

# Intrazelluläre Magnetitbiomineralisation in Bakterien: ein eigener Stoffwechselweg unter Beteiligung von membrangebundenem Ferritin und einer $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies\*\*

Damien Faivre, Lars H. Böttger, Berthold F. Matzanke und Dirk Schüler\*

Magnetotaktische Bakterien (MTBs) sind in der Lage, mit Hilfe so genannter Magnetosomen entlang der geomagnetischen Feldlinien zu navigieren. Magnetosomen sind intrazelluläre Organellen, die aus magnetischen membranumhüllten Kristallen bestehen.<sup>[1]</sup> Wegen dieser einzigartigen kristallinen und magnetischen Eigenschaften der Magnetosomen stehen MTBs im Zentrum interdisziplinärer Arbeiten; sie werden z. B. in biotechnologischen Anwendungen eingesetzt<sup>[2]</sup> oder dienen als Biomarker für mögliches Leben auf dem Mars.<sup>[3]</sup> Unter mikrooxischen Bedingungen (d. h. bei einem geringen Sauerstoffgehalt der Umgebung) erfolgt im magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* eine Biomineralisation von bis zu 100 kubisch-flächenzentrierten Magnetikristallen ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , inverse Spinellstruktur, Raumgruppe  $Fd\bar{3}m$ ) pro Zelle. Dieser Vorgang erfordert die intrazelluläre Akkumulation enormer Eisenmengen (bis zu 4 % des Trockengewichts<sup>[4]</sup>) und lässt darauf schließen, dass MTBs sehr effiziente Systeme für die Aufnahme, den Transport und die Präzipitation von Eisen enthalten müssen. Die Kenntnisse über diese Prozesse sind allerdings bisher noch gering. Basierend auf Mößbauer-spektroskopischen und biochemischen Analysen wurde vorgeschlagen, dass bei der bakteriellen Magnetitbildung  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen von der Umgebung des Bakteriums aufgenommen und

anschließend intrazellulär reduziert werden. Die Präzipitation des Minerals würde gemäß diesem Modell im Magnetosomenvesikel durch partielle Reduktion von kristallwasserhaltigem Eisenoxid erfolgen.<sup>[5-7]</sup>

Die einzelnen Schritte dieses Mechanismus blieben bislang unklar, weil sich die Wachstumsgeschwindigkeiten und die extrazelluläre Sauerstoffkonzentration während des Bakterienwachstums bei früheren Herangehensweisen nur unzureichend kontrollieren ließen. Insbesondere standen bislang keine zeitaufgelösten Daten für die frühe Magnetitpräzipitation zur Verfügung. Die vorliegende Studie befasste sich deshalb mit den folgenden Fragestellungen:

- 1) Welche Eisenspezies werden aus dem Medium in die Zelle und in die Magnetosomenvesikel transportiert?
- 2) Finden sich außer Magnetit noch weitere anorganische Phasen in Magnetosomen, z. B. Vorstufen wie Ferrihydrit ( $\text{Fe}_5\text{HO}_8\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) oder Oxidationsprodukte des Magnetits wie Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )?
- 3) Sind die Stoffwechselwege intrazellulären Eisens, die für die Magnetitsynthese genutzt werden, dieselben wie jene des allgemeinen Eisenmetabolismus in nichtmagnetischen Zellen?

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Zellsuspensions-Assay eingesetzt, der eine wachstumsunabhängige Analyse der Magnetitbildung unter streng kontrollierten Bedingungen ermöglichte. Für die zeitaufgelöste Untersuchung des intrazellulären Eisenmetabolismus und der durch Eisen induzierten Magnetosomenbildung kamen Mößbauer-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie zum Einsatz.

In nichtmagnetischen Eisenmangelzellen des Wildtyps (WT) konnte die Magnetitbildung durch die Zugabe sowohl von  $\text{Fe}^{3+}$ -Citrat als auch von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ascorbat induziert werden (Abbildung 1). Die Bakterien können also sowohl durch Reduktion als auch durch Oxidation extrazelluläre Eisenionen für die Biosynthese der gemischtvalenten  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Kristalle bereitstellen. 55 Minuten nach Eisenzugabe zur Zellsuspension wurden die ersten Magnetitkristallite durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen; das gleichzeitige Auftreten von ersten magnetisch orientierten Zellen wurde mithilfe von  $C_{\text{mag}}$ -Messungen belegt (Abbildung 1). Im weiteren Verlauf wuchsen die Partikelgrößen von 18.1 auf 31.5 nm, und die Zahl der Kristalle pro Zelle erhöhte sich von 16 auf 30. Nach etwa sechs Stunden war die Kettenbildung der Magnetosomen beendet. Bei Elektronenbeugungs(ED)-Experimenten ließ sich auf allen Stufen der Magnetitbiosynthese in den Magnetosomen ausschließlich Ma-

