



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Isotopenlabor der Sektion
Naturwissenschaften der Universität zu Lübeck
Leiter: Prof. Dr. Christian L. Schmidt

**Untersuchungen zu Struktur und Funktion des
Bakterioferritins von *Magnetospirillum gryphiswaldense***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Diplom-Biologin Katharina Maria Jäger
aus Salzkotten

Lübeck 2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Christian L. Schmidt
2. Berichtstatter: Prof. Dr. Stefan Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2016

Zum Druck genehmigt: 4. Februar 2016

Zusammenfassung

Magnetospirillum gryphiswaldense ist einer der Modellorganismen der magnetotaktischen Bakterien, die bisher nur mit wenigen Arten in Reinkultur vorhanden sind. Sie gehören alle zur Gattung *Magnetospirillum*. Magnetospirillen leben in den mikroaeroben Bereichen der Gewässer und akkumulieren besonders große Mengen an Eisen in ihrem Inneren in Form der Magnetosomen. Dabei handelt es sich um Magnetitpartikel, die von den Zellen innerhalb von Membranvesikeln gebildet werden. Diese ermöglichen es den Zellen, sich mithilfe der Magneto-Aerotaxis am Magnetfeld zu orientieren, was eine wesentlich gezieltere Bewegung ermöglicht, als eine reine Aerotaxis.

Der Vorgang der Bildung der Magnetosomen ist bisher nicht komplett geklärt worden. In vorhergehenden Untersuchungen gab es jedoch Hinweise auf ein ferritinartiges, membranassoziertes Protein, welches als Zwischenstufe der Magnetosomensynthese fungieren sollte.

Dieses ferritinartige Protein konnte während dieser Arbeit als Bakterioferritin identifiziert werden, ein oligomeres Protein, welches zur Familie der Eisenspeicherproteine gehört. Im Genom von *M. gryphiswaldense* sind zwei operonartig organisierte *bfr*-Gene vorhanden. Diese konnten in *E. coli* überexprimiert werden und ein aktives, rekombinantes, aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehendes Bfr, aufgereinigt werden.

Als dodekameres Bakterioferritin mit zwei verschiedenen Untereinheiten, ist das Bfr von *M. gryphiswaldense* im Vergleich mit anderen Bfr-Proteinen ungewöhnlich. Die Sequenzen der beiden Untereinheiten wiesen keine großen Ähnlichkeiten auf. Dafür gab es deutliche Hinweise auf eine Funktionsteilung zwischen einer Untereinheit mit Ferroxidaseaktivität und einer Untereinheit mit der Fähigkeit zur Koordination einer Häm b-Gruppe. Auch die Bindung von Häm b im Bfr von *M. gryphiswaldense* wurde nachgewiesen.

Weiterhin wurden die Proteine von *M. gryphiswaldense* fraktioniert und auf die vorhandenen Häm-Gruppen hin untersucht. Dabei wurde Häm b, welches bei Bfr vorhanden sein muss, nur in der Membranfraktion nachgewiesen. Die Lokalisation des Bfrs wurde auch mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie untersucht. Hierbei wurde die, bisher angenommene, Lokalisation des Bfrs in der Membranfraktion bestätigt. Flotationsversuche mit *M. gryphiswaldense*-Membranen widersprachen dem nicht.

Untersuchungen mit einer Δbfr -Deletionsmutante zeigten, dass Bfr keine, für die Magnetosomensynthese, essentielle Zwischenstufe sein kann, da die Δbfr -Deletionsmutante keine Einschränkungen in Größe und Zahl der gebildeten Magnetosomen im Vergleich zum Wildstamm, zeigte. Auch im Mößbauerspektrum konnte keine ferritinartige Komponente gefunden werden. Weiterhin wurde die Identität des ferritinartigen Proteins als Bfr bestätigt.

Es gab Hinweise auf eine Rolle des Bfrs bei der Bewältigung von oxidativem Stress. Dazu wurden einige Versuche mit verschiedenen *Magnetospirillum*-Stämmen und dem rekombinanten Bfr durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das Bfr eine Rolle bei der Bewältigung von oxidativem Stress spielt. Interessant war hierbei, dass Bfr das Eisen, welches für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich ist, speichert und dabei vermutlich H_2O_2 zu ungefährlichen Reaktionsprodukten abbauen kann. Die Eisenspeicherfähigkeit des Bfrs wurde ebenfalls nachgewiesen.

Kristalle des rBfrs konnten während dieser Arbeit ebenfalls erhalten werden. Weitere Optimierungen in dieser Richtung werden fortgeführt.

Abstract

Magnetospirillum gryphiswaldense is one model organism of the magnetotactic bacteria, which has only a few species available in pure cultures. So far, all belong to the genus *Magnetospirillum*.

Bacteria of the genus *Magnetospirillum* exist in the micro aerobic zone of waters and accumulate lots of iron in form of magnetosomes. Magnetosomes are particles consisting of magnetite, formed in membrane vesicles that allow the bacteria to orientate in the earth's magnetic field with the so called Magneto-Aero-Taxis.

The formation of magnetosomes remains unclear, but previous research gave hints at a ferritin-like, membrane-associated protein, which could act as an intermediate for the synthesis of magnetosomes.

During this research, the ferritin-like protein could be identified as a bacterioferritin, an oligomeric protein, belonging to the family of iron storage proteins. There were two operon-like *bfr*-genes in the genome of *M. gryphiswaldense*. These genes were overexpressed in *E. coli* and a fully active recombinant Bfr, containing of two different subunits could be purified.

The Bfr was identified to be dodecameric with two different subunits, which was unusual. The sequences of the two Bfr-subunits were not very similar but gave evidence for a functional differentiation between the subunits, one coordinating the heme b-group and one with ferroxidase activity. The binding of heme b to the Bfr was verified during this research.

Furthermore, the proteins of *M. gryphiswaldense* were fractionated and analyzed for heme-groups. Heme b, which has to be bound to Bfr, was only detected in the membrane fraction of *M. gryphiswaldense*. The localization of Bfr in the membrane fraction was verified. Flotation of the membrane fraction of *M. gryphiswaldense* didn't contradict this.

Analyses with a Δbfr -deletion mutant gave evidence, that Bfr is not an essential protein for magnetosome synthesis, because magnetosome formation was unaffected in size and morphology, when the *bfr*-genes were deleted. The Mössbauer spectra showed no ferritin-like component, either. The data confirmed the identity of the ferritin-like protein being a bacterioferritin.

Indications for Bfr to take part in the mastering of oxidative stress led to experiments with different *M. gryphiswaldense* strains and the recombinant Bfr, showing a role of Bfr in the oxidative stress management. Bfr can store iron, which was proven and is supposed to degrade H_2O_2 to H_2O as a protective mechanism.

RBfr was crystallized, but crystals were too small, so that further optimization has to be done.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1. Magnetospirillum und andere magnetotaktische Bakterien (MTB).....	1
1.2. Biomineralisierung in den Magnetosomen und Einflussfaktoren	2
1.3. Genetik von <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> und Proteinausstattung der Magnetosomenmembran	4
1.4. Eisen.....	5
1.5. Eisenhomöostase bei Bakterien.....	7
1.6. Eisenspeicherproteine/Ferritinfamilie	8
1.6.1. Ferritin.....	9
1.6.2. Bakterioferritin (Bfr).....	10
1.6.3. Das Dps-Protein (DNA-binding proteins from starved cells) am Beispiel von <i>E. coli</i>	11
1.6.4. Häm und Cytochrom	12
1.6.5. Ziel der Arbeit.....	13
2. Materialien	14
2.1. Geräte	14
2.2. Software	14
2.3. Chemikalien	15
2.4. Verbrauchsmaterialien und Säulen	18
2.5. Kits.....	19
2.6. Puffer und Lösungen	19
2.7. Kulturmedien	21
2.8. PCR-Reagenzien, Plasmide, Marker, Antikörper und Enzyme	23
2.9. Verwendete Bakterienstämme	24
3. Methoden	25
3.1. Wachstumsbedingungen für <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> Stämme	25
3.2. Einfluss von H ₂ O ₂ auf das Wachstum von <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	25
3.3. Zellaufschluss der <i>M. gryphiswaldense</i> und <i>E. coli</i> -Zellen	25
3.4. Herstellung von Präparationen für die Mößbauer-Spektroskopie.....	26
3.5. Extraktion von Bfr aus der Membranfraktion durch Tenside	26
3.6. Extraktion von Bfr aus der Membranfraktion mit Salz und chaotropen Reagenzien.....	27
3.7. Klonierung der <i>bfr</i> -Gene von <i>M. gryphiswaldense</i> in <i>E. coli</i>	28
3.7.1. DNA-Isolation, PCR und Klonierung	28

