messungen, dazu in der Lage, die Eisenaufnahme der Zellen zu stimulieren (Schüler und Baeuerlein, 1996). Inhibitionsstudien mit generellen Energieinhibitoren, die zu einer Hemmung der Eisenaufnahme in Wildtyp und Mutante MSR-1B führten, deutete darauf hin, daß auch die spontane unmagnetische Mutante noch über einen energieabhängigen Fe-Aufnahmeweg verfügt.

Frühere Messungen in *M. gryphiswaldense* zeigten eine noch effizientere Eisenaufnahme ($V_{\max} 0,86 \text{ nmol Fe min}^{-1} (\text{mg TG})^{-1}$) (Schüler und Baeuerlein, 1996). Dies könnte durch stärker eisengehungerte Zellen oder andere Kulturbedingungen begründet sein. Die unmagnetische Mutante MV-1nm1 erreichte unter geringen Eisenkonzentration ($3 \mu\text{M Fe}$) eine deutlich höhere Biomasse als der entsprechende Wildtypstamm MV-1, wies jedoch einen geringeren Eisengehalt auf (Dubbels *et al.*, 2004). Der Mutantenstamm MV-1nm1 besitzt gegenüber dem Wildtypstamm

offensichtlich einen Wachstumsvorteil, den die unmagnetische Mutante MSR-1B nicht aufweist.

3.3.2 Deletion eines 40 kb großen DNA Fragmentes

Mittels biochemischer, molekularbiologischer und genetischer Untersuchungen wurde das Fehlen der Magnetosomenbiomineralisation im Stamm MSR-1B analysiert.

Da vermutet wurde, daß die Genprodukte der *mam*-Gene an der Magnetosomenbiomineralisation mit beteiligt sind, wurden mit Hilfe von PCR und Southernblot-Analyse verschiedene *mam*-Gene auf die Anwesenheit und korrekte Größe untersucht. Alle getesteten *mam*-Gene (*mamA*, *B*, *C*, *D*, *F*, *G*, *N*, *U*) konnten im Gegensatz zum Wildtyp in der unmagnetischen Mutante MSR-1B nicht detektiert werden. Zudem wurden noch weitere Gene *mms16*, *bfr1* und *bfr2* getestet, die erst kürzlich beschrieben wurden, auch mit an der Magnetitsynthese in *Magnetospirillum* AMB-1 und *M. magnetotacticum* MS-1 beteiligt zu sein (Bertani *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2001). Homologe dieser Gene wurden mit einer Ähnlichkeit von 90 % zu *mms16* und 98 % zu *bfr1* und *bfr2* im Wildtyp aber auch im Mutantenstamm MSR-1B identifiziert. Demnach erstreckt sich die Deletion im Wesentlichen über das *mamGFDC*- sowie das *mamAB*-Cluster. Um abschätzen zu können, wie groß die Deletion des DNA Fragmentes ist, wurde die genomische DNA von MSR-1 und MSR-1B mit *SwaI* und *PmeI* geschnitten und mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die berechneten Genomgrößen nach dem Verdau durch *SwaI* lagen bei 4,59 Mb für MSR-1 und 4,52 Mb für MSR-1B. Durch den Verdau mit *PmeI* wurden die Genomgrößen auf 4,63 für MSR-1 und 4,54 für MSR-1B bestimmt. Damit ergibt sich eine ungefähre Deletionsgröße von 50 bis 110 kb.

Um die Position der Deletionsstelle genauer zu bestimmen, wurde mittels PCR die umgebende Region der *mam*-Cluster in einer Größe bis 110 kb überprüft. So konnte die 5'-Position der Deletion mit dem Primerpaar SS45_f und SS47_r, 10 kb stromaufwärts des *mms*-Cluster, und die 3' Position mit dem Primerpaar SS16_f und SS17_r, 1 kb stromabwärts von *mamU*, eingegrenzt werden. Eine Sequenzierung dieser Übergangsregion mit den Primerpaaren SS39_f/SS17_r bzw. SS45_f/SS48_r im Mutantenstamm MSR-1B zeigte die genaue Deletionsstelle. Die 5'- und 3'- Randsequenzen stimmen jedoch nicht mit der oben genannten Konsensussequenz (Abschnitt 3.1.4.) überein. Nach einem Vergleich der Sequenz von MSR-1B und MSR-1 konnte die Deletion auf eine genaue Größe von 40,685 kb bestimmt werden (Abbildung 3-5).

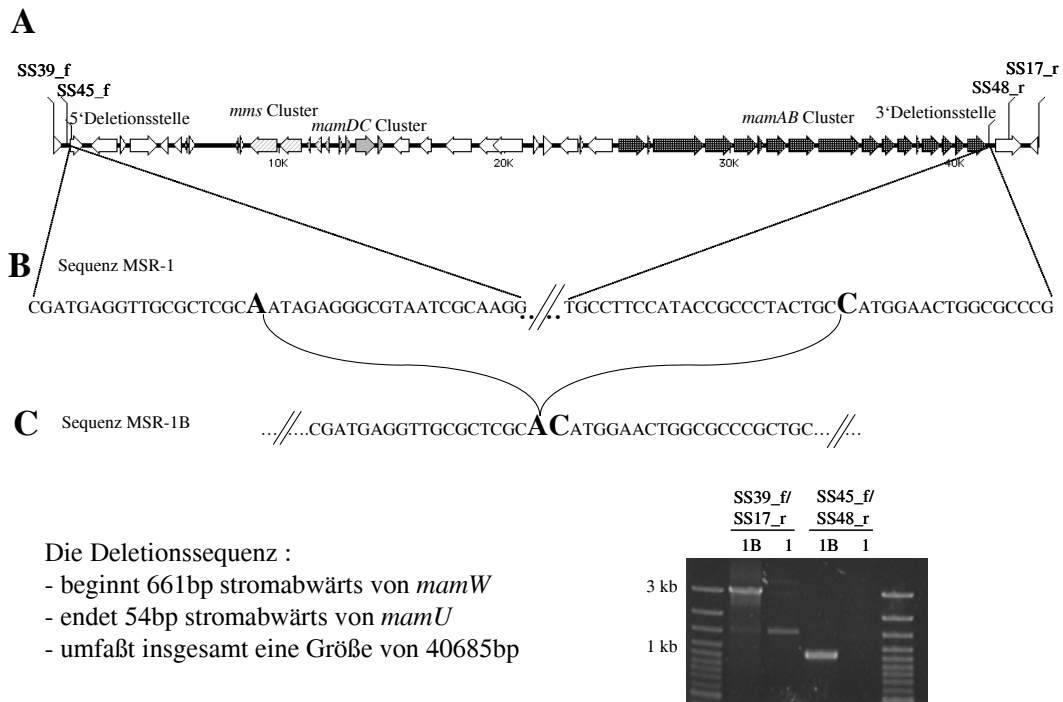


Abbildung 3-5: Deletionsregion im Stamm MSR-1B

A Genomische Organisation der *mam*- und *mms*-Gene mit eingezeichneten Primern und Deletionsstellen, **B** DNA-Sequenz des Wildtypstammes MSR-1 an den Deletionsregionen der nicht magnetischen Mutante MSR-1B, **C** durchgehende DNA-Sequenz über die Deletionsstellen des Mutantenstammes MSR-1B durch die Sequenzierung mit den Primern SS39_f/SS17_r bzw. SS45_f/SS48_r.

Andere Mutanten des Typ A, die in der Diplomarbeit von S. Ullrich untersucht wurden, zeigten ein eher mosaikartiges Deletionsmuster, das auch innerhalb der Stämme nicht einheitlich ist. Es wurde nicht die gesamte Region der *mam*- und *mms*-Cluster deletiert, sondern einzelne Gene und Fragmente wurden von der Deletion ausgeschlossen, wie z. B. die Gene *mamOP* oder *mamKLMNOP* sowie unterschiedliche IS-Elemente (Ullrich, 2004). Keine unmagnetische Mutante wies ein so durchgängiges Deletionsfragment auf, wie der Stamm MSR-1B (Manuskript 2 Abbildung 1). Dies könnte bedeuten, daß in der Mutante MSR-1B mehrere Rekombinationsereignisse gleichzeitig stattgefunden haben und in den anderen Typ A Mutanten nur einzelne. Es wäre jedoch auch denkbar, daß in den Typ A Mutanten andere IS-Elemente an den Deletionen beteiligt waren als in MSR-1B.

Die Deletion der *mam*- und *mms*-Gene in der unmagnetischen Mutante MSR-1B deutet an, daß diese Gene eine Rolle in der Magnetosomenbiomineralisation haben. Die anderen Typ A Mutanten lassen vermuten, daß einzelne Gene nicht die volle Funktion der Magnetosomensynthese übernehmen können. Die Gesamtzahl der Gene, die an dem Syntheseprozess beteiligt sind, ist jedoch unklar.

Teil II Transkriptionelle Organisation und Regulation der *mam/mms*-Gene

3.4 Transkription und Regulation der Magnetosomengene

In aquatischen Habitaten, der natürlichen Umgebung, findet man magnetotaktische Bakterien in der oxisch-anoxischen Übergangszone (Bazylinski *et al.*, 1995b; Stolz, 1993). Sie besitzen eine Magneto-aerotaxis die es ihnen erleichtert die optimalen Sauerstoffbedingungen zu finden (Frankel *et al.*, 1997). Kultivierte magnetotaktische Bakterien zeigen ebenfalls eine Aerotaxis mit einer Präferenz für geringe Sauerstoffkonzentrationen, sie sind mikroaerophil. Bereits 1985 wurde durch Blakemore und Mitarbeiter festgestellt, daß die Magnetosomenbiomineralisation durch mikroaerobe Bedingungen induziert wird (Blakemore *et al.*, 1985). Die Bakterien sind aber auch unter anaeroben Bedingungen in der Lage Magnetit zu synthetisieren (Bazylinski *et al.*, 1988). Yang und Mitarbeiter (2001) haben beschrieben, daß sowohl Sauerstoff als auch Eisen einen Einfluß auf die Synthese der Magnetosomen in *Magnetospirillum* spec. AMB-1 haben (Yang *et al.*, 2001). In *Magnetospirillum gryphiswaldense* konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Magnetitbildung ebenso von der Sauerstoffkonzentration abhängt wie von der Eisenkonzentration (Schüler und Baeuerlein, 1996, 1998). Diese Daten wurden nochmals von Heyen und Schüler 2003 bestätigt. Hier konnte sogar nachgewiesen werden, daß die Magnetitbildung erst ab einer Sauerstoffkonzentration unter 20 mbar induziert wird und die beste Bedingung bei einer Konzentration von 0,25 mbar vorliegt (Heyen und Schüler, 2003).

Die Untersuchungen der genomischen Organisation hatten gezeigt, daß die *mam*- und *mms*-Gene in Clustern colinear angeordnet sind. Diese Organisation warf die Frage auf, ob die *mam*-Gene in jeweils einem Operon organisiert sind. Außerdem sollte analysiert werden, ob diese Gene durch jeweils einen Promotor coreguliert werden oder mehrere Promotoren in der Regulation involviert sind. Eine Veränderung des magnetischen Phänotyps durch unterschiedliche Sauerstoff- und Eisenkonzentrationen konnte mehrfach beobachtet werden. Hier sollte im Folgenden geklärt werden, ob diese Veränderungen auf eine genetische Regulation zurückzuführen sind, und ob dabei die *mam*- und *mms*-Gene mit involviert sind.

3.4.1 Transkriptionelle Organisation der *mam/mms*-Gene

Für die Untersuchung der transkriptionellen Organisation sollte zum einen geklärt werden, ob die *mam*- und *mms*- Gene auf polycistronischen Transkripten liegen, zum anderen sollten die Promotoren, die diese Transkripte regulieren, identifiziert werden. Die genomische Organisation der *mam*- und *mms*-Cluster läßt die Hypothese zu, daß diese Gene als Operon transkribiert werden. Daher wurden zunächst Northernblot-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe von Northernblots ist es möglich, die Transkriptlänge und die relative Expressionsstärke der Transkripte zu ermitteln. Für die RNA-Isolierung wurden unterschiedliche Methoden wie z. B. der Aufschluß mit kleinen Glasscherben oder mit „Roti-Phenol“ (Roth), sowie dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden) ausgetestet. Die besten Ergebnisse wurden jedoch mit der Methode nach Oelmüller *et al.* 1990 erzielt (Oelmüller *et al.*, 1990). Obwohl die rRNA keine Degradierung nach dieser Methode erkennen ließ, zeigte sich beim Nachweis der *mam*-Gen-Transkripte ein Schmier der mRNA, so daß die Größe der Transkripte nicht zu bestimmen war (Daten nicht gezeigt). Dieses deutet auf einen starken Abbau bzw. Prozessierung der RNA hin, wie es in Bakterien häufiger vorkommt (Oelmüller *et al.*, 1990; Rauhut und Klug, 1999). Es ist für lange Transkripte bekannt, daß diese nur in wenigen Kopien vorliegen und leicht abgebaut und daher mittels Northernblot nur schwer nachzuweisen sind (Gupta, 1999). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Operonstruktur mittels Reverser Transkriptions (RT)-PCR nachgewiesen werden kann. Die RT-PCR ist eine sehr viel empfindlichere Methode und bietet deshalb den Vorteil, daß selbst einzelne Transkripte ausreichen, um diese auch in ihrer vollen Länge nachzuweisen.

Eine computergestützte Analyse mittels der DBTBS release 3.4 Datenbank, zeigte keine *rho*-unabhängigen Terminationsstrukturen (Makita *et al.*, 2004). Daher konnte vermutet werden, daß die *mam*-Gene in drei Operons strukturiert sind. Diese Vermutung konnte durch die Resultate der RT-PCR bestätigt werden, die jeweils ein Transkript der intergenischen Bereiche in jedem der drei Cluster zeigte. Es konnten keine Transkripte in der 5'- und 3'- Region der *mam/mms*- Gencluster nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die mRNA der Cluster nicht durch interne Terminationssignale unterbrochen werden. Damit zeigte sich die Hypothese bestätigt, daß die Magnetosomengene in drei polycistronischen Transkripten exprimiert werden und jeweils ein Operon (*mamAB*, *mamGFDC*, *mms*) bilden.

Als nächstes wurden die Transkriptionsstartpunkte aller drei Operons mittels Primerextension-Analyse, mit isolierter RNA, aus magnetischen *M. gryphiswaldense* Zellen, ermittelt. Ausgehend von den Ergebnissen der RT-PCR wurden die Transkriptionsstartpunkte jeweils stromaufwärts des ersten Gens eines jeden Operons identifiziert. Die Promotoren lagen in unterschiedlichen Abständen zum jeweiligen Translationsstartpunkt: P_{mamAB} 22 bp, $P_{mamGFDC}$ 51 bp und P_{mms} 58 bp. Die -10 und -35 Regionen zeigten eine hohe Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des σ^{70} -Promotors aus *E. coli* (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Promotorsequenzen der *mam/mms*-Gene magnetotaktischer Bakterien

Dargestellt sind die +1, -10, -35 und die jeweiligen Zwischenregionen der experimentell identifizierten Promotoren von *M. gryphiswaldense* sowie der mittels Sequenzvergleich identifizierte Promotor vor *mamH* von *M. magnetotacticum* mit der *E. coli* Konsensussequenz zum Vergleich.

Stamm (Promotor)	-35	Zwischen-region	-10	Zwischen-region	+1	Zwischen-region
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 (P_{mamAB})	TTGTCA	19 bp	TATAGT	9 bp	T	22 bp
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 ($P_{mamGFDC}$)	TTCGCT	22 bp	TAAATT	7 bp	T	51 bp
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 (P_{mms})	GGCAGA	16 bp	TAAGGT	8 bp	T	58 bp
<i>M. magnetotacticum</i> MS-1 (P_{mamAB})	TTGTCA	19 bp	TATAGT	(9 bp) ¹	(T) ¹	(90 bp) ¹
<i>E. coli</i> σ^{70}	TTGACA		TATAAT			

¹ nicht experimentell identifiziert

Für das *magA*-Gen (postuliert an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligt zu sein) im Stamm *Magnetospirillum spec.* AMB-1 wurde eine Promotorregion von ca. 300 bp beschrieben, jedoch ohne eine Angabe der Bindungsstelle der Polymerase oder des Transkriptionsstartpunktes (Nakamura *et al.*, 1995a; Nakamura *et al.*, 1995b). Somit handelt es sich bei den in *M. gryphiswaldense* ermittelten Promotoren P_{mamAB} , $P_{mamGFDC}$ und P_{mms} um die ersten beschriebenen Promotoren in magnetotaktischen Bakterien. Eine nähere Ähnlichkeit zu Promotoren weiterer α -Proteobakterien war nicht erkennbar. Ein Sequenzvergleich mit den magnetotaktischen Bakterien *M. magnetotacticum* MS-1 und Stamm MC-1 zeigte eine hohe Ähnlichkeit des Promoters P_{mamAB} zum Stamm MS-1. Die -10 und -35 Region sind hoch konserviert, lediglich die Sequenz zwischen diesen Regionen zeigt eine geringe Abweichung. Homologe zu den Promotoren $P_{mamGFDC}$ und P_{mms} konnten jedoch nicht identifiziert werden. Die Kenntnis über die *mam*-Gen-Promotoren ermöglicht in zukünftigen Expressionsversuchen die Expression unter einem nativen Promotor, z. B. für Reportergenfusionen.

Da vermutet wurde, daß zusätzlich zu P_{mamAB} noch interne Promotoren innerhalb des *mamAB*-Operons lokalisiert sind, wurden stromaufwärts der Gene *mamE*, *mamJ*, *mamK*, *mamM*, *mamO*, *mamA*, *mamB*, *mamT* und *mamU* noch weitere experimentelle Analysen durchgeführt. Mittels der Primerextension-Methode konnten jedoch keine weiteren Promotoren identifiziert werden. Somit ist davon auszugehen, daß das Transkript des *mamAB*-Operons 17 Gene von insgesamt 16,4 kb Länge umfaßt. Dabei handelt es sich um ein ausgesprochen langes Transkript, das in Prokaryoten seltener vorkommt. Obwohl auch längere Transkripte von bis zu 35 kb in *Acinetobacter spec.* beschrieben wurden (Dal *et al.*, 2005) kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, daß noch weitere Promotoren innerhalb des *mamAB*-Operons vorhanden sind, die mit dieser Methode nicht identifiziert werden konnten.

3.4.2 Regulation der Magnetosomengene durch Eisen und Sauerstoff

Die Operons *mamAB*, *mamGFDC* und *mms*, die die Gene der Magnetosomenbiomineralisation umfassen, haben zwar heterogene Promotoren, ordnen sich aber auf Grund ihrer Konsensussequenz in die Gruppe der vegetativen σ^{70} -Promotoren. Dieses könnte daraufhin deuten, daß die Gene auch einer vergleichbaren Regulation unterliegen. *M. gryphiswaldense* induziert die Magnetosomenbiomineralisation nur unter bestimmten Bedingungen. Daher ergab sich die Frage, ob die *mam*-Gene ausschließlich unter den Bedingungen, unter denen auch Magnetit synthetisiert wird, exprimiert werden oder eine generelle Transkription vorliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde *M. gryphiswaldense* unter verschiedenen Bedingungen angezogen, die die Magnetitbildung induzierenden oder inhibieren.

Eine sauerstoffabhängige Regulation der Magnetitbildung wurde in einem Sauerstoff „Shift“-Experiment in einem Oxystat Fermenter durchgeführt. *M. gryphiswaldense* wurde zunächst unter 30 mbar O_2 in eisenhaltigem Medium kultiviert. Wie erwartet synthetisierten die Zellen unter diesen Bedingungen kein Magnetit. Nach 14 Stunden wurde die O_2 -Konzentration von 30 auf 3 mbar reduziert. Diese Konzentrationsverschiebung des Sauerstoffs führte innerhalb von 1,5 Stunden zu einer Magnetitbildung, die bis zur stationären Wachstumsphase zunahm. Interessanterweise konnten zu allen Zeitpunkten Transkripte der Gene *mamA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H* und *M* mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Ein Unterschied der Expressionsstärke war mit dieser Methode nicht meßbar (Abbildung 3-6).

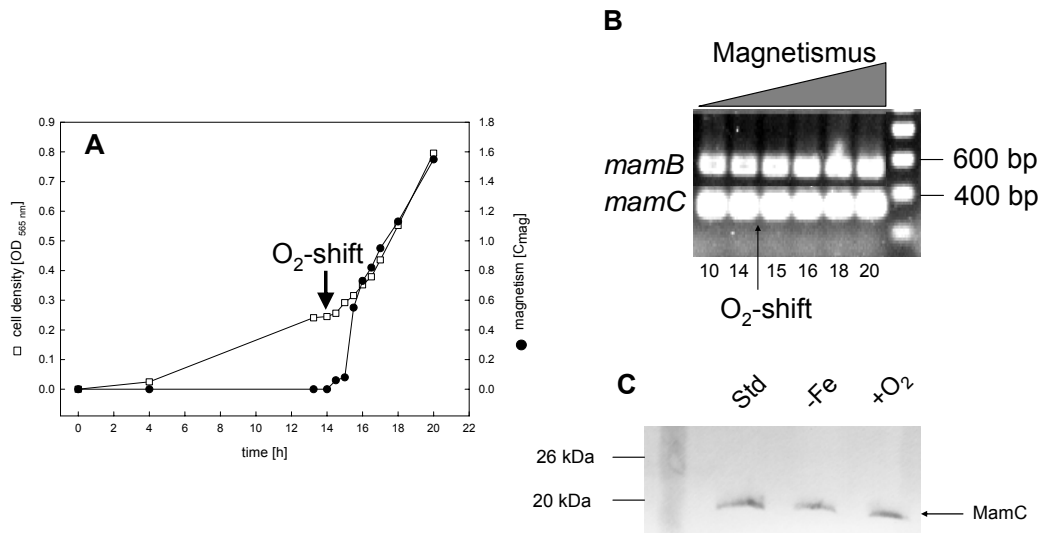


Abbildung 3-6: Expression von *mamC*/MamC und *mamB* in Abhängigkeit von Fe- und O₂-Konzentration

A Wachstum und Magnetismus des Sauerstoff „Shift“-Experimentes. Der Pfeil kennzeichnet die Konzentrationsverschiebung von 30 auf 3 mbar O₂. **B** RT-PCR beispielhaft von *mamB* und *mamC* dargestellt. Die Zahlen beschreiben die Stunden des Wachstumsverlaufs zu denen die Probe für die RT-PCR genommen wurde. Der Pfeil kennzeichnet die Zeit des Sauerstoff „Shifts“. **C** Westernblot-Nachweis von MamC in Rohextrakten aus Kulturen gewachsen unter Standard (Std) Eisenmangel (-Fe) und aeroben (+O₂) Bedingungen.

Eine Abhängigkeit der Magnetitbildung von der Eisenkonzentration wurde in Flaschenkulturen mit Konzentration von < 1 μM und 100 μM Eisen getestet. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Veränderung der Expression über den Wachstumsverlauf untersucht. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten eine konstante Expression der oben genannten *mam*-Gene. Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß die Transkriptionsinitiation ebenso unabhängig ist von der Magnetosomenbildung wie von der Wachstumsphase.

Zur Überprüfung, ob auch die Translation der *mam*-Gentranskripte unter Bedingungen eingeschaltet ist, unter denen kein Magnetit synthetisiert wird, wurden Westernblot Experimente durchgeführt. Dieses Experiment diente dem Nachweis der Expression der MMP. Dazu wurden Zellrohextrakte aus magnetisch und unmagnetisch angezogenen Zellen exemplarisch mit dem MamC Antikörper, einem der häufigsten MMP, hybridisiert. Unabhängig von der Magnetosomensynthese konnte unter allen Bedingungen das MamC Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3-6C). Demnach werden sowohl die *mam*-Gene, als auch die Mam-Proteine generell exprimiert.

Da keine Unterschiede in der Expressionsstärke der Transkripte anhand der RT-PCR zu messen waren, sollte eine mögliche Feinregulation der *mam*- und *mms*-Gene, mittels RNA-Mikroarray und „real-time“ RT-PCR gemessen werden. Diese beiden

Ansätze stellen eine empfindlichere Methode zur Quantifizierung der Expression dar. Die Analysen wurden mit der RNA derselben Kulturen durchgeführt, die im Folgenden näher beschrieben werden. Isolierte RNA aus der magnetischen Kultur ($C_{\text{mag}} 1,54$) von *M. gryphiswaldense* MSR-1, die mit 150 μM Eisen und 0,25 mbar O_2 angezogen wurde, diente als Vergleich und wird im Folgenden als Standardbedingung bezeichnet. Als Negativkontrolle diente der Stamm *M. gryphiswaldense* MSR-1B ($C_{\text{mag}} 0$), bei dem auf Grund der Deletion der *mam*- und *mms*-Gene keine Transkription dieser Gene zu erwarten war. Vergleichend wurde RNA zum einen aus Eisenmangel-Kulturen isoliert, die unter einer reduzierten Eisenkonzentration $< 1 \mu\text{M}$ und 0,25 mbar O_2 angezogen wurden, so daß die Zellen jedoch trotzdem noch schwach magnetisch waren ($C_{\text{mag}} 0,28$). Zum anderen wurde die RNA aus einer aeroben Kultur isoliert, die unter erhöhten Sauerstoffbedingungen 100 mbar O_2 und 150 μM Eisen kultiviert war, so daß die Zellen unmagnetisch ($C_{\text{mag}} 0$) waren.

Die RNA-Mikroarrays wurden in Zusammenarbeit mit C. Würdemann durchgeführt. Für diese Analyse wurden alle *mam*- und *mms*-Gene (26), benachbarte Gene innerhalb der Magnetosomeninsel sowie Gene, für die eine Eisen- und Sauerstoffregulation vermutet wurde, als Kontrolle mitgeführt, so daß insgesamt 43 Gene betrachtet werden sollten. Die Arrays wurden mittels einer „Drei-Farb-Markierung“ durchgeführt, bei der drei Zustände gleichzeitig betrachtet werden konnten. Durch die Verfügbarkeit einer isogenen Deletionsmutante MSR-1B bestand die einzigartige Möglichkeit, Sonden mit unspezifischen Hybridisierungssignalen auszuschließen. Diese Sonden wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen, so daß 15 *mam/mms*-Gene und drei mutmaßlich eisenregulierte Gene (*magA*, *bfr1*, *pbrA*) außerhalb der MAI betrachtet werden konnten. Die Ergebnisse zeigten jeweils eine negative Regulation der *mam*- und *mms*-Gene unter Eisenmangel und aeroben Bedingungen. Eisenmangel-Bedingungen führten auch bei den vermutlich an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligten Genen *magA*, ein mutmaßliches Fe(II)-Transportprotein der Magnetosomen und *bfr1*, eine Untereinheit des Bakterioferritins, zu einer negativen Regulation, obwohl zuvor eine positive Regulation dieser Gene in dem Stamm AMB-1 bzw. MS-1 beschrieben wurde (Bertani *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1995a; Nakamura *et al.*, 1995b). Verglichen mit Fe(II)-Transportern der äußeren Membran, wäre eine Hochregulation für *magA* unter eisengesättigten Bedingungen auch denkbar. Hingegen wurde der eisenregulierte Sigmafaktor *pbrA* von Sexton 1996 beschrieben hoch reguliert (Sexton *et al.*, 1996). Die Gene *bfr1* und *pbrA* zeigten keine

Regulation unter aeroben Bedingungen, hingegen wurde *magA*, entsprechend der anderen *mam*-Gene, herunter reguliert.

Um die im Mikroarray beobachtete Regulation zu verifizieren, wurden „real-time“ RT-PCR Experimente durchgeführt, die eine sensitivere und genauere Methode der Quantifizierung darstellt. Für die Berechnung des Expressionslevels wurde für jedes Gen eine Standardgerade angelegt. In diesen Wert wurde die Größe des PCR-Fragmentes mit einkalkuliert, so daß schließlich ein vergleichbarer relativer Expressionslevel erhalten wurde. Für diese Quantifizierung wurden die Gene *mgI458*, *mgI460*, *mamG*, *F*, *D*, *C*, *M*, *N*, *A*, *B*, *U* und *bfr1* ausgewählt. Die negative Regulation dieser Gene unter Eisenmangel bzw. aeroben Bedingungen wurden durch die „real-time“ RT-PCR Analysen bestätigt. Diese Experimente gaben außerdem Aufschluß über den relativen Expressionslevel der Gene, der es erlaubt, die Expressionsstärken untereinander zu vergleichen. Hierbei zeigte sich, daß von den Genen *mamF* und *mamD* mehr Transkripte vorliegen, als von den anderen untersuchten Genen. Dies scheint zunächst im Widerspruch zu der Tatsache zu stehen, daß *mamGFDC* ein Operon bilden und diese Gene daher eine vergleichbare Expression zeigen sollten. Da die Proteinexpression jedoch vergleichbar ist, könnte eine posttranskriptionale Regulation dabei eine Rolle spielen. Die negative Regulation war unter Eisenmangel-Bedingungen stärker (Unterschied 19-23-fach) als unter aeroben Bedingungen (Unterschied 2,5-4,3-fach), verglichen mit den Standardbedingungen (Abbildung 3-7). Damit wiesen die Gene der Magnetosomenbiomineralisation wie erwartet eine Regulation durch Eisen- und Sauerstoffkonzentrationsänderung in der Anzucht auf. Die Expression der Gene ist unter reduzierten Sauerstoffbedingungen und einer Eisenverfügbarkeit bis 150 µM maximal.

Die Regulation erscheint ökologisch sinnvoll, da die Magnetitbiomineralisation erst unter mikroaeroben Bedingungen induziert wird und magnetotaktische Bakterien in ihren natürlichen Habitaten ebenfalls vorwiegend in der mikroaeroben bis anaeroben Zone vorzufinden sind. Außerdem ist eine ausreichende und verfügbare Eisenquelle wichtig für die Magnetitsynthese, die auch in den untersuchten Habitaten der MTB vorgefunden wurde (Flies *et al.*, 2005a). (Die Daten dieses Kapitels sind in Publikation 3 enthalten.)

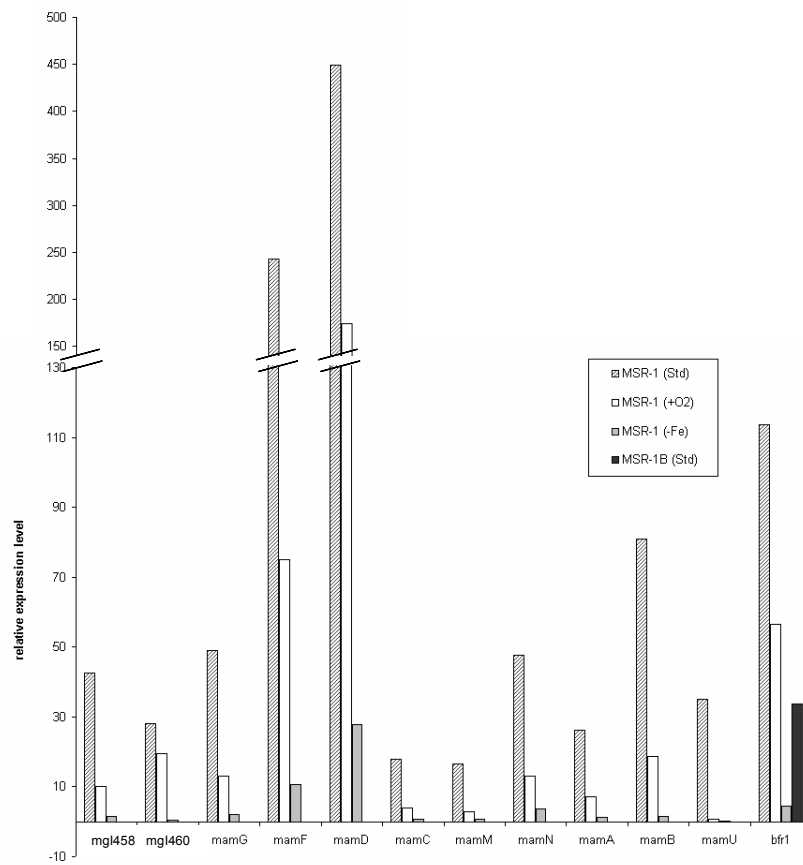


Abbildung 3-7: Expressionslevel ausgewählter Magnetosomengene und *bfr1*

Die x -Achse beschreibt die Gene, die untersucht wurden, die y -Achse gibt das relative Expressionslevel der Gene an. MSR-1 (Std)- MSR-1 kultiviert unter Standardbedingung, MSR-1 (+O₂)- MSR-1 kultiviert unter aeroben Bedingungen, MSR-1 (Fe⁻)- MSR-1 kultiviert unter Eisenmangel-Bedingungen, MSR-1B (Std)- MSR-1B kultiviert unter Standardbedingungen

Teil III Funktionelle Untersuchung eines unbekanntes Mam Proteins

MamK aus *Magnetospirillum gryphiswaldense*

(bisher unveröffentlichte Daten)

3.5 Kodiert das *mamK*-Gen eine cytoskeletale Struktur?

Die bisherige Arbeit beschäftigte sich mit der Genomanalyse von *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Dabei wurde eine Magnetosomeninsel eingegrenzt, auf der alle bisher bekannten *mam*-Gene, die in drei Clustern organisiert sind, liegen. Die Transkriptionsstudien zeigten, daß die drei *mam/mms*-Operons cotranskribiert werden. Dies bekräftigte die Vermutung, daß alle *mam/mms*-Gene in die Magnetosomenbiomineralisation involviert sind. Doch sowohl die Genprodukte, als auch die Funktion der Proteine war bisher unbekannt. Für die meisten der *mam*-Gene konnte bereits im 1D- und 2D-Proteingel das entsprechende Genprodukt nachgewiesen werden. Es war jedoch nicht klar, ob die Proteine tatsächlich beim Prozeß der Magnetosomenbiomineralisation eine Rolle spielen, da ihre Funktion noch ungeklärt blieb. Einige Mam-Proteine wie MamA, E, O, P, B und M wiesen Homologie zu Proteinen aus anderen magnetotaktischen Bakterien, aber auch zu bekannten Proteinfamilien wie TPR-Proteinen, HtrA-Serin-Proteasen und CDF-Transportern auf. Einige Proteine, wie MamH, MamI, MamK, MamL, MamP und MamU konnten jedoch noch nicht identifiziert werden (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004).

Besonders interessant schien ein *mam*-Gen, *mamK*, das Homologie zu MreB, einem aktinähnlichen, filamentbildenden Protein zeigte. MreB wurde insbesondere in *E. coli* und *B. subtilis* schon sehr intensiv untersucht. Es bildet in den prokaryotischen Zellen eine dynamische helikale Struktur entlang der Longitudinalachse der Zelle vermutlich direkt an der Cytoplasmamembran (Figge *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2003). Die Proteinfamilie der Aktine bilden ATP-abhängige ATPasen, die ADP binden und dadurch eine aktive Form annehmen. *In vitro* Experimente zeigten auch, daß sich MreB und ParM mit Hilfe von ATP zu einer einfach bzw. doppelt filamentösen Struktur polymerisieren (Möller-Jensen *et al.*, 2002; van den Ent *et al.*, 2001a). Es wurde zunächst postuliert, daß die Zellform nicht-sphärischer Zellen von den *mre*-Genen *mreBCD* abhängt und diese damit Zellform-bestimmend sind. So konnte man zeigen, daß Stäbchen wie z. B. *E. coli* und *B. subtilis* oder Spirillen, wie z. B. *Azospirillum brasilense* durch eine Mutation oder Deletion des *mreB*-Gens nur noch runde oder irreguläre Zellen ausbildeten (Doi *et al.*, 1988, Jones *et al.*, 2001, Biondi,

2004 #315). Man konnte außerdem nachweisen, daß MreB-Orthologe nur in zylindrisch oder helikal geformten Zellen vorkommen, jedoch nicht in rund geformten Zellen. Kokken und auch einige stäbchenförmige Zellen, wie z. B. Corynebakterien und Rhizobien besitzen kein aktinähnliches Protein (Margolin, 2003). Neuere Studien zeigten außerdem, daß MreB auch an der DNA-Separation und -Segregation beteiligt ist. Eine Deletion oder Mutation des *mreB*-Gens führt zu einer Inhibierung der DNA-Verteilung. Dies war nachweisbar, bevor ein Defekt der Zellform detektiert werden konnte (Defeu Soufo und Graumann, 2003, Kruse *et al.*, 2003).

Sollte *mamK* mit in die Magnetosomenbiomineralisation involviert sein, wird es vermutlich nicht am Prozeß der Magnetitsynthese beteiligt sein. Es wäre jedoch möglich, daß MamK durch Ausbildung einer ähnlichen filamentösen Struktur wie die MreB-Proteine mit für die Bildung der Kettenstruktur der Magnetosomen verantwortlich ist.

Das Gen *mamK* sollte im Folgenden auf seine Funktion hin charakterisiert werden. Dazu sollte der Phänotyp einer Δ *mamK*-Mutante, ebenso wie die Lokalisation des Proteins in der Zelle *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Auch die Eigenschaften des aufgereinigten MamK-Proteins sollten betrachtet werden.

3.5.1 Sequenzanalyse von *mamK*

3.5.1.1 Eigenschaften des vorhergesagten Mam Proteins MamK

Das Gen, das MamK kodiert, liegt im *mamAB*-Operon stromabwärts von *mamJ* und stromaufwärts von *mamL* und besitzt eine Länge von 1080 bp mit einem G+C-Gehalt von 58 %. Die Länge des abgeleiteten MamK-Proteins beträgt 360 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 39,1 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 5,44. Ein Hydrophobizitätsdiagramm nach Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) wurde mit dem Programm Protean des Softwareprogrammpaketes Lasergene 6 berechnet. Es zeigte eine diffuse Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Demnach besitzt MamK keine Transmembranhelices und ist daher wahrscheinlich kein Membranprotein. Dies könnte erklären, weshalb MamK noch nicht im Subproteom von MSR-1 gefunden wurde. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, daß das vorhergesagte MamK-Protein nicht am Prozeß der Biomineralisation beteiligt ist.

3.5.1.2 Identifizierung von MamK-Homologen in magnetotaktischen Bakterien

Die Gencluster der *mam*-Gene *mms6*, *mamDC* und *mamAB* sind in den Arten *M. magnetotacticum* MS-1, *M. gryphiswaldense* MSR-1, und dem magnetischen Kokkus MC-1 konserviert (Grünberg *et al.*, 2001). So ist auch das im *mamAB*-Cluster enthaltene MamK in anderen magnetotaktischen Bakterien vertreten. Die Anordnung der Gene im Stamm MS-1 ist identisch mit der in *M. gryphiswaldense*. Die Anordnung im Stamm MC-1 unterscheidet sich jedoch, da Homologe zu *mamJ* und *mamL* bisher nicht identifiziert werden konnten. Zwischen *mamK* und *mamM* liegen zwei Gene und zwischen *mamK* und *mamE* liegen sieben Gen anstatt jeweils eines Genes (*mamL* bzw. *mamJ*). Auf der Homepage des Joint Genome Institute (JGI) (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_micobial/html/index.html) sind die unvollständigen Genomsequenzen der Stämme MS-1 und MC-1 hinterlegt, die es ermöglichen Sequenzvergleiche durchzuführen. MamK aus *M. gryphiswaldense* zeigte 94 % Identität und 96 % Ähnlichkeit zu *Magnetospirillum magnetotacticum* und 51 % Identität und 71 % Ähnlichkeit zum Stamm MC-1. Dieser Vergleich zeigte auf, daß MamK offensichtlich eine wichtige Rolle in magnetotaktischen Bakterien einnimmt.

3.5.1.3 Sequenzvergleich von MamK mit diversen MreB- und MreB-ähnlichen Proteinen

Der Vergleich der Proteindomänen von homologen Proteinen aus anderen nah verwandten Organismen kann konservierte Domänen aufzeigen, die von Bedeutung für die Funktion der Proteine sein können. Mittels des BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) war es möglich, nach Homologen zu MamK aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* zu suchen. Es konnten nicht nur homologe MamK-Proteine aus magnetotaktischen Bakterien, und wie schon beschrieben MreB aus *E. coli* und *B. subtilis* identifiziert werden, sondern auch MreB-Proteine aus weiter entfernten Organismen, wie z. B. *Methanopyrus kandleri* und *Synechococcus elongatus*. Interessanterweise konnten sogar Paraloge zu MamK in den magnetotaktischen Bakterien gefunden werden. Alle diese Proteine zeigten im Sequenzvergleich deutlich konservierte Regionen (Abbildung 3-8).