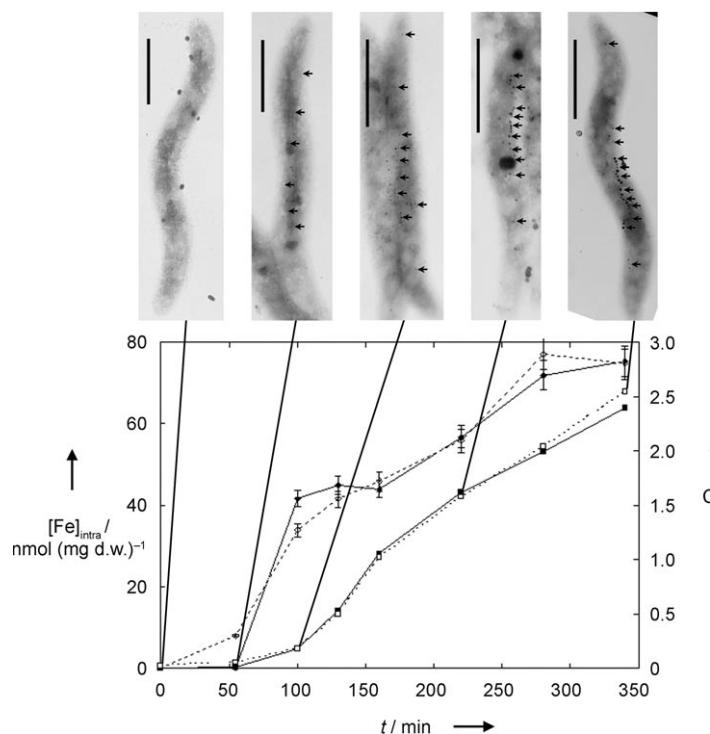
[\*] Prof. D. Schüler  
Mikrobiologie, Department für Biologie, LMU München  
Maria-Ward-Straße 1a, 80638 München (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-2180-6127  
und  
Abteilung Mikrobiologie  
Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie  
Celsiusstraße 1, 28359 Bremen (Deutschland)  
E-Mail: dirk.schueler@lrz.uni-muenchen.de

Dr. D. Faivre  
Abteilung Biomaterialien  
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung  
Wissenschaftspark Golm, 14424 Potsdam (Deutschland)

L. H. Böttger  
Institut für Physik, Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)

Prof. B. F. Matzanke  
Isotopenlabor, Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft und dem Biofuture Programm des BMBF gefördert. R. Sonntag danken wir für seine Hilfe bei den Fermentationen und J. Schorch für die technische Unterstützung bei der Zellfraktionierung. D.F. dankt für die Unterstützung durch ein Marie-Curie-Stipendium der EU (Project BacMag, EIF-2005-009637).



**Abbildung 1.** Magnetosomenbildung nach Induktion: Die Magnetitbildung wurde in ruhenden Eisenmangelzellen durch Zugabe von  $\text{Fe}^{II}$  oder  $\text{Fe}^{III}$  in das Medium induziert (schwarze Symbole und durchgezogene Linien für  $\text{Fe}^{III}$ , offene Symbole und gestrichelte Linien für  $\text{Fe}^{II}$ ). Die Magnetitbildung wurde durch Messung der intrazellulären Eisenakkumulation ( $[\text{Fe}]_{\text{intra}}$  (d.w.: Trockengewicht), Rauten), magnetische Reaktion ( $C_{\text{mag}}$ , Quadrate) und TEM verfolgt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen oben im Bild zeigen das Anwachsen der Partikelzahl und der Partikelvolumina (Pfeile, die auf jedes dritte Magnetosom zeigen) in repräsentativen Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach der Induktion (Skalierungsbalken = 1  $\mu\text{m}$ ). Die Bildung von Ketten ist nach 340 Minuten abgeschlossen.

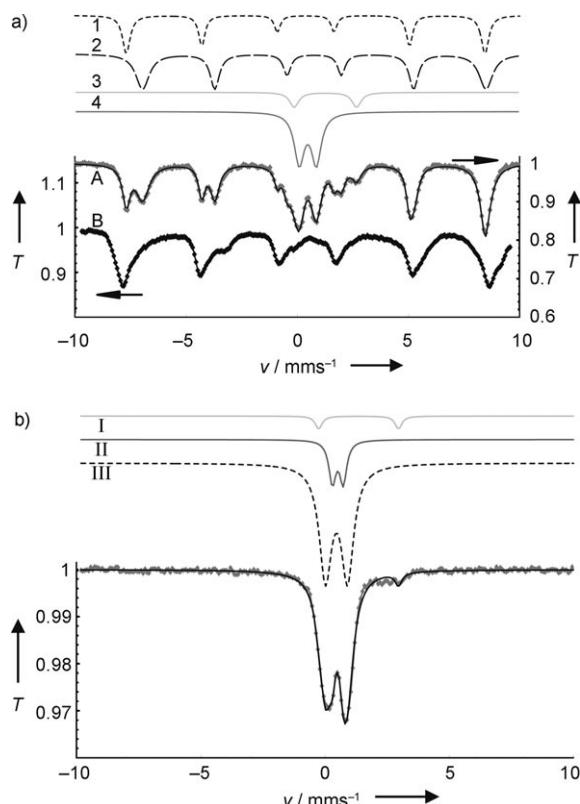
gnetit nachweisen; andere Mineralphasen oder -strukturen wurden nicht gefunden (Daten nicht gezeigt). Allerdings könnte die geringe Kristallinität von Ferrihydrit dessen Nachweis durch ED verhindern.<sup>[8]</sup>