3.7.2. Herstellung chemokompetenter Zellen	34
3.7.3. Transformation.....	34
3.7.4. Testexpression der <i>bfr</i> -Gene in pBadHisb	35
3.7.5. Wachstums- und Expressionsbedingungen.....	35
3.8. Elektrophoretische Techniken und Färbemethoden.....	36
3.8.1. Herstellung von Gradientengelen für die native Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE).....	36
3.8.2. Herstellung von Gradientengelen für die denaturierende SDS-PAGE	37
3.8.3. Coomassie-Brillant-Blau-Färbung und Eisenfärbung nach Fridovich.....	38
3.8.4. Herstellung von Gelen für die Agarose-Gelelektrophorese	38
3.8.5. Western Blot	38
3.8.6. Blotten von Proteinen auf eine PVDF-Membran für N-terminale Sequenzierung	39
3.9. Acetonfällung.....	40
3.10. Säulenchromatographie.....	40
3.10.1. Gelfiltration - Größenausschlusschromatographie	40
3.10.2. Ionenaustauschchromatographie	40
3.10.3. Metallchelatchromatographie	40
3.11. Aufreinigungsprotokolle für die Isolation der rekombinanten Proteine aus <i>E. coli</i> BL21 Gold	41
3.11.1. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs	41
3.11.2. Aufreinigung des rBfr1-His.....	41
3.12. Bestimmung des Molekulargewichts von rBfr und Auftrennung der Untereinheiten	42
3.13. Dynamische Lichtstreuung - DLS.....	43
3.14. Auftrennung der rBfr-Untereinheiten	43
3.15. Bestimmung und Berechnung des Häm-Gehalts mit der Pyridin-Hämochrom-Methode.....	44
3.16. Eisenbestimmung des rBfrs durch FerroZine-Test und Berechnung des Eisengehalts des rBfr-Proteins	44
3.17. Konzentrationsbestimmung bei Proteinen durch den BCA-Test	45
3.18. Bindung von rBfr an DNA	45
3.19. Schutz der DNA vor oxidativem Stress	46
3.20. Flotation von Membranen.....	46
3.21. Polyklonale Antikörper	47
3.22. Mößbauerspektroskopie	47
3.23. Kristallisation des Bakterioferritins	49
4. Ergebnisse	50
4.1. Klonierung - Sequenzierung der DNA Sequenz K18	50
4.2. PCR-Produkte	52
4.3. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs aus <i>E. coli</i> BL21-Gold.....	53
4.4. RBfr - Bestimmung des Molekulargewichts.....	57

4.4.1. Gelfiltration.....	57
4.4.2. Dynamische Lichtstreuung - DLS.....	58
4.5. Nachweis von Eisen in rBfr und Bfr durch Färbung im nativen Polyacrylamidgel.....	60
4.6. Vergleich des rekombinanten und des nativen Bfrs im nativen Polyacrylamidgel.....	61
4.7. Eisen- und Proteinverteilung bei <i>M. gryphiswaldense</i>	62
4.8. Bestimmung des Häm-Gehalts von rBfr und MSR-1-Fractionen mit der Pyridin-Hämochrom-Methode	63
4.9. Empfindlichkeit von <i>M. gryphiswaldense</i> -Stämmen gegen oxidativen Stress, ausgelöst durch Zugabe von H ₂ O ₂ zum Kulturmedium	67
4.10. Interaktion von rBfr mit DNA.....	70
4.11. Schutz der DNA vor oxidativem Abbau durch rBfr	71
4.12. Bfr-Extraktion mit Salz und chaotropen Reagenzien.....	72
4.13. Flotation von MSR-1B-Membranen über einen Saccharose-Stufengradienten	74
4.14. Sequenzen der N-terminalen Edman-Sequenzierung.....	77
4.15. Polyklonale Antikörper	78
4.16. Mößbauerspektren.....	80
4.16.1. Mößbauerspektren der lyophilisierten löslichen Proteine von MSR-1.....	80
4.16.2. Mößbauerspektren der Membranfraktion von $\Delta mamM$ und MSR-1.....	81
4.16.3. Mößbauerspektrum des Stamms Δbfr	83
4.16.4. Mößbauerspektren des aufgereinigten rBfrs.....	84
4.17. Kristallisierung des rBfr.....	85
5. Diskussion.....	87
5.1. Klonierung des Bfrs von <i>M. gryphiswaldense</i> , Sequenzen der rBfr-Untereinheiten und Sequenzvergleiche mit anderen bekannten Mitgliedern der Ferritinfamilie	87
5.2. Bestimmung des Molekulargewichts des Bakterioferritins aus <i>M. gryphiswaldense</i>	96
5.3. Nachweis von Eisen im Bfr durch Färbung im nativen Polyacrylamidgel, Eisen- und Proteinverteilung bei <i>M. gryphiswaldense</i>	98
5.4. Bestimmung des Häm-Gehalts mit der Pyridin-Hämochrom-Methode.....	100
5.5. Beeinflussung des Wachstums durch oxidativen Stress, Bindung von rBfr an DNA, Schutz der DNA vor oxidativem Stress durch rBfr.....	102
5.6. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs aus <i>E. coli</i> BL21-Gold im Vergleich zu <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	105
5.7. Polyklonale Antikörper	106
5.8. Flotation von Membranen – Membranbindung des Bfr, Lokalisation des Bfrs, polyklonale Antikörper	106
5.9. Mößbauerspektren - Lokalisation des Bfrs und Identifikation der ferritinartigen Komponente	108
5.10. Bakterioferritin und Magnetosomensynthese.....	110

6.	Fazit.....	111
6.1.	Ausblick	112
7.	Quellenverzeichnis.....	113
	Danksagung.....	122
	Eidesstattliche Erklärung.....	123

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Angabe für die Mischung zweier flüssiger Komponenten, Volumen pro Volumen
(w/v)	Angabe für die Mischung einer bestimmten Masse mit einer flüssigen Komponente, Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
Bfd	Bfr associated ferredoxin
Bfr	Bakterioferritin
B _{Hf}	magnetische Aufspaltung
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum Album, Rinderserumalbumin
cdf	cation diffusion facilitator
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dps	DNA-binding protein from starved cells
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence
ECT	Elektronenkrytomographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
Fe	Eisen
Feo	Eisen(II)-Transporter bei Bakterien
Fur	ferric uptake regulator
fwd.	forward, Richtungsangabe für Oligonukleotide
g	Gramm
Glu, E	Glutaminsäure
h	Stunde
His, H	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth, Nährmedium
M	molar
MAI	magnetosome island, Magnetosomeninsel
mam	magnetosome membrane, Magnetosomenmembran
Mega 9	N-D-Gluco-N-methylalkanamid
Met, M	Methionin
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mms	magnetic particle membrane specific, magnetosomenspezifisch
MSR-1	Magnetospirillum gryphiswaldense