		Phosphat 1																																													
MamKMSR1	1	-----LWIDLLARERSDKMSEGEQAKNRLF	L	G	I	D	L	G	T	S	H	T	A	V	M	T	S	R	----	G	K	K	F	L	L	K																					
MamKMS1	1	-----																																													
MamKMC1	1	-----MQSPAGNDKQLFV	G	I	D	L	G	T	S	R	T	A	I	M	T	R	----	G	V	K	T	M	V	R																							
MreBMSR1	1	-----MFPNLTGWF	S	A	D	M	A	I	D	L	G	T	A	N	T	L	V	V	K	----	R	G	I	V	L	N	E	P																			
MreBMS1	1	-----																																													
MreBMC1	1	-----MLSKLLGLF	S	T	D	M	A	I	D	L	G	T	A	N	T	L	V	V	K	----	K	G	I	V	L	S	E	P																			
MreBBsub	1	-----MFGIGARDL	G	I	D	L	G	T	A	N	T	L	V	V	K	----	K	G	I	V	V	R	E	P																							
MblBsub	1	-----MFARDIGIDL	G	T	A	N	V	L	I	H	V	K	----	K	G	I	V	L	N	E	P																										
MreBHSsub	1	-----MFQSTEIGIDL	G	T	A	N	I	L	V	S	K	N	----	K	G	I	L	N	E	P																											
MreBEc	1	MVGKVS	G	F	S	F	P	P	Q	L	S	L	S	M	L	K	F	R	G	M	F	S	N	D	L	S	I	D	L	G	T	A	N	L	I	V	V	K	----	Q	G	I	V	L	N	E	P
MreBSe	1	-----MSILRRF	S	L	S	R	D	M	G	I	D	L	G	T	A	N	T	L	V	V	S	----	K	G	I	V	L	O	E	P																	
MreBMk	1	-----MFSFG	K	K	S	E	E	K	P	E	K	S	A	I	T	N	T	L	G	I	D	L	G	T	L	N	T	V	V	A	K	P	A	G	D	----	K	F	D	Y	K	I	P				
ParM	1	-----MLVF	I	D	D	G	S	T	N	I	K	L	Q	W	Q	E	S	D	G	T	I	K	Q	H	I	S	P	N	S	F	K	R	E	W	A	V	S	F	G	K							

MamKMSR1	50	S	V	V	C	Y	P	K	D	V	I	G	----	L	K	L	L	G	R	P	Y	V	V	G	D	E	A	F	E	M	R	S	Y	L	D	R	Y	P	L	Q	D	G	V	L	S	E	I	S	D	R	I	E	V	A	R	H	L			
MamKMS1	12	S	V	V	C	Y	P	K	D	V	I	G	----	L	K	L	L	G	R	P	Y	V	V	G	D	E	A	F	E	M	R	S	Y	L	D	R	Y	P	L	Q	D	G	V	L	S	E	I	S	D	R	I	E	V	A	R	H	L			
MamKMC1	36	S	V	V	C	Y	P	K	D	I	I	G	----	V	K	L	N	N	T	V	V	I	G	O	E	A	L	D	N	Q	A	Y	L	N	L	Y	P	L	A	D	G	V	L	K	E	T	S	E	K	D	E	M	A	A	K	E	L			
MreBMSR1	37	S	V	V	A	A	E	E	K	G	K	----	K	K	V	L	A	V	G	D	E	A	K	M	L	G	R	T	P	G	Y	T	Q	A	I	R	P	L	R	D	G	V	I	A	D	E	F	V	A	E	E	M	I	K	H	F	I			
MreBMS1	29	S	V	V	A	A	E	E	K	G	K	----	K	K	V	L	A	V	G	D	E	A	K	M	L	G	R	T	P	G	Y	T	Q	A	I	R	P	L	R	D	G	V	I	A	D	E	F	V	A	E	E	M	I	K	H	F	I			
MreBMC1	37	S	V	V	A	I	H	E	S	P	R	H	----	R	K	V	L	A	V	G	N	E	A	K	R	M	L	G	R	T	P	G	N	I	V	A	T	R	P	M	R	D	G	V	I	A	D	F	T	V	T	E	A	M	L	K	H	F	I	
MreBBsub	33	S	V	V	A	L	Q	T	----	D	T	K	S	I	V	A	V	G	N	D	A	K	N	M	L	G	R	T	P	G	N	V	A	L	R	P	M	K	D	G	V	I	A	D	Y	E	T	T	A	T	M	M	K	Y	I	N				
MblBsub	30	S	V	V	A	L	D	K	N	----	S	G	K	V	L	A	V	G	E	E	A	R	R	M	V	G	R	T	P	G	N	I	V	A	I	R	P	L	K	D	G	V	I	A	D	E	F	V	T	E	A	M	L	K	H	F	I			
MreBHSsub	31	S	V	V	A	V	D	T	----	T	T	K	A	V	L	A	I	G	A	D	A	K	N	M	I	G	K	T	P	G	K	I	V	A	V	R	P	M	K	D	G	V	I	A	D	Y	D	M	T	T	D	L	L	K	H	I	M			
MreBEc	57	S	V	V	A	I	R	Q	D	R	A	G	S	P	K	S	V	A	A	V	G	H	D	A	K	O	M	L	G	R	T	P	G	N	I	A	A	I	R	P	M	K	D	G	V	I	A	D	F	F	V	T	E	K	M	L	Q	H	F	I
MreBSe	37	S	V	V	A	L	D	Q	N	----	L	K	K	P	L	A	V	G	S	E	A	K	M	L	G	R	T	P	G	S	V	A	A	L	R	P	L	R	D	G	V	I	A	D	E	D	A	A	E	L	M	I	K	H	F	I				
MreBMk	48	S	V	V	A	V	K	K	D	----	D	P	S	Y	L	A	V	G	E	E	A	K	M	L	G	R	T	P	E	D	I	I	A	V	R	P	L	R	K	G	V	I	E	S	V	A	Q	A	E	A	L	I	V	A	M					
ParM	44	K	V	F	N	Y	T	L	N	G	E	Q	Y	S	F	D	P	L	S	P	D	A	V	V	T	T	N	L	A	W	Q	Y	S	D	V	N	V	A	V	H	H	A	L	L	T	S	G	L	P	V	S	E	V	D	I	V	C	T	P	

		„Connect 1“																																																									
MamKMSR1	108	T	H	V	V	K	S	A	E	P	G	A	N	E	I	C	A	V	I	G	----	V	P	A	R	A	S	A	N	K	A	L	L	L	K	M	A	Q	E	V	V	H	T	A	L	V	V	S	E	P	F	M	V	G	Y	G	L		
MamKMS1	70	T	H	V	V	K	S	A	E	P	G	P	N	D	E	I	C	A	V	I	G	----	V	P	A	R	A	S	A	N	K	A	L	L	L	K	M	A	Q	E	V	V	H	T	A	L	V	V	S	E	P	F	M	V	G	Y	G	L	
MamKMC1	94	K	Y	V	I	S	Q	A	K	P	Q	G	D	E	Q	I	L	G	I	V	G	----	V	P	A	R	T	S	I	Y	N	K	S	Q	L	L	K	I	T	D	D	I	M	S	M	V	V	S	E	P	F	M	V	A	Y	G	L		
MreBMSR1	95	K	V	H	N	R	R	S	F	S	A	S	----	P	L	V	I	C	V	P	S	G	S	T	A	V	E	R	R	A	I	Q	E	S	A	E	S	A	G	A	R	K	V	F	L	I	E	E	P	M	A	A	A	I	G	A	G	L	P
MreBMS1	87	K	V	H	N	R	R	S	F	S	A	S	----	P	L	V	I	C	V	P	S	G	S	T	A	V	E	R	R	A	I	Q	E	S	A	E	S	A	G	A	R	R	V	F	L	I	E	E	P	M	A	A	A	I	G	A	G	L	P
MreBMC1	96	R	V	H	K	R	R	F	F	H	S	----	P	R	I	I	C	V	P	N	G	A	T	P	V	E	R	K	A	I	R	D	S	A	E	T	A	G	A	R	E	V	F	L	I	E	E	P	M	A	A	A	I	G	A	G	L	P	
MreBBsub	89	Q	A	I	K	N	K	G	M	F	T	R	K	P	Y	M	V	C	V	P	S	G	I	T	A	V	E	R	A	V	I	D	A	T	R	Q	A	G	A	R	D	A	Y	P	I	E	E	P	M	A	A	A	I	G	A	N	L	P	
MblBsub	86	K	L	N	V	K	G	L	F	S	K	----	P	R	M	L	I	C	C	P	T	N	I	T	S	V	E	Q	A	I	K	E	A	A	E	K	S	G	G	K	H	V	L	E	E	P	K	V	A	A	I	G	A	G	L	P			
MreBHSsub	87	K	A	A	K	S	I	G	M	S	F	R	K	P	N	V	V	C	T	P	S	G	S	T	A	V	E	R	R	A	I	S	D	A	V	K	N	C	G	A	K	N	V	H	L	I	E	E	P	V	A	A	A	I	G	A	D	L	P
MreBEc	117	Q	V	H	S	N	S	F	M	R	P	S	----	P	R	V	L	C	V	P	V	G	A	T	O	V	E	R	R	A	I	R	E	S	A	Q	G	A	R	E	V	F	L	I	E	E	P	M	A	A	A	I	G	A	G	L	P		
MreBSe	93	Q	V	Q	E	G	R	----	S	G	V	----	A	R	V	V	I	G	I	P	S	G	V	T	G	V	E	R	R	A	V	M	E	A	A	T	Q	A	G	A	R	E	V	Y	L	I	E	P	V	A	A	A	I	G	A	G	L	P	
MreBMk	105	M	G	A	G	D	----	S	D	S	I	D	R	I	V	I	G	I	P	G	D	A	S	E	V	E	R	N	A	V	E	E	I	G	R	K	A	G	A	N	Y	V	L	V	I	S	E	G	L	A	A	A	I	G	A	G	L	P	
ParM	104	L	T	E	Y	Y	D	R	N	----	Q	P	N	T	E	N	I	E	R	K	K	A	N	F	R	K	I	T	L	N	G	D	T	F	T	I	K	D	V																				

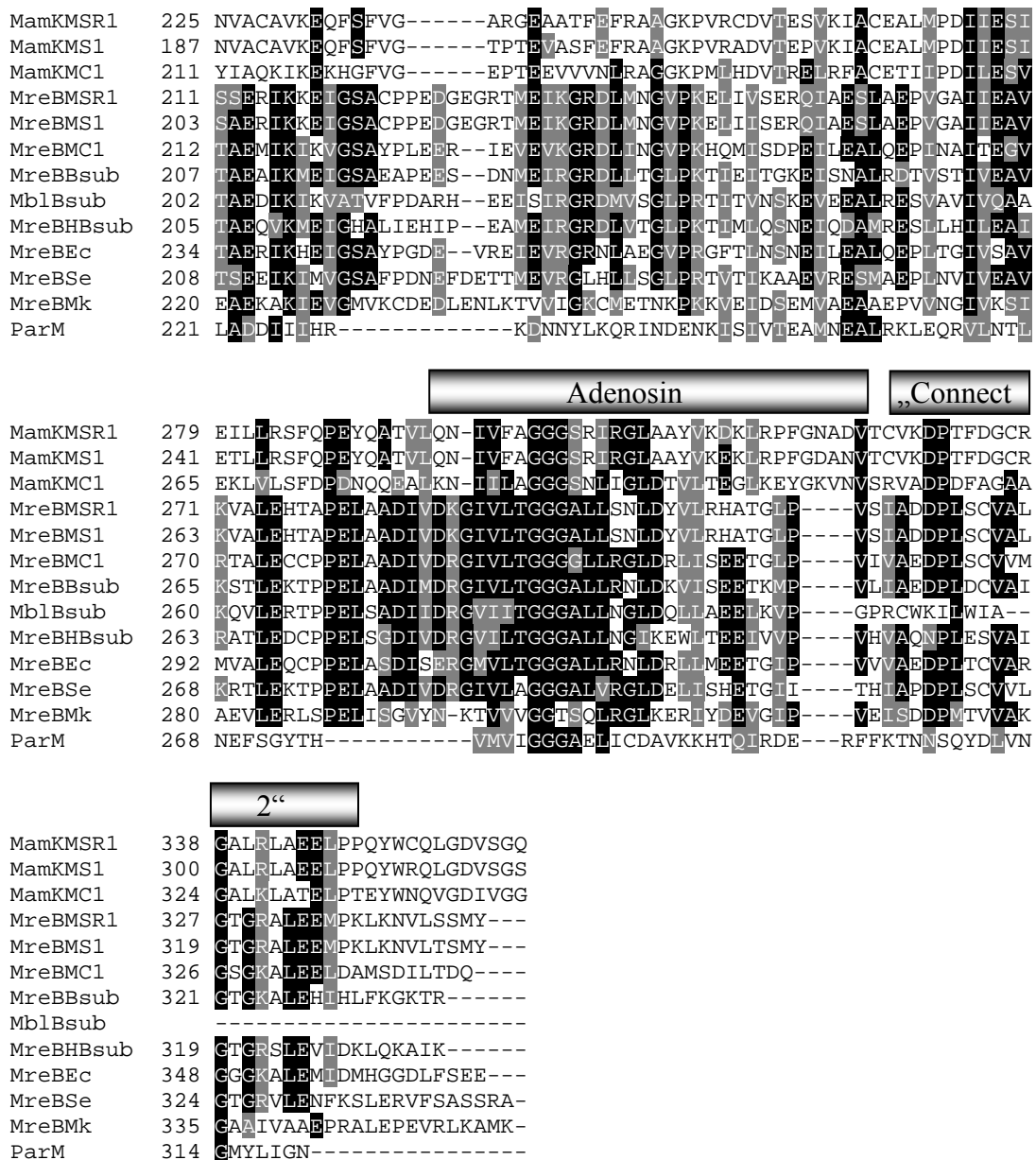


Abbildung 3-8: Sequenzvergleich diverser homologer MreB- und MreB-Proteine

Die Proteinsequenzen von 13 MreB- und MreB-ähnlichen Proteinen zeigen deutlich konservierte Regionen. Die Sequenzen wurden zunächst mit dem Programm ClustalW angeordnet und anschließend mit dem Programm Boxshade schattiert, im Internet unter der Adresse <http://www.ch.embnet.org/schattiert>. Schwarze Boxen kennzeichnen identische Aminosäuren, graue Boxen kennzeichnen ähnliche Aminosäuren. Konservierte Domänen dieser Proteinfamilie sind durch Balken gekennzeichnet (Bork *et al.*, 1992). Phosphat 1 und 2 kennzeichnen die Phosphatbindungsstellen, Adenosin, die des Adenosins, „Connect“ 1 und 2 sind die Regionen, an denen die beiden Domänen des Proteins verbunden sind. MSR1 *Magnetospirillum gryphiswaldense*, MS1 *Magnetospirillum magnetotacticum*, MC1 magnetischer Kokkus Bsub *Bacillus subtilis*, Ec *Escherichia coli*, Se *Synechococcus elongatus*, Mk *Methanopyrus kandleri*

Die Familie der aktinähnlichen Proteine zeigt fünf stark charakteristische konservierte Domänen, die anhand von 3D-Röntgenstrukturmodellen analysiert wurden (Bork *et al.*, 1992). Diese fünf Domänen, zwei phosphatbindende und eine adenosinbindende Domäne sowie zwei Verbindungsregionen, die die beiden Domänen

der Proteine verbinden, konnten auch bei dem Vergleich der hier aufgeführten MreB homologen Proteine identifiziert werden (Abbildung 3-8). Zu dieser Familie gehören neben den aktinähnlichen Proteinen MreB und FtsZ auch Hitzeschockproteine und Zuckerkinasen.

Es könnte demnach verschiedene Funktionen geben, die MamK innerhalb der Magnetosomenbiomineralisation einnimmt. Eine Möglichkeit wäre die Stabilisierung der Magnetosomen in einer Kettenstruktur durch die Ausbildung helikal gewundener Filamente. Alternativ wäre eine chaperonähnliche Funktion denkbar, Proteine der Magnetosomenmembran korrekt zu falten. Eine ganz andere Funktion, die keine Ähnlichkeit zu den bisher bekannten Funktionen der MreB-Familie zeigt, wäre auch möglich. Um Aufschluß darüber zu bekommen, welche Funktion MamK einnimmt, war es sinnvoll einen Baum berechnen zu lassen, der die Ähnlichkeitsverhältnisse der Proteine darlegt (Abbildung 3-9).

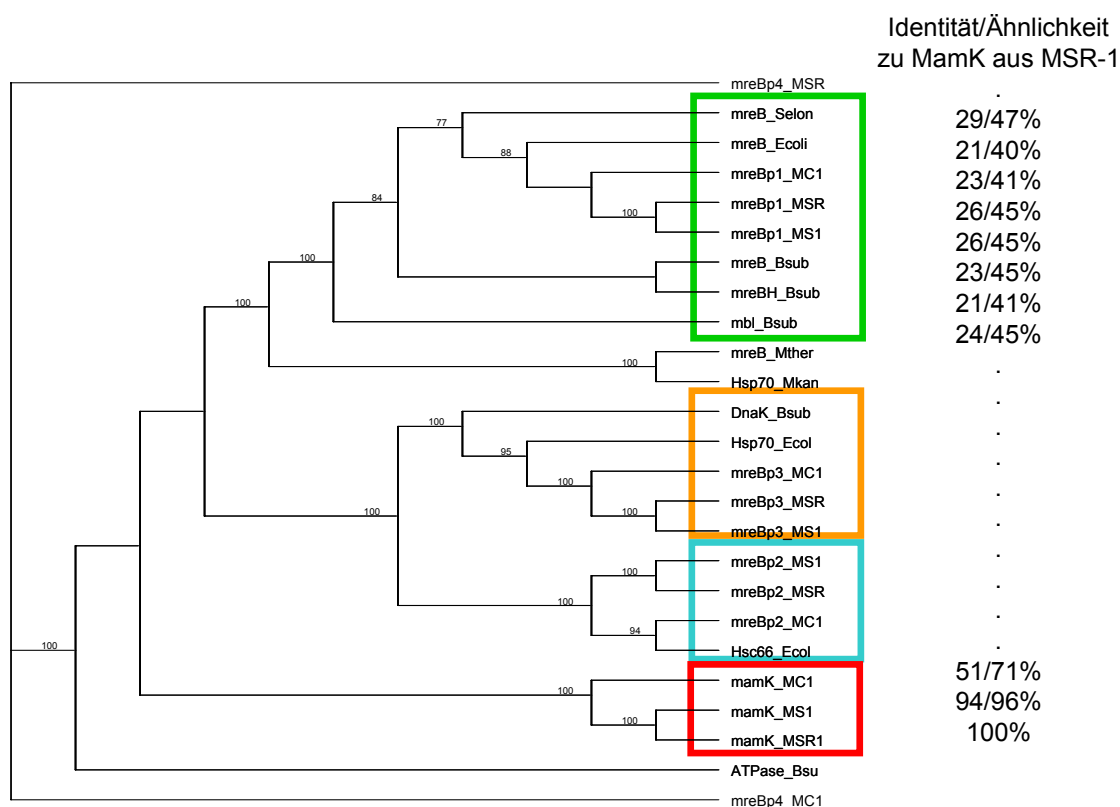


Abbildung 3-9: Baumdiagramm zur Veranschaulichung der Ähnlichkeit von MamK-Homologen

Das Baumdiagramm wurde mit dem Softwareprogramm MacVector 7.0 berechnet. Die Boxen kennzeichnen die vier unterschiedlichen Gruppen, zu denen sich die Proteine gliedern. Die Prozente geben die Identität bzw. Ähnlichkeit zu MamK aus MSR-1 wider. Selong *Synechococcus elongatus*, Ecoli *Escherichia coli*, Bsub *Bacillus subtilis*, Mther *Methanothermobacter thermautotrophicus*, Mkan *Methanopyrus kandleri*, MC1 magnetischer Kokkus, MSR *M. gryphiswaldense*, MS1 *M. magnetotacticum*.

Dieses Baumdiagramm veranschaulicht, daß die MamK-Orthologen der magnetotaktischen Bakterien eine eigene Gruppe bilden. Wie unterschiedlich MamK im Vergleich zu den MreB-Proteinen ist verdeutlichen die eingezeichneten Prozente. MamK aus *M. gryphiswaldense* zeigt eine höhere Verwandtschaft zu magnetotaktischen Bakterien, als zu den anderen Bakterien. Die drei weiteren MreB-Paralogen der magnetotaktischen Bakterien bilden eine Gruppe mit MreB-Proteinen oder mit unterschiedlichen Hitzeschockproteinen. Das MreBp1-Protein aus *M. gryphiswaldense* zeigt auch eine nähere Verwandtschaft zu MreB aus *B. subtilis* mit 59 % Identität und 77 % Ähnlichkeit. Interessanterweise wurde auch im Genom von Stamm MC-1 ein zu *mreB*-homologes Gen nachgewiesen, obwohl diese Art kokkoide, d. h. sphärische Zellen besitzt und MreB bisher nur in nicht sphärischen Zellen nachgewiesen wurde.

Aus diesen Analysen ergab sich, daß das MamK der magnetotaktischen Bakterien vermutlich zu der Familie der aktinähnlichen Proteine gehört, in dieser Familie jedoch eine eigene Gruppe bildet und damit verbunden vermutlich auch eine andere Funktion einnimmt. Welche Funktion das MamK-Protein in der Magnetosomenbiomineralisation einnimmt, sollte in weiteren Mutations- sowie Lokalisationsexperimenten analysiert werden.

3.6 Funktionsuntersuchung mittels einer Gendeletion

Eine Deletion des *mamK*-Gens sollte Aufschluß darüber geben, ob das Genprodukt für die Magnetosomenbiomineralisation essentiell ist und welche Funktion es hierbei ausübt. Da die genomische Analyse dieser Arbeit gezeigt hat, daß *mamK* mit den anderen Genen des *mamAB*-Operons cotranskribiert wird, sollte die Deletion unmarkiert sein, um polare Effekte zu vermeiden. Die Mutation in MSR-1 sollte mittels homologer Rekombination erzeugt werden (Schultheiss und Schüler, 2003).

3.6.1 Konstruktion einer Δ *mamK*-Deletionskassette

Für die Konstruktion einer Deletionskassette wurden die das Gen 5'- und 3'-flankierenden DNA-Regionen per PCR aus chromosomaler DNA amplifiziert und in einen entsprechenden Suizidvektor eingesetzt. Über homologe Rekombination sollte das *mamK*-Gen mit dem Deletionskonstrukt ausgetauscht werden. Als Suizidvektoren wurde sowohl der pK19*mobsacB* als auch der pCM184 Vektor gewählt. Klone, die auf den pK19*mobsacB* Vektor zurückgehen, konnten zunächst nur durch Kanamycin auf

Insertionsmutanten selektiert werden. Erst durch die Expression des *sacB*-Gens, durch das die Klone sensitiv gegen Saccharose werden, kann auf ein doppeltes Rekombinationsereignis selektiert werden. Die Selektion der Klone, die auf den Vektor pCM184 zurück gehen, erfolgte mit dem *cre-loxP* System (Marx und Lidstrom, 2002), das von Gärdes 2005 für *M. gryphiswaldense* etabliert wurde. Die flankierenden Genregionen wurden so in den Vektor eingesetzt, daß sie eine Kanamycinkassette flankierten. Somit erhielt man zunächst eine markierte Deletionsmutante. Zwischen der Antibiotikakassette und den flankierenden DNA-Regionen befanden sich *loxP*-Erkennungsstellen, die von der *Cre*-Rekombinase, des Vektors pCM157, erkannt werden. Die Kanamycinkassette konnte durch diese herausgeschnitten werden und eine *loxP*-Erkennungsstelle bleibt zurück. Dadurch entsteht eine unmarkierte Deletionsmutante.

Das 5'- und 3'- Fragment von *mamK* für das Deletionskonstrukt des Suizidvektors pK19*mobsacB* wurde mit den Primern 5'*mamK*XbaI_f/5'*mamK*SmaI_r bzw. 3'*mamK*SmaI_f/ 3'*mamK*HindIII_r amplifiziert, mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut und in den *XbaI/HindIII* geöffneten Vektor pUC19 in einer 3-Stück Ligation eingesetzt. Es entstand das Plasmid pSS14. Dieses Deletionskonstrukt wurde als *XbaI/HindIII*-Kassette ausgeschnitten und in den Vektor pK19*mobsacB* eingesetzt. Das so entstandene Plasmid wurde als pSS19 bezeichnet.

Für den Vektor pCM184 wurden die Primer 5'*creloxMunI_f*/5'*creloxKpnI_r* für das 5'-Fragment verwendet. Das die 5'-Flanke enthaltende Plasmid wurde als pSS28a bezeichnet. In dieses Plasmid wurde anschließend die 3'-flankierende Region, amplifiziert mit den Primern 3'*creloxApaI_f* und 3'*mamKpWM91SacI_r*, eingebracht. Dieses Konstrukt erhielt die Bezeichnung pSS28.

Das Deletionskonstrukt des Plasmids pSS19 enthält lediglich das Start- und das Stop-Codon von *mamK*. Für das Deletionskonstrukt des Plasmids pSS28 wurden die Regionen 5'- und 3'- 100bp innerhalb des Gens verlagert, um mögliche Regulationsstellen, die für die anderen Gene des *mamAB*-Operons relevant sein könnten, mit zu erfassen (vgl. Abbildung 3-10).

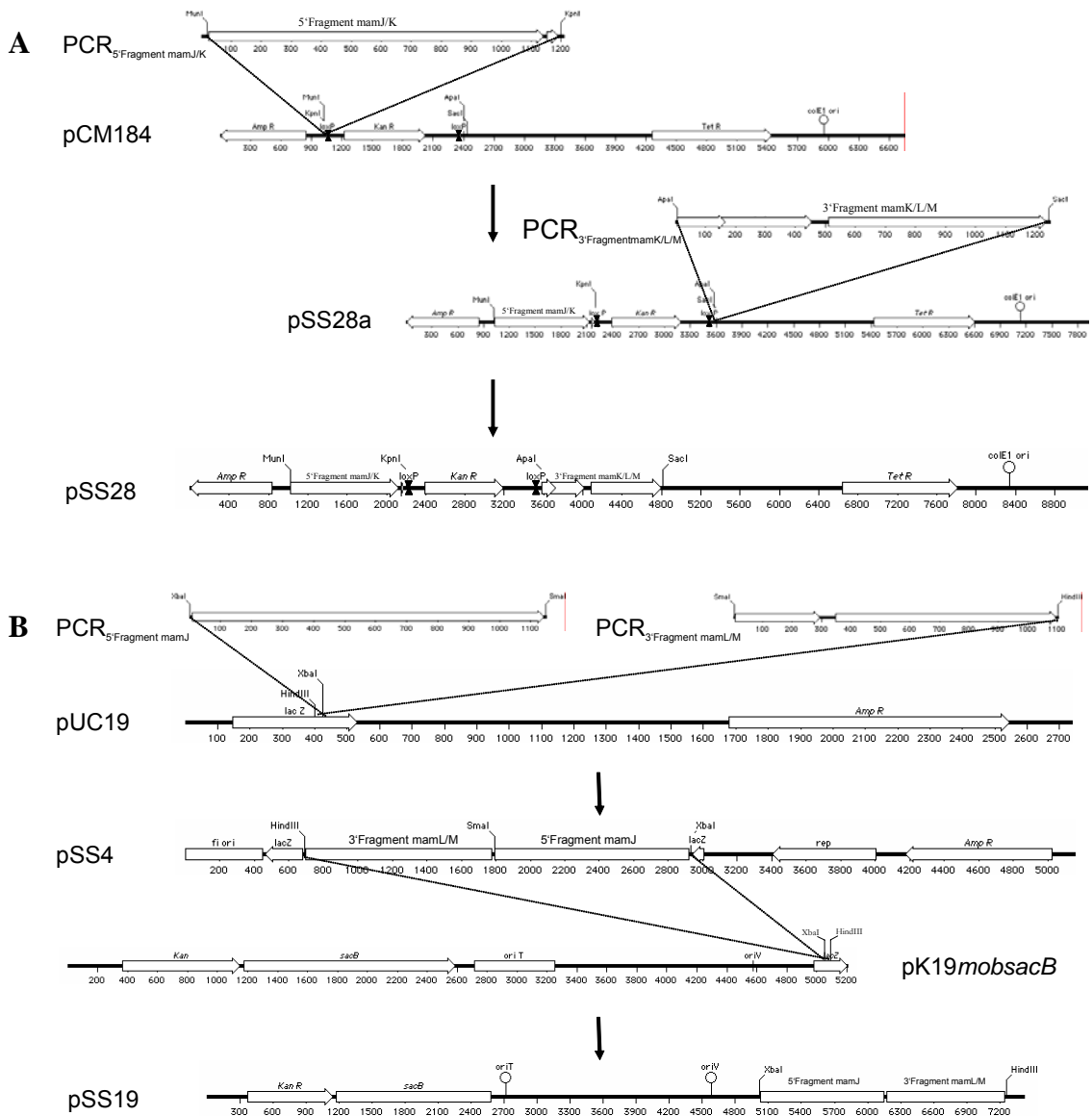


Abbildung 3-10: Herstellung der Deletionskonstrukte für die $\Delta mamK$ -Mutante

A Herstellung des Deletionskonstruktes im Vektor pCM184 mit der *cre-loxP*-Erkennungsstelle
 B Herstellung des Deletionskonstruktes $\Delta mamK$ im Vektor pK19mobsacB mit *sacB* als Selektionsmarker.

Die Plasmide pSS19 und pSS28 wurden in den Donorstamm *E. coli* BW29427 transformiert. Die so entstandenen Stämme wurden als SS19 und SS28 benannt. Diese wurden für die Konjugation wie in Schultheiss und Schüler (2003) beschrieben mit dem Empfängerstamm *M. gryphiswaldense* R1/S6 zusammengeführt. Die Selektion der Klone erfolgte wie oben beschrieben. Die Konjugationen des Stammes SS28 ergab aufgrund einer phänotypischen Veränderung des Donorstammes nur 5 Klone. Dieses ist zurückzuführen auf eine ungewöhnliche Schleimbildung des Stammes BW29427, die eine effiziente Plasmidübertragung verhinderte. Diese Mutanten mußten nun

hinsichtlich ihres Genotyps getestet werden, ob es sich um Insertions- oder Deletionsmutanten handelt.

3.6.2 Nachweis der Deletion/Insertion mittels PCR und Southernblot

Der Nachweis auf eine Deletions- oder Insertionsmutante erfolgte mittels PCR und Southernblot. Dabei wird überprüft, ob das Plasmidrückgrat und das Wildtypallel mit der *mamK*-Genkassette durch ein doppeltes Rekombinationsereignis aus dem Chromosom deletiert wurde, oder die jeweiligen Plasmide pSS19 bzw. pSS28 ins Genom von *M. gryphiswaldense* integriert waren.

Zunächst erfolgte eine Kontrolle mittels PCR mit den Primern mamJ_SSf und mamL_SSr. Das Bild des Agarosegels zeigte sowohl bei dem Stamm SSM19 als auch SSM28 zwei Banden. Dies bedeutet, daß ein Amplifikat dem Wildtypallel, das andere dem Mutantenallel entspricht. Daraus läßt sich schließen, daß es sich noch um Insertionsmutanten handelt.

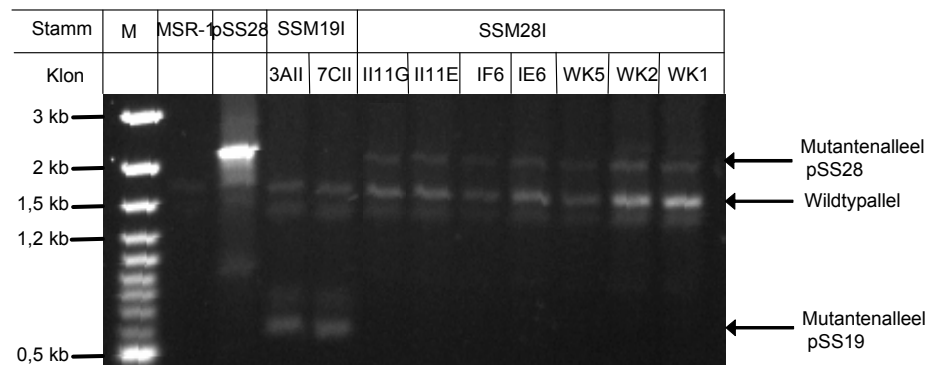


Abbildung 3-11: Kontrolle der Insertionsmutanten mittels PCR

Es wurden die Primer mamJ_SSf und mamL_SSr verwendet. Die 1,8 kb Bande zeigt das Wildtypallel, das auch bei MSR-1 erkennbar ist. Die 2,2 kb Bande entspricht dem Deletionskonstrukt wie es auch in der Kontrolle der Plasmid DNA von pSS22 zu erkennen ist. Die 600 bp Bande entspricht dem Mutantenallel des Plasmids pSS19, indem *mamK* deletiert ist.

Der Southernblot-Nachweis sollte zusätzlich bestätigen, daß es sich bei den Klonen um Insertionsmutanten handelt. Als Sonde wurde ein 300 bp Fragment der Region mamL/mamM gewählt. Die genomische DNA der Insertionsmutantenstämme sowie des Wildtyps MSR-1 zur Kontrolle wurden *EcoRI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Der erhaltene Phosphorscan ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

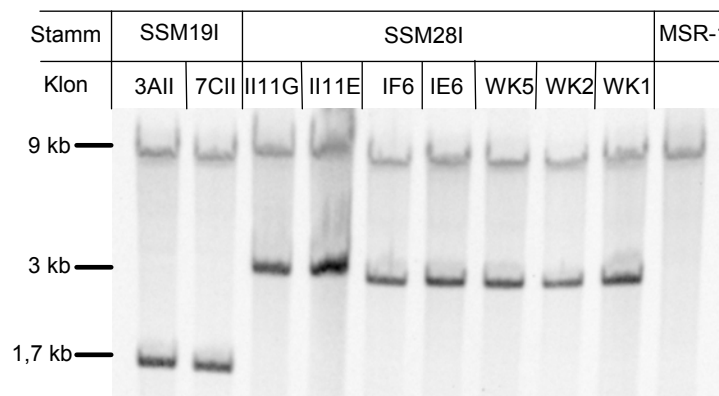


Abbildung 3-12: Southern-Analyse zur Kontrolle der Insertionsmutanten

Die *EcoRI* verdaute genomische DNA der Stämme MSR-1 und SSM19I und SSM28I wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. MSR-1 WT diente dabei als Kontrolle. Die Hybridisierung des Filters erfolgte gegen das radioaktiv markierte 300 bp große *mamL/mamM* PCR Fragment.

Der Southernblot zeigte erneut zwei Signale für die Insertionsmutanten. Das Signal bei ca. 9 kb entsprach dem Wildtypallel. Dieses trat auch in den Kontrollen auf. Das entsprechend kleinere Fragment entsprach dem Mutantenallel. Damit konnte eindeutig belegt werden, daß bei diesen Insertionsmutanten noch kein zweites homologes Rekombinationsereignis stattgefunden hat.

Es wurde weiterhin versucht bei diesen Insertionsmutanten durch das Transferieren der Kulturen (Stamm SSM19) bzw. Antibiotikaselektionsdruck (Stamm SSM28) ein zweites Rekombinationsereignis herbeizuführen. Obwohl weit mehr als 1000 Klone sowohl für den Stamm SSM19 als auch für den Stamm SSM28 mittels Replikaplattierung und PCR auf eine Deletion hin untersucht wurden, konnten bisher nur Insertionsmutanten erhalten werden. Dies könnte darin begründet sein, daß die Fragmente für die homologe Rekombination an DNA Bereiche binden müssen, die stabile Sekundärstrukturen bilden und dadurch die Rekombination erschweren.

Beide Insertionsstämme SSM19 und SSM28 sind unmagnetisch und beweglich. Da diese Stämme bisher noch das Wildtypallel enthalten und demnach das *mamK*-Genprodukt noch exprimiert werden sollte, kann noch keine Aussage über die vermutliche Funktion von MamK getroffen werden. Zudem kann durch die Insertion des Plasmids der Leserahmen des Operons durchbrochen werden, wodurch die nachfolgenden Gene und damit die Magnetosomenbiomineralisation außer Funktion gesetzt sind.

3.7 Rekombinante Herstellung des MamK-Proteins

Da das Genprodukt von *mamK* nicht bekannt war, sollte die rekombinante Überexpression des Proteins es ermöglichen, *in vitro* Experimente mit dem gereinigten Protein durchzuführen. Diese umfaßten Lokalisationsstudien ebenso wie Interaktionsstudien. Zur Isolierung von MamK wurde das Protein mit einer kurzen Aminosäuresequenz, in diesem Falle dem so genannten Strep-Tag, fusioniert, anschließend in einem induzierbaren Vektor heterolog überexprimiert und mittels einer geeigneten Matrix, an die das Fusionsprotein bindet, in diesem Falle dem Strep-Tactin, isoliert.

3.7.1 Expressionsnachweis des Fusionsproteins im Westernblot

Für den Nachweis der Translation des Fusionsgens sollten die Plasmide pSS8 (N-terminale Strep-Tag Fusion) und pSS9 (C-terminale Strep-Tag Fusion) heterolog in *E. coli* überexprimiert und die exprimierten Proteine im Westernblot nachgewiesen werden. Der Rohextrakt der oben beschriebenen Kulturen wurde gelelektrophoretisch größenfraktioniert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Fusionsnachweis wurde mit Hilfe der Strep-Tag Horseradish Peroxidase analysiert (Abbildung 3-13).

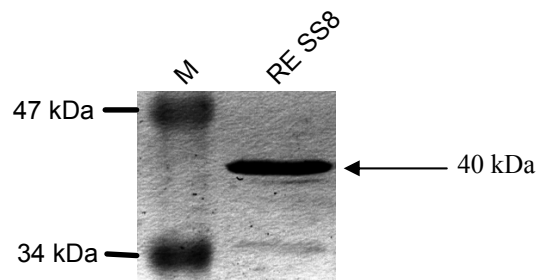


Abbildung 3-13: Immunologischer Nachweis der Expression und Stabilität der Strep-Tag-MamK-Fusion

Das Plasmid pSS8 wurde in den Stamm BL21 exprimiert. Je 20 µg Gesamtprotein wurde auf ein 12 %iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Die Strep-Tag fusionierten Proteine konnten dann mittels der anti-Strep-Tag Antikörper, die konjugiert mit der Horseradish Peroxidase (HP) vorlagen, und einem geeigneten Nachweissubstrat nachgewiesen werden. Das theoretische Molekulargewicht des Fusionsproteins ist angegeben. M Größenmarker, RE Rohextrakt vom Stamm SS8

Das Signal der Strep-Tag-MamK-Fusion zeigte die erwartete Größe von 40 kDa. Das bedeutet, daß das Fusionsprotein vollständig transkribiert und translatiert wurde und das Fusionsprotein ausreichend stabil für anschließende Polymerisierungsversuche und die Antikörperbildung war. Bei einem nachträglichen oder vorzeitigen Abbruch der

Transkription oder Translation wäre das resultierende Genprodukt nicht nachweisbar oder entsprechend kleiner, wie bei dem Stamm SS9. Der immunochemische Nachweis zeigte ebenso wie das SDS-Proteingel zusätzlich zu MamK noch ein verkürztes MamK-Protein, was sich in einer Doppelbande auf der Membran bzw. dem SDS-Gel verdeutlichte. Dieses Fusionsprotein war deshalb nicht für die weiteren Versuche verwendbar. Daher sind alle folgenden Versuche ausschließlich mit dem Stamm SS8 weitergeführt und gezeigt.

3.7.1.1 Reinigung des Strep-Tag Fusionsproteins

Für die Reinigung des Fusionsproteins wurde der Rohextrakt von jeweils 200 ml Kultur des Stammes SS8 verwendet. Dieser wurde über die Strep-Tactin MacroPrepmatrix gegeben. Die anschließende Elution erfolgte in acht Fraktionen zu je 1 ml. Abbildung 3-14 zeigt das Proteingel der unterschiedlichen Fraktionen.

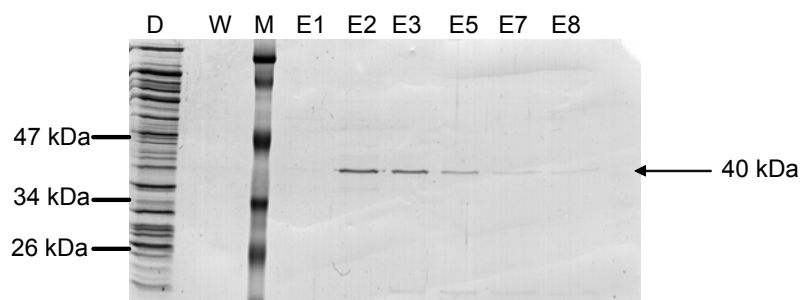


Abbildung 3-14: SDS-PAGE unterschiedlicher Fraktionen der Reinigung des Strep-Tag-MamK Proteins

Der gewaschene und mittels Ultraschallsonde aufgeschlossene Rohextrakt aus 200 ml Kultur wurde über eine Strep-Tactin MacroPrepmatrix gegeben und der Durchfluß D aufgefangen. Die Stringenzwäsche erfolgte mit den Puffern W und W 500 und der Waschfluß wurde aufgefangen. Die Elution erfolgte mit dem Puffer E in 8 Fraktionen (E1-8). Jeweils 5 µl dieser Fraktionen wurden auf ein 12 %iges Gel aufgetragen und aufgetrennt. M Größenmarker.