In Abbildung 2a sind typische Mößbauer-Spektren ganzer Zellen 20 Stunden nach Beginn der Induktion, gemessen bei Temperaturen von 130 K (Spektrum A) und von 4.3 K (Spektrum B) dargestellt. Die entsprechenden Mößbauer-Parameter sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mößbauer-Spektren können durch drei Parameter charakterisiert werden: Isomerieverschiebung  $\delta$ , Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  und magnetisches Hyperfeinfeld  $B_{\text{HF}}$ . Wenn keine Quadrupol- oder magnetische Wechselwirkung vorliegt, wird eine einzelne Resonanzabsorption beobachtet, die durch die Isomerieverschiebung  $\delta$  beschrieben wird. Sie röhrt von der elektrischen Monopolwechselwirkung zwischen Kern und Elektronenhülle her. Die Isomerieverschiebung ist ein Maß für die Oxidationsstufe und für den Kovalenzgrad der Bindung Eisen-Ligand. Die Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  stammt von der elektrischen Quadrupolwechselwirkung zwischen Kern und Elektronenhülle – sie bewirkt die Aufspaltung der

Resonanzabsorptionslinie und ist ein Maß für die Symmetrie des Metallkomplexes sowie für den Kovalenzanteil der Ligand-Metall-Bindung. Das magnetische Hyperfeinfeld  $B_{\text{HF}}$  schließlich resultiert aus der magnetischen Dipolwechselwirkung zwischen Kern und Elektronen und erzeugt ein Sechslinien-Spektrum oder auch komplexere spektrale Muster.

In unseren Experimenten zeigt das Spektrum bei 130 K zwei magnetisch aufgespaltene Sextetts, die den A- und B-Lagen von Eisen in Magnetit entsprechen (Subspektren 1 und 2 in Abbildung 2a),<sup>[5,9,10]</sup> High-Spin- $[\text{Fe}^{2+}(\text{O/N})^{x-}]^{2-x}$  (Subspektrum 3 in Abbildung 2a, Sauerstoff oder Sauerstoff/Stickstoff-Liganden) und ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Quadrupoldublett (Subspektrum 4 in Abbildung 2a). Das  $\text{Fe}^{3+}$ -Dublett hat spektroskopische Eigenschaften, die für Ferrihydrit ( $(\text{FeOOH})_8 \cdot (\text{FeOH}_2\text{PO}_4)$ ) typisch sind, nicht aber für  $\text{FeOOH}$ .<sup>[9,11]</sup>

Die biogene Herkunft dieses Materials, also das Vorhandensein von Ferritin und nicht von anorgani-



**Abbildung 2.** a) Mößbauer-Spektrum ganzer Zellen 1230 min nach Induktion der Magnetitbildung bei 130 K (A) und 4.3 K (B). Das Spektrum bei 130 K besteht aus zwei Magnetitsextetts (1 und 2), einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente (3) und einem Ferritindublett (4). Die Einzelkomponenten sind der Übersicht halber gespreizt aufgetragen. Bei 4.3 K verschwindet das Ferritindublett, weil sich ein magnetisch aufgespaltenes Sextett bildet. Diese Struktur wird durch die Magnetitkomponenten überdeckt, die zudem unterhalb des Verwey-Übergangs verbreitert sind. Die Transmission  $T$  ist auf 1 skaliert. b) Mößbauer-Spektrum des Mutantenstammes MSR-1B bei 80 K. Unregelmäßige graue Linie: experimentelle Daten; III) Ferritin, I)  $\text{Fe}^{II}$ , II) nicht näher spezifizierte Eisenkomponente.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Mößbauer-Parameter, mit denen die Spektren angepasst wurden. Die Zahlen in Klammern geben an, um welche Subspektren es sich handelt.

Probe	T [K]	$\delta$ [mms <sup>-1</sup> ]	$\Delta E_Q$ [mms <sup>-1</sup> ]	$B_{HF}$ [T]	relativer Anteil [%]
<b>Ganze Zellen</b>					
Magnetit A (1)	130	0.38	0	49.5	23.9
Magnetit B (2)	130	0.76	0	47.4	47.8
Fe <sup>II</sup> (3)	130	1.27	2.81	–	6.4
Ferritin (4)	130	0.47	0.77	–	21.9
<b>IM</b>					
Magnetit A (5)	130	0.38	0	49.9	33.3
Magnetit B (6)	130	0.76	0	47.9	66.7
<b>SF</b>					
Ferritin <sup>[a]</sup> (7)	4.3	0.49	0.77	–	13.2
Ferritin <sup>[b]</sup> (8)	4.3	0.49	0	47.4	86.8
Ferritin (9)	77	0.47	0.77	–	100
<b>MF</b>					
kleines Magnetit A (10)	130	0.38	0	46.8	4.3
Kleines Magnetit B (11)	130	0.76	0	44.8	8.6
Fe <sup>II</sup> (12)	130	1.26	2.86	–	9.0
Ferritin (13)	130	0.47	0.77	–	78.1

[a] Relaxierender Teil. [b] Nicht relaxierender Teil, Hyperfeinverteilung.