Ni-NTA	mit Nickelionen beladene Affinitätssäule aus an vernetzte Agarose gebundener Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomolar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rBfr	rekombinantes Bakterioferritin mit beiden Untereinheiten von <i>M. gryphiswaldense</i>
rBfr1	die erste, rekombinante Bakterioferritinuntereinheit von <i>M. gryphiswaldense</i>
RecA	DNA-Reparaturprotein bei <i>E. coli</i>
Rev	reverse, Richtungsangabe für Oligonukleotide
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	round per minute, Drehzahl in Minuten
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T7	Bakteriophage T7
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween 20
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TPR	tetratricopeptide repeat
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	ultraviolett
XANES	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie
δ	Isomerieverschiebung
ΔE _Q	Quadrupolaufspaltung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fur-Rezeptors	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der intra-dimeren, intermonomeren Hämbindungsstelle von <i>E. coli</i> -Bfr (Le Brun, Crow et al. 2010).....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Eisenoxidation am Ferroxidasezentrum von Bfr (Crow, Lawson et al. 2009).....	11
Abbildung 4: Oxidation von Eisen durch Fenton-Reaktion und am Ferroxidasezentrum (Calhoun und Kwon 2011).....	11
Abbildung 5: Porphyrin-Grundgerüst und verschiedene, daraus abgeleitete Häm-Typen.....	12
Abbildung 6: Extraktion von MSR-1B-Membranen mit verschiedenen Tensiden	27
Abbildung 7: Sequenzierung des pBadHisb-Vektors mit den <i>bfr</i> -Genen	51
Abbildung 8: Produkte der PCR mit den Primern 1 und 2. Die Produkte wurden für die Klonierung der <i>bfr</i> -Gene in den pBadHisb-Vektor verwendet	52
Abbildung 9: PCR zur Vervielfältigung der <i>bfr</i> -Gene. Produkte der PCR mit den Primern P5fwBspHI f und P6revNdeI r für die Klonierung der <i>bfr</i> -Gene in den pet15b-Vektor	53
Abbildung 10: Testexpression der <i>bfr</i> -Gene in pBadHisb	54
Abbildung 11: Expression der <i>bfr</i> -Gene in pet15b.....	55
Abbildung 12: Trennung der löslichen Proteine von <i>E. coli</i> mit dem rekombinanten Magnetospirillum-Bfr über eine S300-Gelchromatographiesäule.....	56
Abbildung 13: Aufreinigung des rBfrs über eine Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q Anionenaustauschersäule.....	56
Abbildung 14: Bestimmung des Molekulargewichts des rBfrs durch Gelfiltration über eine Sephacryl 300 HR Säule	57
Abbildung 15: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit verschiedenen Proteinen, Pferdeferritin (440 kDa), Rinder IgG (150 kDa), Conalbumin (75 kDa).....	58
Abbildung 16: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von rBfr mittels DLS.....	58
Abbildung 17: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Pferdeferritin mittels DLS.....	59
Abbildung 18: Auftrennung des rBfrs auf einem 6 - 12 % nativen Polyacrylamidgel.....	60
Abbildung 19: Auftrennung der mittels Triton X-100 aus MSR-1-Membran extrahierte Proteine über eine S300 HR-Gelchromatographiesäule und anschließende Auftrennung auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel.....	61
Abbildung 20: Eisen- und Proteinkonzentrationen der Membran.- und der löslichen Proteine von MSR-1.....	62
Abbildung 21: Eisen- und Proteinkonzentrationen der Membran.- und der löslichen Proteine von MSR-1B	62
Abbildung 22: Pyridin-Hämochrom-Spektren der Membranproteine und der löslichen Proteine von MSR-1, sowie des rBfrs.....	63
Abbildung 23: Auftrennung der löslichen Proteine von MSR-1 über eine S300 HR-Säule	64
Abbildung 24: Pyridin-Hämochrom-Spektren der mittels Gelchromatographie gewonnenen Fraktion 22.....	64
Abbildung 25: Pyridin-Hämochrom-Spektren der mittels Gelchromatographie gewonnenen Fraktion 27.....	65
Abbildung 26: Bestimmung des Molekulargewichts des Bfrs im MSR-1 Tensidextrakt der Membran durch Auftrennung über eine S300 HR Gelchromatographiesäule verwendet.	65
Abbildung 27: Die S300 HR Gelfiltrationssäule wurde mit Pferdeferritin (440 kDa), Rinder IgG (150 kDa) und Conalbumin (75 kDa) kalibriert.....	66

Abbildung 28: Immunologische Detektion von Bfr in Fraktionen des Detergensextrakts von MSR-1-Membranen	67
Abbildung 29: Der Einfluss von H ₂ O ₂ auf Kulturen des MSR-1-Stamms wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen 16 h nach der Inokulation untersucht.	68
Abbildung 30: Der Einfluss von H ₂ O ₂ auf Kulturen des Δbfr -Stamms wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen 16 h nach der Inokulation untersucht.	69
Abbildung 31: Bindung von rBfr an DNA	70
Abbildung 32: 12 nM pUC19-DNA wurden in mehreren Ansätzen, mit und ohne rBfr, oxidativem Stress durch die Fenton-Reaktion ausgesetzt.....	71
Abbildung 33: Bfr sollte aus der Membran MSR-1 durch Salz und den Zusatz von Harnstoff gelöst werden. Die entstandenen Extrakte wurden auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Hälften jeweils mit Coomassie Brillant Blau sowie auf eisenhaltige Proteine mit der Färbung nach Fridovich gefärbt	72
Abbildung 34: Extraktion der MSR-Membran mit Salz und Harnstoff. Nach der Extraktion wurden die Pellets auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brillant Blue und nach Fridovich angefärbt.....	72
Abbildung 35: Extraktion von MSR-1-Membranen mit Na ₂ CO ₃ . Außerdem wurde aus den Pellets der Salz- und Harnstoffextraktionen ein weiterer Extrakt durch den Zusatz von Triton X-100 hergestellt.....	73
Abbildung 36: Saccharosestufengradienten nach Flotation von MSR-1 und MSR-1B-Membranen....	74
Abbildung 37: Immunologische Detektion der Bfr-1 Untereinheit nach Flotation von Membranen über einen Saccharosegradienten.....	75
Abbildung 38: SDS-PAGE der Fraktionen der Flotation von Membranen über einen Saccharosegradienten.....	75
Abbildung 39: Flotation von rBfr über einen Saccharosestufengradienten	76
Abbildung 40: N-terminale Edman-Sequenzierung der Banden von rBfr von einer PVDF-Membran.	77
Abbildung 41: SDS-PAGE der rBfr1-haltigen Fraktionen nach Überexpression in <i>E. coli</i>	78
Abbildung 42: Reinigung von Bfr1-His über eine Ni-NTA-Säule.....	79
Abbildung 43: Immunologische Detektion der rBfr-1-Untereinheit mittels Anti-Bfr1-Antikörpers. ...	79
Abbildung 44: Mößbauerspektrum der lyophilisierten Proteine von MSR-1 bei 4,2 K.....	80
Abbildung 45: Mößbauerspektrum der Membranfraktion von $\Delta mamM$ bei 130 K.....	81
Abbildung 46: Mößbauerspektren der Membranfraktionen von $\Delta mamM$ und MSR-1 bei 4,2 K.....	82
Abbildung 47: Mößbauerspektrum der ganzen Zellen von Δbfr bei 130 K.....	83
Abbildung 48: Mößbauerspektren des aufgereinigten rBfrs bei 130 K und bei 5 K.....	84
Abbildung 49: Kristalle des rBfrs	85
Abbildung 50: Röntgenbeugungsmuster eines rBfr-Kristalls.	86
Abbildung 51: Stammbaum der Eisenspeicherproteine	90
Abbildung 52: Analyse der <i>M. gryphiswaldense</i> Bakterioferritin-Untereinheit 1 durch die NCBI Blast Conserved Domain Database	94
Abbildung 53: Analyse der <i>M. gryphiswaldense</i> Bakterioferritin-Untereinheit 2 durch die NCBI Blast Conserved Domain Database	94
Abbildung 54: intaktes Ferroxidasezentrum von <i>E. coli</i> (Le Brun, Crow et al. 2010).....	95
Abbildung 55: Vergleich der Bfr-Proteinsequenzen verschiedenen Magnetospirillen mit der Bfr-Untereinheit von <i>E. coli</i> durch ClustalW.....	95
Abbildung 56: Proteinverteilung in den Fraktionen des Saccharosegradienten nach der Flotation von MSR-1-Membranen	107
Abbildung 57: Vorstellungen über Struktur und Funktion des Bfrs vor Beginn und nach Abschluss dieser Arbeit.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inkubation von MSR-1-Membranen mit verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff und NaCl.....	27
Tabelle 2: PCR mit den Primern 1 und 2 zur Vervielfältigung der <i>bfr</i> -Gene aus genomischer DNA. .	28
Tabelle 3: Blunting des pBadHisb-Vektors mittels T4 DNA Polymerase	29
Tabelle 4: Dephosphorylierung von DNA 5'-Termini, pBadHisb-Vektor	29
Tabelle 5: Phosphorylierungsprotokoll für die P1/P2 PCR-Produkte	30
Tabelle 6: Ligation des <i>bfr</i> -Inserts in den pBadHisb-Vektor	30
Tabelle 7: Für die PCR wurden die folgenden Bedingungen und die Primer P5fwBspHI f und P6revNdeI r verwendet. Die Produkte wurden als Insert für die Ligation in den pet15b-Vektor verwendet.....	31
Tabelle 8: Verdau von P5fwBspHI f / P6revNdeI r PCR-Produkten mit NdeI und BspHI	32
Tabelle 9: Für die PCR wurden die folgenden Bedingungen und die Primer P3fwNde f und P4rcBamHI r verwendet. Die erhaltenen Produkte wurden für die Ligation von des <i>bfr1</i> -Gens in den pet15b-Vektor mit His-Tag verwendet.	33
Tabelle 10: Pipettierschema für vier native Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 6 - 12 % Acrylamid	36
Tabelle 11: Pipettierschema für vier denaturierende SDS-Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 13- 20 % Acrylamid.....	37
Tabelle 12: Pipettierschema Bindung von rBfr an DNA.....	45
Tabelle 13: Pipettierschema Schutz der DNA vor oxidativem Stress	46

1. Einleitung

1.1. Magnetospirillum und andere magnetotaktische Bakterien (MTB)

Bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden magnetotaktische Bakterien von Salvatore Bellini in Pavia beschrieben. Dies wurde der breiteren Öffentlichkeit allerdings erst 2009 zugänglich, als Richard B. Frankel die bisher nur im Italienischen vorhandenen Schriften übersetzte und veröffentlichte (Bellini 2009). Davor war Richard Blakemore als Entdecker der MTB bekannt. Er beschrieb 1975 ein Bakterium, welches ihm durch die schnelle Bewegung zu einer Seite des von ihm beobachteten Tropfens unter dem Mikroskop und durch die eingeschlossenen Ketten von eisenreichen Partikeln, auffiel. Schon damals erkannte er den Zusammenhang zwischen den sogenannten Magnetosomen und der als Magnetotaxis bekannten speziellen Eigenschaft, die es den Organismen ermöglicht, sich am Erdmagnetfeld auszurichten (Blakemore 1975).

