

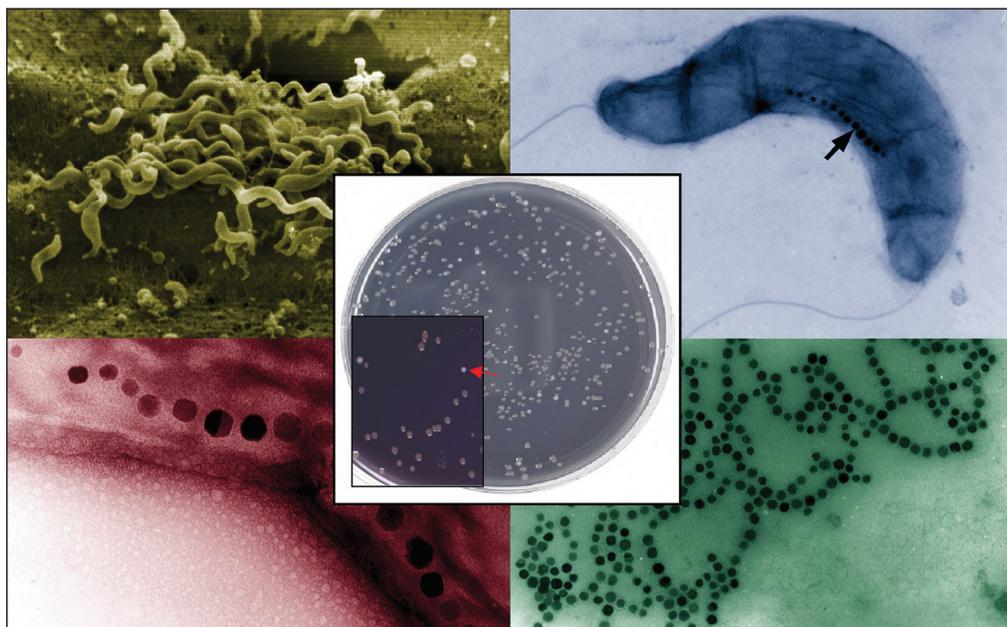
D 13808 F ISSN 0947-0867

www.biospektrum.de

3/2005
NR. 3 • 11. JAHRGANG

BIOspektrum

ZEITSCHRIFT DER GESELLSCHAFT FÜR BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE (GBM),
DER VEREINIGUNG FÜR ALLGEMEINE UND ANGEWANDTE MIKROBIOLOGIE (VAAM),
DER GESELLSCHAFT FÜR GENETIK (GfG), DER GESELLSCHAFT FÜR ENTWICKLUNGSBIOLOGIE
(GfE) UND DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE
PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE (DGPT)



IN KOOPERATION MIT DEM VERBUND
BIOWISSENSCHAFTLICHER UND BIOMEDIZINISCHER
GESELLSCHAFTEN (vbbm)



NANOKRISTALLE FÜR DIE MAGNETFELDDORIENTIERUNG:
BIOMINERALISATION VON MAGNETOSOMEN IN BAKTERIEN
• AKTINDYNAMIK UND WASP/ WAVE-PROTEINE • CRE/LOXP-
VERMITTELTE KONDITIONALE MUTAGENESE DES cGMP-SIGNALWEGS
IN DER MAUS • MARKTÜBERSICHT: PROTEINAUFREINIGUNGS- UND
-TRENNVORFAHREN • AKTUELLES AUS FORSCHUNG UND
TECHNOLOGIE

Nanokristalle für die Magnetfeldorientierung: Biomineralisation von Magnetosomen in Bakterien

Dirk Schüler

Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen

Ein faszinierendes Beispiel für einen biologisch regulierten Mineralisationsprozess ist die Bildung von magnetischen Nanopartikeln in magnetotaktischen Bakterien (MTB). Die „Magnetosomen“ verleihen den Zellen die Fähigkeit zur Orientierung in magnetischen Feldern (Magnetotaxis). Obwohl die Biom mineralisation der Magnetosomen schon lange von interdisziplinärem Interesse ist, gab es erst in den letzten Jahren wichtige Fortschritte bei ihrer genetischen und biochemischen Analyse.