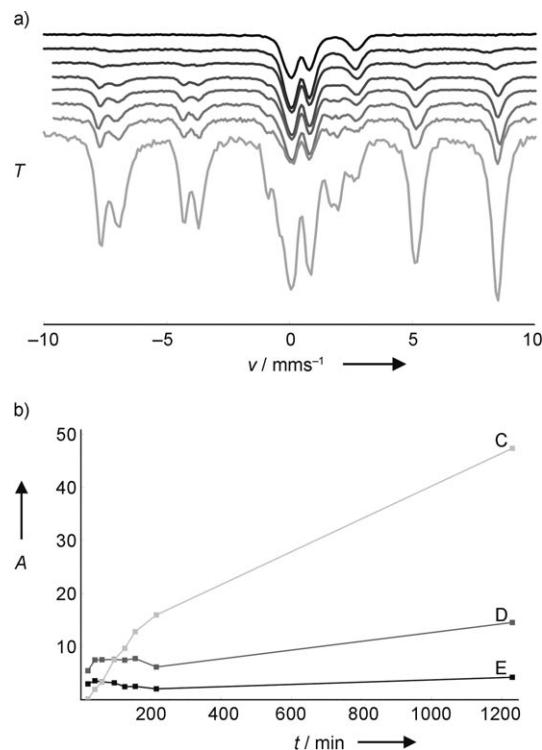
schem Ferrihydrit, konnte durch biochemische Untersuchungen bestätigt werden: In Membranen und in der löslichen Fraktion von aufgebrochenen Zellen der Langzeitprobe ließ sich durch Ultrafiltration und native Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE) ein rötliches, hochmolekulares Protein ( $M > 100$  kDa) isolieren, das große Mengen an Eisen enthielt. In Natriumdodecylsulfat(SDS)-PAGE zerfällt dieses Protein in 20–40 kDa große Untereinheiten (Daten nicht gezeigt). Das Spektrum bei 4.3 K ist durch ein typisches Sechslinienmuster von Magnetit geprägt. Das Ferrihydritdublett, das bei 130 K beobachtet wird, ist aufgrund magnetischer Ordnung verschwunden. Das Sechslinienmuster von Ferrihydrit ist im 4.3-K-Spektrum nicht sichtbar, da es wegen der ferritintypischen Partikelgrößenverteilung nur sehr breite Linien aufweist und zudem durch die dominante Magnetitkomponente maskiert wird. Der Übergang von Ferrihydrit zum magnetisch geordneten System oberhalb von 4.3 K bedeutet, dass die magnetische Isotropiekonstante  $K$  oder das Volumen  $V$  der Kristallite deutlich größer ist als in typischen bakteriellen Ferritin. [11] Dies wiederum ist ein Merkmal, das besser zu Säugerferritin passt, die sich durch einen niedrigen Phosphatgehalt auszeichnen.

Bei den zeitabhängigen Induktionsexperimenten ganzer WT-Zellen weisen alle Mößbauer-Spektren die gleichen Komponenten wie in Abbildung 2a auf. Die ersten Spuren von Magnetit, Ferritin und zweiwertigem Eisen lassen sich in den Mößbauer-Spektren schon 20 Minuten nach der Induktion mit  $^{57}\text{Fe}^{3+}$ -Citrat feststellen (Abbildung 3a,b). Der Absolutbetrag aller Komponenten steigt innerhalb von 40 Minuten weiter an. Danach ändert sich der Beitrag von  $\text{Fe}^{2+}$  und Ferritin nur wenig, während sich das Magnetitwachstum beschleunigt. Das Wachstum der Magnetitbildung verlangsamt sich etwa 215 Minuten nach der Induktion (Abbildung 3b).