Magnetotaxis ist die Orientierung von schwimmenden Zellen entlang der Feldlinien des Erdmagnetfeldes. Das Erdmagnetfeld beeinflusst dabei die Bewegungsrichtung, verursacht aber nicht die Bewegung an sich. Diese muss durch die sich an den Zellen befindenden Flagellen stattfinden. Auch abgestorbene, magnetische Zellen werden daher ebenfalls passiv am Erdmagnetfeld ausgerichtet (Blakemore 1982).

Möglich wird Magnetotaxis durch spezielle zelluläre Organellen, die Magnetosomen, bei denen es sich um membranumhüllte Magnetitkristalle handelt (Frankel, Blakemore et al. 1979). Da MTB bis zu 100 x mehr Eisen (Komeili 2012) als andere Bakterien für die Bildung der Magnetosomen akkumulieren müssen, ist es interessant, wie Aufnahme und Transport erfolgen und wie Eisen bei *Magnetospirillum* gespeichert wird.

Magnetospirillum gryphiswaldense ist heute eines der Forschungsobjekte unter den magnetotaktischen Bakterien, da es relativ leicht zu kultivieren ist und bisher nur wenige MTB in Reinkultur vorhanden sind. Es bildet bis zu 100 Magnetosomen pro Zelle. Dabei werden bis zu 4 % des Trockengewichts an Eisen akkumuliert (Schüler und Baeuerlein 1998). Auch nicht-magnetische Zellen haben einen hohen Eisengehalt von bis zu 0,2 % des Trockengewichts (Frankel, Blakemore et al. 1981; Blakemore 1982).

Die gramnegativen, mikroaerophilen, durch Flagellen sehr beweglichen Zellen der MTB kommen in aquatischen Habitaten in großer morphologischer Diversität (Flies, Peplies et al. 2005), sowohl auf der Süd- als auch auf der Nordhalbkugel, vor. Die Morphologie der Magnetosomen bei verschiedenen, bisher unkultivierten MTB kann sehr unterschiedlich sein. Gefunden wurden bisher z.B. auch pfeil- oder patronenförmige Magnetitkristalle (Abracado, Abreu et al. 2011).

Da magnetotaktische Bakterien mikroaerophil sind, kommen sie häufig in Habitaten vor, in denen Sauerstoff und redoxaktive Stoffe horizontal stratifiziert vorkommen. In der sogenannten oxisch-anoxischen Grenzzone entsteht durch den von der Oberfläche des Gewässers eindringenden Sauerstoff und durch den Schwefel in den Sedimenten ein Bereich, in dem der Sauerstoffgehalt sehr gering ist. Die meisten magnetotaktischen Bakterien halten sich in der Nähe dieser Zone auf (Thornhill, Burgess et al. 1995; Simmons, Sievert et al. 2004). Auch im anoxischen Sediment sind die Bakterien teilweise zu finden (Bazylnski 1999). Magnetosomen werden nur unter mikroaeroben Bedingungen gebildet, wenn Eisen gut verfügbar und Sauerstoff nicht wachstumslimitierend ist (Schüler und Baeuerlein 1998). Die Bildung von Magnetosomen ist außerdem möglicherweise eine Lösung Eisen zu speichern und die Konzentration von intrazellulärem freien Eisen zu reduzieren und die Zellen vor Redoxstress zu

schützen (Yijun, Weijia et al. 2007). Magnetotaktische Bakterien erfüllen als Eisenspeicher eine wichtige Funktion in Sedimenten, da sie hohe Zelldichten in den Sedimenten erreichen können (Simmons, Sievert et al. 2004; Simmons, Bazylinski et al. 2007).

Magnetotaktische Bakterien auf der Südhalbkugel schwimmen hauptsächlich nach Süden und auf der Nordhalbkugel hauptsächlich nach Norden. Auf dem Äquator, wo das Erdmagnetfeld horizontal verläuft, kommen etwa zur Hälfte nord- und südorientierte Bakterien vor. Da aber alle magnetotaktischen Bakterien trotzdem im Sediment zu finden sind, müssen andere Mechanismen der Taxis, wie z.B. Aerotaxis, zusätzlich involviert sein (Frankel, Blakemore et al. 1981), so dass man heute auch von Magneto-Aerotaxis spricht. Zusätzlich zur Magneto-Aerotaxis reagieren einige magnetotaktische Bakterien auch auf Licht, was sie möglicherweise davon abhalten kann, in die Wassersäule zu schwimmen (Frankel, Bazylinski et al. 1997).

Der Stoffwechsel der magnetotaktischen Bakterien ist chemoorganoheterotroph, wobei organische Säuren als Elektronen- und Kohlenstoffquelle dienen (Bazylinski, Dean et al. 2000).

Auch unkultivierte marine magnetotaktische Bakterien mit einem chemolithoautotrophen Stoffwechsel sind bekannt. Diese verwenden reduzierte Schwefelkomponenten als Elektronendonatoren um autotroph leben zu können (Williams, Zhang et al. 2006; Geelhoed, Sorokin et al. 2009).

Es wurden drei verschiedene Theorien diskutiert, die die Vielfalt der magnetotaktischen Bakterien erklären können (Lefevre, Schmidt et al. 2012):

- (1) Die magnetotaktischen Bakterien sind monophyletisch entstanden und basieren auf einem einzigen, gemeinsamen Vorfahren.
- (2) Die magnetotaktischen Bakterien sind polyphyletisch, d.h. mehrfach evolutionär auf der Basis der Eisenoxid- und Sulfidproduktion entstanden. Bei nahe verwandten, nichtmagnetischen Bakterien, ist diese Fähigkeit verloren gegangen.
- (3) Die Vielfalt der magnetotaktischen Bakterien ist durch horizontalen Gentransfer entstanden, wobei die Magnetosomengene auf einen ursprünglichen, gemeinsamen Vorfahren zurückgehen.

Nach bisherigen Erkenntnissen durch Analysen der 16s rRNA, sind die magnetotaktischen Bakterien vermutlich polyphyletisch entstanden. Hierbei macht man sich die Möglichkeit der Anreicherung von magnetotaktischen Bakterien zur Analyse durch Ausnutzung der Magnetotaxis zu Nutze, wobei diese durch ein angelegtes Magnetfeld aufkonzentriert werden (Amann, Peplies et al. 2007).

Unter den so analysierten magnetotaktischen Bakterien fanden sich viele Alphaproteobacteria aber auch Deltaproteobacteria und Nitrospira. Auch einige Gammaproteobacteria wurden gefunden (Lefevre, Vioria et al. 2012).

1.2. Biomineralisierung in den Magnetosomen und Einflussfaktoren

Unter Biomineralisierung versteht man die Entstehung anorganischer Kristalle mit spezifischer Größen- und Formencharakteristik innerhalb eines biologischen Systems.

Die Magnetosomenmembran als abgegrenzter Raum schafft dabei die chemischen Voraussetzungen für die Biomineralisierung des Magnetits und schützt die Zelle vor möglichen toxischen Nebenprodukten.

Die Magnetosomenmembran entsteht aus einer Einstülpung der cytoplasmatischen Membran (Komeili 2012). Die Membranvesikel können unter Eisenmangelbedingungen auch leer sein und keine

Magnetosomen enthalten. Die Magnetitbildung setzt sofort nach Eisenzugabe ein und kann nach kurzer Zeit beobachtet werden (Komeili, Vali et al. 2004).

Dass Magnetosomen Gebilde der cytoplasmatischen Membran sind, in denen Magnetitkristalle gebildet werden, zeigten Komeili et al. bei *M. magneticum* AMB-1 durch Elektronen-Kryotomographie. Hierbei wurden keine klar von der Membran abgegrenzten Magnetosomen gefunden, so dass es möglich ist, dass diese während der gesamten Entwicklungszeit mit der Membran verbunden bleiben (Komeili, Li et al. 2006; Katzmann, Scheffel et al. 2010). Auch Katzmann et al. konnten keine eindeutig abgelösten Magnetosomen bei *M. gryphiswaldense* finden (Katzmann, Scheffel et al. 2010).