► Magnetotaktische Bakterien kommen zahlreich im Sediment vieler Meeres- und Süßwasserhabitats vor, wo man sie hauptsächlich kurz unterhalb der oxisch-anoxischen Übergangszone findet^[1]. Anscheinend erleichtert die Magnetotaxis dort die vertikale Navigation entlang chemischer Gradienten mit Hilfe des erdmagnetischen Feldes^[2]. Grundlage hierfür sind die Magnetosomen, die aus membranumgebenen Kristallen eines magnetischen Eisenminerals bestehen. Die Magnetosomen haben definierte Größen sowie genetisch determinierte Kristallformen, deren Vielfalt und Regelmäßigkeit aus anorganischen Systemen unbekannt sind und eine exakte biologische Steuerung des Mineralisationsprozesses belegen^[2]. Der molekulare Mechanismus der Magnetosomenbildung war auf Grund der schwierigen experimentellen Zugänglichkeit von MTB und des Fehlens geeigneter Labormodelle lange Zeit unbekannt.

In unserem Labor untersuchen wir das α -Proteobakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Abb. 1). Das mikroaerophile Bakterium ist mit speziellen Techniken im beliebigen Maßstab kultivierbar^[3] und kann genetisch manipuliert werden^[4]. Die Genomsequenz von *M. gryphiswaldense* wurde in einer Zusammenarbeit mit Michael Kube und Richard Reinhardt (MPI für Molekulare Genetik in Berlin) beinahe vollständig aufgeklärt. Damit eröffnen sich viel versprechende Möglichkeiten für eine umfas-

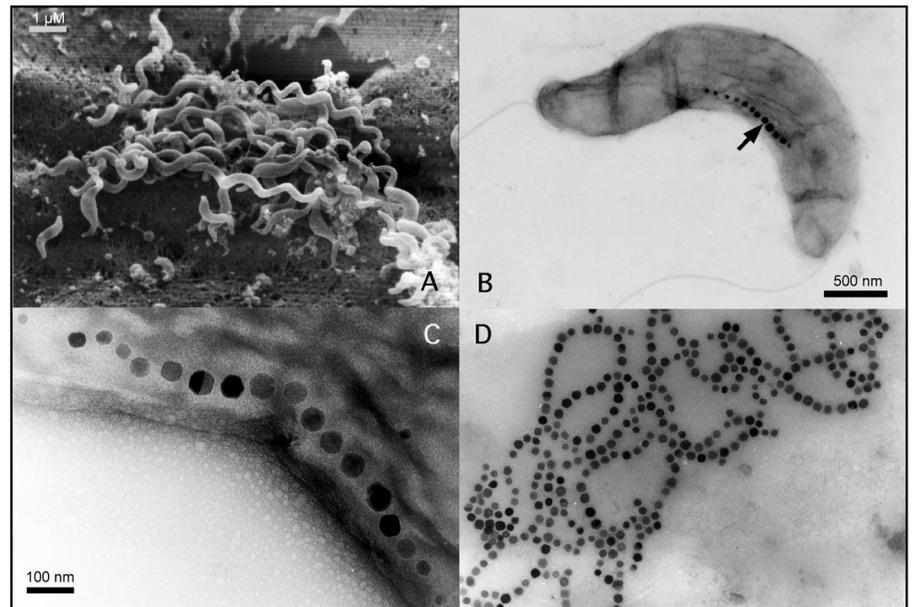


Abb. 1: Raster- (A) und Transmissions-elektronenmikroskopische (B, C) Aufnahmen von *M. gryphiswaldense*. Die Zellen haben eine helikale Morphologie und enthalten bis zu 80 Magnetosomen (Pfeil). Isolierte MM-umgebene Magnetosomenpartikel (D) zeigen eine starke Tendenz zur Bildung von Ketten.

sende Analyse der Biom mineralisation von Magnetosomen.