Das Proteingel verdeutlicht, daß nur wenige Proteine des Rohextraktes von der Strep-Tactin Matrix gebunden wurden. Mit der Stringenzwäsche wurden nur sehr wenige ungebundene bis leicht gebundene Proteine von der Matrix entfernt. Die eigentliche Elution des MamK-Proteins begann erst bei der 2. Fraktion der Elution und erstreckte sich bis zur 8. Fraktion. Nach der Reinigung aus 200 ml Kultur erhielt man 200 µg gereinigtes MamK-Protein gelöst in 7 ml Puffer. Diese Lösung wurde mittels Zentrifugation aufkonzentriert. Jedoch wurde ein Teil der Proteinlösung während der Einengung vermutlich im Durchfluß verloren, so daß 3 l Kultur nötig waren um 1 – 1,2 mg gereinigtes MamK-Protein, gelöst in 1 ml Puffer, zu erhalten.

3.7.2 Polymerisierung des MamK-Proteins

Das isolierte MamK-Protein ermöglicht nun die Durchführung unterschiedlicher funktioneller Untersuchungen. Interaktionsstudien mit gereinigten Magnetosomen wären ebenso denkbar wie Interaktionsanalysen mit weiteren gereinigten Mam-Proteinen oder isolierten DNA-Regionen. Diese könnten Rückschlüsse auf die Funktion in der Magnetosomenbiomineralisation geben.

In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, daß MreB, ParM und FtsZ-Proteine zu hochmolekularen Polymeren polymerisieren können. Diese Polymerisierung erscheint im Elektronenmikroskop als lange filamentartige Strukturen (Möller-Jensen *et al.*, 2002; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; van den Ent *et al.*, 2001a).

Falls MamK ähnliche Funktionen besitzt, muß auch dieses Protein hoch molekulare Polymere bilden. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollten *in vitro* Polymerisierungsversuche durchgeführt werden. Zunächst sollte ein Pelletierungsassay durchgeführt werden. Dazu wurden 200 µg/ml MamK-Protein in Polymerisierungspuffer mit 2 mM ATP bzw. 2 mM GTP sowie ohne Zugabe von Nukleotiden als Kontrolle bei 37 °C 10 min inkubiert. Die Komplexe, die sich in dieser Zeit gebildet haben sollten, sind groß genug, um durch Zentrifugation bei 140000g und 15 min in einer Tischultrazentrifuge zu pelletieren (Pellet nicht sichtbar). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet solubilisiert. Beides wurde auf ein Proteingel aufgetragen und aufgetrennt. Das Coomassie gefärbte Gel ist in Abbildung 3-15 dargestellt.

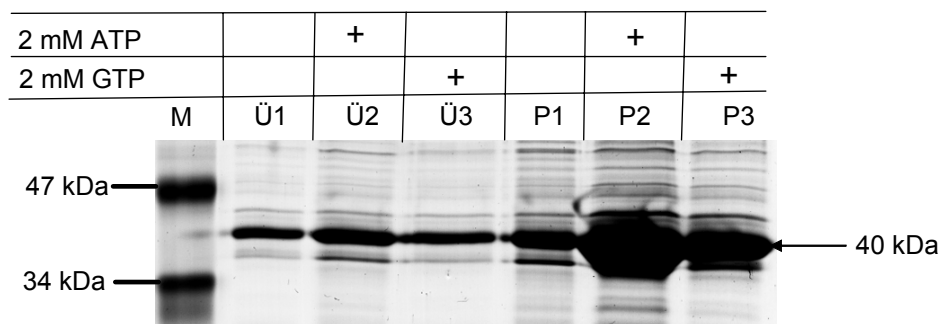


Abbildung 3-15: Untersuchung der Polymerisierung von MamK

MamK wurde in der An- und Abwesenheit von ATP und GTP für 10 min bei 37 °C inkubiert. Überstand und Pellet wurden separat mittels SDS-PAGE analysiert. Das Bild zeigt das Coomassie gefärbte Gel. M Größenmarker, Ü Überstand, P Pellet,

Das Proteingel zeigt eine Anreicherung des MamK-Proteins vor allen Dingen im Pellet, jedoch auch im Überstand. Daher ist das MamK-Protein offensichtlich

tatsächlich dazu in der Lage, zu polymerisieren und Aggregate zu bilden, so daß es durch Zentrifugation pelletiert werden konnte. Es zeigt sich jedoch auch, daß MamK nicht vollständig pelletierte, da sowohl in der Anwesenheit von ATP als auch in der Anwesenheit von GTP immer noch Proteinrückstände im Überstand verblieben. Auch die Kontrolle ohne Zugabe von ATP oder GTP zeigte die Komplexbildung des MamK Proteins, wenn auch nicht von so großer Intensität wie durch die Zugabe von ATP. Es ist erstaunlich, daß die Polymerisierung offensichtlich nicht von der Anwesenheit von Nucleotiden abhängig ist, da die Polymerisierung von MreB Proteinen als ATP-abhängig beschrieben wurde (Möller-Jensen *et al.*, 2002; Mukherjee und Lutkenhaus, 1998; van den Ent *et al.*, 2001a).

Um die Polymerisierung zu optimieren, wurden die Temperatur (30 °C und RT) und die Dauer (5-30 min) der Inkubation sowie die Konzentration der Nucleotide (4 mM) variiert. Es konnte jedoch unter keiner dieser Bedingungen eine Verbesserung der Polymerisierung beobachtet werden. Eine zu lange Inkubation des Proteins kann auch dazu führen, daß die Filamente wieder dissoziieren, da die Polymerisierung ein dynamischer Prozess ist (Mukherjee und Lutkenhaus, 1998).

Die Probe aus den *in vitro* Polymerisierungs-Assays wurde weiterhin für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Unterschiedliche Probenansätze wurden auf ein Grid gebracht und mittels Uranylacetat negativ kontrastiert. Es waren jedoch keine filamentartigen Strukturen von Proteinen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Da mittels der Proteingele eine Pelletierung des Proteins nachgewiesen wurde, die nur durch eine Polymerisierung möglich ist, konnte das Protein entweder nicht richtig auf dem Grid haften, so daß es abgespült wurde, oder die Auflösung war zu gering, so daß die Proteinstrukturen nicht erkennbar waren.

3.8 Intrazelluläre Lokalisierung von MamK *in vitro* und *in vivo*

Die Lokalisation eines Proteins kann Hinweise auf seine Funktion geben. So war es im Falle von MamK interessant, ob es an die Magnetosomen gebunden oder assoziiert ist. Dieses würde daraufhin deuten, daß es an der Assemblierung der Membran, der Kettenstruktur oder Ähnlichem beteiligt ist.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte das MamK-Protein nicht durch proteinbiochemische Analysen im Subproteom der Magnetosomenmembranproteine nachgewiesen werden (Grünberg *et al.*, 2004). Proteomstudien, die in Zusammenarbeit mit B. Voigt und T. Schweder aus Greifswald durchgeführt wurden, zeigten eine

Analyse der löslichen Proteinfraction von MSR-1 mittels 2D-Gelelektrophorese im pH Bereich 4-7. Unter den dabei untersuchten Proteinen konnte das MamK-Protein als einziges Magnetosomenprotein identifiziert werden. (Abbildung 3-16). Daher läßt sich vermuten, daß es sich bei MamK vermutlich um ein cytoplasmatisches Protein handelt, das nicht oder nicht ausschließlich mit der Magnetosomenmembran (MM) assoziiert ist.

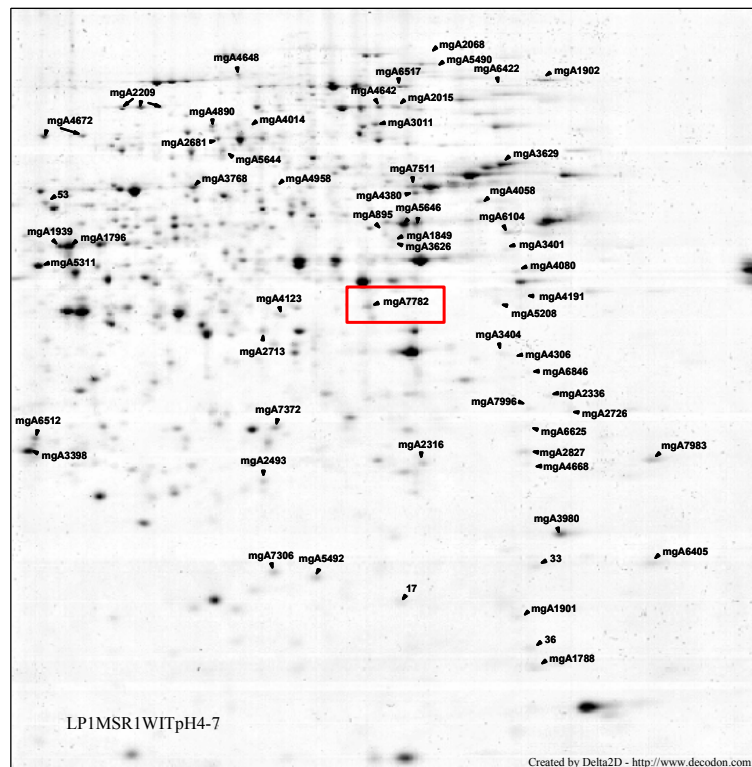


Abbildung 3-16: 2D-Gelelektrophorese der löslichen Proteine von *M. gryphiswaldense*

Die lösliche Proteinfraction von MSR-1 wurde in einem pH Bereich von 4-7 aufgetrennt. Das Gel wurde mittels Silberfärbung angefärbt. Das rote Kästchen kennzeichnet das Protein, das mittels MALDI-TOF-MS Analyse als MamK identifiziert wurde. Gelbild von B. Voigt und T. Schweder aus Greifswald.

EGFP („*enhanced green fluorescent protein*“) ist ein häufig genutztes Protein, das u. a. zur Lokalisierung von Proteinen in Eukaryoten, wie auch in Bakterien benutzt wird (Lewis und Errington, 1996; Margolin, 1998, 2000; Webb *et al.*, 1995). Auch der Nachweis der Struktur und Lokalisierung der MreB-Proteine erfolgte über GFP-Fluoreszenz (Defeu Soufo und Graumann, 2003; Jones *et al.*, 2001), ebenso wie die Lokalisierung eines Magnetosomenmembranproteins im Stamm *Magnetospirillum* AMB-1 (Komeili *et al.*, 2004) und *M. gryphiswaldense* (Scheffel *et al.*, eingereicht). Deshalb sollte die Assoziation an die MM *in vitro* durch Westernblot -Experimente mit dem Anti-MamK Antikörper und *in vivo* durch eine Fusion des MamK mit dem fluoreszierenden Protein EGFP untersucht werden.

3.8.1 Immunochemischer Nachweis der Expression von MamK in unterschiedlichen Zellfraktionen

Für den Nachweis der intrazellulären Lokalisierung wurde der Zellrohextrakt einer magnetisch angezogenen *M. gryphiswaldense* Kultur wie in Grünberg *et al.* 2001 beschrieben in die löslichen-, Membran- und Magnetosomenmembran- Proteine fraktioniert. Diese drei Fraktionen und zusätzlich der Zellrohextrakt von MSR-1 sowie MSR-1B zur Kontrolle wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit dem Immunsereum Anti-MamK als primären und einem Anti-Kaninchen als sekundären Antikörper. Dieser war an eine alkalische Phosphatase (AP) konjugiert und konnte mit einem geeigneten Nachweisreagenz nachgewiesen werden (Abbildung 3-17).

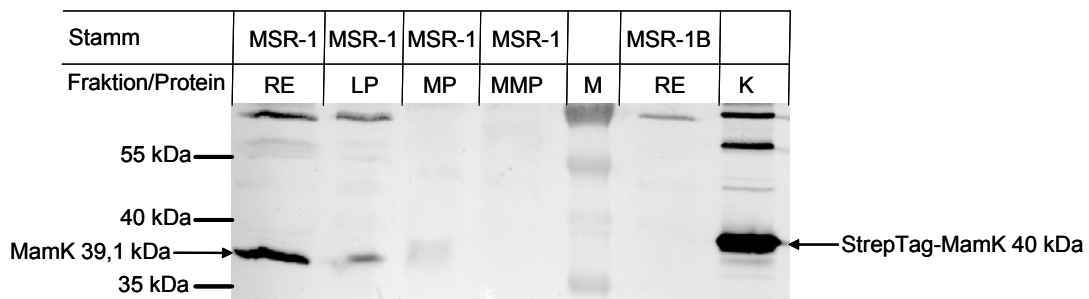


Abbildung 3-17: Immunologischer Nachweis von MamK

M. gryphiswaldense wurde ca. 16 Stunden in einer mikroaeroben 11 FSM Flaschenkultur angezogen. Nach Aufschluß mit der French Press wurde der Rohextrakt wie in Grünberg *et al.* 2001 beschrieben in lösliche, Membran- und Magnetosomenmembranproteine fraktioniert. Die enthaltene Proteinkonzentration wurde bestimmt, die Extrakte denaturiert und je 20 µg Gesamtprotein auf ein 12 %iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Das Anti-MamK enthaltene Immunsereum diente dabei als primärer Antikörper. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe sekundärer Anti-Kaninchen Antikörper, die konjugiert mit einer Alkalischen Phosphatase vorlagen, und mittels eines geeigneten Nachweisreagenz nachgewiesen werden konnten. RE Rohextrakt, LP lösliches Protein, MP Membranprotein, MMP Magnetosomenmembranprotein, M Größenmarker, K gereinigtes Strep-Tag-MamK Protein.

Der Nachweis zeigte im Rohextrakt des Wildtyps MSR-1, der als Positivkontrolle diente, ein deutliches Signal des MamK-Proteins. MamK liegt hauptsächlich im Cytosol, d. h. in der löslichen Proteinfraction vor. Ein schwaches Signal war auch in der Membranfraction zu erkennen, das eine schwache Assoziation des MamK an Membranproteine andeuten könnte. Es ist jedoch auch möglich, daß die Membranfraction durch eine unsaubere Trennung der Fraktionen, mit Proteinen der löslichen Fraction beim Zellaufschluß verunreinigt war. In der Magnetosomenmembranfraction sowie im Rohextrakt der unmagnetischen Mutante MSR-1B konnte wie erwartet kein MamK-Signal nachgewiesen werden. Das Signal bei ca. 80 kDa ist

offensichtlich unspezifisch, da es auch im Stamm MSR-1B sichtbar war. Die Fraktionen des gereinigten MamK-Proteins enthielten noch *E. coli*-Proteine, die bei der Reinigung nicht eliminiert werden konnten und mit der Aufkonzentration eine Kreuzreaktion mit dem Immunserum zeigten.

3.8.2 Konstruktion der *mamK-egfp*-Genfusionen

Die Fusion des MamK mit EGFP sollte am C-Terminus des Proteins erfolgen. Der Vorteil dieser Position wäre die Kontrolle des *egfp*-Gens durch den nativen MamK-Promotor. Um keinen Kopienzahleffekt zu erhalten, sollte sowohl eine Fusion in einem replizierenden Vektor für eine *in trans* Expression als auch eine Fusion in einem nicht replizierenden Suizid-Vektor zur chromosomalen Integration konstruiert werden.

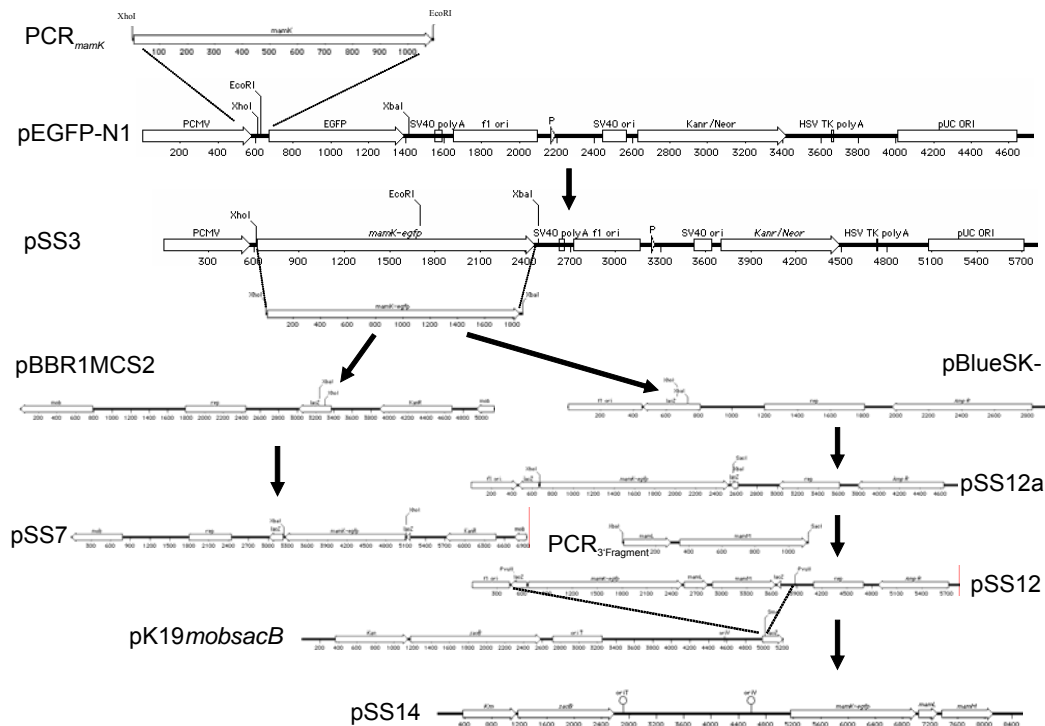


Abbildung 3-18: Konstruktion der *mamK-egfp*-Fusionsplasmide

Dargestellt ist die Fusionierung des *mamK* Gens mit dem *egfp* Gen in dem Vektor pEGFP-N1 und die anschließende Ligation in den replizierenden mobilisierbaren Vektor pBBR1MCS2. Für die chromosomale Integration des Fusionsgens war ein 3' homologer Bereich für die doppelt homologe Rekombination nötig (pSS12). Dieses neue Konstrukt konnte in den nicht replizierenden mobilisierbaren Vektor pK19mobsacB ligiert werden.

Das *egfp*-Gen, das für eine besonders effiziente GFP-Variante codiert, war auf dem Vektor pEGFP-N1 lokalisiert. Das *mamK*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden CTGmamKXhoI_SSf und oStopmamKEcoRI_SSr aus chromosomaler DNA

amplifiziert, gereinigt und mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *EcoRI* geschnitten. Das PCR-Fragment wurde in den ebenfalls *XhoI/EcoRI* geöffneten Vektor eingesetzt und ergab das neue Plasmid pSS3 (*mamK-egfp* Fusionsgen). Aus dem Plasmid pSS3 konnte die *mamK-egfp*-Fusionskassette mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/XbaI* in den Vektor pBBR1MCS2 transferiert werden. Das so erzeugte replizierende Plasmid wurde als pSS7 (*mamK-egfp Kan*) bezeichnet (Abbildung 3-18).

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß das vorliegende Plasmid zu einem hinreichend starken Fluoreszenzsignal führte (vgl. Abbildung 3-12), konnte das Konstrukt für eine integrierte Fusion konstruiert werden. Dazu wurde die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/XbaI* freigesetzte Genfusionskassette in den ebenso geschnittenen Vektor pBlueSK- eingesetzt und ergab das neue Plasmid pSS12a. Das noch erforderliche 3'- Fragment (*mamL/M*) wurde aus genomischer DNA mit dem Primerpaar EGFPmamLXbaI_f/ EGFPmamMSacI_r amplifiziert, gereinigt und die Restriktionsschnittstellen durch Endonukleasen aktiviert. Dieses geschnittene 3'- Fragment (*mamL/M*) wurde in das zuvor konstruierte Plasmid pSS12a, das ebenfalls *XbaI/SacI* geschnitten war, inseriert. Es entstand das Plasmid pSS12, das flankierend zum *egfp*-Gen den 5'-Bereich des *mamK*-Gen und den 3'-Bereich des *mamL/mamM*-Bereich enthält (vgl. Abbildung 9). Die 5'- und 3'-Fragmente sind für die chromosomale Integration durch homologe Rekombination notwendig. Dieses Konstrukt konnte als *PvuII* Kasette aus dem Plasmid freigesetzt und in den mit *SmaI* blund-end geöffneten Vektor pK19*mobsacB* eingesetzt werden. Das ergab das Plasmid pSS14 (*mamK-egfp-mamL/mamM Kan mob sacB*), das für die Übertragung in *M. gryphiswaldense* MSR-1 zur Verfügung stand.

Das Plasmid pSS7 wurde in den Donorstamm *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) und pSS14 in den Donorstamm *E. coli* BW29427 (B. Wanner) transformiert und es entstanden die neuen Stämme SS7 bzw. SS14. Diese Stämme wurden für die Konjugation jeweils mit dem Empfängerstamm *M. gryphiswaldense* R1/S6 und SS7 zusätzlich mit der unmagnetischen Mutante MSR-1B R1/S6, zur Kontrolle, zusammengeführt und die Konjugation wurde wie in Schultheiss 2003 beschrieben durchgeführt. Die Selektion der Klone erfolgte auf Kanamycin. Die Konjugation mit dem Stamm SS7 führte zum Stamm *M. gryphiswaldense* SSM7 bzw. mit MSR-1B den Stamm SSMB7, die jeweils eine *in trans mamK-egfp* Genfusion enthielten. Der Stamm SSM7 war magnetisch und beweglich, SSMB7 war unmagnetisch und unbeweglich. Die Konjugation mit dem Stamm SS14 führte zunächst zu Insertionsklonen, durch

homologe Rekombination des 5'- oder des 3'-Fragmentes. Um einen Selektionsdruck für das zweite homologe Rekombinationsereignis auszuüben wurden die Insertionsklone auf Medium mit Saccharose aufgebracht. Auf diesem Medium konnten nur die Klone Kolonien bilden, die das Plasmidrückgrat, auf dem das *sacB* Gen lokalisiert ist, durch Rekombination verloren hatten. Diese Klone können keine Levansucrase mehr synthetisieren und sind demnach nicht mehr sensitiv gegen Saccharose. Die so erhaltenen Klone wurden mittels *whole cell* PCR mit dem Primerpaar mamK_SSf/mamL_SSr auf das Vorhandensein des *egfp*-Gens bzw. den Verlust des Plasmidrückgrats hin getestet (nicht gezeigt). Ein positiver Klon konnte daraus selektiert werden und bildete den magnetischen, jedoch nur schwach beweglichen *M. gryphiswaldense* Stamm SSM14.

3.8.2.1 Nachweis der chromosomalen *egfp* Integration im Southernblot

Für den Nachweis der korrekten Insertion des *egfp*-Gens in das Genom, wurde ein Southernblot-Experiment durchgeführt. 100 µg *EcoRI* verdaute genomische DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Kappilarblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Sonden gegen das *egfp*-Gen und den Bereich mamK/mamL wurden $\alpha^{33}\text{PdATP}$ markiert und über Nacht hybridisiert. Der Phosphorscan ist in Abbildung 3-19 dargestellt.

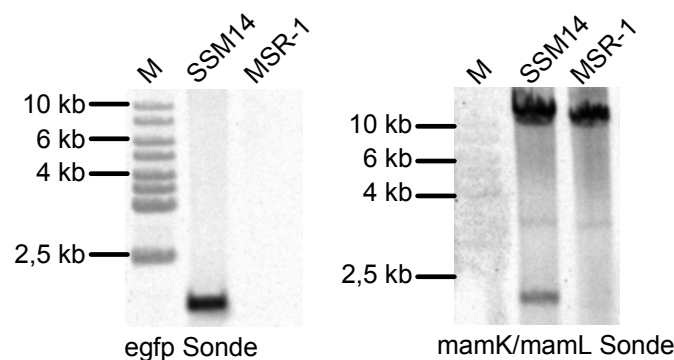


Abbildung 3-19: Southern-Analyse zum Nachweis der chromosomalen *mamK-egfp*-Genfusion

Die *EcoRI* verdaute genomische DNA der Stämme MSR-1 und SSM14 wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. MSR-1 WT diente dabei als Kontrolle. Die Hybridisierung des Filters erfolgte gegen das radioaktiv markierte 300 bp große *egfp* bzw. das 300 bp großen *mamK/mamL* PCR Fragment.

Der Southernblot zeigte eindeutig das Signal der *egfp*-Sonde bei dem Stamm SSM14, jedoch nicht bei der Wildtyp Kontrolle. Die Sonde *mamK/mamL* zeigte zwei Signale beim Stamm SSM14, da zwischen *mamK*- und dem *egfp*-Gen eine *EcoRI* Schnittstelle eingefügt wurde. Diese ist beim WT nicht vorhanden, der deshalb nur ein Signal zeigte.

3.8.2.2 Expressionsnachweis einer MamK-EGFP-Proteinfusion mittels Immunoblot

Durch den Southernblot konnte gezeigt werden, daß das *egfp*-Gen korrekt in das Chromosom inseriert wurde. Es sollte jedoch auch noch nachgewiesen werden, daß die beiden Gene *mamK* und *egfp* zusammen transkribiert und translatiert werden und die Fusion nicht zu instabil ist und es zu Abbrüchen kommt. Der Expressionsnachweis sollte im Westernblot sowohl mit Antikörpern gegen das EGFP als auch gegen MamK erfolgen. Die Zellen für die Fraktionierung der Proteine wurden vom Festmedium genommen, da die Zellen des Stammes SSM14 die Eigenschaft haben, nur zu fluoreszieren, wenn sie auf Festmedium kultiviert wurden, nicht aber in Flüssigmedium. Es ist bekannt für einige GFP-Fusionen, die nur auf bestimmten Medien oder unter bestimmten Bedingungen fluoreszieren. So erreicht eine MamC-EGFP Fusion erst nach längerer Lagerung ihre volle Fluoreszenz (C. Lang mündliche Mitteilung). Diese Zellen vom Stamm SSM14, die von der Platte geerntet wurden, sind jedoch nicht magnetisch genug, um Magnetosomen isolieren zu können und man erhält demnach auch keine Fraktion der Magnetosomenmembranproteine. Die Untersuchung des Westernblotexperimentes beschränkt sich deshalb auf die Membran-, und löslichen Proteine sowie den Rohextrakt. Als Kontrolle dienen die Rohextrakte von MSR-1 und MSR-1B (Abbildung 3-20).

Das Signal der MamK-EGFP Fusion des Anti-GFP Antikörpers war deutlich bei 70 kDa erkennbar. Dieses entspricht der Fusion von MamK (39,1 kDa) und EGFP (30 kDa). In den Kontrollen des Rohextraktes von MSR-1 und MSR-1B war wie erwartet kein Protein nachweisbar. Auch der Anti-MamK Antikörper zeigte ein Signal der Proteinfusion bei 70 kDa. Im Rohextrakt des Wildtyps MSR-1 war das Signal von MamK bei 39,1 kDa erkennbar. Die Zellextrakte von MSR-1 und MSR-1B zeigten bei 70 kDa ein unspezifisches Signal wie bereits in Abschnitt 3.9.1 beschrieben (vgl. Abbildung 3-15).

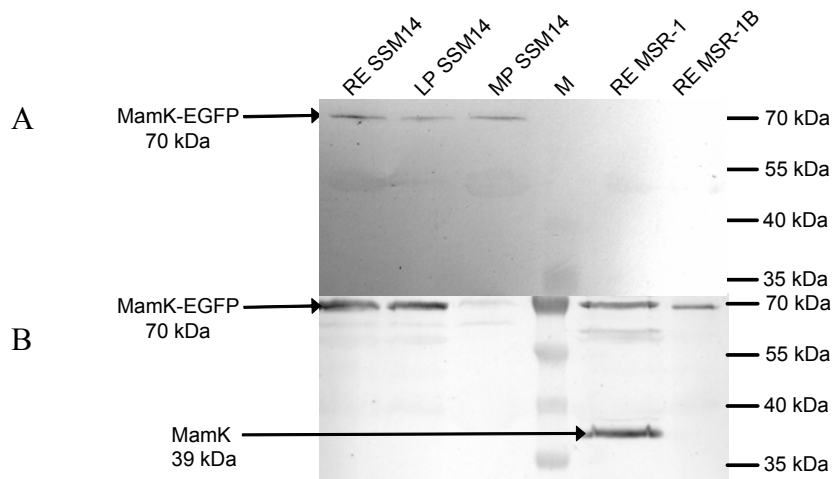


Abbildung 3-20: Immunologischer Nachweis der Expression und Stabilität der MamK-EGFP-Proteinfusion

M. gryphiswaldense SSM14 wurde von der Kulturplatte gespült und in Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Isolierung der Proteinfractionen erfolgte wie in Grünberg *et al.* 2001. Es wurden je 20 µg Gesamtprotein auf ein 12 %iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Das Anti-GFP (A) bzw. Anti-MamK (B) enthaltene Immunsereum diente dabei als primärer Antikörper. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe sekundärer Anti-Kaninchen Antikörper, die konjugiert mit einer Alkalischen Phosphatase vorlagen, und mittels eines geeigneten Nachweisreagenz nachgewiesen werden konnten. RE Rohextrakt, LP lösliches Protein, MP Membranprotein, M Größenmarker.

Der immunologische Nachweis zeigte, daß das Fusionsprotein stabil translatiert wurde. Damit konnte gezeigt werden, daß das EGFP-Signal von einem Fusionsprotein mit MamK stammt und nicht unspezifisch durch gespaltenes, im Cytosol gelöstes EGFP Protein hervorgerufen wurde.

3.8.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung des Fusionsproteins

Die Kulturen von SSM7 und SSM14 sowie SSMB7 wurden mit sterilem Medium (FSM) vom Festmedium gespült und resuspendiert. Für die Färbung der Zellmembranen wurde der Farbstoff FM4-64 mit einer Endkonzentration von 1 µM hinzugefügt. Von dieser gefärbten Zellsuspension wurden ca. 8 µl auf einen zuvor dünn mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Das so vorbereitete Präparat wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und nach der Durchsicht mehrerer Präparate ausgewählte, repräsentative Zellen fotografiert.

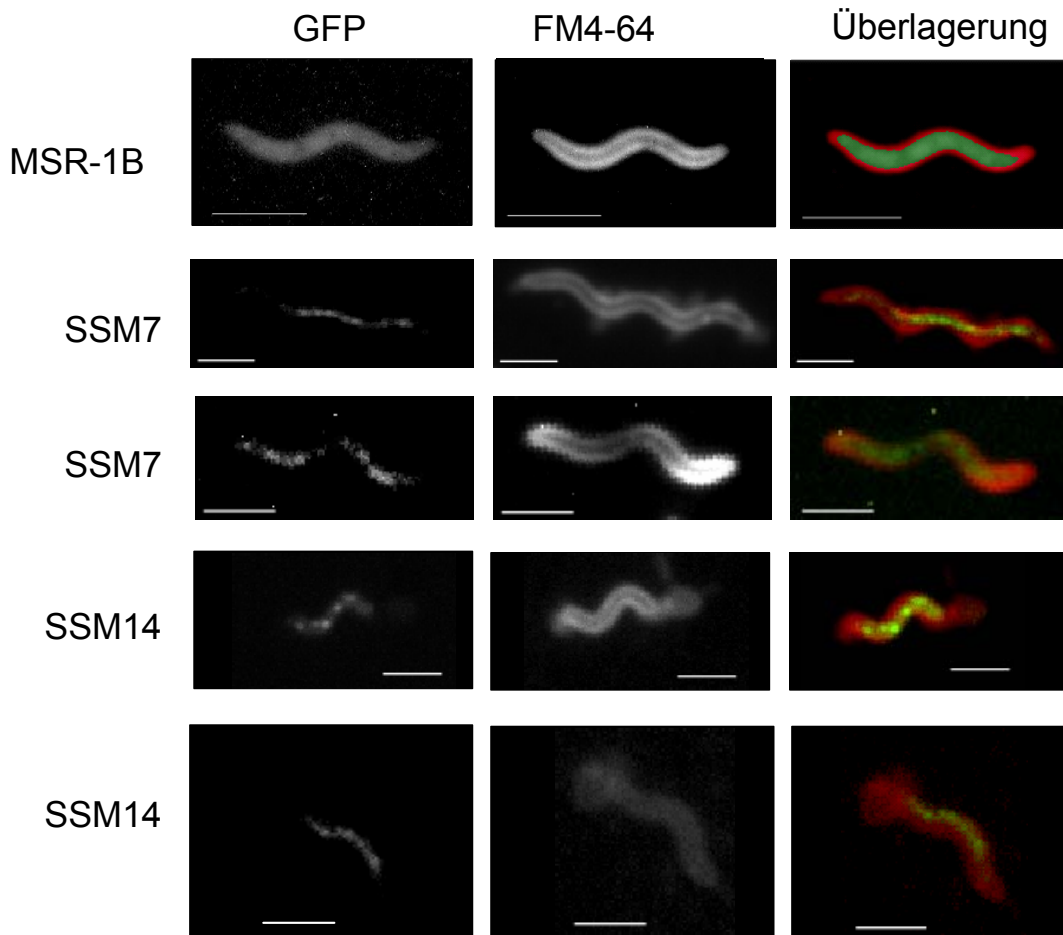


Abbildung 3-21: Intrazelluläre Lokalisierung der MamK-EGFP-Fusionsproteine

Gezeigt sind repräsentative Zellen der Stämme SSM7 mit einer *in trans* exprimierten MamK-EGFP Fusion und SSM14 mit einer chromosomalen MamK-EGFP Fusion sowie MSR-1B pSS7 als Negativkontrolle eine *in trans* Expression in dem nicht magnetischen Stamm MSR-1B. Maßbalken entspricht 2 μ M (Aufnahmen von A. Scheffel im Labor von P. Graumann aus Freiburg)

In Abbildung 3-21 sind repräsentative Aufnahmen von Zellen der drei Stämme dargestellt. Die unmagnetische Mutante mit der *in trans* fusionierten *mamK-egfp* Genfusion Stamm SSMB7 zeigte wie erwartet keine spezifische Lokalisierung des MamK-EGFP-Fusionsproteins in der Zelle. Sowohl die *in trans* Fusion als auch die chromosomal integrierte Fusion zeigten in dem Wildtypstamm ein langes filamentartiges z. T. punkartiges Signal entlang der Zellachse. Dieses Signal füllt im direkten Vergleich mit der Membranfärbung nicht das gesamte Cytoplasma aus. Das von MamK ausgehende Signal ist durchgehend in einer einheitlichen Stärke, während das Signal der *in trans* MamJ-EGFP Fusion durch größere Fluoreszenzsignale, die vermutlich von PHBs herrühren, unterbrochen wird (Scheffel *et al.*, eingereicht). Im Vergleich zur chromosomal inserierten *mamA-gfp*-Fusion in dem Stamm *Magnetospirillum spec.* AMB-1 (Komeili *et al.*, 2004) fällt auf, daß das Signal von

einem Zellpol bis zum anderen reicht, während das Signal von MamK hauptsächlich im mittleren Teil der Zelle auftritt, nicht jedoch an den Zellpolen. Die letzte Beobachtung ist konsistent mit der Lokalisierung der Magnetosomenkette. Daher läßt sich vermuten, daß auch MamK an den Magnetosomen lokalisiert ist. Ob MamK tatsächlich ein Filament entlang der Magnetosomenkette bildet oder das Protein schwach an die Magnetosomenvesikel assoziiert ist, läßt sich anhand der zur Verfügung stehenden Auflösung nicht klären.

Die Sequenzanalysen haben gezeigt, daß MamK-Homologie zu aktinähnlichen Proteinen aufweist. Diese Analyse ließ die Vermutung zu, daß MamK ähnliche, zytoskeletale Strukturen in *M. gryphiswaldense* bildet und dadurch die Kettenstruktur der Magnetosomen stabilisiert. Da die Ähnlichkeitsverhältnisse von MamK zu aktinähnlichen Proteinen weiter entfernter Organismen gezeigt hat, daß MamK aus magnetotaktischen Bakterien eine eigene Gruppe bildet, könnten auch ganz andere Funktionen dieses Proteins diskutiert werden. So wäre eine chaperonähnliche Funktion, zur Proteinfaltung ebenso denkbar, wie eine Kinase-Funktion, angelehnt an die Zuckerkinasen, die auch zu der Familie der Aktine zählen (Bork *et al.*, 1992). *In vitro* Lokalisationsstudien haben gezeigt, daß MamK in *M. gryphiswaldense* in der cytosolischen Fraktion lokalisiert ist. Lokalisierungen, die *in vivo* analysiert wurden wiederum lassen die Vermutung einer Assoziation an die Magnetosomen zu. Diese Ergebnisse könnten jedoch die Hypothese einer zytoskeletalen, stabilisierenden Struktur für die Magnetosomenkette bestätigen. Es wäre also denkbar, daß MamK im Cytoplasma eine filamentöse Struktur bildet, die z. B. mit Hilfe anderer Proteine an die Magnetosomen gebunden ist.

3.9 Perspektiven für eine künftige molekulare Charakterisierung der Magnetosomenbiomineralisation

In der vorliegenden Arbeit wurde eine spontane unmagnetische Mutante charakterisiert, die nicht mehr dazu in der Lage war, Magnetosomen zu synthetisieren. Der Verlust der Fähigkeit zur Magnetosomenbiomineralisation resultierte aus dem Verlust der *mam*-Gene, wodurch gezeigt werden konnte, daß die *mam*-Gene mit in den Prozeß involviert sind. Diese unmagnetische Mutante bietet die Möglichkeit für Studien zur Komplementation des magnetischen Phänotyps im homologen Organismus. Die Wiederherstellung des magnetischen Phänotyps durch homologe Expression der für die

Magnetosomenbiomineralisation notwendigen Gene, ließe Aussagen über das erforderliche minimale Set an Genen zu. Mit Hilfe dieser Kenntnisse wäre es anschließend möglich auch in heterologen Organismen Bedingungen für eine heterologe Expression der MMP und Magnetosomensynthese herzustellen.

Die Aufklärung der genomischen Organisation der *mam*-Gene zeigte, daß die bisher bekannten *mam/mms*-Gene innerhalb einer 40 kb Region auf einer 130 kb großen Magnetosomeninsel lokalisiert sind. Diese Struktur erweitert die Zahl der Kandidaten für weitere Untersuchungen an Genen, die zusätzlich zu den bisher bekannten Magnetosomengenegen noch an der Magnetosomenbiomineralisation beteiligt sind.

Erstmals konnte durch transkriptionelle Analysen der Nachweis erbracht werden, daß die *mam*- und *mms*-Gene wie aufgrund der Genomanalyse vorhergesagt innerhalb drei polycistronischer Operons jeweils cotranskribiert werden. Zudem konnten erstmals Promotoren identifiziert werden, die die Transkription der Operons steuern. Weiterhin konnte erstmals eine Eisen- und Sauerstoff- abhängige Regulation der *mam*- und *mms*-Gene nachgewiesen werden. Dies ist die Voraussetzung für Expressionsstudien an nativen, eisen- und sauerstoffregulierten Promotoren durch z. B. die Konstruktion von Reporterfusionen. Dabei ist die Kontrolle durch den nativen Promotor von besonderem Vorteil.

Die Konstrukte zur Deletion des *mamK*-Gens sowie die Insertionsmutantenstämme sind die Grundlage für die Aufklärung der Funktion des MamK-Proteins. Die Reinigung des MamK-Proteins wie auch weiterer Mam-Proteine bietet die Möglichkeit für *in vitro* Protein-Protein- bzw. Protein-Magnetosomen-Interaktionsexperimente (z. B. GST-Pulldown, Immunpräzipitation), und DNA- und Protein-Bindestudien, (z. B. Gelretardierungsexperimente), durchzuführen. Der Nachweis derartiger Interaktionen kann zur Aufklärung der Funktion der MMP beitragen und damit die Regulation der Magnetosomenbiomineralisation aufklären.