Die Eisenaufnahme ist bei den meisten MTB auch von der Sauerstoffkonzentration der Umgebung abhängig. Trotz der hauptsächlich mikroaerophilen Lebensweise setzt die Eisenaufnahme und Magnetitbildung bei den Bakterien erst bei sehr geringem Sauerstoffgehalt, bei nahezu anaeroben Bedingungen ein (Rosenblatt, Frankel et al. 1985). Es ist nicht bekannt, ob es sich hierbei um eine genetische Regulation handelt, oder durch die Veränderungen der Eisenverfügbarkeit unter anaeroben Bedingungen bedingt ist. Magnetotaktische Bakterien akkumulieren große Mengen Eisen intrazellulär. Diese Menge liegt bis zu 100 x höher als bei anderen, nichtmagnetischen Bakterien wie z.B.: *E. coli* (Komeili 2012).

Wie die Synthese des Magnetits genau abläuft ist bisher unklar. Für die Initialisierung der Kristallbildung muss die chemische Umgebung so modifiziert werden, dass konzentriertes Eisen einen Magnetitkern bilden kann. Magnetit enthält Fe^{2+} und Fe^{3+} -Ionen.

Frankel et al. vermuteten bei *M. magneticum* einen Weg, bei dem lösliches Eisen zuerst in eine Ferrihydrit-Vorstufe oxidiert wird, dann in die Magnetosomen transportiert wird und dann teilweise wieder reduziert wird, um Magnetit zu bilden. Diese Vermutungen basieren darauf, dass wenig dichtes Ferrihydrit und lösliches Fe^{2+} mit der Zellfraktion assoziiert gefunden wurden, während hoch dichtes Ferrihydrit und Magnetit in der Magnetosomenfraktion gefunden werden (Frankel, Papaefthymiou et al. 1983).

Auch Fdez-Gubieda et al. haben Ferrihydrit bei MSR-1 nachgewiesen, wobei es sich um den Eisenkern des Bfrs handeln soll. Der Anteil des Ferrihydrits nahm mit zunehmender Magnetosomensynthese ab, was nicht für eine Magnetit-Vorstufe sprach, sondern für das Bfr als eine Eisenquelle für die Magnetosomenbildung (Fdez-Gubieda, Muela et al. 2013).

Faivre et al. beschrieben ein ferritinartiges Protein, welches vor allem in der Membranfraktion von *M. gryphiswaldense* nachgewiesen wurde (Faivre, Böttger et al. 2007).

Die Morphologie der Magnetitkristalle wird auch durch die Aufnahme rate des Eisens beeinflusst. Schnell wachsende Kristalle sind strukturell weniger perfekt als langsam wachsende Kristalle (Faivre, Menguy et al. 2008). Kleine Magnetitkristalle sind superparamagnetisch, d.h., dass die Richtung des Dipolmoments nicht stabil ist. Ab einer Größe von >35 nm entstehen stabile Ein-Domän-Kristalle, was wichtig für die Fähigkeit der Ausrichtung der Zellen am Erdmagnetfeld ist.

Da die Produktion von Magnetosomen für biotechnologische Anwendungen, wie die Immobilisierung von Enzymen, relevant ist (Ginet, Pardoux et al. 2011), wird versucht, die Magnetosomen im großen Maßstab herzustellen. Hier ist es vor kurzem gelungen, diese in *Rhodospirillum rubrum* zu produzieren, welches aufgrund der relativ nahen Verwandtschaft und biotechnologischen Relevanz geeignet schien (Kolinko, Lohsse et al. 2014).

1.3. Genetik von *Magnetospirillum gryphiswaldense* und Proteinausstattung der Magnetosomenmembran

Die Magnetosomenmembran enthält ein einzigartiges Set von Proteinen, welches die Membran von anderen bekannten Membranen deutlich unterscheidet. Viele dieser Proteine zeigen Charakteristika typischer Membranproteine und sind fest an die Magnetosomen gebunden, andere scheinen mehr oder weniger hydrophil zu sein und können mit milden Detergenzien abgelöst werden (Schüler 2004). Im Magnetitkristall selbst befinden sich hingegen keine Proteine (Tanaka, Arakaki et al. 2010; Tanaka, Mazuyama et al. 2011).

Die Gene für die *mam*- (magnetosome membrane) und/oder *mms*- (magnetic particle membrane specific)-Proteine, sind bei magnetotaktischen Bakterien in der Magnetosomeninsel (magnetosome island, MAI), einem 80 - 150 kb großen Abschnitt codiert (Grünberg, Wawer et al. 2001; Grünberg, Müller et al. 2004).

Sie wurde bei allen bisher analysierten MTB gefunden und zeigt konservierte strukturelle Charakteristika. 152 Gene sind konserviert, wobei davon 28 exklusiv nur bei magnetotaktischen Bakterien und nicht bei unmagnetischen Bakterien gefunden wurden (Jogler und Schüler 2009).

Die MAI ist instabil und kann durch Mutation oder Rekombination spontan verloren gehen, wobei dies durch Stress gefördert wird, wie dies z.B. durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck oder Kälte in MSR-1 entsteht (Schübbe, Kube et al. 2003).

Einige MTB - spezifische Proteine, die keine Homologie zu Proteinen nichtmagnetischer Organismen zeigen, sind beispielsweise MamG, F, D, C, J, W, X, Y, Mms6, MmeA und MtxA (Grünberg, Wawer et al. 2001; Grünberg, Müller et al. 2004).

Charakteristische Proteinfamilien, zu denen die zu anderen Proteinen homologen MM-Proteine gehören sind z.B.: TPR-haltige (tetratricopeptide repeat) Proteine (MamA), CDF-Transporter (cation diffusion facilitator, MamB und MamM), HtrA-artige Serin Proteasen (MamE, MamP, MamO), Actinartige Proteine (MamK) und Transportproteine (MamH und MamN).

Die Biomineralisierung der Magnetosomen wird nicht nur durch die Gene der MAI kontrolliert. Auch andere Gene, wie beispielsweise *fur* spielen für die korrekte und vollständige Magnetosomenbildung eine Rolle.

Für die Bildung von Magnetosomen müssen bestimmte Redoxbedingungen geschaffen werden, da es sich bei Magnetit um ein Eisenoxid $[\text{FeII}(\text{FeIII})_2\text{O}_4]$ mit gemischten Valenzen handelt. Dies erfordert ein ausgewogenes Fe(II)/Fe(III)-Verhältnis für die Präzipitation des Magnetits (Li, Sabaty et al. 2014). Hierbei wurde auch die Funktion von NirS deutlich, einer Nitritreduktase mit Eisen(II):Nitrit-Oxidoreduktasefunktion, die für die Bereitstellung des oxidierten Eisen für die Präzipitation des Magnetits eine wichtige Rolle spielt (Li, Bali et al. 2013).

Magnetosomen haben eine klare kettenartige Organisation, welche durch angrenzende cytoskelettartige Filamente gewährleistet wird. Bei *M. magneticum* AMB-1 soll hierfür MamK verantwortlich sein, denn *mamK*-Deletionsmutanten fehlte die kettenartige Organisation der Magnetosomen (Komeili, Li et al. 2006).

Für *M. gryphiswaldense* wurde dies nicht bestätigt. *mamK*-Deletionsmutanten von *M. gryphiswaldense* zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Morphologie, bildeten jedoch weniger Magnetosomen (Katzmann, Scheffel et al. 2010).

Bei den Proteinen MamGFDC ist die Funktion bisher unbekannt (Jogler und Schüler 2007). Sie haben keine Gemeinsamkeiten mit bekannten Transportern, sind also vermutlich nicht involviert in den Eisentransport in die Vesikel. Wenn MamGFDC fehlten, wurden kaum Effekte auf die Kristallbildung festgestellt, diese waren lediglich kleiner. Da aber auch die beobachteten Vesikel kleiner waren, ist nicht klar, ob die Vesikelgröße oder die Eisenzufuhr aus dem Außenraum die Größe begrenzen (Scheffel, Gardes et al. 2008).

Die Hemmung des Kristallwachstums ist außerdem unabhängig von der Eisenverfügbarkeit im Medium. Wahrscheinlich ist, dass MamGFDC die physikochemischen Bedingungen in den Vesikeln regulieren (Scheffel, Gardes et al. 2008), denn es zeigte sich, dass Größe und Form von Magnetitkristallen sehr stark von den Redoxbedingungen während der Synthese beeinflusst werden (Heyen und Schüler 2003).

MamB und MamM gehören zu den CDF und scheinen komplexe und essentielle Funktionen bei der Magnetosomenbildung zu erfüllen. Unter anderem sind sie am Eisentransport in die Magnetosomen beteiligt. Beide Deletionsmutanten bilden keine Magnetitkristalle aus, während bei $\Delta mamB$ -Mutanten auch keine Membranvesikel gebildet wurden. Beide Proteine sind hochkonserviert und bisher bei allen untersuchten MTB gefunden worden. Dabei ist die Stabilität von MamB von MamM abhängig, da diese ein Dimer bilden (Uebe, Junge et al. 2011).