Die intrazelluläre Synthese von Magnetitkristallen

Die Magnetosomenkristalle, die in *M. gryphiswaldense* aus Magnetit (Fe_3O_4) bestehen, werden innerhalb von Vesikeln der Magnetosomenmembran (MM) synthetisiert. Die Biom mineralisation von bis zu 80 Magnetitkristallen pro Zelle ist mit einer enormen intrazellulären Akkumulation von Eisen verbunden, das mehr als vier Prozent des Trockengewichts ausmachen kann. Die Synthese von Magnetitkristallen erfolgt nach einem wenig verstandenen Mechanismus, der auf anorganischem Weg bisher nicht vollständig reproduziert werden kann^[5]. Für die Bildung des gemischt-valenten Eisenoxids Magnetit müssen sowohl Fe^{2+} als auch Fe^{3+} in den Magnetosomenvesikeln zur Verfü-

gung stehen. Mößbauer-spektroskopische Daten legen nahe, dass ein Teil des intravesikulär aufgenommenen Eisens ein reaktives Fe(III)-Oxid bildet, wahrscheinlich Ferrihydrit, das über die Lösung wiederum mit dem vorhandenen Fe^{2+} reagiert, wozu ein neutraler pH innerhalb des Magnetosomen-Kompartiments aufrechterhalten werden muss^[6].

Struktur und Zusammensetzung der Magnetosomenmembran (MM)

Die Magnetosomenmembran weist den charakteristischen Aufbau einer Einheitsmembran auf und enthält Phospholipide sowie Proteine^[7]. Mittels verschiedener proteomischer Techniken wurden etwa 20 spezifische Polypeptide in der MM von *M. gryphiswaldense* nachgewiesen^[8, 9]. Mutageneseexperimente zeigten, dass viele dieser Magnetosomenproteine essenziell für die Bildung

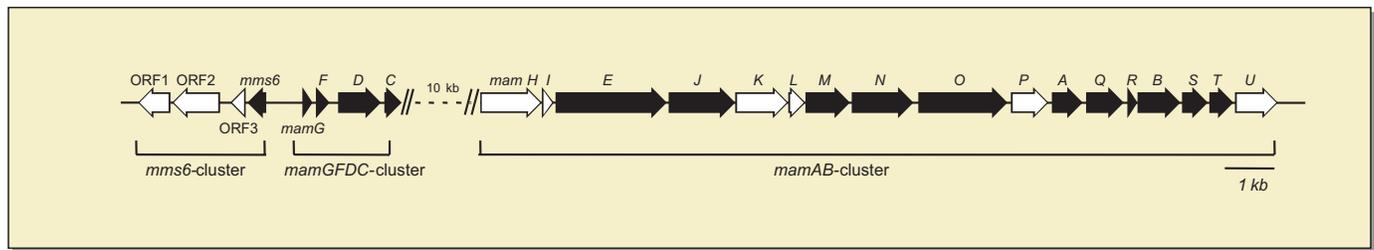


Abb. 2: Ausschnitt aus der genomischen „Magnetosomeninsel“ in *M. gryphiswaldense*. Die Gene für Magnetosomenproteine (schwarze Pfeile) sind in drei Operon-ähnlichen Genclustern lokalisiert.

von Magnetitkristallen sowie deren intrazelluläre Organisation sind, während andere anscheinend eine redundante Funktion haben.

Die Magnetosomenproteine lassen sich charakteristischen Proteinfamilien zuordnen. MamA enthält beispielsweise TPR (tetratricopeptide repeat)-Motive. Diese vermitteln oft Protein-Protein-Interaktionen, weshalb über eine Rolle von MamA bei der Assemblierung von Magnetosomenvesikeln spekuliert wurde^[7]. Allerdings bilden Deletionsmutanten von MamA weiterhin unverändert Magnetosomenpartikel, wenn auch anscheinend in etwas geringerer Zahl^[10]. MamE und MamO weisen Homologie zu HtrA-ähnlichen Serinproteasen auf und enthalten PDZ-Domänen, die eine Funktion bei der Assemblierung und korrekten Positionierung von MM-assoziierten Multiproteinkomplexen haben könnten^[7]. MamB und MamM gehören zur CDF3-Familie (Cation Diffusion facilitator) von Metalltransportern^[11] und haben wahrscheinlich eine Funktion beim Eisentransport in die MM-Vesikel.