4 Anhang

4.1 Verwendete Organismen

4.1.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	(Hanahan, 1985)}.
S17-1	<i>pro thi hsdR Tra⁺ recA⁻ Tr^R Sm^R ΩRP4-Tc::Mu-Kn::Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1986)}.
BW29427	<i>Tra⁺ ???</i>	B. Wanner
INV110	F' { <i>tra Δ36 proAB lacI^q lacZ ΔM15</i> } <i>rpsL (Str^R) thr leu endA thi-1 lacY galK galT aratonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr)102::Tn10 (Tet^R)</i>	
Top10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)}.
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_Bm_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	

4.1.2 *Magnetospirillum* Stämme

A) Übernommene Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	Wildisolat	(Schleifer <i>et al.</i> , 1991)
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1B	Deletion der MAI	(Schübbe <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1R1/S3	Rif ^R Sm ^R , spontane Mutante	(Schultheiss und Schüler, 2003)
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1BR1/S3	Rif ^R Sm ^R , spontane Mutante, Deletion der MAI	

B) Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm
SSM7	<i>mamK-egfp</i>	MSR-1R1/S3
SSMB7	<i>mamK-egfp</i>	MSR-1BR1/S3
SSM14	<i>mamK::mamK-egfp</i>	MSR-1R1/S3
SSM19	<i>mamK, ΔmamK</i>	MSR-1R1/S3
SSM28	<i>mamK, ΔmamK::Kan</i>	MSR-1R1/S3

4.2 Klonierungsvektoren und Plasmide

4.2.1 *E. coli* Vektoren

Vektor	Genetische Marker	Referenz
pBlueskriptSK-	Ap^R	Stratagene, Heidelberg
pEGFP-N1	Km^R	BD Bioscience Clontech
pASK-IBA3	Ap^R	IBA, Göttingen
pASK-IBA5	Ap^R	IBA, Göttingen
pGEM-T Easy	Ap^R <i>lacZ</i> T7 Promotor	Promega, Heidelberg

4.2.2 Mobilisierbare Vektoren

Vektor	Genetische Marker	Referenz
pBBR1-MCS2	Km^R , <i>mob</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pK19mobsacB	Km^R , <i>mob</i> , <i>oriV</i> , <i>lacZα</i> , <i>ptac-</i> , <i>tac-</i> Promoter, <i>sacB</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pCM184	Km^R , Ap^R , <i>oriV</i>	(Marx und Lidstrom, 2002)

4.2.3 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Genetische Marker	Vektoranteil
pSS1b	5' <i>mamK</i>	pBlueskriptSK-
pSS3	<i>mamK-egfp</i>	pEGFP-N1
pSS4	Δ <i>mamK</i>	pBlueskriptSK-
pSS7	<i>mamK-egfp</i>	pBBR1-MCS2
pSS8	Strep-Tag <i>mamK</i>	pASK-IBA5
pSS9	<i>mamK</i> Strep-Tag	pASK-IBA3
pSS12a	<i>mamK-egfp</i>	pBlueskriptSK-
pSS12	<i>mamK-egfp-mamL/mamM</i>	pBlueskriptSK-
pSS14	<i>mamK-egfp-mamL/mamM</i>	pK19mobsacB
pSS19	Δ <i>mamK</i>	pK19mobsacB
pSS28a	5' <i>mamK</i>	pCM184
pSS28	Δ <i>mamK</i> :: <i>Kan</i>	pCM184

4.3 Oligonukleotide

Name	Gen	Sequenz
mamJ_SSf	<i>mamJ</i>	CGAGTTCGAGTATTCGCA
mamL_SSr	<i>mamL</i>	AATCCCAATGGCGAAACC
5'mamKXbaI_f	5'mamK	tctaga TGTGCCGGTTGCCGATCTGGTCAA
5'mamKSmaI_r	5'mamK	cccggg CATCACATTCGGCGATGAACAAC
3'mamKSmaI_f	3'mamK	cccggg TGATGGGGGATGTCATTTTGGTTG
3'mamKHindIII_r	3'mamK	aagctt AATCATGTTCGGCCCAGATGTCTTG
CTGmamKXhoI_SSf	<i>mamK</i>	ccgctcgag CGGCTGTGGATTGATCTGTTAGCACGC
oStopmamKEcoRI_SSr	<i>mamK</i>	ggaattc CCTGACCGGAAACGTCACCAAGCTG
mamKuebexEcoRI_f	<i>mamK</i>	ggaattc TGGATTGATCTGTTAGCACGCGAAC
mamKuebexXhoI_r	<i>mamK</i>	ccgctcgag CTGACCGGAAACGTCACCAAGCTGAC
mamKuebXhoI_r	<i>mamK</i>	ccgctcgag TCACTGACCGGAAACGTCACCAAGCTG
mamKuebEcoRI_f	<i>mamK</i>	ggaattc CTGGATTGATCTGTTAGCACGCGAAC
EGFPmamLXbaI_f	<i>mamL</i>	gctctaga TGGGGGATGTCATTTTGGTTGGCGA
EGFPmamMSacI_r	<i>mamM</i>	cgagctc CTCGGGATCGACGCCAATAATCAT
5'creloxMunI_f	<i>mamJ</i>	gat ccaattg CTTGAAAGTTCGCCGTGGTCAGCTA
5'creloxKpnI_r	<i>mamJ</i>	gggtacc CATTTTGTCACTCCGTTTCGCGTG
3'creloxApaI_f	<i>mamL</i>	gat gggcccc ATTCGCGGTTTGGCAGCCTATGTGA
3FvKpWM91SacI_r	<i>mamM</i>	cgagctc CACATAGCGAGCCCGCAGATGGAT

4.4 Konstruktion einer Strep-Tag-*mamK* Fusion

Als Vektoren wurden pASK-IBA3 und pASK-IBA5 (IBA, Göttingen), die eine C- bzw. N-terminalen Strep-Tag-Fusion ermöglichen, verwendet. Die Vektoren enthalten einen *Tet* Promotor, der mit Anhydrotetracyclin induziert werden kann.

Das *mamK*-Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *M. gryphiswaldense* mit den Primern mamKuebexEcoRI_f und mamKuebexXhoI_r bzw. mamKuebEcoRI_f und mamKuebXhoI_r amplifiziert, aufgereinigt und durch die angefügten Restriktionsstellen durch Endonukleaseverdau mit *EcoRI/XhoI* aktiviert. Das PCR-Fragment wurde dann in den jeweils *EcoRI/XhoI* geöffneten Vektor eingesetzt und ergab die Plasmide pSS9 (C-terminale Strep-Tag Fusion) bzw. pSS8 (N-terminale Strep-Tag Fusion).

4.5 Heterologe Überexpression des Strep-Tag fusionierten Proteins

Die Plasmide pSS8 und pSS9, die das N- bzw. C-terminale Strep-Tag *mamK*-Fusionskonstrukt enthalten, wurden jeweils in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Die neuen Stämme wurden als SS8 und SS9 bezeichnet. Unter den optimierten Expressionsbedingungen wurden die beiden Stämme SS8 und SS9 bei 37 °C, 200 Upm in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB Medium angezogen und

bei einer OD_{560} 0,6 mit Anhydrotetracyclin induziert. Vier Stunden nach Induktion wurden die Kulturen geerntet und mittels Ultraschallsonde aufgeschlossen.

4.6 Reinigung des Strep-Tag Fusionsproteins

Für die Reinigung des Fusionsproteins wurde der Rohextrakt von jeweils 200 ml Kultur des Stammes SS8 verwendet. Dieser wurde über die Strep-Tactin MacroPrepmatrix mit einem Säulenbettvolumen von 2,5 ml gegeben. Die Stringenzwäsche erfolgte mit 2 x 5 ml Puffer W (100 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8) 5 ml Puffer W 500 (100 mM TrisHCl, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 % Glycerin, pH8) und wiederum 2 x 5 ml Puffer W. Die anschließende Elution erfolgte mit dem Puffer E (100 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1 mM, EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8) in acht Fraktionen zu je 1 ml.

4.7 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen MamK

Anti-MamK Antikörper wurden mittels des gereinigten MamK-Proteins in Kaninchen gebildet. Die Immunisierung dauerte 150 Tage (Pineda Antikörper Service, Berlin). Das gewonnene Immuns Serum, das die Anti-MamK Antikörper enthält, wurde für den Westernblot in 1:2500 Verdünnung eingesetzt.

4.8 Polymerisierung von MamK

Polymerisierungspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 3mM CaCl
 4 mM MgCl

Für den Pelletierungsassay werden 200 µg/ml MamK-Protein in Polymerisierungspuffer mit 2 mM ATP bzw. 2 mM GTP sowie ohne Zugabe von Nukleotiden als Kontrolle bei 37 °C 10 min inkubiert. Durch Zentrifugation bei 140000g und 15 min sollten die gebildeten Komplexe pelletieren (Pellet nicht sichtbar).

5 Literaturverzeichnis

- Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P., und Miller, J.H. (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* **29**: 319-328.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Arakaki, A., Webb, J., und Matsunaga, T. (2003) A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**: 8745-8750.
- Balkwill, D.L., Maratea, D., und Blakemore, R.P. (1980) Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**: 1399-1408.
- Banerjee, S.K., und Moskowitz, B. (1985) Ferrimagnetic properties of magnetite. In *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms*. Kirschvink, J.L., Jones, D.S. und MacFadden, B.M. (eds). New York and London: Plenum Press, pp. 17-41.
- Baeuerlein, E. (2003) Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Edit.* **42**: 614-641.
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., und Jannasch, H.W. (1988) Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature* **334**: 518-519.
- Bazyliniski, D.A. (1995a) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**: 337-343.
- Bazyliniski, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Mann, S., King, J.W., Donaghay, P.L., und Hanson, A.K. (1995b) Controlled biomineralization of magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 3232-3239.
- Bazyliniski, D.A. und Moskowitz, B.M. (1997) Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: Microbiology, magnetism and environmental significance. *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals* **35**: 181-223.
- Berry, C.C., und Curtis, A.S.G. (2003) Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Physics D-Appl. Physics* **36**: R198-R206.

- Berson, A.E., Hudson, D.V., und Waleh, N.S. (1991) Cloning of a sequence of *Aquaspirillum magnetotacticum* that complements the *aroD* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2261-2264.
- Bertani, L.E., Huang, J.S., Weir, B.A., und Kirschvink, J.L. (1997) Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **201**: 31-36.
- Bertani, L.E., Weko, J., Phillips, K.V., Gray, R.F., und Kirschvink, J.L. (2001) Physical and genetic characterization of the genome of *Magnetospirillum magnetotacticum*, strain MS-1. *Gene* **264**: 257-263.
- Biondi, E. G., Marini, F., Altieri, F., Bonzi, L., Bazzicalupo, M., delGallo, M. (2004) Extended phenotype of an *mreB*-like mutant in *Azzospirillum brasilense*. *Microbiol.* **150**: 2465-2474
- Bishop, A.L., Baker, S., Jenks, S., Fookes, M., Gaora, P.O., Pickard, D., Anjum, M., Farrar, J., Hien, T.T., Ivens, A., und Dougan, G. (2005) Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA^{leuX}. *J. Bacteriol.* **187**: 2469-2482.
- Blakemore, R. (1975) Magnetotactic bacteria. *Science* **190**: 377-379.
- Blakemore, R.P., Maratea, D., und Wolfe, R.S. (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.
- Blakemore, R.P., Short, K.A., Bazylnski, D.A., Rosenblatt, C., und Frankel, R.B. (1985) Microaerobic conditions are required for magnetite formation within *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Geomicrobiol. J.* **4**: 53-71.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschäpe, H., und Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**: 606-614.
- Bork, P., Sander, C., und Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 7290-7294.
- Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**: 169-193.

- Bustin, S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**: 23-39.
- Carballido-Lopez, R., und Errington, J. (2003a) The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev. Cell* **4**: 19-28.
- Cornell, R.M., und Schwertmann, U. (2003) *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Weinheim: VCH Wiley.
- Dal, S., Trautwein, G., und Gerischer, U. (2005) Transcriptional organization of genes for protocatechuate and quinate degradation from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1025-1034.
- Dean, A.J., und Bazyliniski, D.A. (1999) Genome analysis of several marine, magnetotactic bacterial strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* **39**: 219-225.
- Defeu Soufo, H.J., und Graumann, P.L. (2003) Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr. Biol.* **13**: 1916-1920.
- Delong, E.F., Frankel, R.B., und Bazyliniski, D.A. (1993) Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science* **259**: 803-806.
- Denham, C.R., Blakemore, R.P., und Frankel, R.B. (1980) Bulk magnetic-properties of magnetotactic bacteria. *Ieee T. Magn.* **16**: 1006-1007.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., und Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 414-424.
- Doi, M., Wachi, M., Ishino, F., Tomioka, S., Ito, M., Sakagami, Y., Suzuki, A., und Matsushashi, M. (1988) Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **170**: 4619-4624.
- Dubbels, B.L., DiSpirito, A.A., Morton, J.D., Semrau, J.D., Neto, J.N., und Bazyliniski, D.A. (2004) Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* **150**: 2931-2945.
- Dunin-Borkowski, R.E., McCartney, M.R., Frankel, R.B., Bazyliniski, D.A., Posfai, M., und Buseck, P.R. (1998) Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* **282**: 1868-1870.
- Farina, M., Esquivel, D.M., und Lins de Barros, H. (1990) Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature* **343**: 256-258.

- Faure, D., Frederick, R., Wloch, D., Portier, P., Blot, M., und Adams, J. (2004) Genomic changes arising in long-term stab cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 6437-6442.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., und Gober, J.W. (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1321-1332.
- Finkel, S.E., und Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 4023-4027.
- Flies, C.B., Jonkers, H.M., de Beer, D., Bosselmann, K., Böttcher, M.E., und Schüler, D. (2005a) Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 185-195.
- Flies, C.B., Peplies, J., und Schüler, D. (2005b) Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2723-2731.
- Frankel, R.B., Blakemore, R.P., und Wolfe, R.S. (1979) Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* **203**: 1355-1356.
- Frankel, R.B., und Blakemore, R.P. (1980) Navigational compass in magnetic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* **15-18**: 1562-1564.
- Frankel, R.B., und Blakemore, R.P. (1984) Precipitation of Fe₃O₄ in magnetotactic bacteria. *Philos. T. Roy. Soc. B* **304**: 567-574.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Johnson, M.S., und Taylor, B.L. (1997) Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* **73**: 994-1000.
- Frankel, R.B., Zhang, J.P., und Bazylinski, D.A. (1998) Single magnetic domains in magnetotactic bacteria. *J. Geophys. Res.-Sol. Ea.* **103**: 30601-30604.
- Gärdes, A. (2005) Deletionsmutagenese eines Magnetosomenproteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense* unter Etablierung des *Cre-loxP* Systemes. Oldenburg: Fachhochschule Oldenburg.
- Ginzinger, D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* **30**: 503-512.
- Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., und Blakemore, R.P. (1988) Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**: 834-841.

- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., und Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 4645-4649.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., und Schüler, D. (2001) A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4573-4582.
- Grünberg, K., Müller, E.C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., und Schüler, D. (2004) Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1040-1050.
- Gupta, A. (1999) RT-PCR: characterization of long multi-gene operons and multiple transcript gene clusters in bacteria. *Biotechniques* **27**: 966-970, 972.
- Gupta, A.K., und Gupta, M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**: 3995-4021.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., und Tschäpe, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Hacker, J., und Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641-679.
- Hanahan, D. (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**: 115-122.
- Hartmann, A., und Braun, V. (1981) Iron uptake and iron limited growth of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **130**: 353-356.
- Heyen, U., und Schüler, D. (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 536-544.
- Heywood, B.R., Bazylinski, D.A., Garrattreed, A., Mann, S., und Frankel, R.B. (1990) Controlled biosynthesis of greigite (Fe₃S₄) in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften* **77**: 536-538.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., und Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.

- Kawaguchi, R., Burgess, J.G., und Matsunaga, T. (1992) Phylogeny and 16s rRNA sequence of *Magnetospirillum* sp. AMB-1, an aerobic magnetic bacterium. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1140.
- Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T.J., und Newman, D.K. (2004) Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and Mama is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 3839-3844.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd, und Peterson, K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Kruse, T., Moller-Jensen, J., Lobner-Olesen, A., und Gerdes, K. (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Embo J.* **22**: 5283-5292.
- Kyte, J., und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Lewis, P.J., und Errington, J. (1996) Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **142 (Pt 4)**: 733-740.
- Lovley, D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 263-290.
- Mahillon, J., und Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.
- Mahillon, J., Leonard, C., und Chandler, M. (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol.* **150**: 675-687.
- Makita, Y., Nakao, M., Ogasawara, N., und Nakai, K. (2004) DBTBS: database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* and its contribution to comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* **32**: D75-77.
- Mandernack, K.W., Bazylnski, D.A., Shanks, W.C., 3rd, und Bullen, T.D. (1999) Oxygen and iron isotope studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria. *Science* **285**: 1892-1896.
- Mann, S., Sparks, N.H., und Board, R.G. (1990a) Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology. *Adv. Microb. Physiol.* **31**: 125-181.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Frankel, R.B., Bazylnski, D.A., und Jannasch, H.W. (1990b) Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* **343**: 258-261.

- Margolin, W. (1998) A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **6**: 233-238.
- Margolin, W. (2000) Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods* **20**: 62-72.
- Margolin, W. (2003) Bacterial shape: growing off this mortal coil. *Curr. Biol.* **13**: 705-707.
- Marx, C.J., und Lidstrom, M.E. (2002) Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *BioTechniques* **33**: 1062-1067.
- Matsunaga, T. (1991) Production of magnetite particles in microorganisms. *Tetsu to Hagane-J. Iron Steel Inst. Japan* **77**: 746-751.
- Matsunaga, T., Nakamura, C., Burgess, J.G., und Sode, K. (1992) Gene-transfer in magnetic bacteria - transposon mutagenesis and cloning of genomic DNA fragments required for magnetosome synthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 2748-2753.
- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y., und Takeyama, H. (2005) Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res.* **12**: 157-166.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B., und Bazylinski, D.A. (1993a) Electron-microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **251**: 231-236.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B., und Bazylinski, D.A. (1993b) Electron-microscopy study of magnetosomes in 2 cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **251**: 237-242.
- Menke, O. (2003) Dissimilatorische Nitratreduktion in magnetotaktischen Bakterien. Oldenburg: Fachhochschule Oldenburg.
- Möller-Jensen, J., Jensen, R.B., Lowe, J., und Gerdes, K. (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J.* **21**: 3119-3127.
- Moskowitz, B.M., Frankel, R.B., Flanders, P.J., Blakemore, R.P., und Schwartz, B.B. (1988) Magnetic-properties of magnetotactic bacteria. *J. Magn. Magn. Mater.* **73**: 273-288.
- Mukherjee, A., und Lutkenhaus, J. (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *Embo J.* **17**: 462-469.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W.M., und Arber, W. (1994) Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **136**: 721-730.

- Naas, T., Blot, M., Fitch, W.M., und Arber, W. (1995) Dynamics of IS-related genetic rearrangements in resting *Escherichia coli* K-12. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 198-207.
- Nakamura, C., Kikuchi, T., Burgess, J.G., und Matsunaga, T. (1995a) Iron-regulated expression and membrane localization of the magA protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 23-27.
- Nakamura, C., Burgess, J.G., Sode, K., und Matsunaga, T. (1995b) An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **270**: 28392-28396.
- Noguchi, Y., Fujiwara, T., Yoshimatsu, K., und Fukumori, Y. (1999) Iron reductase for magnetite synthesis in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. *J. Bacteriol.* **181**: 2142-2147.
- Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchel, A., und Friedrich, C.G. (1990) Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Meth.* **11**: 73-84.
- Okamura, Y., Takeyama, H., und Matsunaga, T. (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., Takeyama, H., und Matsunaga, T. (2001) A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 48183-48188.
- Okuda, Y., Denda, K., und Fukumori, Y. (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 Fukumori, Y. (2001) Expression and characterization of a magnetosome-associated protein, TPR-containing Mam22, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **491**: 169-173.
- Raj, K., Moskowitz, B., und Casciari, R. (1995) Advances in Ferrofluid Technology. *J. Magn. Magn. Mater.* **149**: 174-180.
- Rajeshwari, R., und Sonti, R.V. (2000) Stationary-phase variation due to transposition of novel insertion elements in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* **182**: 4797-4802.
- Rauhut, R., und Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 353-370.

- Reiter, W.D., und Palm, P. (1990) Identification and characterization of a defective SSV1 genome integrated into a tRNA gene in the archaebacterium *Sulfolobus* sp. B12. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 65-71.
- Rodgers, F.G., Blakemore, R.P., Blakemore, N.A., Frankel, R.B., Bazyliński, D.A., Maratea, D., und Rodgers, C. (1990) Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote. *Arch. Microbiol.* **154**: 18-22.
- Sakaguchi, T., Burgess, J.G., und Matsunaga, T. (1993) Magnetite formation by a sulfate-reducing bacterium. *Nature* **365**: 47-49.
- Sakaguchi, T., Arakaki, A., und Matsunaga, T. (2002) *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 215-221.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., und Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scheffel, A., Gruska, M., Plitzko, J.M., und Schüler, D. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *submitted to Nature*.
- Schleifer, K., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., und Köhler, M. (1991) The genus *Magnetospirillum* gen. nov., description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 379-385.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., und Schüler, D. (2003) Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* **185**: 5779-5790.
- Schüler, D., und Köhler, M. (1992) The isolation of a new magnetic spirillum. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**: 150-151.
- Schüler, D., Rainer, U., und Bauerlein, E. (1995) A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 139-145.

- Schüler, D., und Baeuerlein, E. (1996) Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**: 301-307.
- Schüler, D., und Baeuerlein, E. (1997) Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Phys. Iv* **7**: 647-650.
- Schüler, D., und Baeuerlein, E. (1998) Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**: 159-162.
- Schüler, D. (2002) The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* **5**: 209-214.
- Schüler, D. (2004) Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**: 1-7.
- Schultheiss, D., und Schüler, D. (2003) Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**: 89-94.
- Sexton, R., Gill, P.R., Jr., Dowling, D.N., und O'Gara, F. (1996) Transcriptional regulation of the iron-responsive sigma factor gene *pbrA*. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 50-58.
- Simmons, S.L., Sievert, S.M., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., und Edwards, K.J. (2004) Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6230-6239.
- Simon, R., Priefer, U., und Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering - Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio Technology* **1**: 784-791.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., und Pühler, A. (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-659.
- Sparks, N.H.C., Mann, S., Bazylinski, D.A., Lovely, D.R., Jannasch, H.W., und Frankel, R.B. (1990) Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Earth Planet. Sc. Lett.* **98**: 14-22.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Vangemerden, H., und Petersen, N. (1993) Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a fresh-water sediment. *Appl. Environ. Microb.* **59**: 2397-2403.

- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Schuler, D., Poralla, K., und Petersen, N. (1995) Phylogenetic analysis of uncultured magnetotactic bacteria from the alpha-subclass of Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 501-508.
- Spring, S., und Schleifer, K.H. (1995) Diversity of magnetotactic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 147-153.
- Stolz, J.F. (1993) Magnetosomes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1663-1670.
- Tölle, J., Michel, K.P., Kruip, J., Kahmann, U., Preisfeld, A., und Pistorius, E.K. (2002) Localization and function of the IdiA homologue Slr1295 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* **148**: 3293-3305.
- Ullrich, S. (2004) Untersuchungen zur Genetik und Mutabilität der Magnetosomeninsel von *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Bremen: Universität Bremen.
- van den Ent, F., Amos, L.A., und Löwe, J. (2001a) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., und Löwe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J.* **21**: 6935-6943.
- Waleh, N.S. (1988) Functional expression of *Aquaspirillum magnetotacticum* genes in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 592-594.
- Webb, C.D., Decatur, A., Teleman, A., und Losick, R. (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**: 5906-5911.
- Yamazaki, T., Oyanagi, H., Fujiwara, T., und Fukumori, Y. (1995) Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. A novel cytochrome cd1 with Fe(II):nitrite oxidoreductase activity. *Eur. J. Biochem.* **233**: 665-671.
- Yang, C., Takeyama, H., Tanaka, T., und Matsunaga, T. (2001) Effects of growth medium composition, iron sources and atmospheric oxygen concentrations on production of luciferase-bacterial magnetic particle complex by a recombinant *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Enzyme. Microb. Technol.* **29**: 13-19.
- Ye, R.W., Wang, T., Bedzyk, L., und Croker, K.M. (2001) Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J. Microbiol. Meth.* **47**: 257-272.
- Yoza, B., Arakaki, A., und Matsunaga, T. (2003) DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *J. Bacteriol.* **101**: 219-228.

Zahn, M. (2001) Magnetic fluid and nanoparticle applications to nanotechnology. *J. Nanoparticle Res.* **3**: 73-78.

Teil B: Publikationen

1 Publikationsliste mit Erläuterungen

Die Dissertation beruht zum großen Teil auf den folgenden drei Publikationen. Die angefügten Erläuterungen zeigen meinen Beitrag an der jeweiligen Arbeit auf.

1. **Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island**

Sabrina Schübbe, Michael Kube, André Scheffel, Cathrin Wawer, Udo Heyen, Anke Meyerdierks, Mohamed H. Madkour, Frank Mayer, Richard Reinhardt, Dirk Schüler

Journal of Bacteriology (2003) **185** (19): 5779-5790

Durchführung der PCR und Southernblot Analysen, der Eisenaufnahmekinetik, der Puls-Feld-Gelelektrophorese und der Annotation der Magnetosomen Insel. Die Wachstumsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Udo Heyen durchgeführt. Redaktionelle Mitarbeit beim Erstellen des Manuskripts.

2. **A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth**

Susanne Ullrich, Michael Kube, Sabrina Schübbe, Richard Reinhardt, Dirk Schüler

Journal of Bacteriology (2005) **187** (21): 7176-7184

Bestimmung der Deletionsstellen in der Mutante MSR-1B. Annotation des 65 kb BAC „Insert“. Die physiologischen Experimente und RFLP Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Susanne Ullrich durchgeführt. Redaktionelle Mitarbeit beim Erstellen des Manuskripts.

3. The magnetosome operons of *Magnetospirillum gryphiswaldense* are regulated by oxygen and iron

Sabrina Schübbe, Chris Würdemann, Jörg Peplies, Frank-Oliver Glöckner, Dirk Schüler

Manuscript in preparation

Entwicklung des Konzepts zusammen mit Dirk Schüler. Durchführung der RNA Präparation, der RT-PCR, der Primer Extension Analyse sowie der „real-time“ RT-PCR. Erstellung des Manuskripts unter redaktioneller Mitarbeit von Dirk Schüler.

2 Publikationen

**Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of
Magnetospirillum gryphiswaldense reveals a large deletion comprising a
putative magnetosome island**

Sabrina Schübbe,¹ Michael Kube,² André Scheffel,¹ Cathrin Wawer,¹ Udo Heyen,¹
Anke Meyerdierks,¹ Mohamed H. Madkour,³ Frank Mayer,³ Richard Reinhardt,² and
Dirk Schüler^{1*}

Journal of Bacteriology (2003) **185** (19): 5779-5790

¹ Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, Germany

² Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Germany

³ Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen, Göttingen, Germany

* Corresponding author

Abstract

Frequent spontaneous loss of the magnetic phenotype was observed in stationary-phase cultures of the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. A nonmagnetic mutant, designated strain MSR-1B, was isolated and characterized. The mutant lacked any structures resembling magnetosome crystals as well as internal membrane vesicles. The growth of strain MSR-1B was impaired under all growth conditions tested, and the uptake and accumulation of iron were drastically reduced under iron-replete conditions. A large chromosomal deletion of approximately 80 kb was identified in strain MSR-1B, which comprised both the entire *mamAB* and *mamDC* clusters as well as further putative operons encoding a number of magnetosome-associated proteins. A bacterial artificial chromosome clone partially covering the deleted region was isolated from the genomic library of wild-type *M. gryphiswaldense*. Sequence analysis of this fragment revealed that all previously identified *mam* genes were closely linked with genes encoding other magnetosome-associated proteins within less than 35 kb. In addition, this region was remarkably rich in insertion elements and harbored a considerable number of unknown gene families which appeared to be specific for magnetotactic bacteria. Overall, these findings suggest the existence of a putative large magnetosome island in *M. gryphiswaldense* and other magnetotactic bacteria.

Introduction

Magnetotactic bacteria are capable of forming magnetosomes, which are specific intracellular structures that enable the cells to orient along magnetic field lines (Balkwill *et al.*, 1980; Bazylinski, 1995a; Schüler and Frankel, 1999). The superior crystalline and magnetic properties of magnetosomes make them potentially useful as a highly ordered biomaterial in a number of applications, e.g., in the immobilization of bioactive compounds, magnetic drug targeting, or as a contrast agent for magnetic resonance imaging (Matsunaga and Takeyama, 1998; Schüler and Frankel, 1999). Recently, the characteristics of bacterial magnetosomes have even been considered for use as biosignatures to identify presumptive Martian magnetofossils (Thomas-Keprta *et al.*, 2002). Moreover, understanding bacterial magnetosome formation is expected to provide insights into more complex biomineralization systems in higher organisms (Kirschvink and Hagadorn, 2000). The biomineralization of magnetosome particles is achieved by a complex mechanism with control over the uptake, accumulation, and precipitation of iron, which, however, is poorly understood at the molecular and biochemical level.

The magnetotactic α -proteobacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* microaerobically produces up to 60 cubo-octahedral magnetosomes, which are approximately 45 nm in size and consist of membrane-bounded crystals of the iron mineral magnetite (Fe_3O_4) (Schleifer *et al.*, 1991; Schüler and Köhler, 1992). In contrast to most other magnetotactic bacteria, methods for mass culture and genetic manipulation of *M. gryphiswaldense* are available (Heyen and Schüler, 2003; Schüler and Baeuerlein, 1998; Schultheiss and Schüler, 2003), which has facilitated its analysis in a number of studies (Schüler *et al.*, 1995; Schüler and Baeuerlein, 1996, 1997a, b).

In *Magnetospirillum* species, the deposition of the mineral particle occurs within a specific compartment, which is provided by the magnetosome membrane (Bazylinski *et al.*, 1994; Schüler, 2000, 2002). Recently, a number of magnetosome membrane-specific polypeptides were identified in isolated magnetosomes from *M. gryphiswaldense* (Grünberg *et al.*, 2001). Cloning and sequencing of the genes encoding several of the most abundant magnetosome membrane-associated proteins (*mamA*, *mamB*, *mamC*, and *mamD*) revealed that these are arranged in two operon-like gene clusters. One major gene cluster containing several magnetosome genes, including *mamA* and *mamB*, was found to be highly conserved between *M. gryphiswaldense* and

other magnetotactic bacteria according to the comparative sequence analysis of preliminary genome assemblies, which became available for *M. magnetotacticum* strain MS-1 and a magnetic coccus, strain MC-1 (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html).

The *mamAB* cluster comprises 15 and 9 colinear open reading frames in *M. magnetotacticum* and strain MC-1, respectively, and is characterized by a set of genes which are shared by all three magnetotactic strains. The corresponding gene products are homologous to several protein families, for example, TPR proteins (Okuda *et al.*, 1996), CDF transporters (Paulsen and Saier, 1997) and PDZ proteins resembling HtrA-like serine proteases (Pallen and Wren, 1997) with speculated functions in iron transport into the magnetosome vesicles (CDF) and protein protein interactions (TPR and PDZ proteins). A second identified chromosomal locus comprised the *mamD* and *mamC* genes, both of which encode abundant magnetosome-associated proteins with unknown functions. These findings suggested that the genetic determination of magnetosome formation is complex and involves several different genomic loci. However, the overall organization of the clusters identified in the genome has not been determined because of the lack of contiguous sequence information. In addition, the essential function of *mam* genes in magnetosome formation has not been proven because of the unavailability of mutants.

In this study, we estimated the spontaneous mutability of the magnetic phenotype and isolated and characterized a spontaneous nonmagnetic mutant of *M. gryphiswaldense* which harbors a large chromosomal deletion of approximately 80 kb comprising all identified *mam* genes. In addition, the sequence of a 35-kb genomic fragment from this region was analyzed, including the complete *mamAB*, *mamDC*, and *mms6* gene clusters and several additional hitherto unknown genes belonging to these clusters. We present data that indicate the existence of a large supercluster in *M. gryphiswaldense* that harbors all of the known *mam* genes and that may represent a putative magnetosome island.

Materials and Methods

Bacterial strains

Magnetospirillum gryphiswaldense strain MSR-1 (DSM 6361) (Schleifer *et al.*, 1991; Schüler and Köhler, 1992) was used in this study. A spontaneous nonmagnetic mutant,

designated strain MSR-1B, was isolated by plating on ACA medium (Schultheiss and Schüler, 2003) from a stock culture of *M. gryphiswaldense* MSR-1 which had been subjected to a number of serial subcultures in slush agar medium (0.4% agar) (Schleifer *et al.*, 1991) and stored at 4°C between transfers.

Flask cultivation

For small culture volumes (10 to 500 ml), *M. gryphiswaldense* strains MSR-1 and MSR-1B were cultured in flask standard medium (FSM) as described previously elsewhere (Heyen and Schüler, 2003). The medium contained 0.3% (wt/vol) sodium pyruvate as a carbon source. Iron was added as ferric citrate before autoclaving as specified. Alternatively, the medium was supplemented with α,α' -dipyridyl to chelate residual iron in a physiologically unavailable form (Schüler and Baeuerlein, 1996). Flask cultures of *M. gryphiswaldense* strains were carried out at 170 rpm (aerobic conditions) and 100 rpm (microaerobic conditions) in loosely stoppered 1-liter bottles containing 500 ml of FSM in an incubator shaker (New Brunswick).

Oxystat cultivation

Growth experiments at various O₂ tensions were performed in a modified dual-vessel laboratory fermentor system (Biostat A Twin; B. Braun Biotech. International, Melsungen, Germany) equipped for the automatic control of pH, temperature, and dissolved oxygen concentration (Oxystat) as described previously (Heyen and Schüler, 2003). Soy bean peptone was omitted from large-scale medium in order to create iron-deficient conditions because of the significant intrinsic iron content of peptone. Iron was added to FSM as ferric citrate as specified in the experiments. The medium (4 liters) was inoculated with 400 ml of a microaerobic flask culture. The initial cell number in the experiments was approximately 10⁸/ml.

Iron transport assay

The incorporation of ⁵⁵Fe was measured essentially as described previously (Schüler and Baeuerlein, 1996). For uptake measurements, cells in spent growth medium at an optical density at 565 nm of 0.3 to 0.35 were used. After 5 min of incubation of the cells at 30°C, transport was started by adding ⁵⁵FeCl₃ to a final concentration of between 0.5 and 50 μM. An activity of approximately 50 kBq was used per experiment. At intervals, samples of 0.2 ml were withdrawn, added to 5 ml of 0.1 M LiCl-5 mM EDTA, filtered

on a 0.45- μm -pore-size cellulose nitrate filter (Sartorius), and washed once with the same buffer. The filters were dried at 50°C, and the radioactivity was determined in a liquid scintillation counter. Inhibition studies were performed in the same way with a final concentration of 100 μM carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) and 1 mM 2,4-dinitrophenol (DNP).

Analytical methods

Cell growth and magnetism were measured turbidimetrically at 565 nm. The average magnetic orientation of cell suspensions (magnetism) was assayed by an optical method as described previously (Heyen and Schüler, 2003; Schüler *et al.*, 1995). Iron measurements were made with an atomic absorption spectrometer (3110; Perkin-Elmer, Überlingen, Germany) as described elsewhere (Grünberg *et al.*, 2001; Heyen and Schüler, 2003).

Electron microscopy

Negative staining was performed as described previously (Valentine *et al.*, 1968). For ultrathin sectioning, cells were washed and suspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8), fixed in the presence of a mixture of 0.2% (vol/vol) glutaraldehyde, and embedded in Spurr's low-viscosity resin as described previously (Walther-Mauruschat *et al.*, 1977). Micrographs were taken with a Philips EM301 electron microscope at an acceleration voltage of 80 kV. Magnifications were calibrated with a cross-lined grating replica (Balzers).

DNA techniques

Total DNA from *M. gryphiswaldense* strains was isolated as described previously (Marmur, 1961). Other DNA manipulations were carried out essentially by standard methods (Sambrook and Russel, 2001). Primers used for PCR (Table 1) were purchased from MWG Biotech (Berlin, Germany).

Table 1: Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-->3')	Size (bp) of amplified DNA	Amplified gene/positions ^a
CW1_2F	ACCTCGGTTGGGATTCTC		23256-23273
CW1_1R	GTACATCGCCGTTCTCG	420 bp	<i>mamN</i> /23660-23676
S16	TGTGGTCAAGGTGCCTGTG		30219-30237
CW10_3R	CCTTATCCGAGCCTGTTTCG	507 bp	<i>mamU</i> /30707-30726
DS24NF	ATGTCTAGCAAGCCGTCG		26498-26515
CW4_1R	CCAATGAACTCGATGAACG	640 bp	<i>mamA</i> /27120-27138
CW7_4F	TTCAAAGGCATCTTGGGGC		28346-28364
CW7_3R	CTCCGTGGATACCGAACTGT	548 bp	<i>mamB</i> /28894-28913
SSC_f+6/+24	CTTTCAACTTGCGCCGTA		5095-5113
SSC_r+355/+337	ATGTCTTCGTCGGACGCT	351 bp	<i>mamC</i> /5428-5446
SSD_f-15/+3	GGAAAGGCCAATACCATG		3655-3673
SSD_r+950/+932	TCAGGCTTATTCCCTCGCC	966 bp	<i>mamD</i> /3976-3994
SSF_f-5/+13	AAGCAATGGCCGAGACTA		3655-3673
SSF_r+315/+335	TCAGATCAGGGCGACTACAT	339 bp	<i>mamF</i> /3976-3994
SSX_f-15/+3	CTTGCCGGAGATCAGATG		3377-3395
SSX_r+291/+274	TTGCTTTGCCCTCGCTTA	282 bp	<i>mamG</i> /3643-3658
GFGD_f	TTAGGTTCAATCCGGGGC		5724-5742
GFGD_r	TCGGGACAATGCGACATC	435 bp	6141-6159
GFGD3'_f	AATTGGGCGTGTTCGATCA		7010-7028
GFGD3'_r	GCCTTGTCGATGACGAAG	336 bp	7328-7346
GFGD5'_f	TTGTGGACACAGCGAAGC		2978-2996
GFGD5'_r	ATGCACGATTCCCTCTCT	396 bp	3356-3374
mms16_r	GGCACGAAGCTTACTTCT		
mms16_f	ACGAAGTGGCCGTGGTGT	244 bp	<i>mms16</i>
bfr1_f	CAGTATTTCCTGCACGCC		
bfr1_r	ACAGTGACCCACAATTGG	495 bp	<i>bfr1</i>
bfr2_f	TGCCCCGTTACTTAAGGA		
bfr2_r	TCTCCTTACGCGATCTCG	510 bp	<i>bfr2</i>
SS14_f	ATGCACTGGCTCGAGGTT		31074-31091
SS15_r	TCGCGCCAAAAGTATCAG	365 bp	31422-31439
SS16_f	AGTTCATCGATCCGG		33060-33077
SS17_r	ACGCGCTGTTTCGAGATCG	432 bp	33474-33492

^a Positions refer to the sequence numbering shown in Fig. 6

Pulsed-field gel electrophoresis

For agarose plug preparation, mid-log-phase cells of strains MSR-1 and MSR-1B were harvested, washed, and resuspended in 1x PBS. Low-melting-point agarose (Invitrogen) was added to a final concentration of 1%. Cells in agarose plugs were lysed overnight at 55°C in 0.5 M EDTA-1% *N*-lauroylsarcosine (Sigma)-1 mg of proteinase K per ml

(Merck) and then washed six times with Tris-EDTA (pH 8.0). For restriction digests, single plugs were equilibrated with the appropriate restriction enzyme buffer for 10 min and then digested overnight with 20 units of enzyme (MBI Fermentas). Electrophoresis was performed with the Chef-DRIII System (Bio-Rad). Pulsed-field certified agarose (Bio-Rad) gels (1% in 0.5x Tris-borate-EDTA) were run at 14°C, 6 V/cm, and an angle of 120°. Pulse times varied according to the size of the fragments to be resolved. Digitized gels were analyzed by the ImageMaster1D software (version 3.0; Amersham-Pharmacia).

Generation and screening of a bacterial artificial chromosome library

For isolation and size fractionation of genomic DNA, preparative pulsed-field gel electrophoresis was performed essentially as described above. DNA greater than 600 kb was excised and dialyzed against 1x Tris-EDTA. Following *Hind*III digestion, the DNA was size selected by a further preparative pulsed-field gel electrophoresis run, and DNA fragments of 50 to 100 kb and 100 to 150 kb were excised from the gel. Agarose plugs were dialyzed against 1x Tris-EDTA, digested with Gelase (Epicentre), and concentrated and dialyzed on VSWP filters (Millipore) against 30% PEG8000 and 0.5x Tris-EDTA. The DNA was ligated to the *Hind*III-digested pIndigoBAC-5 cloning vector (Epicentre) and transformed into *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) with a Biometra cell porator and voltage booster system (350 V, 330 μ F, 4 k Ω). Transformed cells were plated onto Luria-Bertani agar plates containing chloramphenicol, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), and isopropylthiogalactopyranoside (IPTG) in standard concentrations. White colonies were initially screened by colony hybridization with a digoxigenin-labeled *mamA* probe. Positive clones were subsequently screened by PCR with all available primers for the amplification of various *mam* genes (Table 1). Out of four clones that proved positive for all *mam* genes tested, one clone harboring a 68-kb insert was subjected to sequence analysis.

Generation and analysis of genome sequence data from *M. gryphiswaldense*

Sequence data were obtained from the selected bacterial artificial chromosome and whole genome by a shotgun approach. Bacterial artificial chromosome DNA was isolated by alkaline lysis and purified on CsCl by standard procedures (Sambrook and Russel, 2001). For subcloning, DNA was sonicated, fragment ends were polished with T4 and Klenow polymerase (New England Biologicals), size selected, ligated in pUC19,

transformed into *E. coli* DH10B (Invitrogen), and selected on ampicillin (Sambrook and Russel, 2001). For the whole genome, shotgun DNA was prepared (genomic kit; Qiagen) from strain MSR-1 and processed in the same way. In both cases, plasmid libraries with 1.5-kb and 3.5-kb inserts were obtained. The inserts of the libraries were amplified by PCR (Radelof *et al.*, 1998) as templates for sequencing. End sequences were performed with Big Dye chemistry (ABI), M13 primers, and ABI 3700 capillary sequencers (ABI), resulting in more than 10-fold coverage for the bacterial artificial chromosome insert and 4.2-fold coverage for the genome, with a total contig length of 4.1 Mb.

All raw sequences were processed by Phred (Ewing and Green, 1998), controlled for vector or *E. coli* contamination, and assembled by Phrap (Staden *et al.*, 2000). Analyzed regions were manually edited in GAP4 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/sequencing/docs/phrap2gap/>). The quality of these sequence data was finished to justify the Bermuda rules (<http://www.ornl.gov/hgmis/research/Bermuda.html#1>). Finishing of analyzed sequences was done by resequencing clones and primer walking. Open reading frame (ORF) finding and annotation of *M. gryphiswaldense* genome sequences were performed with GenDB (Meyer *et al.*, 2003).