Wie erwartet, konnte im Mutantenstamm MSR-1B, dessen Magnetosomengene durch Deletion entfernt worden

waren, weder durch TEM noch durch Mößbauer-Spektroskopie Magnetit nachgewiesen werden (Abbildung 2b). Das Spektrum belegt allerdings das Auftreten einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies (Subspektrum I in Abbildung 2b), wenn auch in geringeren Mengen als im WT, sowie eine nicht näher spezifizierte Verbindung (Subspektrum II in Abbildung 2b), die möglicherweise einem Eisen-Schwefel-Protein zuzuordnen ist, und schließlich auch Ferritin (Subspektrum III in Abbildung 2b). Diese Beobachtung lässt auf zwei unterschiedliche metabolische Routen für intrazelluläres Eisen schließen: eine für den generellen Eisenstoffwechsel, repräsentiert durch Ferritin und kleine Mengen an  $\text{Fe}^{2+}$ , und eine weitere Route, repräsentiert durch  $\text{Fe}^{2+}$  und Magnetit. Verschiebungsexperimente an Zellen

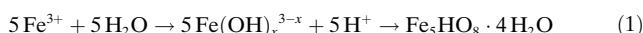
(Daten nicht gezeigt) vom eisenversorgten, aber nicht magnetischen Zustand hin zum Eisenmangelzustand zeigen, dass



**Abbildung 3:** a) Stapeldarstellung der Mößbauer-Spektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion: Von oben (Schwarz) bis unten (hellgrau): 20, 40, 60, 95, 125, 155, 215 und 1230 min nach  $^{57}\text{Fe}$ -Induktion. b) Die Gesamtflächen  $A$  der Mößbauer-Komponenten (bezogen auf Probenmasse) sind gegen die Zeit nach  $^{57}\text{Fe}$ -Induktion aufgetragen: High-Spin- $\text{Fe}^{II}$  (schwarz, E), Ferritin (dunkelgrau, D), und Magnetit (A- und B-Positionen; hellgrau, C). Die Verbindungslinien zwischen den Messpunkten dienen lediglich der Orientierung.

diese verschiedenen Eisenpools das Metall nicht leicht untereinander austauschen können.

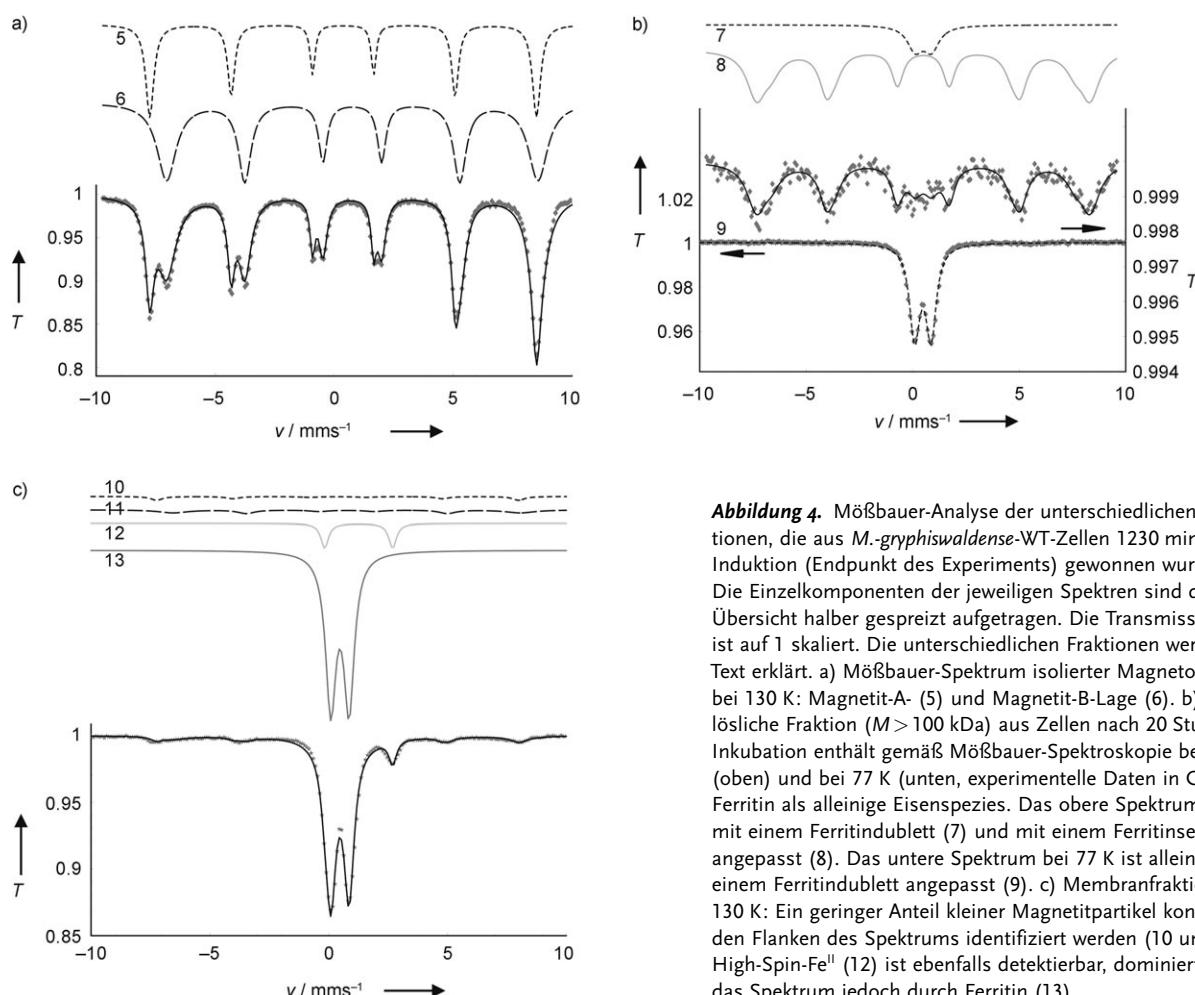
Zur Bestimmung der subzellulären Zuordnung der beobachteten Eisenspezies wurden die nichtmagnetische lösliche Fraktion (SF) und die Membranfraktion (MF) sowie die magnetischen Magnetosomen (IMs) aus reifen Zellen mit voll entwickelten Magnetosomenketten isoliert. IMs zeigten ausschließlich zwei Sextetts (Subspektren 5 und 6 in Abbildung 4a), die typisch für Magnetit sind. Dies war unerwartet, weil in Magnetosomenpräparationen des nahe verwandten *M. magnetotacticum* ein weiteres magnetisches Sextett durch Mößbauer-Spektroskopie identifiziert und Ferrihydrit zugeordnet wurde.<sup>[6]</sup> Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurde ein Mechanismus der Magnetitbildung vorgeschlagen, der – nach Aufnahme von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in die Zelle und deren teilweiser Oxidation – von Ferrihydrit als Vorstufe ausgeht [Gl. (1),(2)].