Ein auffälliges Sequenzmuster findet sich in MamJ, das eine Rolle bei der Bildung beziehungsweise Stabilisierung der Magnetosomenketten spielt (Scheffel et al., in Vorbereitung). Das Protein ist reich an den sauren Aminosäuren Glu und Asp, die in repetitiven Domänen angeordnet sind^[9].

Weitere solcher sauren Proteine mit hochrepetitiven Sequenzmotiven lassen sich aus der Genomsequenz von *M. gryphiswaldense* und anderen MTB vorhersagen. Ähnliche polyelektrolytische Cluster von ladungstragenden Gruppen sind häufig Bestandteile anderer biomineralisierender Systeme, wo sie durch Bindung von Ionen der jeweils komplementären Ladung zur Steuerung der Kristallisation beitragen^[12]. Weitere auffällige Sequenzmuster finden sich in MamD, Mms6 und MamG, die insbesondere ein Sequenzmotiv gemein haben, das durch die alternierende Abfolge von Leu und Gly gekennzeichnet ist. Ähnliche LG-reiche Sequenzen finden sich in Spinnenseide (Fibroin), Gerüstproteinen sowie Elastin- und Knorpel-Proteinen, die eine Tendenz zur Selbstorganisation aufweisen oder in Biomineralisationsprozesse involviert sind^[7]. Das Mms6-Protein aus dem nahe verwandten *Magnetospirillum*-Stamm AMB-1 zeigt eine Eisenbindungsaktivität und scheint die Morphologie von Magnetitkristallen *in vitro* zu beeinflussen^[13].

Molekulare Organisation der genomischen „Magnetosomeninsel“

Die Gene aller bisher identifizierten Magnetosomenproteine wurden innerhalb einer

35 kb großen Region der 4,5 Mb-Genomsequenz von *M. gryphiswaldense* gefunden. Sie sind in drei Operon-ähnlichen Genclustern angeordnet^[9, 14] (Abb. 2): Das *mamAB*-Cluster umfasst 17 aufeinanderfolgende ORFs (*mamH-mamU*, *mam* für magnetosome membrane). Neben Genen für MM-Proteine enthält das *mamAB*-Cluster weitere ORFs mit bisher unbekannter Funktion. Ein Beispiel dafür ist *mamK*, das Sequenzähnlichkeit mit bakteriellen aktinähnlichen Genen aufweist. Das *mms6*-Cluster (*mms* für magnetic particle membrane specific protein) und das *mamGFDC*-Cluster kodieren weitere häufige Magnetosomenproteine. Die Organisation der Magnetosomen-Gene scheint in verschiedenen MTB konserviert zu sein (Abb. 3).

Bei der Aufklärung der Magnetitbiomineralisation hat sich die Analyse von Mutanten der Magnetosomenbildung als nützlich erwiesen. Neben Mutanten, die die Fähigkeit zur Bildung von Magnetitkristallen völlig verloren haben, weisen andere eine abweichende Zahl, Größe und Form oder Anordnung der Magnetosomen auf (Abb. 4). Obwohl ein System für die genetische Manipulation von *M. gryphiswaldense* erst seit kurzem zur Verfügung steht^[15, 16], lieferte die gezielte Deletionsmutagenese einzelner Magnetosomengene bereits interessante Aufschlüsse über deren mögliche Funktio-