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequence of the 35-kb *M. gryphiswaldense* genomic region containing the complete *mamAB* and *mamDC* gene clusters has been deposited in the GenBank, EMBL, and DDJB libraries with accession number BX571797. The sequences for *bfr1*, *bfr2*, and *mms16* *M. gryphiswaldense* genes were deposited under BX571782 and BX571783, respectively.

Results

Estimation of spontaneous mutation frequency of the magnetic phenotype and isolation of the nonmagnetic mutant strain *M. gryphiswaldense* MSR-1B

We repeatedly observed that long-term cultures of *M. gryphiswaldense* were completely taken over by nonmagnetic mutants after only a few transfers. Plating of cells on ACA medium revealed that these cultures consisted homogeneously of nonmagnetic cells which formed white colonies, versus the dark brown colonies of magnetic cells. In order

to estimate the frequency with which spontaneous loss of cellular magnetism occurred, cells from a magnetic colony from the wild type were serially subcultured for 12 passages in 50 ml of FSM medium under continuous agitation and incubated at 28°C before plating. In repeated experiments, we failed to detect any nonmagnetic colonies among approximately 5×10^5 clones if the cells were kept under conditions of continuous growth. In contrast, nonmagnetic colonies were repeatedly isolated from other cultures which were grown to saturation and subsequently aged by keeping them for several days at 4°C without agitation to mimic storage conditions. Although the proportion of nonmagnetic clones varied between independent experiments, up to 0.5% of the total colonies from those stationary-phase cultures were nonmagnetic. One clone from a nonmagnetic long-term culture was selected for further characterization after verification of its identity as *M. gryphiswaldense* by sequencing of the 16S rRNA gene (not shown). The mutant strain was designated MSR-1B.

Phenotypic characterization of strain MSR-1B

The morphology of MSR-1B cells appeared to be very similar to that of the wild-type cells by phase-contrast microscopy. We were unable to detect any particles resembling native or aberrant magnetosome crystals in electron micrographs of MSR-1B cells. In addition, intracellular membrane structures which might represent empty, preformed magnetosome membrane vesicles were absent from ultrathin sections of embedded cells. Loss of magnetism was permanent, and no reversions to the wild-type phenotype were observed. Due to the lack of magnetosomes, cell pellets of the mutant were rusty red in color, versus the blackish appearance of magnetic wild-type cells.



Figure 1: (A) Electron micrograph of negatively stained cells of *M. gryphiswaldense* MSR-1B. The nonmagnetic mutant MSR-1B exhibits the characteristic morphology of magnetic spirilla but lacks electron-dense magnetic crystals and flagella. Bar, 1 μ m. (B) Ultrathin section of MSR-1B. Bar, 400 nm. (C) Ultrathin section of a wild-type *M. gryphiswaldense* MSR-1 cell, showing the characteristic magnetosome chain (M). Bar, 400 nm. PHA, polyhydroxyalkanoate; PPH polyphosphate.

In addition to a lack of a magnetic reaction, MSR-1B was substantially impaired in motility. Less than 0.1% of the population simultaneously displayed brief swimming

runs, as observed by microscopy. Consistently, the cells failed to form aerotactic bands in semisolid agar and in swarm plates (not shown). The reduced motility was accompanied by the lack of flagella (Fig. 1). Although the loss of motility in the population apparently was not total, we failed to detect any flagellum-like structures in numerous cells inspected by electron microscopy.

Growth and iron uptake characteristics of strain MSR-1B

The ability to form magnetosomes could not be restored by any of the growth conditions tested in an oxystat-controlled fermentor (e.g., increased iron concentration and growth at various oxygen concentrations; data not shown). Under microaerobic (0.25 mbar of O₂), iron-depleted (<1 μM Fe) conditions, MSR-1B grew slightly slower (average doubling time, 9.5 h) than the wild type (average doubling time, 8.9 h; Fig. 2A, B). However, iron-replete medium (80 μM Fe) inhibited the growth of MSR-1B (average doubling time, 11.1 h), whereas the growth of the wild type was significantly enhanced (average doubling time, 6.1 h) under these conditions (Fig. 2C, D). While the intracellular iron content of iron-deprived cells was similar both in the wild type (0.07% of dry weight) and in the mutant (0.06% of dry weight), wild-type cells accumulated significantly higher amounts of iron (1.3% of dry weight) than MSR-1B (0.4% of dry weight) when grown in iron-replete medium.

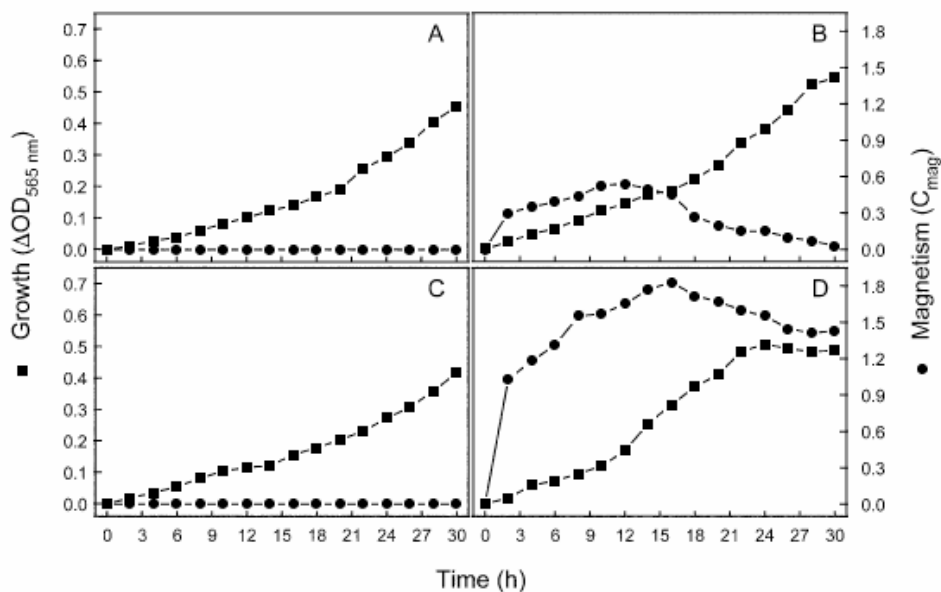


Figure 2: Growth (■) and magnetism (●) of *M. gryphiswaldense* strains MSR-1 (wild-type) and MSR-1B (nonmagnetic mutant) in the oxystat at microaerobic conditions (0.25 mbar of O₂). (A) MSR-1B, <1 μM Fe; (B) MSR-1, <1 μM Fe; (C) MSR-1B, 80 μM Fe; (D) MSR-1, 80 μM Fe

To analyze whether the nonmagnetic mutant strain MSR-1B was affected in its iron uptake kinetics, the incorporation of ^{55}Fe was measured at various iron concentrations (Fig. 3). Compared to the wild type, strain MSR-1B displayed significantly reduced iron uptake at all concentrations tested. A V_{\max} of $0.46 \text{ nmol of Fe min}^{-1} (\text{mg} [\text{dry weight}])^{-1}$ and a K_m of $21.6 \mu\text{M Fe}$ were calculated from these experiments for the wild-type MSR-1, compared to a V_{\max} of $0.18 \text{ nmol of Fe min}^{-1} (\text{mg} [\text{dry weight}])^{-1}$ and a K_m of $11.6 \mu\text{M Fe}$ determined in the mutant strain MSR-1B. Generally, the K_m and V_{\max} values determined for iron uptake in the wild type were slightly different from those in a previous study (Schüler and Baeuerlein, 1996), which might be due to the different growth conditions used in this study. In both strains, the addition of $100 \mu\text{M CCCP}$ or 1 mM DNP resulted in an approximately 45 to 70% and 25 to 40% inhibition of iron uptake, respectively (data not shown). These results indicate that the mutant strain is still capable of energy-dependent iron uptake, but at a drastically reduced rate.

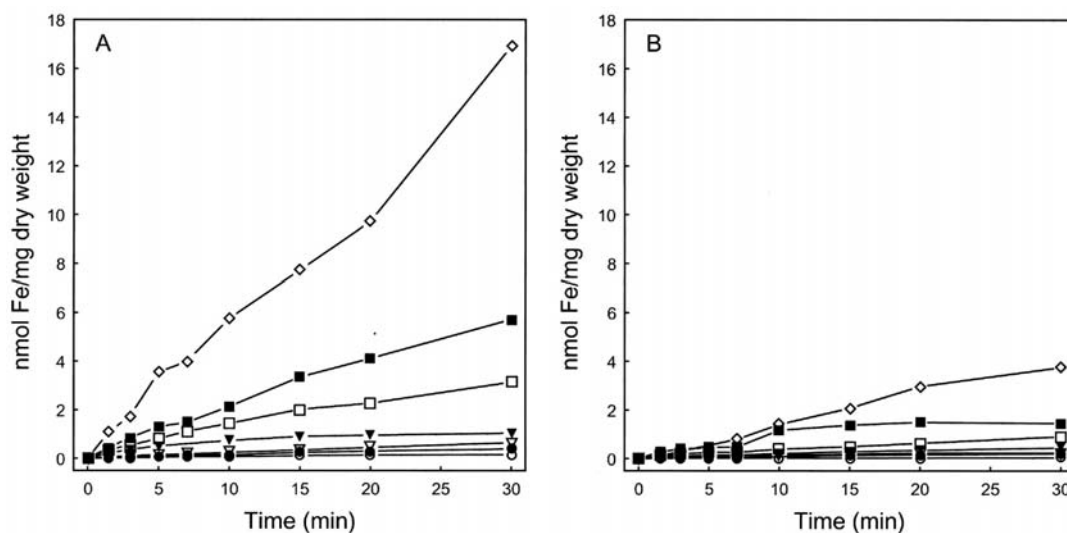


Figure 3: Iron uptake kinetics of MSR-1 (A) and MSR-1B (B). Cells from spent culture fluids were incubated with $0.5 \mu\text{M}$ to $50 \mu\text{M } ^{55}\text{FeCl}_3$. \circ $0.5 \mu\text{M}$; \bullet $1 \mu\text{M}$; ∇ $2 \mu\text{M}$; \blacktriangledown $5 \mu\text{M}$; \square $10 \mu\text{M}$; \blacksquare $20 \mu\text{M}$; \diamond $50 \mu\text{M Fe}$.

Large deletion in strain MSR-1B comprises all previously identified *mam* genes

To test whether genes of the previously identified *mam* clusters were affected by the mutation, their presence was analyzed in strain MSR-1B. Southern blots with probes derived from *mamA* and *mamB* revealed the absence of these genes in genomic digests of the mutant. In addition, *mamC* and *mamD* probes also failed to recognize a hybridizing band in MSR-1B, indicating that both genes were deleted in the mutant strain (Fig. 4).

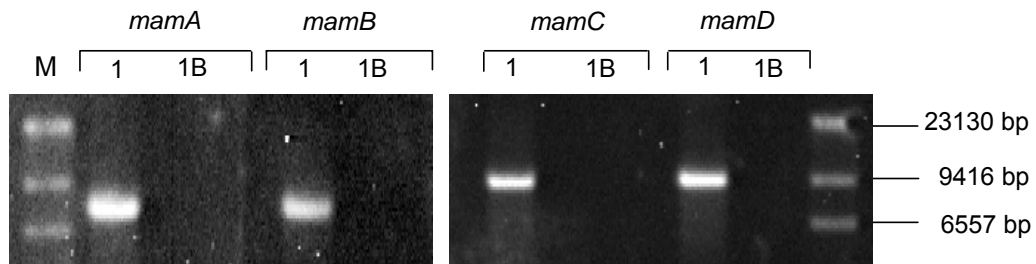


Figure 4: Southern blot analysis of *EcoRI* digested MSR-1 and MSR-1B genomic DNAs subsequently blotted and hybridized with digoxigenin-labeled *mamA*, *mamB*, *mamC* and *mamD* gene specific probes. Lanes: 1, strain MSR-1; 1B, strain MSR-1B; M, digoxigenin-labeled DNA size standards.

To determine the extent of the deletion, a number of additional genes from both the *mamAB* and *mamDC* clusters and sequences neighboring to them were analyzed by PCR. In addition to *mamA*, *mamB*, *mamC*, and *mamD*, all genes tested were detected in the wild type but deleted in strain MSR-1B (Table 2). A further set of tested genes were *mms16*, *bfr1*, and *bfr2*, which were previously suggested to be involved in magnetite synthesis in *Magnetospirillum* strain AMB-1 and *M. magnetotacticum* MS-1 (Bertani *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2001). Homologues with high similarity (90 to 98%) to *mms16*, *bfr1*, and *bfr2* were found in the *M. gryphiswaldense* genome and could also be detected in the mutant strain MSR-1B.

Table 2: Genes tested for presence in strains MSR-1 and MSR-1B

Gene or position	Gene present	
	MSR-1	MSR-1B
<i>mamA</i>	+	-
<i>mamB</i>	+	-
<i>mamC</i>	+	-
<i>mamD</i>	+	-
<i>mamF</i>	+	-
<i>mamG</i>	+	-
<i>mamN</i>	+	-
<i>mamU</i>	+	-
GFCDS ³	+	-
GFCD	+	-
GFCDS ³	+	-
<i>bfr1</i>	+	+
<i>bfr2</i>	+	+
<i>mms16</i>	+	+

To further determine the extent of the deletion, the genome sizes of the mutant and the wild type were compared by pulsed-field gel electrophoresis (Table 3). Genomic DNA from MSR-1B and MSR-1 clearly yielded different restriction patterns in digests with various enzymes. For the wild type, genome sizes of 4.59 Mb and 4.63 Mb were calculated from *Swa*I and *Pme*I digests, respectively, while strain MSR-1B yielded sizes of 4.52 and 4.54 Mb, respectively, with the same enzymes. This implied that a fragment of approximately 80 (50 to 110) kb that comprises all genes from both the *mamDC* and *mamAB* loci but not the *mms16* and *bfr* genes is deleted from the MSR-1B genome.

Table 3: Sizes of PFGE-resolved restriction fragments generated by *Swa*I and *Pme*I digestions of genomic DNA and estimated genome sizes in kb of strains MSR-1 and MSR-1B^a.

Fragment	<i>Swa</i> I		<i>Pme</i> I	
	MSR-1	MSR-1B	MSR-1	MSR-1B
A	1420	1420	1512	
B	1022	1026		1402
C	762	766	1178	1163
D	400		709	716
E	381		413	
F		360	278	
G		351		275
H	314		267	
I	300			264
J		300		223
K		293		213
L				149
M				142
N			139	
O			132	
Total	4599	4516	4628	4547

^a Fragment sizes unique to each strain are in bold.

As the extent of the large deletion suggested the loss of a considerable number of genes, the protein composition of MSR-1B cells grown under different conditions was analyzed for the absence of protein bands by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970). Under conditions of both iron excess and iron deficiency, the protein patterns of the mutant and the wild type were virtually identical. Likewise, no significant differences were detectable in microaerobically versus aerobically grown cells of both the mutant and the wild type (data not shown but available on request). These results indicated that no abundant proteins were among the products of the deleted genes.

Identification of a 50-kb genomic fragment harboring the *mamAB* and *mamDC* gene clusters in the *M. gryphiswaldense* wild-type strain

To localize the genomic region corresponding to the identified clusters, genomic digests of MSR-1 and MSR-1B were resolved by pulsed-field gel electrophoresis and subsequently hybridized with probes corresponding to *mamB* and *mamD* (Fig. 5). In *ScaI* digests of MSR-1, both probes recognized an identical fragment of approximately 50 kb that was missing in the MSR-1B mutant, as expected. Hence, it could be concluded that the *mamAB* and *mamDC* clusters are adjacent within less than 50 kb of the genome of MSR-1.

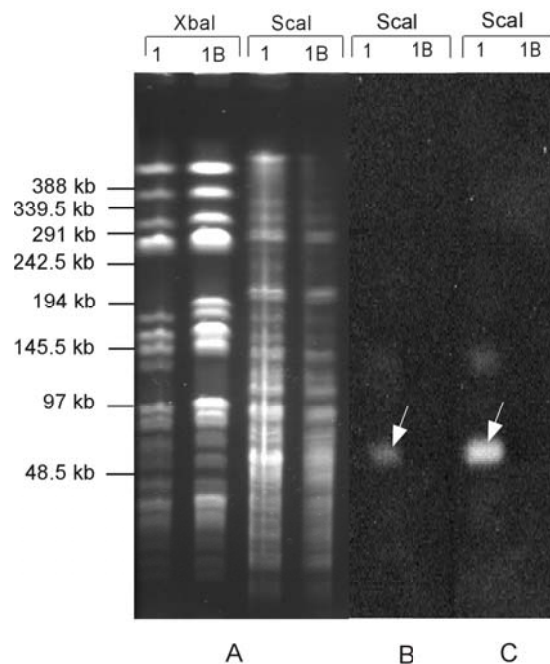


Figure 5: Southern blot analysis of *ScaI*-digested genomic DNA from *M. gryphiswaldense* MSR-1 and MSR-1B. Restriction fragments were resolved by PFGE (A) and subsequently blotted and hybridized with DIG-labeled *mamB* (B) and *mamD* (C) gene-specific probes, respectively. Arrows indicate a single genomic 50 kb *ScaI*-fragment cohybridizing to both *mamB* and *mamD*. Lanes: 1, strain MSR-1, 1B, strain MSR-1B

Genomic organization of the *mamAB* and *mamDC* clusters in *M. gryphiswaldense* MSR-1

After we had found evidence for a close genetic linkage of the *mamAB* and *mamDC* clusters, a genomic bacterial artificial chromosome library of *M. gryphiswaldense* MSR-1 was constructed and screened. A single clone harboring both the *mamAB* and *mamDC* clusters on a 68-kb fragment was identified and subjected to sequence analysis. The molecular organization of a 35-kb subsequence is presented in Fig. 6, and the characteristics of the annotated open reading frames are summarized in Table 4. A total of 37 genes were predicted. Although the extent of the deletion exceeds the size of the

genomic region covered by the cloned fragment, all tested genes that proved missing in the mutant were among the identified genes. Genes that encode known magnetosome-bound proteins are located within three different operon-like clusters:

***mamAB* cluster**

The *mamAB* cluster extends over 16.5 kb and comprises 17 consecutive, colinear ORFs that were designated *mamH* to *mamU*. The organization and sequence of the genes are similar to those in the homologous regions previously found in *M. magnetotacticum* MS-1 (Grünberg *et al.*, 2001). However, one ORF located at the right border of the *mamAB* cluster of *M. magnetotacticum* encoding one of three CDF transporters in this strain was absent in *M. gryphiswaldense*. Two additional ORFs (*mamH* and *mamI*) were identified at the left boundary of the cluster in *M. gryphiswaldense* MSR-1.

***mms6* cluster**

A putative 2.7-kb operon comprising four ORFs is located 15 kb upstream from the left border of the *mamAB* cluster. ORF4 is apparently homologous (78% similarity) to *mms6*, which has recently been identified as encoding a magnetosome-bound protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 (Arakaki *et al.*, 2003).

mamGFDC

The putative *mamGFDC* operon is located 9.2 kb upstream of the *mamAB* cluster and extends over 2.1 kb. Two additional colinear ORFs preceding *mamDC* were identified and designated *mamF* and *mamG*. *mamG* appears to encode an equivalent of the Mms5 protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 (Arakaki *et al.*, 2003), for which the gene has not been identified so far. In addition, MamG shares partial homology with MamD of MSR-1 as well as Mms6 and Mms7 of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1, which appears to be restricted to repetitive stretches of hydrophilic amino acid residues with a speculated function in iron binding (Arakaki *et al.*, 2003).

Remarkably, the regions flanking and between the clusters encoding magnetosome membrane proteins contain a considerable number of ORFs which have close homologues in the genomes of *M. magnetotacticum* MS-1 and strain MC-1 but yield no database hits to nonmagnetic organisms and hence can be considered specific to magnetotactic bacteria. One noticeable example of a gene with functional assignment outside of magnetotactic bacteria is *idiA* (ORF9), which is located between the *mamDC*

and *mamAB* clusters. The *IdiA* (iron deficiency induced) protein is an iron-binding, thylakoid-associated protein involved in iron metabolism in *Synechocystis* spp. and other cyanobacteria (Tölle *et al.*, 2002). A further remarkable feature of the region sequenced is the presence of six ORFs with homology to mobile DNA elements such as insertion sequence elements and integrases. Preliminary sequence analysis of the region adjacent to the 35-kb fragment revealed further numerous representatives of these gene families (data not shown). In total, these genes represent 14% of the total sequence shown and include members of at least two different major transposase families (transposase 11 and transposase 25).

Table 4: Characteristics of gene products deduced from ORFs identified within the 35 kb genomic region of *M. gryphiswaldense* MSR-1.

ORF number/ Name ^a	Size of gene product (amino acids)	Best BLAST hit ^b (accession no.)	E-value	homologous in MTB ^d (accession no.)	E-value	proposed function of BLAST homolog
ORF 1	230	-		<i>M. mag.</i> (ZP_00055313.1) MC-1 (ZP_00047740.1)	4e -05 0.003	unknown
ORF 2	347	r03081 <i>S. meliloti</i> (AL591792)	1e -05	<i>M. mag.</i> (ZP_00053421.1)	8e -77	unknown transmembrane
ORF 3	107	-		<i>M. mag.</i> (ZP_00053420.1) MC-1 (ZP_00042693.1)	6e -43 2e -07	unknown
ORF 4	136	-		<i>mms6</i> AMB-1 (BAC65162.1) <i>M. mag.</i> (ZP_00053419.1)	7e -11 7e -11	iron binding
<i>mamG</i>	84	-		<i>M. mag.</i> (ZP_00050810.1)	0.37	unknown
<i>mamF</i>	111	<i>abfI</i> <i>K. marxianus</i> (Z19865)	0.003	<i>M. mag.</i> (ZP_00053416.1) MC-1 (ZP_00042693.1)	9e -41 3e -09	transcription regulation
<i>mamD</i>	314	-		<i>M. mag.</i> (ZP_00053415.1) <i>mms7</i> AMB-1 (BAC65161.1) MC-1 (ZP_00043592.1)	4e -88 1e -87 2e -11	unknown
<i>mamC</i>	125	-		<i>M. mag.</i> (ZP_00053414.1) <i>mms13</i> AMB-1 (BAC65160.1) MC-1 (ZP_00042848.1)	4e -16 4e -16 2e -04	unknown
ORF 9	278	<i>idiA</i> <i>Synechococcus</i> spec. (Z48754)	9e -75			ferric iron transport
ORF 10	214	TRm2011 <i>S. meliloti</i> (NP_435256.1)	2e -30	MC-1 (ZP_00049672.1) <i>M. mag.</i> (ZP_00052583.1)	9e -41 2e -37	Transposase
ORF 11	436	<i>istA</i> <i>A. tumefaciens</i> (AE009415)	1e -90	MC-1 (ZP_00042589.1)	5e -25	IS21 family transposase
ORF 12	525	PA1673 <i>P. aeruginosa</i> (AE004595)	8e -11	<i>M. mag.</i> (ZP_00054420.1) <i>MC-1</i> (ZP_00043360.1)	2e -17 4e -07	hemerythrin-like
ORF 13	149	PA1673 <i>P. aeruginosa</i> (AE004595)	3e -07	<i>M. mag.</i> (ZP_00052998.1) MC-1 (ZP_00044836.1)	1e -35 9e -11	hemerythrin-like
ORF 14	317	<i>A. xylinus</i> (S35004)	3e -46	<i>M. mag.</i> (ZP_00052299.1) MC-1 (ZP_00048870.1)	3e -17 2e -09	transposase_11 IS1031C
ORF 15	76	MSR8681 <i>R. loti</i> (Q98AK2)	1e -20	<i>M. mag.</i> (ZP_00052258.1)	2e -07	unknown
ORF 16	415	MLL1146 <i>R. loti</i> (Q98L77)	3e -45	<i>M. mag.</i> (ZP_00053281.1)	0	unknown

Table 4: continued

ORF number/ Name ^a	Size of gene product (amino acids)	Best BLAST hit ^b (accession no.)	E-value	homologous in MTB ^d (accession no.)	E-value	proposed function of BLAST homolog
<i>mamH</i>	431	CT1475 <i>C. tepidum</i> (Q8KCE7)	8e -35	<i>M. mag.</i> (ZP_00053280.1) MC-1 (ZP_00043594.1)	e -170 5e -77	sugar (and other) transporter
<i>mamI</i>	87	-		MC-1 (ZP_00042845.1)	0.002	unknown
<i>mamE</i>	773	MLL5022 <i>R. loti</i> (Q98CS8)	9e -35	<i>mamE M. mag.</i> (ZP_00054403.1) MC-1 (ZP_00042846.1)	0 5e -55	serine protease
<i>mamJ</i>	466	SP1772 <i>S. pneumoniae</i> (E95206)	0.001	<i>mamJ M. mag.</i> (ZP_00054404.1)	2e -32	cell wall surface anchor family
<i>mamK</i>	347	<i>mreB M. kandleri</i> (QSTYX3)	2e -17	<i>mamK M. mag.</i> (ZP_00054405.1) MC-1 (ZP_00042854.1)	e -159 6e -84	actin-like
<i>mamL</i>	123	-		<i>mamL M. mag.</i> (ZP_00054405.1) MC-1 (ZP_00042854.1)	3e -07 0.048	unknown
<i>mamM</i>	318	BH1238 <i>B. halodurans</i> (F83804)	1e -33	<i>mamM M. mag.</i> (ZP_00054406.1) <i>mamM</i> MC-1 (ZP_00043611.1)	e -171 4e -77	cation efflux
<i>mamN</i> (ORF1) ^c	437	TM0934 <i>T. maritima</i> (AE001757)	6e -30	<i>mamN M. mag.</i> (ZP_00054407.1)	0	transporter
<i>mamO</i> (ORF2) ^c	632	CC1282 <i>C. crescentus</i> (C87408)	6e -15	<i>mamO M. mag.</i> (ZP_00054408.1) <i>mamO</i> MC-1 (ZP_00043610.1)	0 7e -77	serine protease
<i>mamP</i> (ORF3) ^c	270	OrfE0 <i>R. capsulatus</i> (CAA72164)	0.042	<i>mamP M. mag.</i> (ZP_0054409.1) <i>mamP</i> MC-1 (ZP_00043609.1)	e -106 1e -32	serine protease
<i>mamA</i> (ORF 4) ^c	217	MM2348 <i>M. mazei</i> (AE013478)	3e -15	<i>mamA M. mag.</i> (BAA11643.2) <i>mamA</i> MC-1 (ZP_00043608.1)	e -111 2e -35	TPR protein
<i>mamQ</i> (ORF 5) ^c	272	<i>lemA T. maritima</i> (AE001759)	3e -16	<i>mamQ M. mag.</i> (ZP_00054411.1) <i>mamQ</i> MC-1 (ZP_00043606.1)	e -109 1e -35	unknown
<i>mamR</i> (ORF 6) ^c	84			<i>mamR M. mag.</i> (ZP_00054412.1)	4e -29	unknown (periplasmic protein)
<i>mamB</i> (ORF 7) ^c	297	<i>ydfM Bacillus subtilis</i> (C69781)	1e -37	<i>mamB M. mag.</i> (ZP_00054413.1) <i>mamB</i> MC-1 (ZP_00043605.1)	e -156 7e -76	cation efflux
<i>mamS</i> (ORF 8) ^c	180	-		<i>mamS M. magn.</i> (ZP_00054414.1) <i>mamS</i> MC-1 (ZP_00043604.1)	1e -58 3e -11	unknown
<i>mamT</i> (ORF 9) ^c	174	-		<i>mamT M. mag.</i> (ZP_00054415.1) <i>mamT</i> MC-1 (ZP_00043609.1)	2e -81 5e -04	unknown (heme binding)
<i>mamU</i> (ORF 10) ^c	297	MLL9677 <i>R. loti</i> (AP003017)	6e -22	<i>mamU M. mag.</i> (ZP_00054416.1)	e -115	unknown
ORF 34	411	SP1776 <i>S. pneumoniae</i> (E95206)	7e -05			cell wall surface anchor family
ORF 35	254	<i>y4hP Rhizobium</i> spec (T10850)	3e -76	<i>M. mag.</i> (ZP_00052071.1) MC-1 (ZP_000442447.1)	2e -78 8e -37	transposase_25 IS66
ORF 36	104	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Q52599)	4e -16	MC-1 (ZP_00049269.1)	2e -07	transposase_25 IS 66
ORF 37	341	<i>y4hP Rhizobium</i> spec (T10850)	1e -108	<i>M. mag.</i> (ZP_00052071.1) MC-1 (ZP_00047840.1)	2e -76 3e -41	transposase_25 IS 66

^a Genes which encode known magnetosome-associated proteins are in bold.

^b Only hits in organisms other than MTB are shown.

^c ORF number in brackets refers to the previously described ORF in *M. gryphiswaldense* (16).

^d MC-1: *Magnetococcus* sp. strain MC-1, AMB-1: *Magnetospirillum* spec. strain AMB-1, *M. mag.*: *Magnetospirillum magnetotacticum* strain MS-1

Identification of the right boundary of the deletion

To pinpoint the excision site, a set of primer pairs were designed from the sequence. Primers SS16_f and SS17 yielded a PCR product in both strains MSR-1 and MSR-1B, while primers SS14_f and SS15_r failed to amplify a fragment from the mutant. We therefore concluded that the right boundary of the deletion is located between 31.4 kb and 33 kb of the bacterial artificial chromosome sequence (Fig. 6). Similar experiments revealed that the left boundary is not covered by the 68-kb bacterial artificial chromosome clone (data not shown).

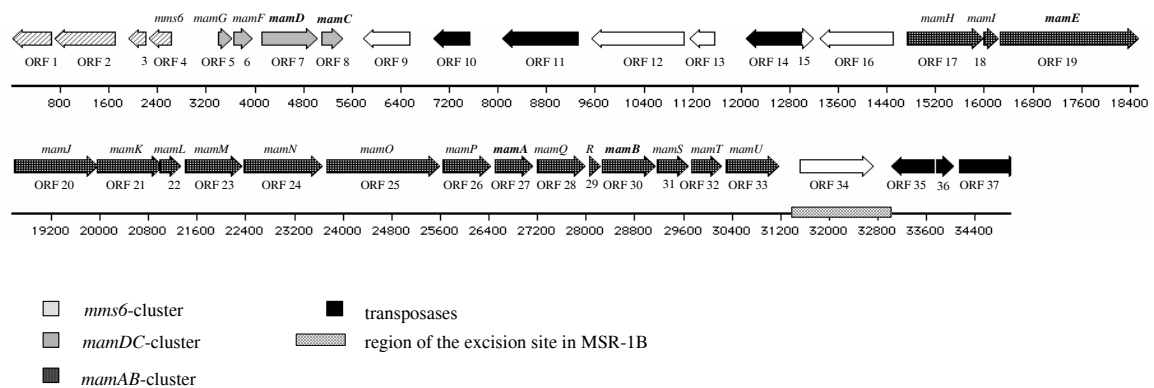


Figure 6: Molecular organization of the *M. gryphiswaldense* MSR-1 35-kb genomic region comprising all identified magnetosome genes. Names of ORFs encoding known magnetosome-associated proteins are shown in bold.

Discussion

The spontaneous loss of the ability to form magnetosomes has been observed occasionally in several different strains of magnetotactic bacteria in our laboratory and by others ((Blakemore *et al.*, 1979); B. L. Dubbels, A. A. Dispirito, J. D. Morton, J. D. Semrau, and D. A. Bazylinski, Abstr. 101st Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 2001, p. 463-464). However, neither the frequency at which the loss of magnetism occurred nor the genotype of those mutations had been determined. In this study, we failed to reproduce the isolation of spontaneous nonmagnetic mutants from exponentially growing serial subcultures. However, after incubation and aging of cells under stationary-phase conditions, the frequency of nonmagnetic mutants in the cultures increased from virtually undetectable levels ($<10^{-5}$) up to 0.5% of the population. Consistently, long-term stock cultures of several *Magnetospirillum* strains were

occasionally found to be entirely taken over by nonmagnetic mutants after only a few serial transfers.

As the deletion mutant MSR-1B was impaired in growth in our experiments, the wild type would be expected to outcompete mutant cells in a mixed population. However, the conditions associated with the storage of cultures apparently not only favor the induction of mutations, but also select for growth of mutants. Although other mutants have not yet been characterized in as much detail as MSR-1B, preliminary analysis revealed their heterogeneous nature (unpublished data). An increase in genetic variability associated with the conditions of aging and stationary phase has been reported repeatedly for different bacteria. For instance, the spontaneous loss of virulence has been described for long-term stab and aging liquid cultures of *Xanthomonas oryzae*, a phenomenon that was referred to as stationary-phase variation (Rajeshwari and Sonti, 2000).

The starvation conditions encountered during stationary-phase incubation were speculated to permit a transient increase in the mutation rate due to a variety of factors (Finkel and Kolter, 1999). In several cases, increased genetic variation could be clearly linked to the accumulation of insertion sequence element transpositions in stationary-phase cultures (Naas *et al.*, 1994; Rajeshwari and Sonti, 2000). Insertion sequence elements have been associated with chromosome rearrangements and are often involved in assembling arrays of genes with so-called accessory functions (Mahillon and Chandler, 1998; Mahillon *et al.*, 1999). The abundant occurrence of insertion sequence elements at a high density is a striking feature of the *mam* region. It will be interesting to see if the large number of mobile genetic elements accounts for the particularly high genetic plasticity and instability of this region. In fact, in MC-1 and *M. magnetotacticum*, a similar but not identical arrangement of the *mam* clusters can be inferred from the available data (http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html), e.g., several sequences appear to be shuffled or exchanged between different sites, which implies that these regions might have undergone several rearrangements.

In strain MSR-1B, the large deletion of approximately 80 kb comprises all known *mam* genes. Sequence analysis revealed that the *mamAB* and *mamDC* loci in *M. gryphiswaldense* are separated by less than 10 kb and are in close proximity to a further putative operon encoding magnetosome membrane-associated proteins. Unlike these genes, *mms16*, encoding a magnetosome membrane-associated protein in *Magnetospirillum* strain AMB-1 (Okamura *et al.*, 2001), and the bacterioferritin genes

bfr1 and *bfr2*, which were speculated to be involved in magnetite biomineralization (Bertani *et al.*, 1997), were unaffected by the deletion in MSR-1B. Data from Bertani and coworkers suggested a putative clustering of genes involved in magnetosome biomineralization in the genome of *M. magnetotacticum* MS-1 (Bertani *et al.*, 2001). However, our findings do not suggest that these genes are intimately linked to the *mamAB* and *mamDC* clusters in *M. gryphiswaldense*.

In addition to the inability to form magnetosomes, the mutant strain MSR-1B shows impaired growth depending on the extracellular iron concentration and displays reduced motility. The ultrastructural analysis (Fig. 1) revealed not only the total absence of any electron-dense structures resembling native or aberrant magnetosome crystals, but also of intracellular membrane structures presumably identical to the empty vesicular membrane structures found by Gorby *et al.* (Gorby *et al.*, 1988) in iron-deprived cells.

Whereas the uptake and growth kinetics of MSR-1B indicated that the mutant is still capable of energy-dependent iron uptake and growth in iron-replete conditions, the uptake and accumulation of iron were substantially reduced. Thus, it is likely that different uptake systems are involved to supply iron for growth and magnetosome formation. The deletion of *mamB* and *mamM* in the uptake-impaired mutant MSR-1B would be consistent with the presumptive function of these CDF transporters in magnetosome-directed iron transport (Grünberg *et al.*, 2001). Interestingly, growth of MSR-1B appeared to be sensitive to elevated concentrations of iron. This might indicate a contribution of magnetite formation to iron homeostasis and detoxification of potentially harmful high intracellular levels, as, for instance, in the iron storage proteins ferritin and bacterioferritin (Andrews, 1998). Apart from the functions discussed above, we failed to detect any further phenotypic traits associated with the deletion. This indicates that the lost genes are not essential for growth under laboratory conditions but involve multiple functions essential to magnetosome biomineralization.

It might be anticipated that a deletion equivalent to about 2.0% of the genome would result in a noticeable number of bands missing from the one-dimensional proteome of strain MSR-1B. The absence of a single periplasmic protein band could be linked to the nonmagnetic phenotype by the analysis of the one-dimensional protein profile of a spontaneous mutant derived from the magnetotactic bacterial strain MV-1 (B. L. Dubbels, A. A. Dispirito, J. D. Morton, J. D. Semrau, and D. A. Bazylinski, Abstr. 101st Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 2001, p. 463-464). In our experiments,

proteins affected by deletion apparently did escape detection by one-dimensional PAGE analysis and are not highly abundant cellular proteins. This was expected, at least for the known magnetosome membrane-associated proteins, as it has been estimated that all magnetosome membrane proteins constitutes less than 0.1% of the total cellular protein (Grünberg *et al.*, 2001).

Recently, partial genome data for various magnetotactic bacteria have become available, and homologous genes encoding magnetosome proteins were identified in strains of *Magnetospirillum* and strain MC-1 (Grünberg *et al.*, 2001). In this study, sequence information for the complete *mamAB* and *mamDC* regions of *M. gryphiswaldense*, which contain all genes encoding known magnetosome membrane proteins, is presented. The alignment of magnetosome genes is not contiguous but interrupted by genes of apparently unrelated functions, suggesting a mosaic-like structure. Interestingly, a considerable number of ORFs are located in this region, which appear to be specific to magnetotactic bacteria. Their universal but exclusive occurrence in magnetotactic bacteria as well as their colocation with the *mam* gene clusters suggest specific involvement in magnetosome formation. *mamK* of the *mamAB* cluster displays extensive similarity to *mreB*, which was previously characterized as a gene encoding an actin-like cytoskeletal protein (Jones *et al.*, 2001; van den Ent *et al.*, 2001a). Multiple homologues of *mreB* are present in the genomes of *M. magnetotacticum* MS-1, strain MC-1, and *M. gryphiswaldense*. As in *M. gryphiswaldense*, at least one homologue was found collocated with either the *mamAB* or *mamDC* cluster in the other two magnetotactic bacteria (unpublished data). It is therefore tempting to speculate that MreB may be associated with the formation of a cytoskeletal superstructure potentially involved in the organization and segregation of magnetosome chains (Schüler, 2000).

Several of the characteristics mentioned above are strongly reminiscent of those described for genome islands in other bacteria (Finan, 2002). Genomic islands usually comprise large regions (10 to 500 kb in size) that are present, for instance, as pathogenicity islands in the genomes of pathogenic strains but absent from the genomes of nonpathogenic members of the same or related species. They often encode determinants required for pathogenicity but are nonessential for growth outside the host and are capable of horizontal gene transfer (Carniel, 2001; Hacker and Kaper, 2000). Recently, it has become apparent that genetic structures similar to pathogenicity islands are also parts of the genome of many nonpathogenic bacteria, where they carry gene functions required for certain metabolic activities, such as symbiosis (Sullivan and

Ronson, 1998; Sullivan *et al.*, 2002). The flanking regions are usually characterized by the presence of mobile genetic elements such as insertion sequences (Mahillon and Chandler, 1998), which play a role in the mobilization and rearrangement of the island. In addition, many genomic islands have the tendency to delete spontaneously (Hacker and Kaper, 2000).

In conclusion, several of the common features of genomic islands are apparently shared by the deleted region in MSR-1B harboring the *mam* clusters. Thus, it can be inferred that most of the gene functions specifically required for magnetite synthesis are organized within a large genomic supercluster, which might be tentatively termed a magnetosome island, and putatively have been distributed by horizontal gene transfer. A growing number of bacterial isolates from different environments can be clearly identified as *Magnetospirillum* species based on 16S rRNA sequence analysis and morphological and physiological characteristics but lack the ability to form magnetosomes (Coats *et al.*, 1999; Shinoda *et al.*, 2000). It will be interesting to see if these nonmagnetic magnetospirilla are distinguished from their magnetic relatives by the absence of the magnetosome island.

Acknowledgments

This study was supported by the BMBF and MPG.

We thank Thierry Lombardot (bioinformatics group, Max-Planck-Institute Bremen) for kind introduction to GenDB and Mario Sontag and Janina Thiel (sequencing group, Max-Planck-Institut Berlin) for help in finishing the DNA sequence and technical assistance. Continuing support by Friedrich Widdel (Dept. of Microbiology, Max-Planck-Institute Bremen) is gratefully acknowledged.