MamM ist außerdem direkt an der Regulation des Kristallwachstums und der Initiation des Kristallwachstums beteiligt. Mutationen innerhalb des *mamMs* (führt zu einem Ersatz von Asp⁵⁰ durch Alanin) förderten die Bildung von Hämatit-Kristallen (Uebe, Junge et al. 2011). Dies könnte durch eine Veränderung des pH-Wertes in den Vesikeln bedingt sein, da CDF-Transporter generell Protonenantiporter sind, oder aber durch den verminderten Transport reduzierten Eisens in die Vesikel (Kambe 2012).

1.4. Eisen

Die wichtige Rolle des Eisens für die sehr stark spezialisierten MTB wurde bereits dargelegt.

Eisen ist aber generell für das Leben auf der Erde nicht wegzudenken, obwohl es potentiell toxisch und in vielen Habitaten schlecht bioverfügbar ist. Es ist ein wichtiges Spurenelement und Teil von aktiven Zentren einiger Enzyme, Elektronentransfer- und Sauerstofftransportproteinen (Touati 2000; Watt 2011).

Es sind die besonderen Eigenschaften des Eisens, die für Organismen in den oxischen Habitaten nicht nur von Vorteil sind. Seit sich vor ca. 2,7 Milliarden Jahren Sauerstoff durch die oxygene Photosynthese in der Atmosphäre anreicherte, ist ein Großteil des vorhandenen Eisens nicht mehr biologisch verfügbar.

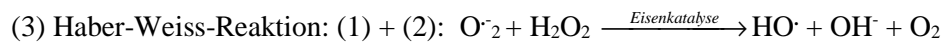
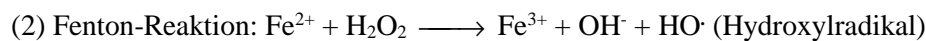
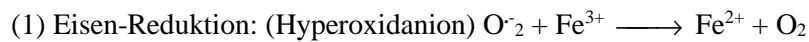
Eisen liegt unter oxischen Bedingungen, bei neutralem pH, als unlösliches Fe^{3+} (10^{-18} M) vor und ist daher in den meisten Habitaten ein wachstumslimitierender Faktor. Dies steht im Gegensatz zu anoxischen und mikroaeroben Habitaten, in denen Eisen als Fe^{2+} vorliegt und bis zu einer Konzentration von etwa 0,1 M gut löslich ist (Andrews, Robinson et al. 2003).

Obwohl Eisen essentiell ist, ist es gleichzeitig Katalysator für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Lebende Zellen müssen nun den Spagat zwischen der Deckung des Eisenbedarfs und dem Schutz vor Schäden durch ROS bewältigen (Watt 2011). Aufgrund der Wirkung von H_2O_2 auf viele Bakterien, ist es nicht verwunderlich, dass H_2O_2 auch bei der Unterdrückung von bakteriellen Infektionen eine Rolle spielt (Mehdy 1994).

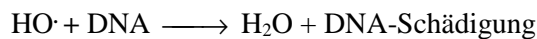
Reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikale, Hydroperoxyanionen und Wasserstoffperoxid entstehen natürlicherweise als Konsequenz des aeroben Stoffwechsels (Fridovich 1995; Mishra und Imlay 2012). Sie können bei hohen Konzentrationen zu gesteigerten Mutationsraten oder dem Tod der Zellen führen.

Die schwach reaktiven Hydroperoxy-Anionen, reagieren mit Eisen zu hochreaktiven und gefährlichen Hydroxyl-Radikalen. Dies ist als Fenton-Reaktion bekannt und führt zu Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüchen und Reaktionen mit zahlreichen anderen Biomolekülen (Halliwell und Gutteridge 1984).

Die Schlüsselreaktionen bei der Entstehung oxidativen Stresses durch Eisen sind folgende:



Entstehung von DNA-Schäden:

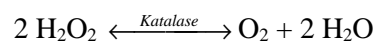


(Woodmansee und Imlay 2002)

Schützende Enzyme sind die Superoxid-Dismutase und die Katalase. Dabei wandelt die Superoxid-Dismutase zwei Superoxidradikale in ein Wasserstoffperoxidmolekül und molekularen Sauerstoff um:



Das von der Superoxid-Dismutase gebildete Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase vernichtet, indem es die Dismutation von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff katalysiert:



(Berg, Tymoczko et al. 2003)

Aufgrund dieser Reaktionen mussten Organismen verschiedene Mechanismen entwickeln, um ihren Eisenbedarf zu decken und sich gleichzeitig vor toxischem freiem Eisen zu schützen.

Dazu gehören hochaffine Aufnahmesysteme und verschiedene Eisenspeicherproteine zur intrazellulären Eisenspeicherung wie beispielsweise das Dps, welches vor allem die DNA vor oxidativem Stress schützt (Chiancone und Ceci 2010) sowie auch einige Bakterioferritine (Figueiredo, Lobo et al. 2012).

Die oben bereits genannten Schutzenzyme wie Katalase und Superoxid-Dismutase und auch DNA-Reparatur-Systeme wie beispielsweise RecA spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des oxidativen Stresses und seiner Folgen.

Wichtig ist auch die Kontrolle des Eisenbedarfs durch die Regulation von eisenhaltigen Proteinen bei Eisenlimitation.

1.5. Eisenhomöostase bei Bakterien

Zur Aufnahme von Eisen aus der Umwelt werden von Bakterien hochaffine Transportsysteme genutzt. Da Eisen häufig sehr schlecht verfügbar ist, geben viele Bakterien Chelatoren, die sogenannten Siderophore, in die Umgebung ab und nutzen diese, um das schwer verfügbare Eisen zu binden (Matzanke, Müller et al. 1984; Andrews, Robinson et al. 2003).

Siderophore werden durch spezifische Aufnahmesysteme von den Zellen aufgenommen, dabei ist die Produktion der Siderophore und ihrer Rezeptoren durch die Verfügbarkeit von Eisen reguliert (Matzanke, Anemüller et al. 2004). Allerdings nehmen viele Bakterien nicht nur die eigenen Siderophore auf sondern sind in der Lage auch Siderophore von anderen Bakterien oder Pilzen, so genannte Xenosiderophore, zu verwerten (Guerinot 1994).

Bei vielen Bakterien ist trotz normaler Eisenaufnahmesysteme eine Siderophorbildung unter Eisenmangelbedingungen möglich (Calugay, Takeyama et al. 2006).

Bei Magnetospirillen wurde die Bildung von Siderophoren z.T. nachgewiesen. Dazu gehört beispielsweise *M. magneticum* (Calugay, Takeyama et al. 2006).

Bei *M. gryphiswaldense* wurden bisher keine Siderophore gefunden (Schüler und Baeuerlein 1996). Im Genom von *M. gryphiswaldense* ist die Gensequenz eines mutmaßlichen Siderophores allerdings vorhanden (Wang, Wang et al. 2014), was darauf hindeutet, dass unter bestimmten Bedingungen auch Siderophore von *M. gryphiswaldense* gebildet werden können.

Ein weiterer Mechanismus zur Erhöhung der Menge verfügbaren Eisens ist die Reduktion des Eisens vor der Aufnahme durch die Zellen. Einige Bakterien, die ausschließlich Fe(II) aufnehmen können, wie z.B.: *Bifidobacterium bifidum* (Bezkorovainy, Solberg et al. 1987) und *Legionella pneumophila* (Johnson, Varner et al. 1991; Poch und Johnson 1993), müssen daher das Fe(III) vorher reduzieren.

Die Aufnahme von Eisen wird durch Fur (ferric uptake regulator) geregelt. Fur ist ein positiver Repressor. Er reprimiert die Transkription während der Interaktion mit dem Co-Repressor (Fe²⁺). Bei Eisenmangel wird Eisen freigesetzt und es erfolgt die Derepression der Fur-regulierten Gene (Andrews, Robinson et al. 2003).

Fur scheint für die Biomineralisation durch die starke Kontrolle des Eisenhaushalts eine zentrale Rolle zu spielen. Das Fehlen von *fur* führte bei *M. gryphiswaldense* MSR-1 zu einer verminderten Magnetosomenzahl. Außerdem wurde vermutet, dass ein Eisentransport von einem cytoplasmatischen Pool in die Magnetosomen stattfinden könnte (Uebe, Voigt et al. 2010).