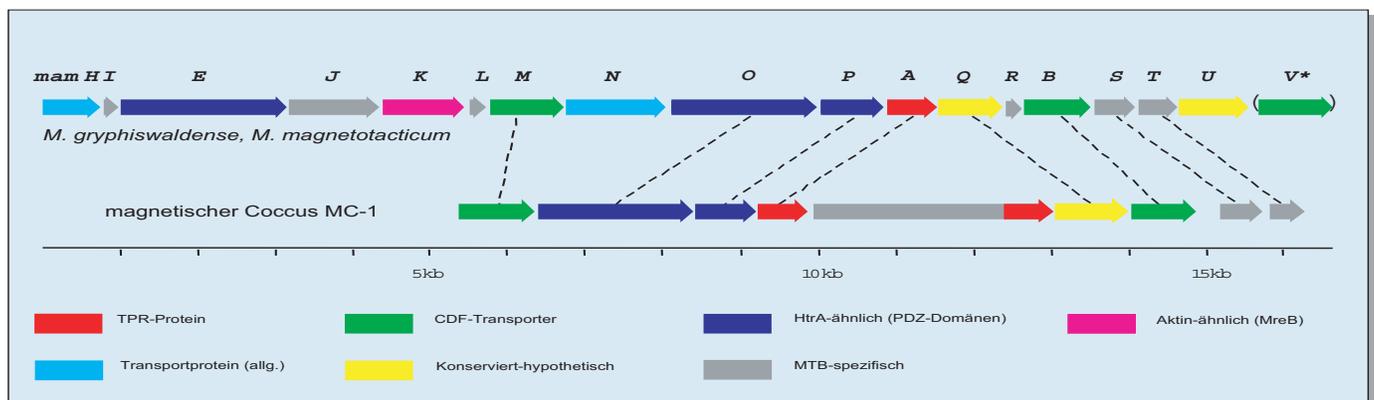


Abb. 3: Molekulare Organisation des *mamAB*-Clusters in verschiedenen MTB-Spezies. Die Farben markieren homologe Genfamilien, gestrichelte Linien verbinden äquivalente Gene. **mamV* ist nur in *M. magnetotacticum* vorhanden.

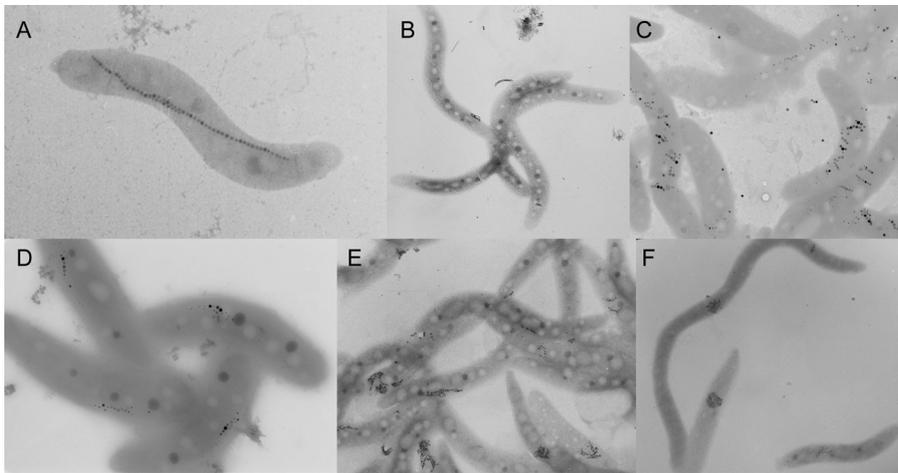


Abb. 4: TEM-Aufnahmen verschiedener Magnetosomenmutanten. (A) magnetischer Wildtyp, (B) magnetosomenfreie Mutante, (C-F) Mutanten, die eine veränderte Form, Größe und Anordnung der Magnetosomenpartikel aufweisen.

nen. Daneben lassen sich auch spontane Magnetosomenmutanten relativ leicht isolieren. So geben sich nichtmagnetische Mutanten als weiße Kolonien gegenüber dem magnetischen Wildtyp zu erkennen, dessen dunkelbraune Färbung auf die schwar-

ze Farbe der intrazellulär gebildeten Magnetitkristalle zurückgeht (Abb. 5). Während spontane Mutanten während des exponentiellen Wachstums sehr selten auftreten, kann ihre Häufigkeit unter stationären Bedingungen bis zu 10^{-2} pro Zelle betragen. So