References

- Andrews, S.C. (1998) Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **40**: 281-351.
- Arakaki, A., Webb, J., and Matsunaga, T. (2003) A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**: 8745-8750.
- Balkwill, D.L., Maratea, D., and Blakemore, R.P. (1980) Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**: 1399-1408.
- Bazylnski, D.A., Garratt-Reed, A.J., and Frankel, R.B. (1994) Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech.* **27**: 389-401.
- Bazylnski, D.A. (1995) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**: 337-343.
- Bertani, L.E., Huang, J.S., Weir, B.A., and Kirschvink, J.L. (1997) Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **201**: 31-36.
- Bertani, L.E., Weko, J., Phillips, K.V., Gray, R.F., and Kirschvink, J.L. (2001) Physical and genetic characterization of the genome of *Magnetospirillum magnetotacticum*, strain MS-1. *Gene* **264**: 257-263.
- Blakemore, R.P., Maratea, D., and Wolfe, R.S. (1979) Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **140**: 720-729.
- Carniel, E. (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* **3**: 561-569.
- Coats, J.D., Michaelidou, U., Bruce, R.A., O'Connor, S.M., Crespi, J.N., and Achenbach, L.A. (1999) Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 5234-5241.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base calling of automated sequencer traces with phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186-194.
- Finan, T.M. (2002) Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* **184**: 2855-2856.
- Finkel, S.E., and Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 4023-4027.
- Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., and Blakemore, R.P. (1988) Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**: 834-841.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., and Schüller, D. (2001) A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4573-4582.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641-679.
- Heyen, U., and Schüller, D. (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 536-544.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Kirschvink, J.L., and Hagadorn, J.W. (2000) A grand unified theory of biomineralization. In *Biomineralization*. Baeuerlein, E. (ed). Weinheim, Germany: Wiley VCH, pp. 139-149.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.
- Mahillon, J., Leonard, C., and Chandler, M. (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol.* **150**: 675-687.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Matsunaga, T., and Takeyama, H. (1998) Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramolecular Science* **5**: 391-394.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A.C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R., and Pühler, A. (2003) GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 2187-2195.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W.M., and Arber, W. (1994) Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **136**: 721-730.
- Okamura, Y., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2001) A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 48183-48188.
- Okuda, Y., Denda, K., and Fukumori, Y. (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.
- Pallen, M.J., and Wren, B.W. (1997) The HtrA family of serin proteases. *Mol. Microbiol.* **26**: 209-221.
- Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**: 99-103.
- Radelof, U., Hennig, S., Seranski, P., Steinfath, M., Ramser, J., Reinhardt, R., Poustka, A., Francis, F., and Lehrach, H. (1998) Preselection of shotgun clones by oligonucleotide fingerprinting: an efficient and high throughput strategy to reduce redundancy in large-scale sequencing projects. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5358-5364.
- Rajeshwari, R., and Sonti, R.V. (2000) Stationary-phase variation due to transposition of novel insertion elements in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* **182**: 4797-4802.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schleifer, K., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., and Köhler, M. (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., and Köhler, M. (1992) The isolation of a new magnetic spirillum. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**: 150-151.
- Schüler, D., Rainer, U., and Bauerlein, E. (1995) A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 139-145.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1996) Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**: 301-307.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1997a) Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Phys. Iv* **7**: 647-650.

- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1997b) Iron uptake and magnetic crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In *Transition metals in microbial metabolism*. Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publisher, pp. 159-185.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1998) Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**: 159-162.
- Schüler, D., and Frankel, R.B. (1999) Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 464-473.
- Schüler, D. (2000) Characterization of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In *Biomineralization*. (ed.), E.B. (ed). Weinheim: Wiley-VCH, pp. 109-118.
- Schüler, D. (2002) The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* **5**: 209-214.
- Schultheiss, D., and Schüler, D. (2003) Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**: 89-94.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Ue, M., Hiraishi, A., and Kato, N. (2000) Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Appl. Environ. Microb.* **66**: 1286-1291.
- Staden, R., Beal, K.F., and Bonfield, J.K. (2000) The staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**: 115-130.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe*-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5145-5149.
- Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J., and Ronson, C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* **184**: 3086-3095.
- Thomas-Keprta, K.L., Clemett, S.J., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., McKay, C.P., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., Jr., and Romanek, C.S. (2002) Magnetofossils from ancient mars: a robust biosignature in the martian meteorite ALH84001. *Appl. Environ. Microb.* **68**: 3663-3672.
- Tölle, J., Michel, K.P., Kruip, J., Kahmann, U., Preisfeld, A., and Pistorius, E.K. (2002) Localization and function of the IdiA homologue Slr1295 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* **148**: 3293-3305.
- Valentine, R.C., Shapiro, B.M., and Stadtman, E.R. (1968) Regulation of glutamine synthase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochem.* **7**: 2143-2152.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- Walther-Mauruschat, A.M., Aragno, M., Mayer, F., and Schlegel, H.G. (1977) Micromorphology of gram-negative hydrogen bacteria. II. Cell envelope, membranes, and cytoplasmic inclusions. *Arch. Microbiol.* **114**: 101-110.

A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth

Susanne Ullrich,⁴ Michael Kube,⁵ Sabrina Schübbe,¹ Richard Reinhardt² and Dirk Schüler^{1*}

Journal of Bacteriology (2005) **187** (21): 7176-7184

⁴ Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, Germany

⁵ Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Germany

* Corresponding author

Abstract

Genes involved in magnetite biomineralization are clustered in the genome of the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. We analyzed a 482-kb genomic fragment, in which we identified an approximately 130-kb region representing a putative genomic "magnetosome island" (MAI). In addition to all known magnetosome genes, the MAI contains genes putatively involved in magnetosome biomineralization and numerous genes with unknown functions, as well as pseudogenes, and it is particularly rich in insertion elements. Substantial sequence polymorphism of clones from different subcultures indicated that this region undergoes frequent rearrangements during serial subcultivation in the laboratory. Spontaneous mutants affected in magnetosome formation arise at a frequency of up to 10^{-2} after prolonged storage of cells at 4°C or exposure to oxidative stress. All nonmagnetic mutants exhibited extended and multiple deletions in the MAI and had lost either parts of or the entire *mms* and *mam* gene clusters encoding magnetosome proteins. The mutations were polymorphic with respect to the sites and extents of deletions, but all mutations were found to be associated with the loss of various copies of insertion elements, as revealed by Southern hybridization and PCR analysis. Insertions and deletions in the MAI were also found in different magnetosome-producing clones, indicating that parts of this region are not essential for the magnetic phenotype. Our data suggest that the genomic MAI undergoes frequent transposition events, which lead to subsequent deletion by homologous recombination under physiological stress conditions. This can be interpreted in terms of adaptation to physiological stress and might contribute to the genetic plasticity and mobilization of the magnetosome island.

Introduction

Magnetotactic bacteria (MTB) form intracellular chains of magnetosomes, which are specific inorganic structures that serve as devices for magnetic navigation in the aquatic habitats of these organisms (Bazylinski and Frankel, 2004). Despite great interdisciplinary interest in magnetosome formation, the molecular mechanism of biomineralization and its genetic determination have remained poorly understood, mostly due to previous difficulties in genetic manipulation and in particular due to the lack of appropriate mutants for functional analysis, as well as the lack of complete genome data (Bazylinski and Frankel, 2004).

The microaerophilic alphaproteobacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* synthesizes magnetosomes, which consist of crystals of magnetite (Fe₃O₄) enclosed in intracytoplasmic vesicles of the magnetosome membrane (MM) (Schüler, 2004). The MM is a unique compartment which provides spatial and physicochemical control over magnetite biomineralization and has a distinct biochemical composition. Besides phospholipids, the MM contains a complex, specific subset of magnetosome membrane proteins (MMPs) (Grünberg *et al.*, 2004). The classes of MMPs in *M. gryphiswaldense* include MMPs with presumed functions in magnetosome-directed transport of iron, control of crystal growth, and assembly of magnetosome chains. The MMPs are encoded by the *mam* and *mms* genes, which are clustered in three operons that are close to each other (Grünberg *et al.*, 2001; Grünberg *et al.*, 2004).

Expression of the magnetic phenotype in *M. gryphiswaldense* is under physiological control and depends on the availability of iron and the presence of microaerobic conditions (Heyen and Schüler, 2003; Schüler and Baeuerlein, 1996, 1998). In addition, the magnetic phenotype seems to be genetically unstable, and spontaneous nonmagnetic mutants have been isolated repeatedly from various MTB during subcultivation in the laboratory (Blakemore *et al.*, 1979; Dubbels *et al.*, 2004). In *M. gryphiswaldense* frequent spontaneous loss of the magnetic phenotype has been observed in long-term cultures during stationary growth (Schübbe *et al.*, 2003). Nonmagnetic mutants accumulated at a frequency of 0.5×10^{-2} in aged cultures that were stored at 4°C, whereas these nonmagnetic mutants were virtually not detectable in growing cultures during repeated serial transfers. One nonmagnetic mutant designated strain MSR-1B was found to have a large chromosomal deletion which was estimated to extend over approximately 80 kb and encompasses the entire *mamAB*, *mamGFDC*, and

mms6 operon-like gene clusters that encode all MMPs (Grünberg *et al.*, 2004). Partial sequence analysis of the deleted region, as well as a region adjacent to the right boundary, revealed that this region contains a number of unknown genes and is remarkably rich in insertion elements (IS elements). The characteristics of this chromosomal region suggested that there is a genomic "magnetosome island" (MAI), which seems to be conserved in various MTB and might extend beyond the sequenced 35-kb region in *M. gryphiswaldense* (Grünberg *et al.*, 2001; Schübbe *et al.*, 2003).

Genomic islands were first described as pathogenicity islands in pathogenic bacteria, but mobile and accessory genetic elements similar to pathogenicity islands have been identified in a range of nonpathogenic species isolated from the environment (Dobrindt *et al.*, 2004). Genomic islands are often found inserted near tRNA genes, typically contain direct and inverted repeat sequences and IS elements in the flanking regions, and exhibit genetic instability, which suggests that they can be acquired and transmitted via horizontal gene transfer.

In this study, we analyzed the putative MAI of *M. gryphiswaldense*. Sequence analysis of a genomic 482-kb contig revealed the presence of a conspicuous 130-kb region that, in addition to the previously identified magnetosome genes, contains genes putatively involved in magnetosome biomineralization. In addition, we investigated the occurrence of spontaneous magnetosome mutations that were associated with various types of deletion events in this region. Our results provide further evidence that there is a genomic MAI that undergoes frequent transposition and subsequent deletion under physiological stress conditions.

Materials and Methods

Bacterial strains

Different strains, subcultures, and mutants were derived from *M. gryphiswaldense* strain MSR-1 (DSM 6361). A fresh subculture was obtained from the stock of MSR-1 deposited in the DSMZ strain collection and was designated the "archetype" strain (MSR-1A). A magnetic derivative of MSR-1 which had been routinely subcultured for an undefined number of passages in the laboratory was designated the "lab strain" (MSR-1L). Strain MSR-1B is a spontaneous nonmagnetic mutant of strain MSR-1 that has a large deletion comprising all known magnetosome genes (Schübbe *et al.*, 2003).

Growth conditions

Cells grown on solid activated charcoal agar (ACA) were incubated at 28°C in anaerobic jars (Ochs, Bovenden-Lenglern, Germany) under an O₂-CO₂-N₂ (0.5:5:94.5, vol/vol/vol) atmosphere (Schultheiss and Schüler, 2003). Liquid cultures of *M. gryphiswaldense* strains were routinely grown microaerobically in flask standard medium (FSM) as described previously (Heyen and Schüler, 2003) at 28°C with 50 µM ferric citrate as the iron source. Alternatively, iron was added at concentrations up to 2,000 µM for iron stress experiments, or ferric citrate was omitted from the growth medium and 10 µM 2,2'-dipyridyl was added for iron starvation experiments. The effect of aerobic conditions was determined with 50-ml cultures which were agitated for 24 h at 150 rpm (INNOVA 4330) with free gas exchange with air. Establishment of aerobic conditions was indicated by the repression of magnetosome formation in the cells. For nutritional deprivation experiments, carbon and nitrogen sources were omitted from the medium. The effect of hydrogen peroxide was tested similarly, as described previously (Maringanti and Imlay, 1999). Overnight cultures were diluted into fresh FSM and grown to an optical density at 565 nm of 0.2. One-milliliter aliquots were exposed to 3% H₂O₂, and the cultures were shaken at 28°C for 10 min. Exposure was stopped by diluting the cultures 625-fold into FSM medium containing 130 U catalase/ml. For cold storage experiments, liquid cultures of *M. gryphiswaldense* strain MSR-1L were incubated for various times at 4°C under microaerobic or aerobic conditions before they were plated onto ACA.

Isolation of spontaneous nonmagnetic mutants

Cells of MSR-1L from different incubation experiments were spread onto ACA (10² to 10³ cells per plate) and incubated as described above. Colonies that developed after 5 to 7 days were visually examined for altered colony morphology. All colonies whose appearance differed from the appearance of the wild-type colonies were considered mutants. Compared to the wild type, which was dark brown due to the presence of fully developed magnetosome chains, clones with a reduced magnetosome content could be recognized by the lighter brown colonies, whereas magnetosome-free mutants were cream to whitish. After restreaking, mutant phenotypes were verified by microscopic inspection of the magnetic reaction, electron microscopy, and growth experiments. The average magnetic orientation of cell suspensions ("magnetism") was assayed by an optical method as described previously (Schüler *et al.*, 1995). Briefly, cells were aligned

at different angles relative to the light beam by means of an external magnetic field. The ratio of the resulting maximum and minimum scattering intensities (C_{mag}) was previously demonstrated to be correlated with the average number of magnetic particles and can be used for semiquantitative assessment of magnetite formation (for practical purposes, a C_{mag} value of 0 was assumed for nonmagnetic cells). Approximately 500 stable mutants with aberrant morphology selected from a total of approximately 2.5×10^5 screened colonies were investigated further.

Generation and analysis of genome sequence data

For BAC and whole-genome shotgun (WGS) cloning, genomic DNA was obtained from different independent subcultures of *M. gryphiswaldense* MSR-1A that were serially transferred for an undefined number of passages. Isolation of a BAC (bacterial artificial chromosome) clone harboring the magnetosome genes, generation of a whole-genome shotgun library, and sequencing were performed as described previously (Schübbe *et al.*, 2003). In addition, a cosmid library (Epicenter Technologies, Madison, WI) was generated, and end sequences determined from 500 clones were used for WGS assembly. Sequencing gaps were eliminated and low-quality regions were improved by resequencing of selected plasmids/cosmids, primer walking, and sequencing of long-range PCR products. The quality of raw sequence data was checked with PHRED (Ewing and Green, 1998). Shotgun sequences were assembled with Phrap (<http://www.genome.bnl.gov/Software/UW/>), and Consed (version 14.00) (Gordon *et al.*, 1998) was used for final editing of the sequence. The final quality of the sequence data was less than 1 error in 20,000 bases. Glimmer 2.0 was used for prediction of open reading frames (ORFs) in the finished sequence (Delcher *et al.*, 1999). ORF predictions were manually refined using ARTEMIS (Rutherford *et al.*, 2000). Similarity searches for annotation were carried out with BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) by using the UniProt database and the translated amino acid sequences encoded by predicted ORFs as queries. Functional assignments were determined with the INTERPRO system (Apweiler *et al.*, 2001), using the modules PROSITE, Pfam, PRINTS, ProDom, SMART, TIGRFAMs, and SIGNALP (Baxevanis, 2003). These methods were implemented in the web-based platform HTGA (High Throughput Genome Annotation) (Rabus *et al.*, 2005) and were used for final annotation. tRNA genes were identified by the algorithm described at <http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/> (Lowe and Eddy, 1997).

PCR amplification and sequence analysis

Amplification of genetic markers within the 482-kb fragment was performed using standard procedures. The primers were purchased from MWG Biotech (Ebersberg, Germany). For direct sequencing the PCR products were purified (PCR purification kit; QIAGEN, Hilden, Germany) and sequenced using BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with an ABI 3700 capillary sequencer. Sequence data were analyzed with the Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI) and MacVector 7.0 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, United Kingdom) programs. Other DNA manipulations were carried out by using standard methods (Sambrook and Russel, 2001).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis by Southern hybridization

Approximately 10 µg of chromosomal DNA was digested with EcoRI, EcoRV, MunI, SspI, and BamHI and electrophoresed in a 1.5% agarose gel. The DNA was blotted and hybridized by using standard procedures. Probes were labeled using an [α -³³P]dATP HexaLabel DNA labeling kit (MBI Fermentas). Prehybridization was carried out in 20 ml of Church's phosphate buffer (0.25 M Na₂HPO₄ [pH 7.2], 1 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate) at 65°C for at least 1 h. Hybridization was performed in the same Church's buffer that was used for prehybridization containing the labeled probe at 60 to 65°C for at least 15 h. Washing was done twice at 65°C in wash buffer (0.1x SSC, 0.1% [wt/vol] sodium dodecyl sulfate) for 30 min (1x SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate). After the membranes were washed, they were exposed to a phosphor screen (Kodak storage phosphor screen; Molecular Dynamics, Krefeld, Germany) for 4 h to 1 day, and the hybridized signals were captured as image files by using a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences).

Electron microscopy

Cells from concentrated suspensions were adsorbed onto 300-mesh carbon-coated copper grids (PLANO, Wetzlar, Germany) and rinsed twice with water. Samples were viewed and recorded without staining using an EM 10 transmission electron microscope (Zeiss, Germany) at an accelerating voltage of 70 kV.

Nucleotide sequence accession numbers

The complete sequences of the 68-kb BAC clone and the 130-kb whole-genome shotgun assembly have been deposited in the GenBank, EMBL, and DDJB libraries under accession numbers BX571797 and AM085146, respectively.

Results

A 482-kb genomic fragment harbors a conspicuous 130-kb region representing an MAI

As previous work indicated that there is a large region resembling a genomic island which might extend beyond the previously analyzed 35-kb subsequence of the 68-kb BAC sequence region, we used two approaches to obtain extended and contiguous sequence information. First, a 482-kb contig was generated from the WGS assembly representing more than 10% of the whole genome (4.6 Mb) of *M. gryphiswaldense*. Second, sequence analysis of the BAC insert was completed, which generated an additional 33.6 kb of sequence information to the right of the previously analyzed 35-kb sequence. In addition to the known magnetosome genes, annotation of the 482-kb contig revealed numerous genes that encode diverse well-known metabolic functions that do not have any obvious relevance to magnetosome biomineralization, such as large operons for ribosome and flagellum synthesis, as well as operons for urea and phosphonate utilization and nitrate reduction. These genes are located predominantly in the left (approximately 1 to 220 kb) and right (350 to 482 kb) arms of the contig (Fig. 1A). These regions encompass a conspicuous 130-kb region (between approximately 220 and 350 kb), which has the following characteristics: (i) it harbors all previously identified magnetosome genes (*mam* and *mms*), (ii) it contains 42 of the 49 transposase-like genes present in the 482-kb region, and 23 of the transposase genes could be assigned to seven distinct groups of paralogs (Table 1), and (iii) most other ORFs (77 genes) are classified as hypothetical genes because of a lack of significant similarity to any known genes.

Table 1: Paralogous groups of IS element genes identified in the 130 kb MAI^a

Group	Paralogous ORFs
1mgI398, mgI518, mgI546, mgI547, mgI556, mgI574
2mgI587, mgI400, mgI557, mgI575
3mgI428, mgI533, mgI535
4mgI441, mgI524, mgI578
5mgI436, mgI507, mgI593
6mgI474, mgI549
7mgI568, mgI602

^aParalogous groups were formed from gene groups that had BLASTP hits to each other with e-values less than 10^{-6} and an alignment length of at least 60 % of the deduced amino acid sequence. If the alignment length was not at least 60 %, other parameters were taken into consideration with respect to the occurrence of fragmented genes (Chien *et al.*, 2004).

Because of these characteristics, we suspected that the 130-kb region might encompass the entire magnetosome island and therefore focused our analysis on this region. The 130-kb region contains numerous direct and inverted repeats, most of which correspond to similar copies of transposase genes. Its G+C content (61.1%) is distinct from those of the 482-kb region (62.59%) and the WGS assembly (62.2%), and it has a more heterogeneous distribution (Fig. 1). For example, the *mms6*, *mamGFDC*, and *mamAB* operons have G+C contents of 63.8, 64.6, and 59.5%, respectively. Three tRNA genes are present in this region (tRNA^{Ala,Ile,Met}). An ORF (*mgI605*) encoding a putative phage-related integrase fragment is located at the right boundary of the 130-kb region, which exhibits 58% sequence similarity to phage integrases from the alphaproteobacteria *Silicibacter* sp. and *Magnetospirillum magnetotacticum*. Several other ORFs are also pseudogenes, including the *idiA* fragment (*mgI469*), which represents a remnant of a ferric iron transport system (Michel and Pistorius, 2004). Another notable feature of the region is the presence of several two-component systems and several ORFs with low levels of similarity to hemerythrin-like genes. We found several genes with potential relevance for magnetosome biomineralization, including *mgI457* encoding a hypothetical TPR protein and *mgI452* encoding an acidic pentapeptide repeat protein, as these motifs have been implicated in magnetosome formation and were identified in several MMPs (Schüler, 2004). One ORF (*mgI438*) located about 11 kb to the left of *mms6* encodes a protein containing the peptide sequence *IAASPTASPIRK*, which matches 100% a peptide sequence obtained by previous mass spectroscopic analysis of the magnetosome subproteome (Grünberg *et al.*, 2004) but which could not be assigned to a known gene sequence. Therefore, we concluded that *mgI438* encodes a magnetosome protein designated MamW, which is a 15.01-kDa protein with a basic pI (pI 12.8). Database searches failed to identify

homologues, with the exception of a very similar hypothetical protein from *M. magnetotacticum* (ZP_00054421). Furthermore, we identified two additional ORFs in the putative *mms6* operon (*mgI460*, 764 bp upstream of *mms6*; and *mgI462*, 722 bp downstream of *mms6*), which encode small basic proteins (for *mgI460*, a molecular weight of 8,756.55 and a pI of 12.3; for *mgI462*, a molecular weight of 9,729.75 and a pI of 11.8). Several of the newly identified ORFs outside the *mam-mms* cluster exhibited best hits to previously identified genes in the *mamAB* operon in BLAST searches. For example, the deduced gene product of *mgI561*, which is located 29.2 kb downstream of *mamU*, exhibits partial similarity (63%) to MamH belonging to the major facilitator superfamily. This gene is followed by *mgI565*, which encodes a protein with partial similarity to MamE (45%). Likewise, two additional ORFs (CDF3 and CDF4) encoding proteins with similarity to the magnetosome-associated putative iron transporters MamB and MamM are present in the 68-kb BAC sequence. However, these genes were not detected in the 482-kb WGS sequence derived from a different subculture of MSR-1, which prompted us to examine the differences between these two sequences more closely.

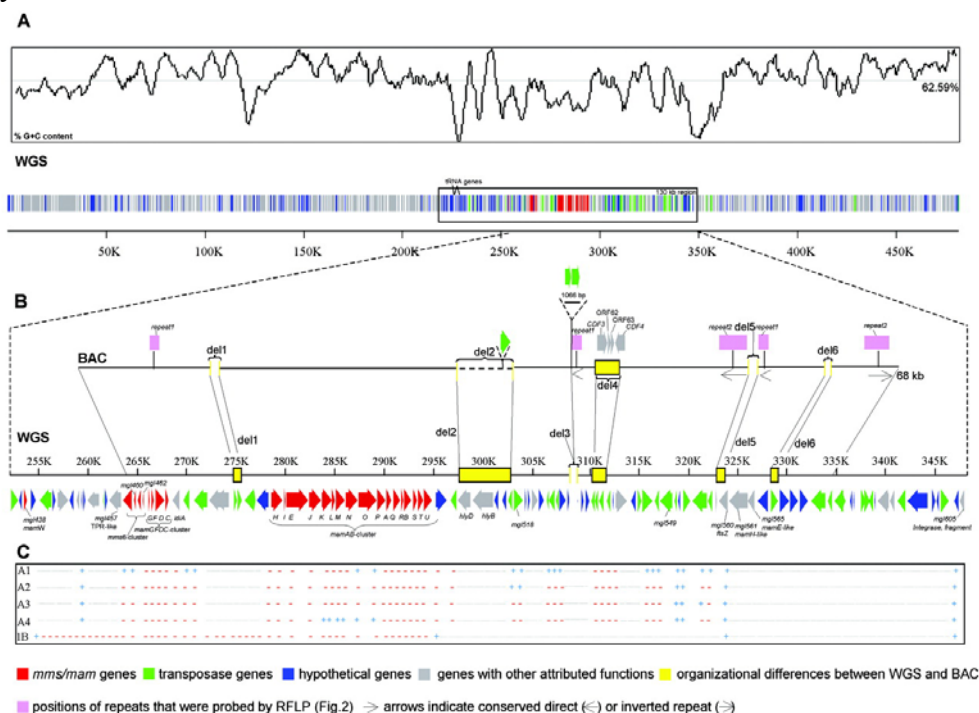


Figure 1: A) Schematic representation of the 482 kb WGS genomic region. Magnetosome (*mms/mam*) genes, hypothetical genes, tRNA genes, genes encoding other attributed functions, and transposase genes are indicated by different colors. The distribution of % G+C content is shown in the uppermost panel (average value for the 482 kb region is 62.59%). The extent of the conspicuous 130 kb region described in the text is indicated by a box. B) Major organizational differences between the BAC sequence and the homologous region from the WGS sequence (del1 to del6). Equivalent positions are connected by lines. Positions of selected features described in the text are indicated. C) Identified deletions within different type A mutants (A1 to A4) and strain MSR-1B (1B). (-) marker absent; (+) marker present; dotted line, not tested.

Clones from different magnetic subcultures exhibit extensive sequence polymorphism in the magnetosome island

Alignment of the 68-kb BAC sequence and the equivalent subsequence from the 482-kb WGS assembly, which were obtained from different subcultures of the magnetic archetype strain MSR-1A, revealed that the homologous regions were interrupted by insertions, deletions, or substitutions. Besides several minor conflicts, such as single nucleotide mismatches and short deletions, six major organizational differences between the two sequences (designated del1 to del6) were detected (Fig. 1B). del1 is a 1,049-bp insertion harboring two transposase genes in the WGS sequence, which are missing in the BAC sequence. In del2, a 196-bp transposase fragment in the BAC sequence is replaced by a 5,459-bp insertion in the WGS sequence, which contains a putative hemolysine transport operon that is bracketed by transposase genes. The excision site in the BAC sequence is flanked by two imperfect inverted repeats, which are present in four or more inverse or direct copies within both sequences. del3, a 1,066-bp fragment harboring two transposase genes in the BAC sequence, is deleted in the WGS sequence. del4, a 2,307-bp fragment harboring two CDF genes in the BAC sequence, is replaced by a 1,710-bp fragment harboring three transposase genes. del5, a 1,065-bp fragment harboring two transposase genes, is deleted in the BAC sequence. del 6, a 924-bp transposase fragment, is inserted into the WGS sequence but is not present in the BAC sequence. All organizational differences are associated with insertion elements or repeats or a combination of insertion elements and repeats. In two of the deletions (del2 and del6), a conserved sequence (CCGCCT) is present immediately to the left of the excision site, whereas the sequence CTAR is adjacent to the right excision site in four of the six deletions (Table 2).

Table 2: Nucleotide sequences of regions flanking the excision sites found in the organizational differences between the BAC and the WGS sequence and the excision site of the large deletion in strain MSR-1B.

Region	Sequence ^a
del1.....	274621-GGCAGG... <u>CTAGAG</u> -275711
del2.....	297431- <u>CCGCCT</u> ...TCAGCCC-302932
del3.....	308996-AAATCA...TAAGCA-309034
del4.....	310060-CAAAGG... <u>CTAGAA</u> -3110807
del5.....	322778-GGGAAG... <u>CTAACA</u> -322816
del6.....	328270- <u>CCGCCT</u> ... <u>CTAATA</u> -329235
MSR-1B.....	254558-CTCGCA...CATGGA-294955

^a The nucleotide positions are the positions in the WGS sequence. Conserved residues are underlined.

Isolation of spontaneous magnetosome mutants under various conditions

The considerable sequence polymorphisms observed for two different subcultures and the previously observed spontaneous mutability of the magnetic phenotype prompted us to investigate the induction, mechanism, and targets of the suspected genetic instability in more detail. Invariably, the abundance of nonmagnetic clones was below the level of detection ($<10^{-5}$ mutations per cell) in serially transferred cultures growing under standard conditions. In contrast, stationary cultures stored in the cold (4°C) for 3 to 5 weeks reproducibly gave rise to numerous white colonies. These colonies appeared at frequencies between about 2×10^{-2} under aerobic storage conditions (2 mM iron) and 10^{-3} under microaerobic storage conditions (1 μM iron). In order to mimic stress conditions presumably encountered during prolonged storage and to determine if a particular stress factor was responsible for the induction of mutants, we determined mutant frequencies in cells cultivated under various defined growth conditions. Growth at a high temperature (37°C), growth at a low temperature (12°C), freezing and thawing, or deprivation of a nutrient (carbon, nitrogen, or iron) did not result in significantly increased mutation rates compared to the rates observed after serial subcultivation. However, high iron concentrations ($>500 \mu\text{M}$) significantly increased the frequency of mutants (4×10^{-4}). Also, exposure to increased oxygen concentrations, which were already inhibitory for growth and magnetosome formation, resulted in mutant frequencies of 6×10^{-4} . Treatment of cells with H_2O_2 for 10 min had the most drastic effect and resulted in an increase in mutant frequencies up to nearly 10^{-2} .

Spontaneous magnetosome mutants have various distinct phenotypes

During the initial mutant screening, colonies with a whitish appearance compared with the dark brown wild-type clones were not differentiated further. However, upon closer inspection of approximately 500 restreaked colonies from various experiments, four mutant classes could be distinguished (Fig. 2). Type A accounted for 36% of the mutants, and the colonies were bright white. The cells failed to align in magnetic fields, which was due to the total lack of magnetosome particles. Type B mutants (61% of the mutants) formed darker gray colonies, and the cells exhibited a magnetic response that was detectable but was weaker (0.1 to 1.6) than that of the wild type (1.8 to 2.0), as detected by differential light-scattering measurements (Schüler *et al.*, 1995). This was consistent with the reduced number of magnetosomes (18 to 29 particles per cell) that were aligned in shorter and less regular chains (Fig. 2). The color of colonies of type C

mutants was only slightly lighter than the color of colonies of the wild type, but the colonies had a heterogeneous "fried-egg" appearance, with a convex peripheral region surrounding a flat central region. The cells were otherwise indistinguishable from the wild-type cells in terms of the number and appearance of magnetosomes, as determined by electron microscopy. Type C mutants accounted for less than 3% of the clones. A further mutant-type phenotype was found only once in a clone (MSR-1K) from a culture after storage at 4°C. MSR-1K formed light brown colonies, and the cells contained fewer magnetosomes, which had a less regular chain-like appearance. Unlike type B mutants, the particles also were smaller (diameter, 15 to 25 nm). All mutants exhibited very similar growth characteristics under high- and low-iron conditions (data not shown).

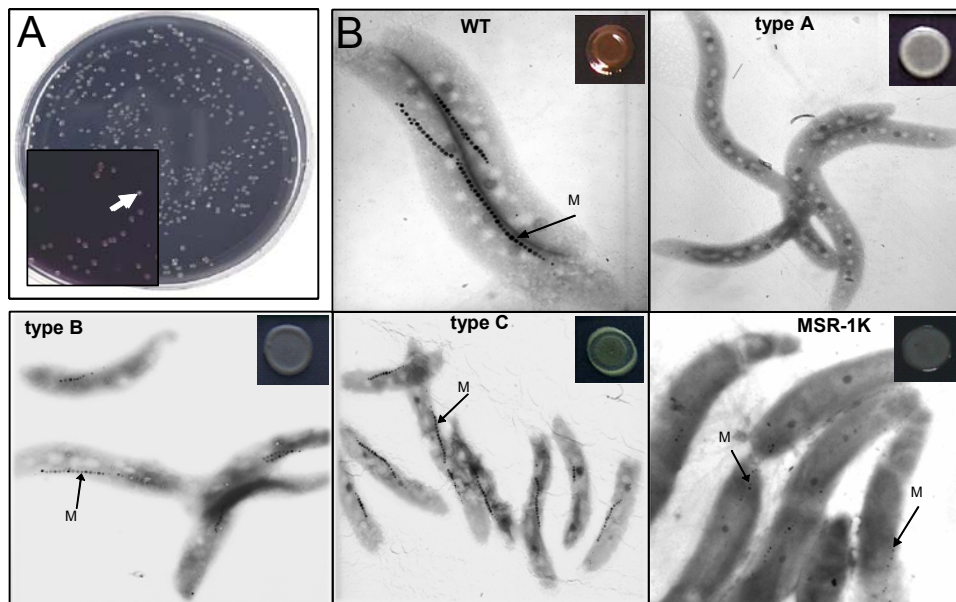


Figure 2: A) Appearance of non-magnetic mutants (white colonies, arrow) between magnetic clones of the wild type (dark brown colonies). B) Phenotypes (electron micrographs and colony morphologies) of wild type *M. gryphiswaldense* (WT) and mutants of type A, type B, type C, and MSR-1K. M, magnetosome chain

Genotypic analysis of mutants

As the region flanking the genes had a particularly high number of repeated IS elements belonging to the IS21 and IS66 families, we hypothesized that these elements were involved in the instability of this genomic region. We therefore performed a Southern (RFLP hybridization) analysis to determine the copy numbers of these IS elements in the genomes of mutants in which magnetosome synthesis was affected (Fig. 3). Probes were derived from selected ORFs corresponding to an IS21 (*mgI549*) element and an IS66

(*mgI518*) element (Fig. 1B). Hybridizations revealed the presence of three DNA fragments that exhibited similarity with IS21 and 11 fragments that exhibited similarity with IS66 in the archetype strain (MSR-1A). Unexpectedly, MSR-1L, which had been used as the parental strain for the isolation of mutants, exhibited only two IS21-hybridizing fragments and five IS66-hybridizing fragments. While all representatives of the type B mutants tested and strain MSR-1K produced hybridization patterns indistinguishable from that of parental strain MSR-1L, all type A mutants, including strain MSR-1B, displayed reduced copy numbers of IS elements, with one IS21-hybridizing band and three to five IS66-hybridizing bands. Type A mutants not only differed in terms of copy numbers of IS elements but also displayed RFLP, indicating that there were insertions or deletions in adjacent genomic regions. Many reports have shown that repeated elements can often be recombinogenic, facilitating the formation of deletions (Albertini *et al.*, 1982; Faure *et al.*, 2004). We therefore investigated the genomic distribution of an IS21-related repeat (repeat1) and an IS66-related repeat (repeat2) that are present in the MAI at levels of multiple copies (Fig. 3; for localization of repeats see Fig. 1). While MSR-1A yielded 10 repeat1-hybridizing fragments, there was one fragment in MSR-1L and type B mutants and there was no fragment in type A mutants. Compared to the four repeat2-hybridizing repeats of the archetype strain (MSR-1A), three fragments were detected in strain MSR-1L and type A mutants; however in the A3 and A4 mutants hybridizing fragments that were different lengths were observed after EcoRI digestion. Three of seventeen isolated type B mutants lacked a 2.3-kb fragment hybridizing with the repeat2 probe.

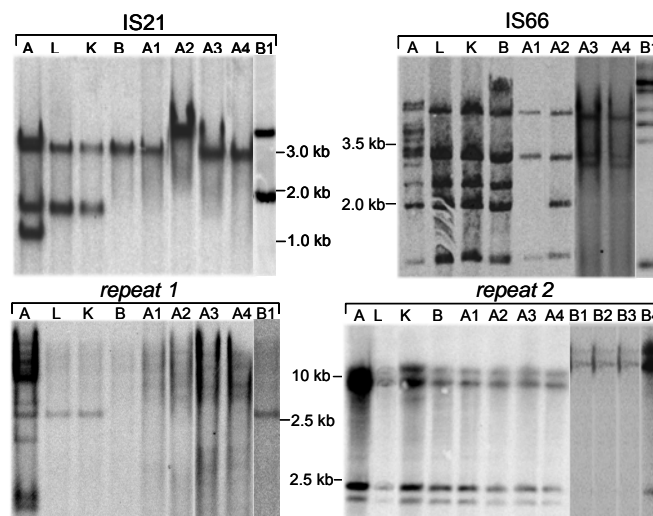


Figure 3: RFLP-analysis of *EcoRI*, *EcoRV* and *MunI* enzyme-digested genomic DNA from various mutants. Restriction fragments were blotted and hybridized with alpha $\alpha^{33}\text{PdATP}$ -labelled IS66, IS21, repeat1, and repeat2 probes. Lanes: MSR-1A (A), MSR-1L (L), MSR-1K (K), MSR-1B (B), mutants of type A (A1, A2, A3, A4), selected representatives of type B mutants (B1, B2, B3, B4).

We found an increase in the copy number, which would have been indicative of recent transposition events, in none of the nonmagnetic strains isolated during mutant screening. While nonmagnetic mutants had the lowest numbers of IS elements, loss of multiple copies apparently resulted in no detectable phenotype for the magnetic parental strain (MSR-1L). Therefore, we asked whether the observed polymorphism was specifically associated with the loss of *mam* genes observed in isolated mutants or whether consecutive loss of copies occurred independently of the coincident loss of *mam* genes. If deletion of IS elements was a general consequence of high genetic instability of the entire genome, then IS element polymorphism with comparable frequency should have been detectable also in magnetic clones, as additional copies of IS elements were also detected outside the magnetosome island. To answer this question, 10 magnetic clones were arbitrarily selected from independent mutant screening experiments and analyzed as described above. All clones tested produced RFLP patterns indistinguishable from that of parental strain MSR-1L, suggesting that loss of IS elements was a relatively rare event in magnetic clones, while nonmagnetic mutants always exhibited loss of IS elements.

All mutants were tested by PCR for the presence of genetic markers located in two of the known magnetosome operons (*mamC*, *mamF*, *mamB*, *mamE*). As in the wild type, all markers tested could be amplified from the type B, type C, and MSR-1K mutants. In contrast, all type A mutants were negative for all of these markers, indicating that as in strain MSR-1B, genomic deletions in the magnetosome operons had occurred. To further characterize the extent of the deletions, we examined the presence of additional markers in the *mam* and *mms* operons, as well as in adjacent and remote regions of the magnetosome island, in selected type A mutants by hybridization and PCR. If they were present, the PCR products of various markers were shorter than the expected sizes, indicating that the regions adjacent to the IS element were also affected by partial deletions. The results of these experiments indicated that there were diverse mosaic-like deletion patterns in the different mutants, all of which were confined to an approximately 64-kb section in the 130-kb region (Fig. 1C). Mutant A1 had at least four different deletions. The entire *mamGFDC* operon and the *idiA* fragment were deleted. In addition, two large parts of the *mamAB* operon (*mamHIEJKLMN* and *mamAQRBSTU*) were absent, whereas the *mamO* and *mamP* genes were present. In addition, a copy of IS21 (*mgI554*) located 24.4 kb to the right of *mamU* was missing due to a short deletion. Mutant A2 had at least four different deletions. One large deletion seemed to encompass

the entire *mms6*, *mamGFDC*, and *mamAB* operons. Three shorter deletions were present further to the right. Mutant A3 had at least three different deletions. Again, one large deletion seemed to comprise the entire *mms6*, *mamGFDC*, and *mamAB* operons, and two shorter deletions were present further to the right. At least five different deletions were detected in A4, which resulted in the loss of the entire *mms6* and *mamGFDC* operons and two fractions of the *mamAB* operon, while the *mamKLMNOP* genes were still present. Three shorter deletions were present to the right of the *mamAB* operon. In MSR-1B, a single large 40.385-kb deletion extended from nucleotide 254564 to nucleotide 294949 (Table 2).

Discussion

In this paper, we present further evidence that there is a genomic MAI in *M. gryphiswaldense*. The 482-kb sequence analyzed in this work is the most extended contiguous genomic sequence from a magnetotactic bacterium and is likely to comprise all gene functions involved in magnetosome formation. In addition to previously identified structural genes, we identified a gene (*mamW*) encoding a magnetosome membrane protein in this region and found two new genes in the *mms6* operon. The conspicuous 130-kb region is further characterized by the presence of numerous genes having unknown functions. Several of these genes exhibit similarity to previously identified *mam* genes (*mgI561* and *mgI565*), are colocalized in an operon along with other magnetosome proteins (*mgI460*, *mgI462*), or contain conspicuous sequence motifs (*mgI457*, *mgI452*) and thus might be candidates for involvement in magnetosome formation. The roles of other hypothetical gene products encoded in this region remain cryptic. The observed loss of genetic material during serial subculturing, such as the loss of two *mamB*-like CDF genes, was not always accompanied by a nonmagnetic phenotype, which indicates that the putative MAI contains sections that are not essential for magnetosome formation. The presence of many pseudogenes suggests that parts of the region might simply represent a "junkyard" of genes derived from previous rearrangements or horizontal gene transfer events. The occurrence of multiple representatives of magnetosome-specific gene families also seems to indicate that there is some redundancy of genetic determination of magnetosome formation.