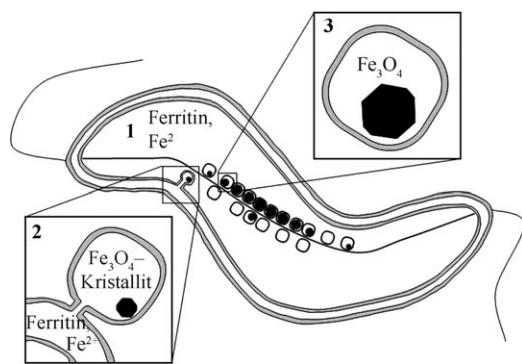
Die von uns erhaltenen Spektren der MF und SF (Abbildung 4b,c) waren konsistent mit Ferrihydrit in Ferritin (Subspektren 7–9,13 in Abbildung 4b,c), einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Verbin-

dung (Subspektrum 12 in Abbildung 4c) und einer weiteren Spezies in relativ niedriger Konzentration (Subspektren 10 und 11 in Abbildung 4c).  $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies, ähnlich der in *M. gryphiswaldense*, wurden schon in vielen Bakterien beobachtet und einem niedermolekularen cytoplasmatischen  $\text{Fe}^{2+}$ -Pool zugeordnet.<sup>[12]</sup> Überraschenderweise sind die in dieser Studie gefundenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen hauptsächlich membranständig, während nur wenig  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in der SF beobachtet wurden. Die ferritinartige Natur der Ferrihydritkomponente wurde zusätzlich mittels SDS-PAGE und nativer PAGE (Fridovich-Färbung) sowohl in der SF als auch in der MF aufgebrochener Zellen nachgewiesen.<sup>[20]</sup> Das Ferritin weist einen superparamagnetischen Übergang zwischen 77 und 4.3 K auf (Subspektren 7 und 8 bei 4.3 K und Subspektrum 9 bei 77 K in Abbildung 4b). Die Aufspaltung und Linienform des Signals der ungewöhnlichen Verbindung ist in Einklang mit dem Vorliegen sehr kleiner Magnetitpartikel (< 5 nm),<sup>[10]</sup> weil es oberhalb 120 K noch magnetisch aufgespalten ist, aber ein Hyperfeinfeld von lediglich 44–45 T aufweist. Das Signal dieser Verbindung ist in ganzen Zellen wegen der starken Absorption des Magnetosomenmagnetits nicht erkennbar.

Unsere Daten lassen folgenden Weg der Magnetitbiomineralisation erkennen (Abbildung 5): Eisen wird aus der Umwelt in Form von sowohl  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als auch  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen

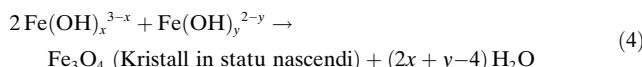
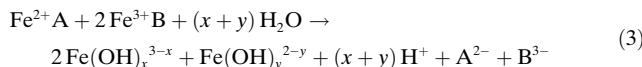


**Abbildung 4.** Mößbauer-Analyse der unterschiedlichen Fraktionen, die aus *M.-gryphiswaldense*-WT-Zellen 1230 min nach Induktion (Endpunkt des Experiments) gewonnen wurden. Die Einzelkomponenten der jeweiligen Spektren sind der Übersicht halber gespreizt aufgetragen. Die Transmission  $T$  ist auf 1 skaliert. Die unterschiedlichen Fraktionen werden im Text erklärt. a) Mößbauer-Spektrum isolierter Magnetosomen bei 130 K: Magnetit-A- (5) und Magnetit-B-Lage (6). b) Die lösliche Fraktion ( $M > 100$  kDa) aus Zellen nach 20 Stunden Inkubation enthält gemäß Mößbauer-Spektroskopie bei 4.3 K (oben) und bei 77 K (unten, experimentelle Daten in Grau) Ferritin als alleinige Eisenspezies. Das obere Spektrum wurde mit einem Ferritindublett (7) und mit einem Ferritinsextett angepasst (8). Das untere Spektrum bei 77 K ist allein mit einem Ferritindublett angepasst (9). c) Membranfraktion bei 130 K: Ein geringer Anteil kleiner Magnetitpartikel konnte in den Flanken des Spektrums identifiziert werden (10 und 11). High-Spin-Fe" (12) ist ebenfalls detektierbar, dominiert wird das Spektrum jedoch durch Ferritin (13).