findet man Kulturen, die längere Zeit bei 4°C gelagert wurden, oft nach nur wenigen Generationen vollständig von unmagnetischen Mutanten überwachsen. Sämtliche bisher analysierten spontanen Mutanten wiesen Insertionen oder Deletionen innerhalb oder in enger Nachbarschaft der *mam*- und *mms*-Gencluster auf. Diese werden von zahlreichen IS-Elementen flankiert, die mehr als 20 Prozent der kodierenden Sequenz dieser Region ausmachen. Alle nichtmagnetischen Spontanmutanten zeigten ein verändertes Hybridisierungsmuster hinsichtlich dieser IS-Elemente, die anscheinend das Ausschneiden größerer genomischer Abschnitte vermitteln (ULLRICH *et al.*, in Vorbereitung). Insgesamt erinnern viele Merkmale dieser genomischen Region an Pathogenitäts- oder Symbiose-Inseln, die in vielen Bakterien akzessorische Genfunktionen kodieren und oft zur spontanen Deletion neigen^[17]. Es erscheint daher plausibel, dass die meisten für die Magnetitbiomineralisation erforderlichen Genfunktionen innerhalb einer genomischen „Magnetosomeninsel“ lokalisiert sind, die möglicherweise durch horizontalen Gentransfer übertragen werden kann^[14]. ▶▶

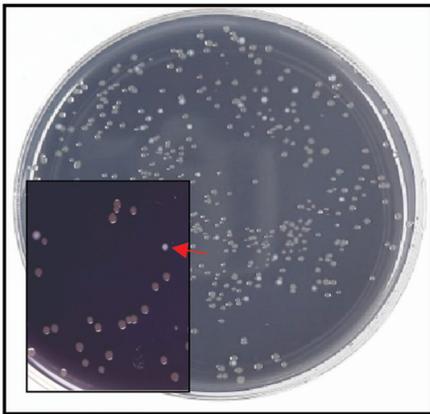


Abb. 5: Kolonien von *M. gryphiswaldense* auf der Oberfläche einer Agarplatte. Nichtmagnetische Mutanten sind als weiße Kolonien (Pfeil) zu erkennen. Die schwarze Farbe des Agarmediums geht auf den Zusatz von Aktivkohle zurück, die für das Wachstum der mikroaerophilen Bakterien erforderlich ist.

► Ausblick

Trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahren bei der Aufklärung der Magnetitbiomineralisation zu verzeichnen waren, sind eine Reihe grundlegender Fragen noch immer offen. So wird der Mechanismus der biogenen Magnetitbildung auf molekularer Ebene noch nicht völlig verstanden, und es ist unklar, wie die Komponenten der Magnetosomenmembran die Bildung spezieller Kristallformen regulieren. Ein viel versprechender experimenteller Ansatz hierfür scheint die *in vitro*-Untersuchung isolierter biomolekularer Komponenten in „biomimetischen“ Kristallisationsassays.

Unbefriedigend ist, dass nur ein kleiner Teil der beeindruckenden natürlichen Diversität von MTB kultivierbar und damit einer genetischen Analyse zugänglich ist^[18]. Im Gegensatz zu anderen Bakterien können MTB jedoch unter Umgehung ihrer Kulti-

vierung selektiv aus Umweltproben bis zur Homogenität angereichert werden^[19]. Wir konnten bereits zeigen, dass sich nahezu vollständige Magnetosomeninseln *en bloc* aus Populationen unkultivierbarer MTB klonieren lassen (C. FLIES, A. MEYERDIERKS, M. KUBE, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Analyse und Expression des „magnetotaktischen Metagenoms“ kann somit künftig den direkten Zugriff auf die genetische Diversität bakterieller Biomineralisationsprozesse erlauben. Aufgrund ihrer nahezu perfekten magnetischen und kristallinen Eigenschaften gab es immer wieder Vorschläge für die biotechnologische Anwendung von bakteriellen Magnetosomenpartikeln^[20], deren Umsetzung durch die jüngsten Fortschritte bei ihrer Herstellung und Analyse nunmehr realistisch erscheint. Mögliche Anwendungen solcher magnetischen Nanopartikel liegen etwa in ihrer Nutzung als MRI-Kontrastreagenz oder für die magnetische Hyperthermie-Behandlung von Tumoren. Eine attraktive Möglichkeit besteht darin, die Magnetosomenmembran *in vivo* oder *in vitro* mit biomolekularen Kopplungsgruppen zu verknüpfen. Solche funktionalisierten magnetischen Nanopartikel wären hochinteressant für die Mikroarray-Technologie sowie in Magnetseparations-Anwendungen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Magnetbakterien am MPI für Marine Mikrobiologie in Bremen sowie unseren verschiedenen Kooperationspartnern. Ich danke der DFG, der MPG sowie dem BMBF für die finanzielle Förderung unserer Arbeiten.