Typically, genomic islands are integrated into or near tRNA genes (Osborne and Böltner, 2002). We found three tRNA genes close to the left terminus of the 130-kb

region, but it is not clear if these genes were involved in the insertion of the region. The G+C content of the 130-kb region is heterogeneous, suggesting that the MAI may have a mosaic structure. Our sequence and experimental analyses of the MAI revealed that this region is unusually prone to insertion and excision events. Hypervariable regions of other bacteria, such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* (Bishop *et al.*, 2005), are characterized by the presence of phage-related genes, such as genes encoding integrases, and IS elements, which has led to the assumption that there are genomic hot spots for insertion and excision of mobile elements. Likewise, a striking characteristic of the region in *M. gryphiswaldense* analyzed is the great abundance of multiple copies of transposase genes belonging to different families of IS elements. Between position 220000 and position 350000 IS elements account for 22.7% of the coding region, suggesting that these mobile genetic elements played a major role in driving the variability of the putative MAI. The detected organizational differences between the different magnetic clones are consistent with recent activity of insertion elements, and all deletions in nonmagnetic mutants are associated with IS elements. These data show that transposition and subsequent deletions are dominant mechanisms of mutations in the magnetosome island of *M. gryphiswaldense* and that IS elements are responsible for the genetic instability and plasticity observed in this region. Insertion elements are frequently also involved in the mobilization of intervening genomic regions, which results in composite transposons (Mahillon and Chandler, 1998). Thus, the numerous IS elements might promote the mobilization and acquisition of the magnetosome island. Together, the presence of IS elements, the presence of phage-associated genes, the presence of an integrase remnant, and the presence of tRNAs in and at the extremities of this region, as well as the distinct G+C content, suggest that the region might have been acquired via horizontal gene transfer from different taxa, potentially by a phage-mediated horizontal gene transfer event. Although comparable data are not yet available for other MTB, a preliminary analysis of the genome assembly of *M. magnetotacticum* MS-1 and the magnetotactic coccus MC-1 (available at <http://www.jgi.doe.gov/>) revealed similar characteristics of the homologous regions. Interestingly, the synteny within the homologous regions is not strictly conserved in related MTB, but genetic elements appear to be shuffled in these regions, probably due to transposition-mediated reorganization (data not shown). Further research could reveal whether this region can in fact be mobilized between different strains of bacteria.

Genomic islands often tend to be deleted en bloc owing to the presence of functional integrase genes, which are involved in site-specific insertion and excision of the DNA region via recombination between specific sequences situated on either side of the element (Dobrindt *et al.*, 2004; Osborne and Böltner, 2002). In some genomic islands the integrase gene may be deleted or nonfunctional, resulting in permanently anchored islands (Bach *et al.*, 1999; Lesic and Carniel, 2005; Osborne and Böltner, 2002). The integrase gene fragment present at the right boundary of the 130-kb region is unlikely to be functional. Consistently, we did not observe spontaneous precise excision of the MAI at predetermined unique sites; rather, multiple consecutive deletions occurred at various different sites, leading to a mosaic-like structure in type A mutants. This indicates that there is a different, integrase-independent mechanism of deletion. Faure *et al.* (Faure *et al.*, 2004) described genomic arrangements that arose in long-term cultures of *E. coli* K-12. In the stationary phase, large-scale deletions spanning many kilobases of the genome arose. Some cultures were observed to be polymorphic and to contain up to three different types of deletions. Most deletions were bordered, either precisely or within a 5-kb range, by sequences associated with IS elements. This led to the assumption that there is a two-step process for generation of deletions in which the insertion of a new IS element copy near a preexisting IS element is followed by homologous recombination between the two copies. As all deletions that we observed in the magnetosome island were associated with IS elements, a similar mechanism for deletion can be assumed for the MAI.

Although a genetic system has been established recently for *M. gryphiswaldense* (Schultheiss and Schüler, 2003; Schultheiss *et al.*, 2005), genetic analysis by directed mutagenesis has remained laborious and time-consuming. Thus, the analysis of a diverse set of spontaneous magnetosome mutants provides a powerful tool for genetic dissection of biomineralization, particularly for determination and mapping of the set of essential genes required for magnetosome formation. Mutants isolated in this study are heterogeneous with respect to their pheno- and genotypes. In addition to nonmagnetic type A mutants, mutants that were aberrant sizes and mutants that had different numbers of magnetosomes (type B, MSR-1K) or a different colony morphology (type C) were identified. While the genotypes of the latter mutants could not be determined clearly, mutations in all type A mutants, including strain MSR-1B, exhibited deletions in 64 kb of the MAI, which in all cases affected the *mms* and *mam* operons. This further substantiates the assumption that this set of genes is crucial for magnetosome synthesis.

Spontaneous loss of the ability to synthesize magnetosomes seems to be a characteristic trait common to diverse MTB and has been reported for different species (Blakemore *et al.*, 1979; Dubbels *et al.*, 2004). For instance, spontaneous nonmagnetic mutants were regularly observed in marine magnetotactic vibrio MV-1. All mutants failed to express a major copper-containing periplasmic protein (ChpA) presumably involved in iron uptake (Dubbels *et al.*, 2004). Although the mutants were genetically heterogeneous, all of the mutants had two point mutations (transversions) at identical wobble positions in *chpA*, which apparently prevented translation of the transcript by an unknown mechanism. This finding suggests that there is no universal explanation for the observed genetic instability of the magnetic phenotype and that different mechanisms are responsible for the appearance of spontaneous nonmagnetic mutants in different MTB.

IS elements have been shown to be ubiquitously distributed in bacterial genomes (Mahillon and Chandler, 1998), and abnormally high mutation rates in many other bacteria are also often due to transposition events. There have been a number of reports which have described increases in the transposition frequency under specific growth conditions. Prolonged nutritional deprivation led to increased levels of transposition of a range of IS elements in stab cultures of *E. coli* K-12 (Naas *et al.*, 1994). Spontaneous gas vesicle mutants caused by transposition appeared frequently in cultures of several cyanobacteria and archaea after prolonged maintenance of cells, particularly after physiological stress, such as cryopreservation (Mlouka *et al.*, 2004). A transposition burst of the *Halobacterium halobium* element ISH27 was observed after storage of the cells at 4°C (Pfeifer and Blaseio, 1990). It has also been demonstrated that large numbers of mutants caused by IS element transposition can accumulate in stationary-phase cultures of *Xanthomonas oryzae*, and it has been suggested that IS elements play prominent roles in the adaptation of bacteria to life in the stationary phase (Rajeshwari and Sonti, 2000). We also observed that magnetosome mutants were abundant in stationary cultures during prolonged storage in the cold, while their levels were below the level of detection under standard growth conditions. However, conditions encountered during cold storage are rather undefined and likely involve complex environmental changes, such as nutrient deprivation and oxidative stress due to decreased respiratory activity of the cells. Of the potential stress factors tested, only increased oxygenation and high iron concentrations led to significantly increased mutation frequencies. Like oxygenation, excess iron also may result in oxidative stress

and is known to increase the vulnerability of cells to damage by H₂O₂ because of Fenton chemistry (Imlay, 2003). Likewise, direct exposure to the strong oxidant H₂O₂ was most effective for induction of nonmagnetic mutants. In *Mycobacterium smegmatis* transposition was stimulated by exposure to microaerobic conditions or a subsequent oxygen shock (Ghanekar *et al.*, 2004). Induction of hypertranspositional activity by the presence of diverse inhibitors, including cyanide and hydrogen peroxide, was observed in *Corynebacterium glutamicum* (Garbe *et al.*, 2004). Hydrogen peroxide is known to be a potent inducer of the SOS response which enhances recombinational activity. As a consequence, phage induction, mutagenesis, and filamentation are induced at sublethal H₂O₂ concentrations in *E. coli* (Imlay and Linn, 1987). Hence, the existence of a similar mechanism could also explain the observed effect of oxidative stress in *M. gryphiswaldense*.

Results of this study demonstrated that parts of the genome of *M. gryphiswaldense* may undergo rapid rearrangement upon subculture in the laboratory. In fact, we observed several other indications of microevolution or "domestication," such as increased oxygen tolerance of the lab strain compared to the archetype, which might have been caused by accidental selection of mutants during repeated subculture, eventually leading to improved adaptation to growth under prolonged laboratory conditions. Besides practical implications, such as the need for proper maintenance and regular selection to prevent accumulation of mutants, the question of whether the induced mutability of the magnetic phenotype might reflect adaptations to stress conditions under environmental conditions arises. We were unable to detect a discernible growth advantage for the nonmagnetic mutants compared to the magnetic parental strain under standard conditions when growth rates were used. Yet stationary cultures were repeatedly found to be completely taken over by nonmagnetic mutants of a single type, which displaced the parental strain. The ubiquity of such deletions in independent cultures and their increase in frequency under physiological stress conditions support the hypothesis that they have a selective advantage. A selective advantage was also reported for large chromosomal deletions in *E. coli* by Faure *et al.* (Faure *et al.*, 2004). Likewise, Zambrano *et al.* (Zambrano *et al.*, 2003) and Zinser *et al.* (Zinser *et al.*, 2003) have shown that mutants carrying loss-of-function alleles predominate in stationary-phase cultures of *E. coli* (Zambrano *et al.*, 2003; Zinser *et al.*, 2003). Further experimentation is required to determine if a selective advantage for survival during the stationary phase and under oxidative stress conditions is conferred

by loss of the magnetic phenotype. Alternatively, the frequent loss of large parts of the MAI may simply reflect the energy costs of producing a large multiprotein organelle under conditions in which it provides no selective advantage.

Acknowledgments

This study was supported by the BMBF Biofuture Program and the Max Planck Society. We thank Ekaterina Schmidt (MPI Bremen) and Ines Müller (MPI Berlin) for excellent technical assistance.

References

- Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P., and Miller, J.H. (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* **29**: 319-328.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andrews, S.C. (1998) Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **40**: 281-351.
- Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M.D., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N.J., Oinn, T.M., Pagni, M., and Servant, F. (2001) The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional size. *Nucleic Acids Res.* **29**: 27-40.
- Arakaki, A., Webb, J., and Matsunaga, T. (2003) A novel protein tightly bound to bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **278**: 8745-8750.
- Bach, S., Buchrieser, C., Prentice, M., Guiyoule, A., Msadek, T., and Carniel, E. (1999) The high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect. Immun.* **67**: 5091-5099.
- Balkwill, D.L., Maratea, D., and Blakemore, R.P. (1980) Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *J. Bacteriol.* **141**: 1399-1408.
- Baxevanis, A.D. (2003) The molecular biology database collection: 2003 update. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1-12.
- Bazylynski, D.A., Garratt-Reed, A.J., and Frankel, R.B. (1994) Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech.* **27**: 389-401.
- Bazylynski, D.A. (1995a) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News* **61**: 337-343.
- Bazylynski, D.A., and Frankel, R.B. (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev. Microbiol.* **2**: 217-230.
- Bertani, L.E., Huang, J.S., Weir, B.A., and Kirschvink, J.L. (1997) Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **201**: 31-36.
- Bertani, L.E., Weko, J., Phillips, K.V., Gray, R.F., and Kirschvink, J.L. (2001) Physical and genetic characterization of the genome of *Magnetospirillum magnetotacticum*, strain MS-1. *Gene* **264**: 257-263.
- Bishop, A.L., Baker, S., Jenks, S., Fookes, M., Gaora, P.O., Pickard, D., Anjum, M., Farrar, J., Hien, T.T., Ivens, A., and Dougan, G. (2005) Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA^{leuX}. *J. Bacteriol.* **187**: 2469-2482.
- Blakemore, R.P., Maratea, D., and Wolfe, R.S. (1979) Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* **140**: 720-729.
- Carniel, E. (2001) The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* **3**: 561-569.

- Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshenko, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Segal, G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A., and Russo, J.J. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**: 1966-1968.
- Coats, J.D., Michaelidou, U., Bruce, R.A., O'Connor, S.M., Crespi, J.N., and Achenbach, L.A. (1999) Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 5234-5241.
- Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., and Salzberg, S.L. (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4636-4641.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 414-424.
- Dubbels, B.L., DiSpirito, A.A., Morton, J.D., Semrau, J.D., Neto, J.N., and Bazylinski, D.A. (2004) Evidence for a copper-dependent iron transport system in the marine, magnetotactic bacterium strain MV-1. *Microbiology* **150**: 2931-2945.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base calling of automated sequencer traces with phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186-194.
- Faure, D., Frederick, R., Wloch, D., Portier, P., Blot, M., and Adams, J. (2004) Genomic changes arising in long-term stab cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 6437-6442.
- Finan, T.M. (2002) Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* **184**: 2855-2856.
- Finkel, S.E., and Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 4023-4027.
- Garbe, T.R., Suzuki, N., Inui, M., and Yukawa, H. (2004) Inhibitor associated transposition events in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Genet. Genomics* **271**: 729-741.
- Ghanekar, T.R., Suzuki, N., Inui, M., and Yukawa, H. (2004) Inhibitor-associated transposition events in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **33**: 982-993.
- Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., and Blakemore, R.P. (1988) Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* **170**: 834-841.
- Gordon, D., Abajian, C., and Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**: 195-202.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., and Schüler, D. (2001) A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4573-4582.
- Grünberg, K., Müller, E.C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2004) Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1040-1050.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641-679.
- Heyen, U., and Schüler, D. (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 536-544.

- Imlay, J.A., and Linn, S. (1987) Mutagenesis and stress response induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **169**: 2967-2976.
- Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 395-418.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Kirschvink, J.L., and Hagadorn, J.W. (2000) A grand unified theory of biomineralization. In *Biomineralization*. Baeuerlein, E. (ed). Weinheim, Germany: Wiley VCH, pp. 139-149.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lesic, B., and Carniel, E. (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* **187**: 3352-3358.
- Lowe, T.M., and Eddy, S.R. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**: 955-964.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.
- Mahillon, J., Leonard, C., and Chandler, M. (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol.* **150**: 675-687.
- Maringanti, S., and Imlay, J.A. (1999) An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase deficient *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3792-3802.
- Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Matsunaga, T., and Takeyama, H. (1998) Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramolecular Science* **5**: 391-394.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A.C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R., and Pühler, A. (2003) GenDB- an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 2187-2195.
- Michel, K.P., and Pistorius, E.K. (2004) Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: the function of IdiA and IsiA. *Physiol. Plant.* **120**: 36-50.
- Mlouka, A., Comte, K., Castets, A.M., Bouchier, C., and Tandeau de Marsac, N. (2004) The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. *J. Bacteriol.* **186**: 2355-2365.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W.M., and Arber, W. (1994) Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **136**: 721-730.
- Okamura, Y., Takeyama, H., and Matsunaga, T. (2001) A magnetosome-specific GTPase from the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 48183-48188.
- Okuda, Y., Denda, K., and Fukumori, Y. (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.
- Osborne, A.M., and Böltner, D. (2002) When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid* **48**: 202-212.
- Pallen, M.J., and Wren, B.W. (1997) The HtrA family of serin proteases. *Mol. Microbiol.* **26**: 209-221.
- Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* **156**: 99-103.

- Pfeifer, F., and Blaseio, U. (1990) Transposition burst of the ISH27 insertion element family in *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6921-6925.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **183**: 27-36.
- Radelof, U., Hennig, S., Seranski, P., Steinfath, M., Ramser, J., Reinhardt, R., Poustka, A., Francis, F., and Lehrach, H. (1998) Preselection of shotgun clones by oligonucleotide fingerprinting: an efficient and high throughput strategy to reduce redundancy in large-scale sequencing projects. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5358-5364.
- Rajeshwari, R., and Sonti, R.V. (2000) Stationary-phase variation due to transposition of novel insertion elements in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* **182**: 4797-4802.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A., and Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**: 944-945.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schleifer, K., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., and Köhler, M. (1991) The genus *Magnetospirillum* gen. nov., description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 379-385.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2003) Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* **185**: 5779-5790.
- Schüler, D., and Köhler, M. (1992) The isolation of a new magnetic spirillum. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**: 150-151.
- Schüler, D., Rainer, U., and Bauerlein, E. (1995) A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 139-145.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1996) Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**: 301-307.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1997a) Iron transport and magnetite crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Phys. Iv* **7**: 647-650.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1997b) Iron uptake and magnetic crystal formation of the magnetic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In *Transition metals in microbial metabolism*. Winkelmann, G. and Carrano, C.J. (eds). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publisher, pp. 159-185.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1998) Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**: 159-162.
- Schüler, D., and Frankel, R.B. (1999) Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 464-473.
- Schüler, D. (2000) Characterization of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In *Biomineralization*. (ed.), E.B. (ed). Weinheim: Wiley-VCH, pp. 109-118.

- Schüler, D. (2002) The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Int. Microbiol.* **5**: 209-214.
- Schüler, D. (2004) Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**: 1-7.
- Schultheiss, D., and Schüler, D. (2003) Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **179**: 89-94.
- Schultheiss, D., Handrick, R., Jendrossek, D., Hanzlik, M., and Schüler, D. (2005) The presumptive magnetosome protein Mms16 is a poly(3-hydroxybutyrate) granule-bound protein (phasin) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **187**: 2416-2425.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Ue, M., Hiraishi, A., and Kato, N. (2000) Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Appl. Environ. Microb.* **66**: 1286-1291.
- Staden, R., Beal, K.F., and Bonfield, J.K. (2000) The staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**: 115-130.
- Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe*-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5145-5149.
- Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J., and Ronson, C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* **184**: 3086-3095.
- Thomas-Keppta, K.L., Clemett, S.J., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., McKay, C.P., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson, E.K., Jr., and Romanek, C.S. (2002) Magnetofossils from ancient mars: a robust biosignature in the martian meteorite ALH84001. *Appl. Environ. Microb.* **68**: 3663-3672.
- Tölle, J., Michel, K.P., Kruip, J., Kahmann, U., Preisfeld, A., and Pistorius, E.K. (2002) Localization and function of the IdiA homologue Slr1295 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* **148**: 3293-3305.
- Valentine, R.C., Shapiro, B.M., and Stadtman, E.R. (1968) Regulation of glutamine synthase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochem.* **7**: 2143-2152.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001a) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- Walther-Mauruschat, A.M., Aragno, M., Mayer, F., and Schlegel, H.G. (1977) Micromorphology of gram-negative hydrogen bacteria. II. Cell envelope, membranes, and cytoplasmic inclusions. *Arch. Microbiol.* **114**: 101-110.
- Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almiron, M., Tormo, A., and Kolter, R. (2003) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* **259**: 1757-1760.
- Zinser, E.R., Schneider, D., Blot, M., and Kolter, R. (2003) Bacterial evolution through the selective loss of beneficial genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* **164**: 1271-1277.

**Transcriptional organization and regulation of magnetosome
operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense***

Sabrina Schübbe,⁶ Chris Würdemann,⁷ Jörg Peplies,² Frank-Oliver Glöckner,^{2,8}
and Dirk Schüler^{1*}

Manuscript in preparation

⁶ Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Abteilung Mikrobiologie, Bremen, Germany

⁷ Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Abteilung Molekulare Ökologie, Bremen, Germany

⁸ International University Bremen, Bremen, Germany

* Corresponding author

Abstract

Genes involved in magnetite biomineralization are clustered within the genomic magnetosome island of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Their transcriptional organization and regulation was studied by several approaches. Cotranscription of genes within the *mamAB*, *mamDC* and *mms* clusters was demonstrated by RT-PCR of intergenic regions, indicating the presence of long transcripts extending over more than 16 kb. The transcription start points of the *mamAB*, *mamDC*, and *mms* operons were mapped at 22 bp, 52 bp and 58 bp upstream of the first genes of the operons, respectively. Identified -10 and -35 boxes of the P_{mamAB} , P_{mamDC} , and P_{mms} promoters show high similarity to the canonical σ^{70} recognition sequence. The transcription of magnetosome genes was further studied in response to iron and oxygen concentrations, respectively. Transcripts of magnetosome genes were detected by RT-PCR both in magnetic cells grown microaerobically at iron-sufficient conditions, as well as in non-magnetic cells grown either aerobically or at iron-deprivation. The presence of transcripts was found to be independent from growth phase. However, the expression of the *mam* and *mms* genes was positively regulated by iron, and to a lesser extent, negatively by oxygen, as revealed by DNA microarray analysis and real-time RT-PCR.

Introduction

Magnetic orientation in magnetotactic bacteria is based on the synthesis of magnetosomes, which consist of crystals of magnetite (Fe_3O_4) enclosed within intracytoplasmic vesicles of the magnetosome membrane (MM) (Bazyliński and Frankel, 2004; Schüler, 2004). The MM consists of a lipid bilayer, which provides spatial and physico-chemical control over the magnetite biomineralization, and which has a distinct biochemical composition. In the microaerophilic *Alphaproteobacterium Magnetospirillum gryphiswaldense* the MM is associated with a characteristic subset of magnetosome membrane proteins (MMPs), which are present in different quantities with relative abundances between less than 1% and more than 15% (Grünberg *et al.*, 2004). Classes of MMPs include those with presumed functions in magnetosome-directed transport of iron, nucleation and control of crystal growth, and the assembly of magnetosome chains. The targeting of MMPs to the MM is controlled by an unknown mechanism, but it can be assumed that stoichiometric synthesis of individual constituents has to be regulated for proper assembly of magnetosomes.

In *M. gryphiswaldense* the MMPs are encoded within a hypervariable 130 kb genomic magnetosome island (MAI) (Schübbe *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2005). In addition to all known magnetosome genes, the MAI contains further genes putatively involved in magnetosome biomineralization and is particularly rich in insertion elements. The *mam* (*magnetosome membrane*) and *mms* (*magnetic particle membrane-specific*) genes encode nearly all of the identified MMPs along with several genes of unknown function. They are located within less than 35 kb of the MAI and are organized within three gene clusters that are conserved among different MTB (Grünberg *et al.*, 2001; Schübbe *et al.*, 2003). The *mamAB* cluster encompasses 17 collinear open reading frames extending 16.4 kb of DNA. The 2.1 kb *mamGFDC* cluster is located 15 kb upstream of the *mamAB* cluster and comprises 4 ORFs. The 3.6 kb *mms* cluster is located 368 bp upstream of the *mamGFDC* cluster and contains 5 ORFs. The collinear organization and close spacing of genes within the three clusters suggest that they each might be transcribed as polycistronic operons from a single promoter.

Magnetosome formation in *M. gryphiswaldense* and other MTB does not occur constitutively, but is tightly regulated by growth conditions (Blakemore *et al.*, 1985; Schüler and Baeuerlein, 1996). Magnetite biomineralization is induced by

microaerobiosis, and there is a clear correlation between the extracellular oxygen tension and magnetite content in *M. gryphiswaldense* (Schüler and Baeuerlein, 1998). In oxystat experiments, magnetite biomineralization was induced only below a threshold value of 20 mbar O₂, and largest magnetosome content occurred at 0.25 mbar, whereas higher oxygen levels entirely repressed magnetosome formation (Heyen and Schüler, 2003). Although it has been speculated that oxygen-dependence is mediated at the level of differential regulation of magnetosome genes, the molecular mechanisms governing the expression of the magnetic phenotype in response to oxygen is presently unknown (Heyen and Schüler, 2003). Beside the prevalence of microaerobic conditions, magnetosome biomineralization depends on the availability of iron. Synthesis of more than 80 magnetite crystals per cell is accompanied by the intracellular iron accumulation of up to 4 % of the dry weight, and iron uptake magnetite biomineralization are saturated above an extracellular iron concentration of 50 µM (Heyen and Schüler, 2003; Schüler and Baeuerlein, 1996, Heyen, 2003 #34). Because of the extraordinary iron-dependence of magnetosome formation, uptake and precipitation of iron has to be genetically regulated by iron via an unknown mechanism.

Despite recent advances in the identification and characterization of genes controlling magnetosome biomineralization, their expression and transcription have not yet been addressed. Specifically, information about the regulation and transcriptional organization of genes identified within the MAI so far has been unavailable, and no promoter structures within the MAI have been identified so far, for MTB. In this study, we have analyzed the transcriptional organization and regulation of the magnetosome gene clusters in *Magnetospirillum gryphiswaldense* and have identified the first promoter structures in a magnetotactic bacterium, which govern the transcription of long polycistronic operons of *mam* and *mms* genes. In addition, we examined transcript levels of magnetosome genes in response to varying iron and oxygen concentrations. Differential expression of various magnetosome genes was analyzed by a three-color microarray hybridization approach, which was facilitated by the use of the isogenic mutant MSR-1B lacking all targeted genes by deletion. Results obtained from microarray hybridization experiments were confirmed and extended by real-time RT-PCR.

Material and Methods

Bacterial strains

Magnetospirillum gryphiswaldense strain MSR-1 (DSM 6361) (Schleifer *et al.*, 1991; Schüler and Köhler, 1992) and non-magnetic mutant strain MSR-1B, which contains a deletion of the MAI of about 40 kb comprising the entire *mam* and *mms* clusters (Schübbe *et al.*, 2003), were used in this study.

Oxystat cultivation

Growth experiments were performed in a modified dual-vessel laboratory fermenter system (Biostat A Twin, B. Braun Biotech. International, Melsungen, Germany) equipped for the automatic control of pH, temperature, and dissolved oxygen concentration (Oxystat) as described previously (Heyen and Schüler, 2003). Soy bean peptone was omitted from large-scale medium (LSM) in order to create iron-deficient conditions because of the significant intrinsic iron content of peptone. Iron was added to the FSM as ferric citrate as indicated. RNA for quantitative expression studies was isolated from cells cultivated under three different conditions, which were kept constant throughout the growth experiment: (i) microaerobic/iron sufficient (in the following referred to as "magnetic", 150 μM iron, 0.25 mbar O_2), (ii) microaerobic / iron-limited ("iron-limited", ferric citrate was omitted from the medium, trace iron was below $<1 \mu\text{M}$, 0.25 mbar O_2), and (iii) high-oxygen/iron-sufficient ("aerobic", 100 mbar O_2 , 150 μM iron; see also Fig. 4A). The medium (10 l) was inoculated to an initial cell density of approximately $1 \times 10^8/\text{ml}$ using 1 l precultures that were grown under the same conditions.

Analytical methods

Cell growth and magnetism were measured turbidimetrically at 565 nm. The average magnetic orientation of cell suspensions ("magnetism") was assayed by an optical method as described previously (Heyen and Schüler, 2003; Schüler *et al.*, 1995). Iron measurements were made with an atomic absorption spectrometer (3110 Perkin-Elmer, Überlingen, Germany) as described elsewhere (Grünberg *et al.*, 2001; Heyen and Schüler, 2003).

Isolation of total RNA from *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Among various tested protocols for RNA isolation, only the phenol-chloroform extractions method described by Oelmüller et al (Oelmüller *et al.*, 1990) yielded satisfactory results with respect to low degradation and yields of RNA. Briefly, cells of 200 ml oxystat culture were harvested, washed in 1 ml of PBS (150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate [pH 7]), and resuspended in 500 µl of ice cold AE buffer (20 mM sodium acetate [pH 5.5], 1 mM EDTA). The solution was incubated with 1 ml of hot phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and 10 µl of 25 % (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS) for 10 min at 60 °C, cooled on ice, and centrifuged at 4 °C. The aqueous phase was mixed with 62.5 µl of 2 M sodium acetate (pH 5.5) and 1 ml of phenol-chloroform-isoamyl alcohol for 5 min. The aqueous phase was again extracted with 1 ml of phenol-chloroform-isoamyl alcohol. After ethanol precipitation, the pellet was dissolved in 100 µl of 1 x DNase buffer (10mM Tris-HCl [pH 7.5], 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) and incubated with 10 U of RNase-free DNaseI (MBI Fermentas, St. Leon Roth, Germany) for 1h at 37 °C. The quality of the nucleic acid preparations was tested with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, USA); their quantity was measured by spectrophotometric measurement using a ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware, USA).

cDNA synthesis for reverse transcription (RT) PCR and real-time RT-PCR

The SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used to synthesize cDNA in a 20 µl reaction with random hexamers applied according to the manufacturer's instructions.

5 µg total RNA, 50 ng random hexamers and 0.5 mM dNTP each were mixed first, heated to 70 °C for 10 min, and placed on ice until addition of the cDNA synthesis mix (20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40U RNase Out, 200U SuperScript™ III RT). The reaction was incubated 10 min at 25 °C followed by 50 min at 50 °C and terminated by heat inactivation at 85 °C for 5 min. Afterwards cDNA was treated with 2U RNase H for 20 min at 37 °C and precipitated with ethanol. PCR was conducted as described elsewhere (Schübbe *et al.*, 2003).

Table 1: Primer used in this study

Primer	Target gene	Primer used for real-time RT-PCR	
		Sequence (5' → 3')	Size (bp) of amplified DNA
mamAf	<i>mamA</i>	GTATTACCGCGACAAGG	307
mamAr	<i>mamA</i>	CATTGAAATTCACCGGATTGG	
RT2mamB_f	<i>mamB</i>	GCCAGCTTCCTGATGTATGGGT	371
RT2mamB_r	<i>mamB</i>	GTCTGCAACAGTTCGGTATCCAC	
SSC_f+6/+24	<i>mamC</i>	CTTTCAACTTGCGCCGTA	234
RTmamC_r	<i>mamC</i>	TCCCAACGAGACCACCAA	
mamDf	<i>mamD</i>	GGCGGCATCGGAACTGG	264
mamDr	<i>mamD</i>	CGGTCTGGGTCATGGCGTTCT	
mamFf	<i>mamF</i>	GCAACTGCCGTTTCATATCTGA	235
mamFr	<i>mamF</i>	CGAGACCAAGCCGACCAC	
mamGf	<i>mamG</i>	GATCAAGGCATCGCGGAGT	194
mamGr	<i>mamG</i>	AGGGAGGCGGCGCAAGCC	
RT2mamM_f	<i>mamM</i>	CGCTGTGTCGCCATTGAGACTAA	378
RT2mamM_r	<i>mamM</i>	CGCTGTTCACCGGTGTT	
mamNf	<i>mamN</i>	CACAGTGGCCGTAGTCGT	299
mamNr	<i>mamN</i>	TCGCCTCTAACCCAAGCTAAA	
mamUf	<i>mamU</i>	GGCGCTATCGGATTGTGG	289
mamUr	<i>mamU</i>	CGGCTTGCCTGTTTCGGTTTG	
RT2flaA_f	<i>flaA</i>	GACGGCATCGACAGGGTATCTC	309
RT2flaA_r	<i>flaA</i>	GGCCAACTGGGTGACACGAAC	
RTbfr1_f	<i>bfr</i>	AGGCCAGCTTGTGATCA	259
RTbfr1_r	<i>bfr</i>	CGCATCCTGTTCTTGAAGG	
RTORF001a_f	<i>mgI458</i>	CGAAAACCTTCGGCCAAACC	300
RTORF001a_r	<i>mgI458</i>	GGGACTTGGAGATTGTTCGC	
RTORF001b_f	<i>mgI460</i>	AAGCCAGAAGGGAGAATAC	199
RTORF001b_r	<i>mgI460</i>	CTGTCTTATCTCAGCGTCCTG	
mamAStd_f	<i>mamA</i>	GGCCTTTTCGGTCAATGATG	374
mamAStd_r	<i>mamA</i>	AGATTATCCAGCGCCACC	
mamBStd_f	<i>mamB</i>	AATACATCTCGTCGGCCATC	460
mamBStd_r	<i>mamB</i>	ATAGATGCTGTGGACCAG	
mamCStd_f	<i>mamC</i>	GCCTGACCCCTGAATTAAGG	328
mamCStd_r	<i>mamC</i>	GATGAAATCGACACCAGGT	
mamDStd_f	<i>mamD</i>	AAGACCGTGCTGGTCGGAAA	328
mamDStd_r	<i>mamD</i>	ACGGTGAAGGTCTTGCCGA	
mamFStd_f	<i>mamF</i>	GCAAAGCAATGGCCGAGA	330
mamFStd_r	<i>mamF</i>	ACTACATGGCTGATCAGGGG	
mamGStd_f	<i>mamG</i>	GGGAATCGTGCATACACTTG	257
mamGStd_r	<i>mamG</i>	TGCGCTTTCGCTTCTTC	
mamMStd_f	<i>mamM</i>	CGTCAATGTGGGCATGT	462
mamMStd_r	<i>mamM</i>	TTCGATGCGGCGTATCTTTC	
mamNStd_f	<i>mamN</i>	TTTGGTGACCTACGGGAT	374
mamNStd_r	<i>mamN</i>	AGCCGATGGTCGATATCGCT	
mamUStd_f	<i>mamU</i>	ATTCATTCAGTCGCGCGA	409
mamUStd_r	<i>mamU</i>	CTTCCATTTTCTCCACCTCG	
flaAStd_f	<i>flaA</i>	TTACGCGATCTCGCCAGC	336
flaAStd_r	<i>flaA</i>	CATGACGAGTTGGACCAT	
bfrStd_f	<i>bfr</i>	TCCAGTCCAAGAGCTTGAAC	411
bfrStd_r	<i>bfr</i>	GAAGCCAGCGACAAGGTA	
StdORF001a_f	<i>mgI458</i>	GGGACATCAAAGCTTACGT	382
StdORF001a_r	<i>mgI458</i>	CCGGAGCAGATGTCTTGGAT	
StdORF001b_f	<i>mgI460</i>	AGTTCCATGCCCGCTGGAA	279
StdORF001b_r	<i>mgI460</i>	CAATCCTTCGGAGCACTCTT	

Primer used for operon mapping			
Primer	Intergenic region	Sequence (5' → 3')	Size (bp) of amplified DNA
3'mamU_Ssr	3'mamU-mamU	TTGGGCTATCAACGCCTG	1049
mamU_Ssf		ATCGGAATGCCGTTGGAT	
CW10_3R	mamU-mamT	CGAAACAGGCTCGGATAAAGG	916
S_15		TCGGACTGGGACTCTATTG	
mamT_Ssr	mamT-mamB	ACCATCAGCAAGGTGATC	1230
mamB_f		GTGAAGTGATTTCCGGGCACA	
CW7_1R	mamB-mamQ	CGAACAGGCGGATATCTC	1238
DS25A9		TTATCTGGCAATGATCACCG	
DS25A6RV	mamQ-mamA	AGATGGCCAGCATGAGTTGC	723
mamA_f		GTATTACCGCGACAAGG	

Table1: continued

Primer	Intergenic region	Sequence (5' → 3')	Size (bp) of amplified DNA
CW4_1R	mamA-mamP	CGTTCATCGAGTTCATTGG	1133
S_04		TTGGGCGAGGTTACTTTG	
DS91RC	mamP-mamO	GCCTTCCAACCTGGCAAAGC	1221
S_03		TAACGCCATCGGAGATTC	
S_26	mamO-mamN	ACGGATTCCAGCAGAGGTG	873
CW_12F		ACCTCGGTTGGGATTCTC	
mamN_SSr	mamN-mamM	GAATAAGATATCGCTGCC	1028
mamM_SSf2		GAACAGGCGCATGAAATT	
3FvKpWM91SacI_r	mamL-mamK	cgagctcCACATAGCGAGCCCGCAGATGGAT	1421
mamK_SSf		AAGCAGCCACCTTCGAGT	
mamK_SSr	mamK- mamJ	CTGACTTCAGCAGGAACT	578
mamJ_SSf		CGAGTTCGAGTATTTCGCA	
mamJ_SSr	mamJ - mamE	GTCACCGAAACAATCTCC	575
mamE_SSf2		TTCGGTGGCAATCGGAGT	
mamE_SSr	mamE-mamH	AGGTTGGAGTGCCTCATC	1162
mamH_SSf		CTTGTGAAAAGTGAGGCG	
mamH_SSr	mamH-5' mamH	AGCAACATGGTCACCGTA	869
5' mamH_SSf		CATGTTTCCAAGCCCAA	
XFCD_r	3' mamC-	TCGGGACAATGCGACATC	1063
SSC_f+6/+24	mamC	CTTTCAACTTGCGCCGTA	
SSC_r	mamC-mamD	ATGTCTTCGTCGGACGCT	1079
RTmamD_f		GAAACTGGATTGCCTTGACC	
mamD_r	mamD-mamF	CGGTCTGGGTCATGGCGTTCT	920
mamF_f		GCAACTGCCGTTTCATATCTGA	
mamF_r	mamF-mamG	CGAGACCAAGCCGACCAC	542
mamG_f		GATCAAGGGCATCGCGGGAGT	
mamG_r	mamG-5' mamG	AGGGAGGCGGCGCAAGCC	610
XFCD5' f		AGGGAGGCGGCGCAAGCC	
3' mms_SSr	3' mgl462-	TTGATCATCTGATCTCCGGC	589
mms_SSf	mgl462	TGAGGTTGCCGAATAGGACA	
mms_SSr	mgl462-mms6	GCAGAGGCAAATGCGAAT	382
mms6_F3		TGCGCCGCGACAACCTTGTT	
mms6_SSr2	mms6-mgl460	AACCAAGGTTGTGCGGCGCA	537
RTORF001b_f		AAGCCCAGAAAGGGAGAATAC	
RTORF001b_r	mgl460-	CTGTCTTATCTCAGCGTCCTG	1201
RTORF001a_f	mgl458	CGAAAACCTTTCGGCCAAACC	
RTORF001a_r	mgl458-mgl457	GGGACTTGGAGATTGTTCGC	713
ORF000_SSf2		CGACATTGTCTGAGAACCAC	
ORF000_SSr2	mgl457-	GATGCTTGTGCACCATTTGTG	869
5' ORF000_SSf	5' mgl457	GATTCGAAACATCATCGACT	

Primer used for primer extension analysis		
primer	target gene	sequence (5' → 3')
mamH_FAM	<i>mamH</i>	ATAGCAACGACGAGATCATG
mamH2_FAM	<i>mamH</i>	AAAAGATCAAGGACCTCGGTCACCA
mamG1_FAM	<i>mamG</i>	AGAAGAACGGGACCCCAAGCA
mamG2_FAM	<i>mamG</i>	TGCGCTTTGCGATTCTTCAGATAA
mamX_FAM	<i>mgl462</i>	ACTATTACATGGAAGTTACGAG
mamX_FAM3	<i>mgl462</i>	ATTTCGATTTGCCTCTGCGC
mamE1_FAM	<i>mamE</i>	ACAACGCCCATGAGCATCAG
mamJ1_FAM	<i>mamJ</i>	AGGGATGGACCGTCACCGAAAACAATCT
mamK_FAM	<i>mamK</i>	AAGTCCCAAGTGCATGCCAA
mamM1_FAM	<i>mamM</i>	ATAGCTGCGATCCACCGATCAG
mamO1_FAM	<i>mamO</i>	GGCGAAAGTCACTAGGATCAGGAA
mamA_FAM	<i>mamA</i>	AAGCATCGACCATATTCGCAC
mamB_FAM	<i>mamB</i>	TCAGCCCCAAGATGCCTTTGAAAA
mamT1_FAM	<i>mamT</i>	GACAGCTCATCCCAATAGAGTC
mamU_FAM	<i>mamU</i>	AAGAATGATCGCGGCATCATG

Primer extension analysis

Up to 50 µg total RNA, 2 µM antisense FAM labeled primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) 100-300 bp upstream of the start codon and 1 mM dNTP each were mixed first, heated to 70 °C for 10 min, and placed on ice until addition of the RT buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.3], 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol) and

0.5 µg actinomycin. The reaction was incubated 10 min at 37 °C, 200U Revert Aid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) was added, followed by 60 min incubation at 42 °C and terminated by heat inactivation at 70 °C for 5 min. Afterwards the cDNA was digested with 2U RNase H for 20 min at 37 °C. The extended product was ethanol precipitated and dissolved in 5 µl TE buffer. The product was analyzed with the ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) with the Genescan 500 ROX standard. The fragment analysis program had the following parameters: oven temperature 60°C, pre run time 180 sec, run voltage 15 kV, run time 1800 sec. The data were analyzed with the GeneMapper® Software v.3.7 2004 from Applied Biosystems. Numbering of nucleotide positions was according to the sequence deposited as (BX571797).

Western Blot Analysis

Crude extract of various cultures were separated by a 12 % SDS-PAGE transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed with an anti-MamC primary antibody, which was a gift from K. Grünberg, Bremen. Detection was conducted with a secondary antibody that was conjugated to an alkaline phosphatase and could be detected with BCIP tablets (Roche Biochemicals).

Sequence analysis

Predictions of hairpin structures for putative transcriptional terminators were analyzed with RNAfold (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003). Binding sites of transcription factors were analyzed with DBTBS release3.4 (Makita *et al.*, 2004)

DNA microarray analysis

Isolated total RNA of MSR-1 (magnetic), MSR-1 (iron-limited), MSR-1 (aerobic), and MSR-1B (mutant) was directly chemically labeled with the fluorescent dyes Alexa 546, Alexa 647, and Alexa 488, respectively, using platinum-linked reporter technology purchased as a kit from Molecular Probes (Eugene, USA). Labeling of 10 µg of total RNA was done according to the manufacturer's protocol, except that 10 and 2 µl of the labeling reagent for dyes Alexa 546/647 and Alexa 488, respectively, were added to the labeling buffer. Labeling efficiency and quantity of labeled RNA was checked by spectrophotometric measurement using a ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware, USA).