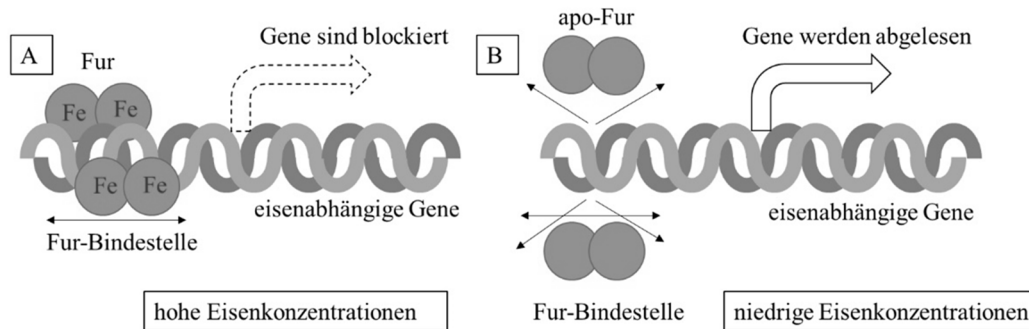


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fur-Rezeptors; A: Wenn Eisen vorhanden ist, werden die eisenabhängigen Gene durch Fur blockiert; B: Fur löst sich bei Eisenmangel von der Bindungsstelle ab, so dass eisenabhängigen Gene bei Eisenmangel abgelesen werden können.

Bei *M. gryphiswaldense* ist die Eisenaufnahme auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen noch möglich. Fur beeinflusst die Bildung der Magnetosomen, den Eisentransport und den sauerstoffabhängigen Stoffwechsel. Der Mechanismus der Eisenaufnahme und Homöostase bei *M. gryphiswaldense* ist bisher immer noch unklar (Liu, Chen et al. 2012). Fur wurde allerdings auch bei *M. gryphiswaldense* gefunden und scheint auch dort wesentliche Funktionen für die Eisenaufnahme zu haben. Fur-Mutanten bilden weniger und etwas kleinere Magnetitkristalle als der Wildtyp. Auch ist die gesamte Eisenaufnahme der Zellen reduziert, der intrazelluläre freie Eisenspiegel aber gleichzeitig erhöht. Dieses Eisen war hauptsächlich im ferritinartigen Molekül gebunden. Die Menge des ferritinartigen Moleküls war bei fur-Mutanten im Mößbauerspektrum signifikant erhöht, allerdings war dies vermutlich auf eine erhöhte Eisenbeladung der Proteine zurückzuführen, was durch die erhöhte intrazelluläre Konzentration an freiem Eisen bedingt war (Uebe, Voigt et al. 2010).

Auch Feo scheint einen Einfluss auf die Magnetosomenbildung zu haben. Bei Feo handelt es sich um einen Transporter für zweiwertiges Eisen. Wenn FeoB1 fehlt, führt das zu einer Reduktion der Magnetosomengröße und -zahl (Rong, Huang et al. 2008).

1.6. Eisenspeicherproteine/Ferritinfamilie

Für die intrazelluläre Eisenspeicherung in Bakterien sind drei Typen von Eisenspeicherproteinen bekannt: Ferritin, das hämhaltige Bakterioferritin und das Dps-Protein (DNA-binding proteins from starved cells).

Alle drei Typen können gleichzeitig in einem Bakterium vorkommen, so z.B. bei *E. coli*. Sie sind nur entfernt verwandt, haben aber viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten, wie z.B. ihre Eisenspeicherfähigkeit.

Alle bisher bekannten Eisenspeicherproteine bestehen aus 24 oder 12 Untereinheiten, die zu einem kugelförmigen Protein mit innenliegendem Hohlraum zusammengesetzt sind, welcher als Eisenspeicher-Reservoir fungiert. Jede Untereinheit wird zu einem 4- α -Helixbündel gefaltet. Die relativ großen Ferritine (etwa 500 kDa) können bis zu 4500 Eisenatome speichern, bei den kleineren Dps-Proteinen sind es ca. 500 (Ilari, Stefanini et al. 2000) und bei den 24-meren Bakterioferritinen sind es bis zu 2700 Eisenatome (Laulhere, Laboure et al. 1992; Baaghil, Lewin et al. 2003).

Das Eisen wird von den Proteinen in einer löslichen Form aufgenommen aber als oxidiertes unlösliches Eisen gespeichert. Der Eisenspeicherprozess benötigt einen Ferroxidationsschritt, Ferroxidase-Zentren befinden sich in den jeweiligen Untereinheiten.

Bei den Ferroxidase-Zentren handelt es sich um eine hochkonservierte Region mit Liganden für die Bindung von zwei Eisenionen, welche zu einem Zwei-Eisen-Intermediat oxidiert werden.

Das Eisen wandert dann in den innenliegenden Hohlraum, wo ein Ferrihydrit- oder amorpher Eisenphosphat-Kern gebildet wird.

1.6.1. Ferritin

Ferritin hat ein Molekulargewicht von etwa 450 kDa und kommt als Eisenspeicherprotein in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vor.

Ferritine haben hochkonservierte Strukturen, bei denen 24 Untereinheiten eine kugelförmige Hülle bilden. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von etwa 20 kDa. Sie bestehen aus einem 4-Helix-Bündel und einer weiteren kurzen Helix am C-terminalen Ende der Polypeptidkette (Lewin, Moore et al. 2005).

Die Ferritine von Säugern sind aus H- und L-Untereinheiten aufgebaut, wobei sich die Zusammensetzung des Ferritins je nach Gewebe unterscheidet. Eisenspeichernde Organe wie z.B. die Leber enthalten Ferritine, die bis zu 90 % aus L-Untereinheiten bestehen. Organe wie das Herz, für die eher die Entgiftungsfunktion wichtig ist, haben Ferritine, die bis zu 2/3 aus H-Untereinheiten bestehen.

Der äußere Durchmesser eines Ferritinmoleküls beträgt 12 - 13 nm, der innere bei 7 - 8 nm (Harrison und Arosio 1996).

Durch einen Defekt des Eisenspeicherproteins Ferritin ist es sogar beim Menschen möglich, dass Magnetit im Gehirn abgelagert wird (Hautot, Pankhurst et al. 2007).

1.6.2. Bakterioferritin (Bfr)

Bakterioferritine gehören aufgrund der funktionellen Ähnlichkeiten mit Ferritinen zur Familie der Eisenspeicherproteine, obwohl diese nur eine entfernte Verwandtschaft verbindet (Andrews, Smith et al. 1991).

Bfr enthält im Gegensatz zum normalen Ferritin, ein zwischen je zwei Untereinheiten gebundenes Häm b. Häm b bindet dabei nicht kovalent an zwei Methionin-Reste (Frolow, Kalb et al. 1994).

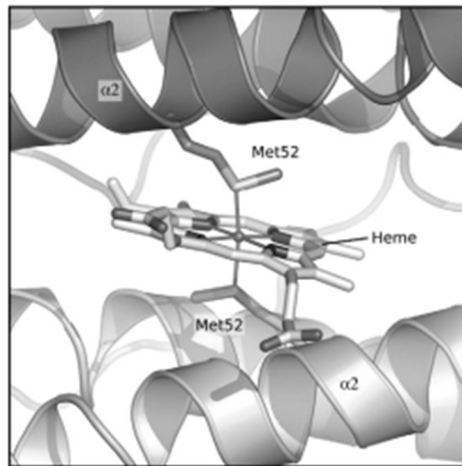


Abbildung 2: Schematische Darstellung der intra-dimeren, intermonomeren Hämbindungsstelle von *E. coli*-Bfr. Dabei wird das Häm durch je ein Met⁵² einer Untereinheit koordiniert (Le Brun, Crow et al. 2010).

Über die Bedeutung des Häms für die Bildung des Eisenkerns und die Speicherung des Eisens gab es viele Vermutungen.

Andrews et al. stellten beispielsweise fest, dass zwei hämfreie Varianten von Bfr bis zu viermal mehr Eisen speicherten als ein hämhaltiges Bfr. Daher wurde angenommen, dass das gebundene Häm eine Rolle für die Eisenfreisetzung aus dem Bfr spielt (Andrews, Le Brun et al. 1995). Eine Bedeutung für die Bildung des Eisenkerns wurde bis dahin nicht festgestellt. Allerdings zeigten Wong et al., dass Häm im *E. coli*-Bfr die Bildung des Eisenkerns beschleunigte (Wong, Abdulqadir et al. 2012).

Denkbar wäre, dass ein Elektronentransfer in die innere Kammer des Bfr durch Häm stattfindet, wobei die Elektronen zur Reduktion des Fe³⁺ zu Fe²⁺ führen. Danach könnte das mobilisierte Eisen durch die Kanäle in der Proteinoberfläche freigesetzt werden. Die Eisenfreisetzung aus dem Bfr ist unabhängig vom Ferroxidase-Zentrum (Richards, Pitts et al. 1996).

Eisenkerne von Ferritinen haben einen geringeren Phosphatgehalt als die von Bakterioferritinen (Lewin, Moore et al. 2005). Phosphat scheint bei Bfr ein integraler Bestandteil der Kerne zu sein, während es bei Ferritinen eher auf dem Kern aufliegt (Rohrer, Islam et al. 1990).