Literatur

- [1] Flies, C., Jonkers, H., deBeer, D., Bosselmann, K., Böttcher, M., and Schüler, D. (2005): Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 185–195.
- [2] Bazylinski, D.A., and Frankel, R.B. (2004): Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 217–230.
- [3] 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.
- [4] Schultheiss, D., and Schüler, D. (2003): Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* 179: 89–94.
- [5] Faivre, D., Arginier, P., Menguy, N., Zuddas, P., Pachana, K., Gloter, A., Laval, J.Y., and Guyot, F. (2004): Mineralogical and isotopic properties of inorganic nanocrystalline magnetites. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68: 4395–4403.
- [6] Cornell, R.M., and Schwertmann, U. (2003): The iron oxides (Structure, properties, reactions, occurrences and uses), 664 pp. Wiley-VCH, Weinheim.

- [7] Schüler, D. (2004): Molecular analysis of a subcellular compartment: The magnetosome membrane in *M. gryphiswaldense*. *Arch. Microbiol.* 181: 1–7.
- [8] 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.
- [9] 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 *M. gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1040–1050.
- [10] Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T.J., and Newman, D.K. (2004): Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3839–3844.
- [11] Nies, D.H. (2003): Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313–339.
- [12] Bäuerlein, E. (2003): Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 614–641.
- [13] 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.
- [14] Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdielks, A., Madkour, M., Mayer, F., Reinhardt, R., and Schüler, D. (2003): Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *M. gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* 185: 5779–5790.
- [15] Schultheiss, D., Handrick, R., Jendrossek, D., Hanzlik, M., and Schüler, D. (2005): The presumptive magnetosome protein Mms16 is a PHB-granule bound protein (phasin) in *M. gryphiswaldense*. *J. Bacteriol.* 187: 2416–2425.
- [16] Schultheiss, D., Kube, M., and Schüler, D. (2004): Inactivation of the flagellin gene *flaA* in *M. gryphiswaldense* results in non-magnetotactic mutants lacking flagellar filaments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3624–3631.
- [17] Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004): Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 414–424.
- [18] Amann, R., Rossello-Mora, R., Flies, C., and Schüler, D. (2004): Phylogeny and in situ identification of magnetotactic bacteria. In: Biomineralization (Bäuerlein, E., Ed.), Vol. pp. 61–74. Wiley-VCH, Weinheim.
- [19] Flies, C., Peplis, J., and Schüler, D. (2005): A polyphasic approach for the characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* In press.
- [20] Schüler, D., and Frankel, R.B. (1999): Bacterial magnetosomes: Microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 464–473.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Dirk Schüler
Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie
Celsiusstraße 1
D-28359 Bremen
Tel.: 0421-20 28-746
Fax: 0421-20 28-580
dschuele@mpi-bremen.de



Dirk Schüler

geb. 1964; Biologiestudium (1985–1990) an der Universität Greifswald; 1995: Promotion am MPI für Biochemie (Martinsried) bei Prof. Edmund Bäuerlein;

1996–1999: Postdoc im Labor von Dennis Bazylinski (Iowa State University, Ames, USA) sowie Brad Tebo (Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA); seit 2000: Leiter einer im Rahmen des BMBF-Wettbewerbs „BioFuture“ etablierten Nachwuchsgruppe am MPI für marine Mikrobiologie in Bremen; 2004: Habilitation im Fach Mikrobiologie