**Abbildung 5.** Modell der Eisenaufnahme und des Mechanismus der Magnetitbildung: In den Zellmembranen wird ein biochemischer Eisenpool gebildet, der im Wesentlichen aus Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen besteht (1). Magnetit-Biomineralsation erfolgt zunächst durch Transport von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und Ferritin in die invaginierten Magnetsomvesikel, wo  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen copräzipitieren (2). Das abschließende Magnetitwachstum findet dann in den reifen Magnetosomen statt (3).

aufgenommen. Dieses Eisen wird in eine membranständige  $\text{Fe}^{2+}$ -High-Spin-Spezies und in ein ebenfalls membranassoziiertes Ferritin umgewandelt. Da wir die bislang angenommene Mineralvorstufe nicht nachweisen konnten, muss die der Umwandlung folgende Magnetitbildung durch schnelle Copräzipitation aus  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen innerhalb des noch membranständigen Magnetosomkompartmenten erfolgen. Es ist zu vermuten, dass dieses Kompartment alkalisch ist, um die thermodynamische Stabilität von Magnetit zu gewährleisten [Gl. (3),(4)].<sup>[13]</sup>



In der Cytoplasmamembran (CM) sind  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen an organische Substrate gebunden (A: Struktur unbekannt, B: Ferritin). Da Fenton-Chemie und thermodynamische Eigenschaften das Auftreten von Aqua- oder Hydroxidokomplexen innerhalb der Membran verbieten, werden A und B an der Kompartmentgrenzfläche dekomplexiert und in das Kompartment ausgeschieden. Eine aktuelle Studie an *M. magneticum* belegte, dass die Magnetosomenmembran (MM) aus einer Invagination (Einstülpung) der Cytoplasmamembran stammt und zumindest transient mit der Cytoplasmamembran verbunden ist.<sup>[14]</sup> Dies stimmt mit unserer Mößbauer-spektroskopischen Beobachtung überein, dass kleine magnetische Partikel mit der Membran assoziiert sind. Andererseits lassen biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen am eng verwandten *M. gryphiswaldense* den Schluss zu, dass MM-Vesikel während der späteren Entwicklung sich von der CM ablösen und nach Differenzierung ein eigenes Kompartment bilden.<sup>[15,16]</sup> Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen muss ein Prozess angenommen werden, bei dem die Keimbildung der Magnetitkristallite hauptsächlich an der CM erfolgt, während das nachfolgende

Wachstum nach Ablösung der reifen, eisenbeladenen Vesikel von der Membran stattfindet.

Zusammenfassend schlagen wir einen Mechanismus für die Magnetitbildung vor, bei dem das für die Magnetitbiomineralisation benötigte Eisen durch die Zellmembranen direkt zur invaginierten MM gebracht wird, ohne dass ein Transport von Eisenionen durch das Cytoplasma erforderlich ist. Die metabolischen Wege für die Magnetitbildung sowie für die allgemeine Metabolisierung des Eisens scheinen sich voneinander zu unterscheiden. Die Magnetitbildung erfolgt über membranassoziierte Kristallite, während der abschließende Schritt des Magnetitkristallwachstums wahrscheinlich räumlich getrennt von der CM erfolgt.

## Experimentelles

In allen Experimenten wurde *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stamm MSR-1 (DSMZ 6361) oder der nichtmagnetische Mutantenstamm MSR-1B<sup>[17]</sup> eingesetzt. Die Zellsuspensionen wurden in einem Bioreaktor nach einem modifizierten Verfahren für die Produktion großer Mengen von *M. gryphiswaldense* unter definierten Bedingungen kultiviert.<sup>[18]</sup> Die Induktionsexperimente erfolgten mit angereichertem  $^{57}\text{Fe}$  in Form von  $^{57}\text{Fe}^{3+}$ -Citrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ;  $x=2-3$ ), um einen größeren Resonanzeffekt und eine bessere Auflösung für die Mößbauer-spektroskopische Analyse zu erhalten. Die mittlere magnetische Orientierung der Zellsuspensionen ( $C_{\text{mag}}$ ) wurde mit einer optischen Methode verfolgt.<sup>[19]</sup> Für wachstumsunabhängige Induktionsexperimente wurden Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase in ein Medium mit niedrigem Kohlenstoffgehalt überführt.<sup>[16]</sup> Unter diesen Bedingungen findet kein oder nur ein schwaches Zellwachstum statt, wobei die Zellen aber dennoch lebensfähig sind und ihre Fähigkeit zur Biomineralisation und Magnetosomenbildung behalten.