Table 2: Oligonucleotide probe set used for DNA microarray analysis

Probe name	Gene targeted	Sequence [5'-3']	Length [nt]	G+C content [%]
cmamA	<i>mamA</i>	AGC GCT CAA GCA ACT CGG TGC CGC GAT CAA CGG CCC CGG TCT TAA CGT AGG CGA TTC CCA AAT GCA GCG C	70	61
cmamB	<i>mamB</i>	GCG GCG ATG GTG TCG GCG ATG GGA AAA CCG ATC ACC GAG GCG ATC ACT CCA ACC ATC ACC GCC GCC GAG G	70	65
cmamD	<i>mamD</i>	GTC GTG GCC GAG ACT GAC GAG ACC GTC GCC GTC TGA CCG GCA AGT GCC CCG ACC TGG GAC GCC TGC ATG G	70	70
cmamF	<i>mamF</i>	GAT GGC GGG CGC TAG CTA TCT GGG CAT CCT CTG CTT CGT CCC GCT GCT TAT GAG CCG CGA TGA CGA ATA T	70	55
cmamG	<i>mamG</i>	TTG GGG TCC CGT TCT TCT CGG CGT TGC CGG ATT GGC TTG CGC CGC CTC CCT ATG TGA TTA TCT GAA GAA T	70	55
cmamE	<i>mamE</i>	TGT ACG TCA CCG TAA AGGA CGA TGT GGG TTC GAT CCG CTA TTC CGG CGA GAT CGT CAA GAT GGA TGA GGC	70	55
cmamJ	<i>mamJ</i>	GCT AGC CCA AAT GTC GCC CTG CAC CGG CTT GGC CGC CGC AGC AAG GTT CGG CGAGGG ATG GAC CGT CAC C	70	68
cmamK	<i>mamK</i>	AGC GGA TAG CGG AGA TCC AGA TAG GAG CGC ATC TCG AAG GCT TCA TCG CCA ACCACA TAG GGG CGA CCG A	70	58
cmamH	<i>mamH</i>	GCA TCA GGA CCG CAT AGA CCA GCG TCA CGC CGA ACG CCA TCA TAA AGG CGG TATTGG ACA GCA GCC GAG C	70	60
cmamL	<i>mamL</i>	CGA AGA TGC GTG GCT GTC CAG GAC ATT GGT ATG GTA AGA GTG ATC GGA TCG TTG GTG TTC GGC GGC TT	68	54
cmamO	<i>mamO</i>	TTA TTC ATT GGG AGG CTC CGG TAA CAT TGG CGC TGG TGA TGA TCC CAG GTG CTT ATG TTG GCG GCA T	67	52
cbfr1	<i>bfr1</i>	AAA GCA CTT TGA AGC CCC AGT TTT CCA ACA TGC GGG CAT GGA CGA AAT ACT GGT CGG CAG CGG TCA	66	53
cpbrA	<i>pbrA</i>	CGG CCC AAA GTC ATG GTT CCA GTC TTG TCG AAG GCG ATG GCG GAC AGT CGT GAC GCC GTC TCA AGA TAT	69	57
cmagA	<i>magA</i>	TCC AGC AGC AAG CCG ATG GAC AGG AAG AAC ACC ATC AAC AAT ACG CTT TGC ACC GGT TCG GCG CTT	66	54
cORF000	<i>mgI457</i>	TAT TGC TGT CCA CGT GCC AGC CAA GCC ATT CCA CCT GCA CCG ATC CGA CAT TGT CTG AGA ACC ACA	66	54
cORF001a	<i>mgI458</i>	CTA TCC AGG ACA GCA ATG AGC CAG GAA AAC TCC CAA GGC GAG GTG CCA ACC AAG GCC ATG CCA GCA	66	57
cORF001b	<i>mgI460</i>	CAC CAG ACC CTG CTT GGC GTG GAA GTA GAC AAA CTC GTC GTC CCG ATC CAC CAG CAG CGG AAC GAA	66	59
cmamN	<i>mamN</i>	CGT GAT GGT GGG AGC GTT GAC CTC GGT TGG GAT TCT CGA TTG GGC CGT GGC TTG GCT TGA AGG AGT TAC	68	54
cmamU	<i>mamU</i>	GCC CAA GCG AGC CCC AAA CGA CCG ATA GTC GCT CCG TCA CGG CGG AGG GCG ACA TCC GAA GCA CGG TTC C	70	67

Forty five oligonucleotide probes, 65 to 70 nucleotides in length and targeting the mRNA of selected genes of the magnetosome gene clusters of *M. gryphiswaldense* were designed semi-automatically using the software package ARB (Ludwig *et al.*, 2004). The probes and their characteristics are listed in Table x. Specificity of all probes was evaluated against the draft genome sequence of *M. gryphiswaldense* by the non-heuristic suffix tree-based Probe_Match tool implemented in ARB and Blast (Altschul *et al.*, 1997). The sequencing coverage of the draft genome is 9-fold, which gives access to nearly all genes of the genome (Branscomb and Predki, 2002).

The DNA oligonucleotide probes were purchased from Biomers (Ulm, Germany) and spotted in four replicates onto GAPS II slides (Corning, Schiphol-Rijk, Netherlands) using a SpotArray 24 spotting device from Perkin Elmer (Wellesley, USA) with Telechem Stealth Pins (Sunnyvale, USA). The concentration of the unmodified oligonucleotides in Micro Spotting Solution Plus spotting buffer (Telechem, Sunnyvale,

USA) was 10 μ M. Post processing of the slides was done according to the manufacturer's protocol, except that after rehydration, slides were dried for 10 sec at 200°C on a 555 Digital Hotplate (VWR, Darmstadt, Germany). For covalent immobilization, both UV crosslinking, using a GS Gene Linker (Bio-Rad, München, Germany) at 245 nm and 350 mJ, and incubation at 80°C for 3 h were used. Slides were stored at room temperature in the dark.

Spotted slides were blocked in a prehybridization solution containing 250 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl at pH 8.0, 50% formamide, 0.5x SSC, 0.05% BSA, and 1% blocking reagent from Roche (Mannheim, Germany) for at least 45 min at 46°C and air dried. For the parallel hybridization of three different target samples, a modified fluorescence *in situ* hybridization (FISH) protocol was used as recently described by Peplies et al. (Peplies *et al.*, 2003), except that the hybridization buffer contained 50% formamide and 2 μ g of labeled RNA of each of the transcriptomes was applied. Hybridization was conducted in a HS-400 hybridization station (Tecan, Crailsheim, Germany) at 50°C for at least 12 h. Afterwards, slides were washed in ULTRArray Low Stringency Wash Buffer (Ambion, Huntington, UK) and dried under nitrogen.

Slides were imaged at a resolution of 5 μ m using a ScanArray microarray scanner (Perkin Elmer, Wellesley, USA) with varied laser power and sensitivity level of the photomultiplier tube (PMT) for each slide. The image analysis software QuantArray 3.0 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) was used for automatic spot detection and signal quantification. The raw data were then processed in terms of filtering, combination of probe replicates, and normalization using the microarray data analysis software tool MADA by Ellrott et al. (Ellrott *et al.*, submitted). Briefly, signals were only assessed as positive if mean spot pixel intensity was higher than the mean local background intensity plus its standard deviation. Spot replicates with poor homogeneity were removed from the data set according to the 50% outlier test of MADA. Non-background-corrected spot signal intensities were normalized to the mean global background of the corresponding dye since a strong linear correlation of the global background signal intensity and the amount of hybridized target RNA was observed for this particular protocol in initial concentrations series (data not shown). Each data point shown represents the arithmetic mean of the normalized spot intensities of the positive replicates for a particular probe coming from two independent hybridizations. The error bars indicate the standard deviation of the replicates.

Real-time RT-PCR

Primers listed in Table 1 were designed using MacVector 7.0 software and purchased from MWG Biotech (Ebersberg, Germany) and Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). PCR reactions were carried out in 96 well microtiter plate wells in 25 μ l reaction volume with Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) with 0.2 μ mol of primers (table 1). An ABI Prism[®] 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, USA) was programmed for an initial step of 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C followed by 40 thermal cycles of 15s at 95 °C and 1 min at 60 °C. For each reaction, 10 ng of the individual RT reaction served as a template. Primer pairs complementary to an assortment of *mam* genes were used to amplify gene-specific products (table 1). Specificity of accumulated products was verified by melting curve analysis. PCR efficiencies were determined as described previously by Pfaffl (Pfaffl, 2001), see equation 3) and Ramakers et al. (Ramakers *et al.*, 2003). Relative expression levels were determined by standard curves. For each tested RNA preparation, at least three independent real-time RT-PCR experiments were conducted. To determine relative transcript amounts, at first standard curves for each gene were conducted. After adapting these quantitative amounts to the size of the amplified PCR product, we revealed relative transcript amounts as indicated (Fig. 5)

Results

Transcriptional organization of the *mamAB*, *mamDC* and *mms* gene clusters

Among the various methods tested for isolation of RNA, only the phenol-chloroform extraction yielded high-molecular RNA of sufficient quality from *M. gryphiswaldense*, as indicated by sharp bands of non-degraded ribosomal RNA species. We noticed that the intact 23S rRNA species running at 2.9 kb was hardly detectable in our preparations independent from the isolation procedure. Instead, additional smaller species migrating at about 1.3 kb and 1,6 kb in agarose gels were present. This suggests that the 23S rRNA precursor was cleaved during rRNA maturation similar as reported for many species of *Alpha*- and other *Proteobacteria* (Evguenieva-Hackenberg and Klug, 2000; Oelmüller *et al.*, 1990). Interestingly, rRNA fragmentation was dependent on the growth phase: While the 23S rRNA precursor was clearly detectable in young, exponentially growing cultures, this species was entirely degraded into cleavage products in late-exponential and stationary cells. Thus, RNA fragmentation provides a convenient indicator for monitoring the growth phase of a *M. gryphiswaldense* culture (Fig1).

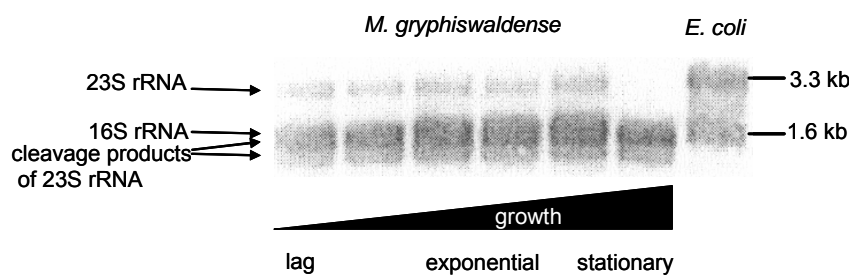


Figure 1: Agarose gel showing different species of ribosomal RNA in preparations from *M. gryphiswaldense*. A 23S rRNA precursor is cleaved into two species of 1.6 kb and 1.3 kb (arrows). During stationary phase, the 23S rRNA precursor becomes entirely undetectable.

The operon-like, collinear organization of the *mamAB*, *mamGFDC* and *mms*-clusters suggested that they might be cotranscribed within a single long messenger (Fig 2). Sequence analysis did not reveal any characteristic *rho*-independent transcription terminator structures within the three clusters (data not shown). Initial attempts to directly identify transcripts from a variety of *mam* genes by Northern hybridization consistently resulted in a conspicuous smear, regardless of the RNA preparation methods and probes used, which might be due to common problems

associated with the isolation of intact long transcripts in sufficient amounts (Gupta, 1999). Therefore we used RT-PCR to establish whether adjacent genes are cotranscribed using primers specific for the intergenic regions of the three clusters. cDNA was synthesized from RNA of magnetic cells using specific primers situated at the 3' end of each cluster (primer CW10_3R for the *mamAB* cluster, primer mamC_SSr for the *mamDC* cluster and primer ORF000_f2 for the *mms* cluster). Transcripts were detected for all tested intergenic junctions, but not for regions located 5' and 3' from the first and last gene of each of the clusters. Amplicons obtained from the cDNA had the same sizes as the amplicons obtained from the genomic DNA. Negative control experiments, which revealed the complete absence of DNA in the RNA samples, were performed by omitting the RT enzyme during RT reaction (Fig. 2A-C). These results suggested that at least one long, polycistronic transcript exists for any of the three clusters.

The *mamAB*, *mamGFDC* and *mms* operons are each cotranscribed from single promoters

The transcription start sites of the *M. gryphiswaldense* *mamAB*, *mamDC* and *mms* operons were determined by primer extension analysis using RNA isolated from magnetic *M. gryphiswaldense* cells grown under standard conditions. Results of promoter mapping are shown in Fig. 2. As suspected from results of the RT-PCR, promoters were identified upstream of the first genes of all three operons. Promoters P_{mms} , P_{mamDC} , and P_{mamAB} are located 58 nt, 51 nt, and 22 bp upstream of the translation start site of *mgI462*, *mamG*, and *mamH*, respectively. The -10 and -35 region display different degrees of similarity with the conserved consensus sequences of the vegetative *sigma70* promoter of *E.coli* (Fig. 2).

In addition to the region located upstream of the initial *mamH* gene, regions preceding further genes of the *mamAB* operon were screened for the presence of promoters approximately every second gene including *mamE*, *mamJ*, *mamK*, *mamM*, *mamO*, *mamA*, *mamB*, *mamT* and *mamU*. However, we were unable to identify internal transcriptional starting points in repeated attempts.

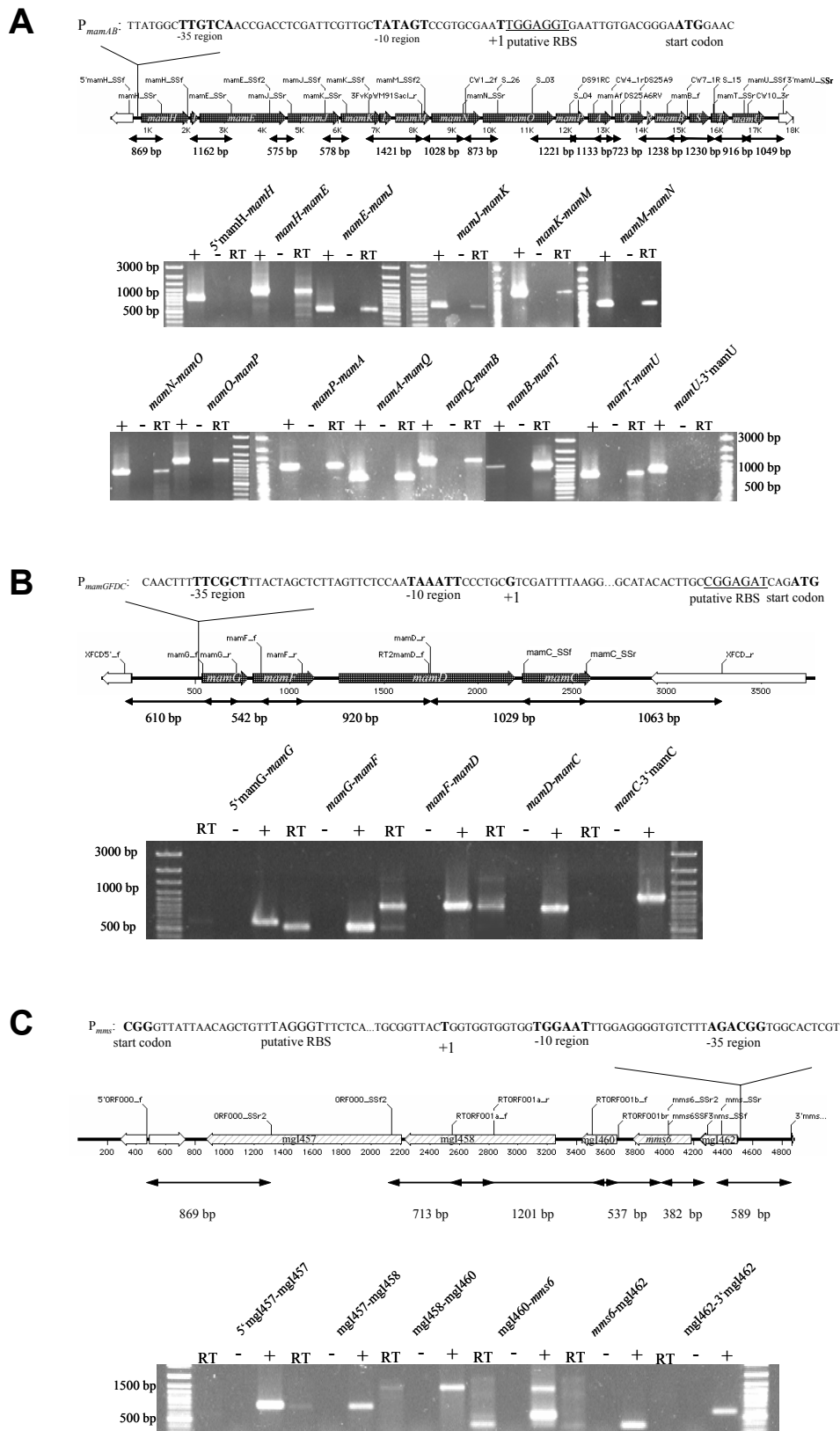


Figure 2: Transcriptional analysis by RT-PCR of the *mamAB* (A), *mamGFDC* (B), and *mms* (C) operons. Primers used in RT-PCR experiments are indicated by vertical marks. Expected sizes of PCR products are indicated below arrows. Agarose gel electrophoresis of PCR products is shown below. Lanes: (RT) RT-PCR, (-) negative control with reverse transcriptase enzyme omitted, (+) positive control with genomic DNA as template, (M) DNA size marker. Sequence of identified promoters (P_{mamAB} , $P_{mamGFDC}$, P_{mms}) are indicated on top of the operon organization. The -10 and -35 regions are in larger font characters. Start codons are in bold.

Magnetosome genes are transcribed under various growth conditions

Transcription studies were carried out on cells grown at various defined oxygen concentrations in the fermenter. In an induction experiment the culture was initially incubated at 30 mbar oxygen in iron-sufficient medium. Under these conditions cells grew at comparable rates as under microaerobiosis, but did not produce magnetite. After 14 h during exponential growth, the pO_2 was shifted from 30 mbar to 3 mbar. First magnetite production was detected 1.5 hours after the shift, as revealed by the quantitative light-scattering assay (C_{mag} 0.55), and the magnetism of the culture gradually increased until stationary phase (C_{mag} 1.55). RT-PCR on RNA from cells sampled at different time points revealed no difference in the presence of transcripts for *mamB* and *mamC* (Fig. 3B) as well as *mamA*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H* and *M* (not shown), indicating that *mam* genes were expressed throughout the growth. Further experiments, which were performed at various constant oxygen concentrations (0.25, 0.5, 2, 6 mbar O_2) as well as at different iron concentrations (<1 μM to 150 μM) revealed the presence of transcripts for all magnetosome genes tested, independent from the formation of magnetite (data not shown). To verify at the protein level whether magnetosome-membrane proteins (MMPs) are in fact translated from the detected transcripts under conditions repressing magnetite formation, cell extracts from different growth conditions were analyzed with an antibody against MamC, which represents the most abundant MMP. Western blot analysis revealed that the MamC protein is present under all tested conditions in magnetic as well as non-magnetic cells (Fig 3C).

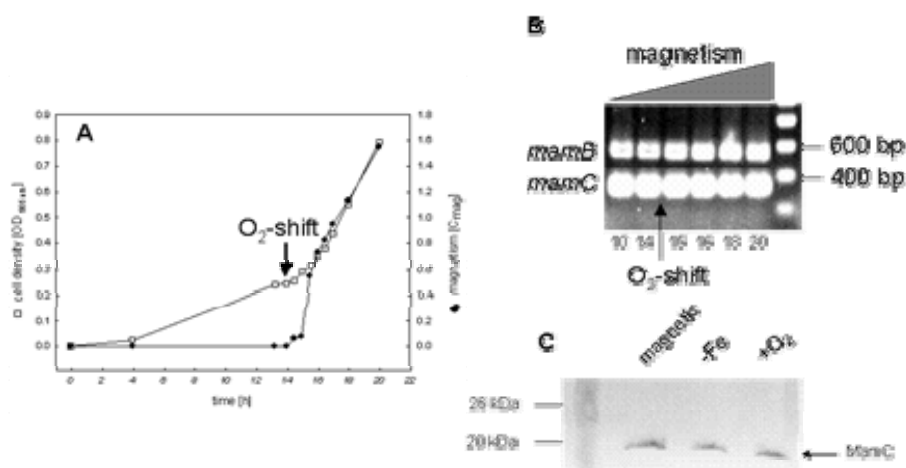


Figure 3: (A) Growth and magnetism of *M. gryphiswaldense* during oxystat cultivation. After 14 h, the pO_2 was shifted from 30 mbar to 3 mbar (arrow). (B) RT-PCR with gene-specific primers on RNA collected at different time points during the oxygen shift experiment. As an example results for *mamB* and *mamC* are shown. Experiments with all other tested *mam* genes yielded identical results. (C) Western blot analysis of MamC expression in magnetic and non-magnetic cells. Cultures were grown under magnetic, iron limited (-Fe) and aerobic (+ O_2) conditions.

Expression profiling of magnetosome genes by DNA microarray analysis

As experiments described above suggested a more subtle regulation of *mam* genes, microarray and real-time RT-PCR experiments were conducted with cells grown at different conditions in an oxystat-controlled fermenter as described.

A specific ‘partial genome’ DNA microarray was designed to study iron- and oxygen-responses in gene expression targeting all *mam* and *mms* genes of *M. gryphiswaldense* as well as selected ORFs neighboring these genes within the MAI and several genes for which a regulation by iron is anticipated. The latter group include the *magA* gene which is encoding an iron-regulated transport protein in *Magnetospirillum* sp. AMB-1 (Nakamura *et al.*, 1995a; Nakamura *et al.*, 1995b), the *bfr1* gene encoding a subunit of bacterioferritin that was presumed to be iron-regulated in *M. magnetotacticum* strain MS-1 (Bertani *et al.*, 1997), and *pbrA* resembling (39 % identity, 55 % similarity) an iron-regulated sigma factor in *Pseudomonas fluorescence* (Sexton *et al.*, 1996). Comparative microarray analysis of in each case two different MSR-1 cultures was conducted with directly labeled RNA extracted from cells grown in an oxystat-controlled fermenter at conditions shown in Fig. 4A. RNA from the non-magnetic mutant MSR-1B, labeled with a third fluorescent dye, was added to all hybridizations to serve as an internal negative control since all targeted *mam* and *mms* genes are absent in this strain due to a 40 kb deletion within the magnetosome island (MAI) (Schübbe *et al.*, 2003; Ullrich *et al.*, 2005).

Interestingly, also hybridization of the MSR-1B RNA displayed comparably weak, but probe-specific signal intensities for all 45 probes applied, which were significantly above the local background even under optimized hybridization stringency (data not shown). This reflects the challenge of providing highly specific hybridization signals in the microarray format especially if sensitive protocols are applied as required for the direct detection of cellular RNA. However, based on the common two-fold criterium for the identification of differentially expressed genes based on the comparison of the two signal intensities measured for each probe in the standard format the following genes must be considered as down-regulated: *mgI457*, *mgI458*, *mgI560*, *mamD*, *mamK*, and *mamH* in cells grown under iron limited conditions (Fig. 4C) and *mgI458* and *mgI460* in cells grown under aerobic conditions (Fig. 4B). No response under the conditions tested was suggested for genes *mgI457*, *mamE*, *mamJ*, *mamL*, *mamM*, *mamO*, *mamN*, *mamB*, *bfr1*, and *pbrA* in cells grown under aerobic and for genes *mamE* and *mamL* in cells grown under iron limited conditions. Taking also into

account the hybridization signals of strain MSR-1B, additional information can be obtained from the data sets.

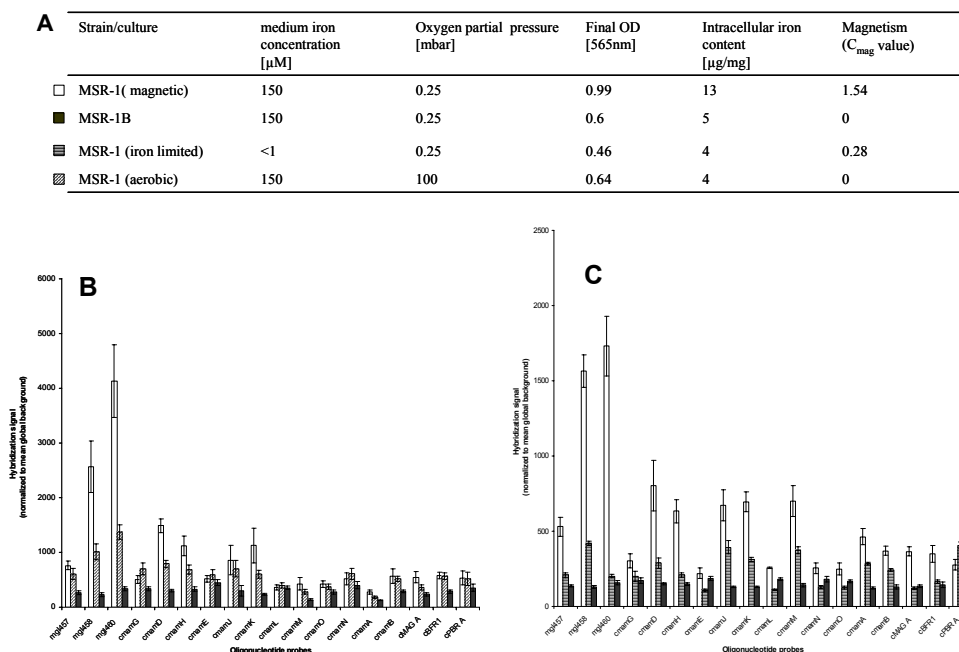


Figure 4: Average ratios of hybridization with probes targeting *mam* gene determined by RNA microarray analysis. Standard (□ MSR-1 magnetic), iron limited (▨ MSR-1 –Fe), aerobic (▩ MSR-1 +O₂), non-magnetic mutant MSR-1B (■ MSR-1B).

Expression profiling of selected magnetosome genes by quantitative real-time RT-PCR

In order to evaluate the data obtained by microarray analysis, relative transcript amounts for 11 selected *mam* and *mms* genes (*mgI458*, *mgI460*, *mamG*, *mamF*, *mamD*, *mamC*, *mamM*, *mamN*, *mamA*, *mamB*, *mamU*) and *bfr1* were determined by quantitative real-time RT-PCR (Fig 5). As expected, no expression of the *mam* and *mms* genes was observed in the MSR-1B deletion strain. At all three growth conditions the highest amounts of transcripts were observed for *mamD* and *mamF*, whereas the lowest were observed for *mamC* and *mamM*.

Cells grown at aerobic conditions showed a down-regulation of the investigated *mam* and *mms* genes compared to magnetite-forming conditions. For example, *mamU* and *mamM* were down-regulated about 55-fold and 6-fold, respectively, and displayed larger regulatory differences than other *mam/mms* genes that showed a 2.5-4.3-fold down-regulation. In cells grown under iron-limited conditions, expression of all investigated *mam* and *mms* genes were down-regulated. Largest regulation differences were found for *mamU* (137-fold) and for *mamB* (55-fold). The regulation differences of the other genes of the *mamAB* and *mamDC* cluster were between 19-23-fold. Only

mamN was lower regulated at about 12-fold. The regulation of *bfr1* with a value of 25-fold was about in the same range like the *mam* genes.

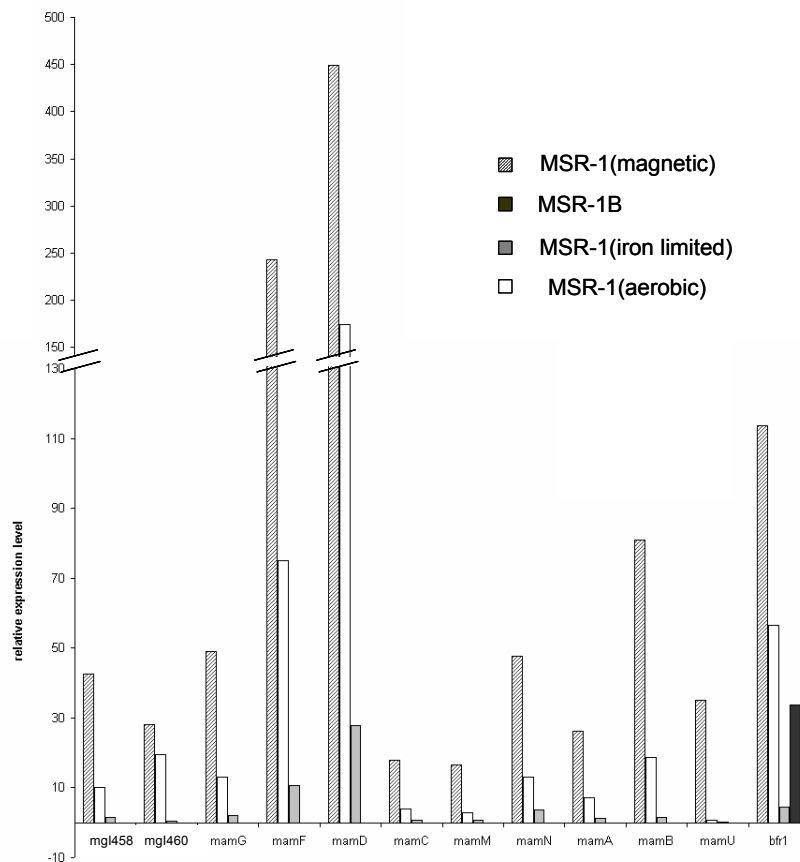






Figure 5: Expression levels of selected genes under  magnetic,  iron limited and  aerobic conditions and in  MSR-1B determined with real-time RT-PCR.

Discussion

In this study we have shown that the previously identified *mam* and *mms* genes are cotranscribed as polycistronic operons from single promoters. For the *mamAB* cluster we found evidence for the existence of a long transcript extending over more than 16 kb and comprising 17 genes.

Although there are well-documented examples for large transcriptional units spanning operons as large as 35 kb (Dal *et al.*, 2005; Enguita *et al.*, 1998; Reeves *et al.*, 1999), transcription in large operons is frequently governed from multiple promoters as for example in the 10 kb *gal-lac* operon in *Streptococcus salivarius* (Vaillancourt *et al.*, 2002), and multiple promoters haven been even found in smaller operons as in the *ilv* operon of *Corynebacterium glutamicum* spanning over only 4 kb (Pátek *et al.*, 2003).

Although no internal promoters could be identified by primer extension analysis, we cannot rule out that there are additional promoters located within the *mamAB* cluster that escaped detection by this method.

The transcription start sites P_{mamAB} , P_{mamDC} , P_{mms} are the first promoter sequences identified experimentally in *M. gryphiswaldense*, and to our knowledge in a magnetotactic bacterium.

Sequence comparison reveals that the -10 regions show similarity to the *E. coli* σ^{70} -10 consensus, whereas the -35 regions are more divergent. Moreover, the three identified promoter sequences show only weak conservation between each other and compared to promoters in other *Alphaproteobacteria* such as *Rhizobium* and *Rhodobacter* controlled by σ^{70} . Promoter regions in closely related strains *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 and *Magnetococcus* spec. MC-1 have not been experimentally identified so far. However, the genetic organization of magnetosome genes in these organisms seems conserved as far as revealed by available genome sequence data (Grünberg *et al.*, 2001)

http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html). Interestingly, inspection of the sequence upstream of the *mamH* gene of *M. magnetotacticum* revealed a nearly identical promoter sequence P_{mamAB} with highly conserved -10 and -35 regions but slight differences in the region between the two boxes (not shown). However, no homologs to P_{mms} and P_{mamDC} are detectable in the region preceding these operons in other MTB.

Although not affected by deletion, *bfr1*, *magA* and *pbrA* showed a lower expression level in mutant strains MSR-1B compared to the wild-type grown under magnetite-forming conditions (according to microarray analysis). In the wild-type, *magA* and *bfr1* genes displayed a similar regulation pattern like the *mam* genes, which seems not to be consistent with their suspected role in iron metabolism (Bertani *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1995b). Although magnetosome formation is tightly controlled by the extracellular iron and oxygen concentrations (Heyen and Schüler, 2003), transcripts of analyzed magnetosome genes were present under all tested conditions, and translation of the most abundant magnetosome protein MamC was confirmed also in non-magnetic cells grown under these conditions. However, the transcription level of several genes varied in response to iron and oxygen as indicated by microarray and real-time RT-PCR data. All investigated magnetosome genes showed maximum expression under magnetite-forming conditions. These conditions are resembling those encountered by MTB in their natural environment within the sediment (Flies *et al.*, 2005a). However,

the regulation does not seem to be not very tight, as indicated by the presence of transcripts under conditions repressing magnetite formation (low iron, high oxygen levels). While magnetite formation proceeds with no delay/immediately when cells grown under iron-limited conditions are shifted to iron-sufficient conditions (Heyen and Schüler, 2003), we observed a lag of 1.5 hours in magnetite formation in our growth experiments after oxygen induction, suggesting that protein synthesis is likely to be required after shifting from aerobiosis towards microaerobiosis. The tight repression of magnetite biomineralization at aerobic conditions is not consistent with the relaxed regulation pattern observed for magnetosome genes. Therefore, we postulate that the expression of the magnetic phenotype is not mainly controlled by differential transcription of the analyzed magnetosome genes, but other regulatory circuits are likely to exist mediating repression or induction of magnetite biomineralization. Common mechanisms of regulation in response to oxygen are the ArcA (aerobic respiration control) and Fnr (fumarate, nitrate reduction) regulons (Shalel-Levanon *et al.*, 2005), and to iron the Fur (*ferric uptake regulator*) regulon (Grifantini *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004) Although homologs of these regulatory proteins are present in the genome of *M. gryphiswaldense*, it is uncertain if they are involved in the regulation of the magnetic phenotype.

The three-colour labeling method used in this study for microarray analysis in combination with the isogenic deletion mutant MSR1B, which provides a unique negative control for most of the analyzed genes, allows for superior sensitivity and specificity. For instance, the regulation of seven genes by oxygen and eight genes by iron based on the “two-fold cut off” method in our study would have escaped identification by conventional methods, which are done in the absence of an appropriate control. RNA microarray analysis revealed a distinct transcription pattern of the *mam* and *mms* genes. This regulatory pattern was confirmed by real-time RT-PCR, although determined differences in transcription levels were generally lower. This agrees with the observation that microarray analyses tend to underestimate expression levels compared to other generally applied methods for RNA analysis (Conway and Schoolnik, 2003). The observed differences in expression determined by real-time RT-PCR were comparable for most tested genes. However, some genes, such as *mamU* gene exhibited a larger amplitude of regulation, and differences in transcription levels of several genes encoding MMPs were not fully consistent with observed abundances of gene products observed in previous analysis of the magnetosome subproteome (Grünberg *et al.*, 2004).

A possible explanation could be a different stability of mRNA or other mechanisms of posttranscriptional regulation.

In conclusion, the results presented in this study have revealed that gene clusters encoding magnetosome proteins are transcribed as operons. In addition, first insights in promoter structures of magnetotactic bacteria have obtained. These might be exploited in the future for the construction of vectors and gene fusions for the expression of genes involved in magnetosome formation. Furthermore, first results of microarray experiments will set the stage for a global analysis in order to explore the upcoming genome sequence of *M. gryphiswaldense*.

Acknowledgment

We thank Sylke Wohlrab, Ekaterina Schmidt and Cornelia Stumpf for excellent technical assistance, and Cathrin Wawer for help with Northern experiments and RNA isolation. Udo Heyen is acknowledged for help with the fermentation experiments. This study was supported by the BMBF BioFuture Program and the Max-Planck Society.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Bazylnski, D.A., and Frankel, R.B. (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev. Microbiol.* **2**: 217-230.
- Bertani, L.E., Huang, J.S., Weir, B.A., and Kirschvink, J.L. (1997) Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Gene* **201**: 31-36.
- Blakemore, R.P., Short, K.A., Bazylnski, D.A., Rosenblatt, C., and Frankel, R.B. (1985) Microaerobic conditions are required for magnetite formation within *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Geomicrobiol. J.* **4**: 53-71.
- Branscomb, E., and Predki, P. (2002) On the high value of low standards. *J. Bacteriol.* **184**: 6406-6409.
- Conway, T., and Schoolnik, G.K. (2003) Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol. Microbiol.* **47**: 879-889.
- Dal, S., Trautwein, G., and Gerischer, U. (2005) Transcriptional organization of genes for protocatechuate and quinate degradation from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1025-1034.
- Ellrott, A., Würdemann, C., Peplies J, and Glöckner, F.O. (submitted) MADA - A transparent and intuitive MicroArray Data Analysis software tool based on Microsoft Excel.
- Enguita, F.J., Coque, J.J., Liras, P., and Martin, J.F. (1998) The nine genes of the *Nocardia lactamdurans* cephamycin cluster are transcribed into large mRNAs from three promoters, two of them located in a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* **180**: 5489-5494.
- Evguenieva-Hackenberg, E., and Klug, G. (2000) RNase III processing of intervening sequences found in helix 9 of 23S rRNA in the alpha subclass of *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.* **182**: 4719-4729.
- Flies, C.B., Jonkers, H.M., de Beer, D., Bosselmann, K., Böttcher, M.E., and Schüler, D. (2005a) Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 185-195.
- Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G., and Genco, C.A. (2003) Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 9542-9547.
- Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., and Schüler, D. (2001) A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4573-4582.
- Grünberg, K., Müller, E.C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2004) Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1040-1050.
- Gupta, A. (1999) RT-PCR: characterization of long multi-gene operons and multiple transcript gene clusters in bacteria. *Biotechniques* **27**: 966-970, 972.
- Heyen, U., and Schüler, D. (2003) Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 536-544.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Makita, Y., Nakao, M., Ogasawara, N., and Nakai, K. (2004) DBTBS: database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* and its contribution to comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* **32**: D75-77.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**: 911-940.
- Nakamura, C., Kikuchi, T., Burgess, J.G., and Matsunaga, T. (1995a) Iron-regulated expression and membrane localization of the magA protein in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 23-27.
- Nakamura, C., Burgess, J.G., Sode, K., and Matsunaga, T. (1995b) An iron-regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J. Biol. Chem.* **270**: 28392-28396.
- Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchel, A., and Friedrich, C.G. (1990) Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Meth.* **11**: 73-84.
- Pátek, M., Nesvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O., and Leblon, G. (2003) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 311-323.
- Peplies, J., Glöckner, F.O., and Amann, R. (2003) Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1397-1407.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62-66.
- Reeves, A.R., English, R.S., Lampel, J.S., Post, D.A., and Vanden Boom, T.J. (1999) Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* **181**: 7098-7106.
- Schleifer, K., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., and Köhler, M. (1991) The genus *Magnetospirillum* gen. nov., description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 379-385.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2003) Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* **185**: 5779-5790.
- Schüler, D., and Köhler, M. (1992) The isolation of a new magnetic spirillum. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**: 150-151.
- Schüler, D., Rainer, U., and Bauerlein, E. (1995) A simple light-scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 139-145.

- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1996) Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **166**: 301-307.
- Schüler, D., and Baeuerlein, E. (1998) Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* **180**: 159-162.
- Schüler, D. (2004) Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* **181**: 1-7.
- Sexton, R., Gill, P.R., Jr., Dowling, D.N., and O'Gara, F. (1996) Transcriptional regulation of the iron-responsive sigma factor gene *pbrA*. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 50-58.
- Shalel-Levanon, S., San, K.Y., and Bennett, G.N. (2005) Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. *Biotechnol. Bioeng.*
- Ullrich, S., Kube, M., Schübbe, S., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2005) A hypervariable 130 kb genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island, which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. *J. Bacteriol.* **185**.
- Vaillancourt, K., Moineau, S., Frenette, M., Lessard, C., and Vadeboncoeur, C. (2002) Galactose and lactose genes from the galactose-positive bacterium *Streptococcus salivarius* and the phylogenetically related galactose-negative bacterium *Streptococcus thermophilus*: organization, sequence, transcription, and activity of the *gal* gene products. *J. Bacteriol.* **184**: 785-793.
- Wan, X.F., Verberkmoes, N.C., McCue, L.A., Stanek, D., Connelly, H., Hauser, L.J., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Leaphart, A., Hettich, R.L., Zhou, J., and Thompson, D.K. (2004) Transcriptomic and proteomic characterization of the Fur modulon in the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* **186**: 8385-8400.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3406-3415.

Danksagung

Bei Herrn Professor Widdel möchte ich mich für die Möglichkeit in seiner Abteilung eine Doktorarbeit anzufertigen und für die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Viel Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dirk Schüler, der durch seine kompetente Betreuung und seine hilfreichen Gespräche und Anregungen viel zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein herzlicher Dank gilt allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, die irgendwie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und für ein angenehmes, oft amüsanter Arbeitsklima und eine gute Zusammenarbeit sorgten. Im Besonderen möchte ich mich bei Olav Grundmann bedanken, für die stete Hilfsbereitschaft beim Lösen vieler Probleme, vieler konstruktiver Diskussionen und die aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so lief; bei Cathrin Wawer für die Einarbeitung in das Thema der MTB und dafür daß sie mir in den ersten beiden Jahren dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand; und ganz besonders bei meinen ehemaligen und jetzigen Bürokollegen Judith Amann, Dörte Gade, Claus Lang, Florin Musat und Insa Werner für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht an die Korrekturleser Katja Junge und Willm-Thomas Heyken, sowie Chris Würdemann, für die Microarrays und viele Dinge darüber hinaus.

Ein großes Dankeschön geht an Ekaterina Schmidt und Cornelia Stumpf für eine stets zuverlässige und perfekte Vorbereitung aller Dinge. Mein Dank gilt außerdem Christina Probian für die Fragmentlängenanalysen sowie René Sonntag und Wiebke Krämer für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Danke Willm!

Meinen Eltern und insbesondere auch meiner Schwester und ihrer Familie danke ich für die immer gewährte Unterstützung während dieser Arbeit.