In festgelegten Zeitintervallen wurden der Kultur für die  $C_{\text{mag}}$ -Bestimmung und TEM-Analyse 2 mL Zellsuspension entnommen. Hellfeld-TEM-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-EM10-Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 60 kV erhalten. Simultan wurden jeweils 1–2 L Zellsuspensionen zentrifugiert und gewaschen; die Pellets wurden gewogen, in Delrin-Probenhalter überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei dieser Temperatur bis zur Mößbauer-spektroskopischen Analyse aufbewahrt. Das Mößbauer-Spektrometer wurde im Modus konstanter Beschleunigung betrieben. Die Spektrometereichung erfolgte mit einer  $\alpha$ -Eisenfolie bei Raumtemperatur. Die Probenmessungen wurden entweder in einem Durchfluss- oder in einem Badkryostaten (Oxford) durchgeführt. An die Spektren wurden Lorentz-Linien mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepasst. Die Spektren wurden bei einer Probentemperatur von 130 K aufgenommen. Ganze, reife Zellen und Ferritin enthaltende Zellfraktionen wurden außerdem bei 77 und 4.3 K vermessen.

Magnetosomen wurden mit einer schon früher beschriebenen Methode abgetrennt.<sup>[15]</sup> Nach der Entfernung der Magnetosomen wurden die übrigen Zellfraktionen in einer Beckman-J-E-Hochgeschwindigkeitszentrifuge (20 min bei 16000 g; Sediment) weiter aufgetrennt; dieser Schritt wurde bei der 20-h-Probe ausgelassen. Ultrazentrifugation des Überstandes erfolgte in einer Beckman Optima Max E bei 100000 g über einen Zeitraum von einer Stunde. Der Eisen- und Proteingehalt wurde vom gewaschenen Pellet, bei dem davon ausgegangen wurde, dass es sich um die Membranfraktion (MF) handelt, und dem Überstand (SF) bestimmt.

Eingegangen am 1. März 2007,  
veränderte Fassung am 30. Mai 2007  
Online veröffentlicht am 27. September 2007

**Stichwörter:** Biomineralsierung · Magnetische Eigenschaften · Magnetotaktische Bakterien · Mößbauer-Spektroskopie · Reaktionsmechanismen

- 
- [1] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 217.
  - [2] C. Lang, D. Schüler, D. Faivre, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 144.
  - [3] D. S. McKay, E. K. Gibson Jr., K. L. Thomas-Kepra, H. Vali, C. S. Romanek, S. J. Clemett, X. D. F. Chilier, C. R. Maechling, R. N. Zare, *Science* **1996**, 273, 924.
  - [4] D. Schüler, E. Baeuerlein, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 159.
  - [5] R. B. Frankel, R. Blakemore, R. S. Wolfe, *Science* **1979**, 203, 1355.
  - [6] R. B. Frankel, G. C. Papaefthymiou, R. P. Blakemore, W. O'Brien, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1983**, 763, 147.
  - [7] D. Schüler, E. Baeuerlein, *Arch. Microbiol.* **1996**, 166, 301.
  - [8] S. Mann, R. B. Frankel, R. P. Blakemore, *Nature* **1984**, 310, 405.
  - [9] R. M. Cornell, U. Schwertmann, *The iron oxides (Structure, properties, reactions, occurrences and uses)*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
  - [10] S. Mørup, J. A. Dumesic, H. Topsøe, in *Magnetic Microcrystals, Vol. 11* (Hrsg.: R. L. Cohen), Academic Press, New York, **1980**, S. 1.
  - [11] B. F. Matzanke, in *Transition Metals in Microbial Metabolism* (Hrsg.: G. Winkelmann, C. Carrano), Harwood academic publishers, Amsterdam, **1997**, S. 117.
  - [12] R. Böhnke, B. F. Matzanke, *BioMetals* **1995**, 8, 223.
  - [13] D. Schüler, *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, Vol. 3*, Springer, Heidelberg, **2006**.
  - [14] A. Komeili, Z. Li, D. K. Newman, G. J. Jensen, *Science* **2006**, 311, 242.
  - [15] K. Grünberg, E. C. Müller, A. Otto, R. Reszka, D. Linder, M. Kube, R. Reinhardt, D. Schüler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 1040.
  - [16] A. Scheffel, M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, J. M. Plitzko, D. Schüler, *Nature* **2006**, 440, 110.
  - [17] S. Schübbe, M. Kube, A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdierks, M. Madkour, F. Mayer, R. Reinhardt, D. Schüler, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 5779.
  - [18] U. Heyen, D. Schüler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 61, 536.
  - [19] D. Schüler, R. Uhl, E. Baeuerlein, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 132, 139.
  - [20] Unveröffentlichte Ergebnisse.