Während der Eisenkernbildung des *E. coli*-Bfrs wirkt das Zweieisen-Ferroxidase-Zentrum als katalytisches Zentrum, welches zwischen den di-Fe²⁺- und den überbrückten di-Fe³⁺-Formen wechselt (Abbildung 3) (Le Brun, Crow et al. 2010).

Die Reduktion des katalytischen Zentrums findet durch einen Elektronentransfer von Fe²⁺ in den inneren Hohlraum statt, welcher durch His⁴⁶ und Asp⁵⁰ koordiniert wird. Dies ist von Bedeutung für den Elektronentransfer zum Ferroxidase-Zentrum. Als Elektronenakzeptor dienen O₂ oder H₂O₂ (Crow, Lawson et al. 2009).

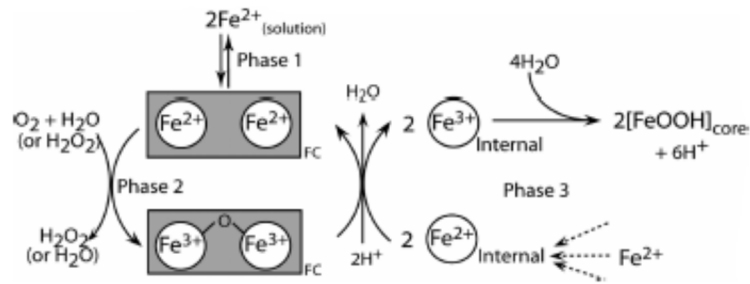


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Eisenoxidation am Ferroxidasezentrum von Bfr. Das Ferroxidasezentrum gewährleistet den Elektronentransfer vom Fe^{2+} zu einem Elektronenakzeptor wie O_2 oder H_2O_2 (Crow, Lawson et al. 2009).

Viele *bfr*-Gene sind mit *bfd*-Genen assoziiert (Bfr-associated ferredoxin). Bei *E. coli* werden die *bfd*-Gene bei Eisenmangel induziert. Es gibt Hinweise, dass Bfr und Bfd interagieren, wobei Bfd als Vermittler bei Eisenmangel für die Freisetzung von Eisen aus dem Bfr dienen könnte. Bfd ist ein kleines, positiv geladenes Protein, welches ein $[2Fe-2S]$ -Cluster enthält ($E_m = -254$ mV). Dieses Protein wird unter Eisenmangelbedingungen exprimiert, was für eine Rolle bei der Eisenfreisetzung spricht (Quail, Jordan et al. 1996).

Auch bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* wurde ein *bfd*-Gen gefunden (MGR_0531).

1.6.3. Das Dps-Protein (DNA-binding proteins from starved cells) am Beispiel von *E. coli*

Dps-Proteine kommen in vielen Bakterien vor. Sie sind häufig in der Lage DNA zu binden, Eisen zu speichern und besitzen Ferroxidase-Aktivität.

Sie schützen die DNA vor schädlichen Umwelteinflüssen, indem freies Fe^{2+} zusammen mit H_2O_2 am Dps oxidiert wird. Zwei $Fe(II)$ -Ionen werden durch ein H_2O_2 oxidiert. Die Anwesenheit von Dps verhindert die Bildung von Hydroxylradikalen, die ansonsten bei der Fentonreaktion entstehen und Zellbestandteile wie die DNA schädigen können (Zhao, Ceci et al. 2002; Calhoun und Kwon 2011).

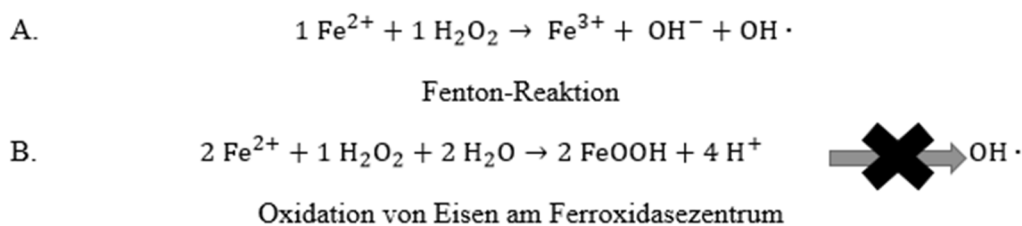


Abbildung 4: Oxidation von Eisen durch Fenton-Reaktion und am Ferroxidasezentrum. Hierbei entstehen unterschiedliche Reaktionsprodukte. A: Fenton Reaktion führt zur Entstehung von reaktiven Hydroxylradikalen, die Zellkomponenten schädigen; B: Die Oxidation von Eisen am Ferroxidasezentrum führt nicht zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, gleichzeitig wird ein Molekül H_2O_2 abgebaut (Calhoun und Kwon 2011).

Dps-Proteine werden nur unter Stressbedingungen stabil exprimiert, wodurch die Bakterien besonders resistent gegenüber Stress werden (Stephani, Weichart et al. 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass *E. coli*-Wildtypzellen und auch Δdps -Mutanten, während des exponentiellen Wachstums sensitiv auf die Zugabe von 15 mM H_2O_2 reagierten, während ausgehungerte Wildtypzellen 20 min länger als ausgehungerte Δdps -Mutanten einer Exposition mit 45 mM H_2O_2 standhielten (Almiron, Link et al. 1992).

Dps-Proteine bestehen aus 12 Untereinheiten, die wie beim Ferritin zu einem kugelförmigen Protein zusammengesetzt sind (Grant, Filman et al. 1998). Jede Untereinheit besitzt ein Ferroxidasezentrum, wobei sich diese jeweils an den Grenzflächen zur benachbarten Untereinheit befinden (Zhao, Ceci et al. 2002). Es werden bis zu 500 Eisenatome in einem Dps-Molekül gespeichert (Zhao, Ceci et al. 2002). Der Eisenkern ist dem des Pferdeferritins ähnlich und enthält bis zu zehn Phosphate pro Dps - Protein (Castruita, Saito et al. 2006).

1.6.4. Häm und Cytochrom

Häm-Gruppen spielen eine wichtige Rolle für verschiedene Enzyme (z.B.: Katalase), Cytochrome, Transportproteine (z.B.: Hämoglobin) und Elektronentransportprozesse (z.B.: Bfr).

Sie bestehen aus einem Porphyrin-Grundgerüst, welches ein Eisenion als Zentralatom enthält. Die verschiedenen Häm-Gruppen unterscheiden sich durch unterschiedliche gebundene funktionelle Gruppen voneinander (Abbildung 5).

Cytochrome, welche eine Vielzahl von Häm-Gruppen enthalten können, kommen in der Natur häufig vor. Sie sind an Elektronentransferreaktionen beteiligt, indem das enthaltene Eisenion zwischen den Oxidationszuständen wechselt.

Häm b, welches auch Bestandteil des Bfrs ist, besteht aus Protoporphyrin IX, welches ein Eisenion als Zentralatom enthält. Es findet hier keine kovalente Bindung des Häms an das Protein statt. Ein konserviertes Methionin ist bei Bfr für die Bindung des Häms verantwortlich (Penfold, Ringeling et al. 1996) (Abbildung 2).

Häm c, welches z.B. Bestandteil des Cytochrom Cs ist, ist kovalent über zwei Cysteine gebunden, während andere Häm-Typen nicht-kovalent gebunden werden (Roat-Malone 2008).

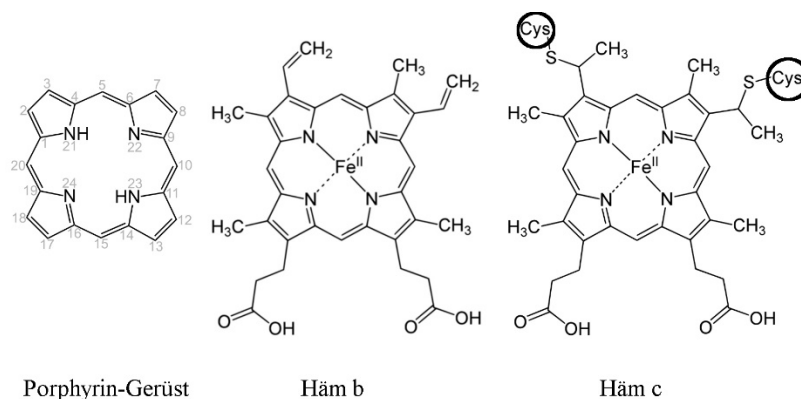


Abbildung 5: Porphyrin-Grundgerüst und verschiedene, daraus abgeleitete Häm-Typen. Die häm-bindenden Cysteine des Proteins, an denen Häm C kovalent gebunden ist, sind markiert. Bildquellen vom 23.06.15, upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Porphyrine_General_Formula_V.1.svg commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.svg#/media/File:Heme_b.svg upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Heme_c_structure.svg

1.6.5. Ziel der Arbeit

Bakterioferritin gilt gemeinhin als ein Eisenspeicherprotein der Bakterien. Bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* wurde zusätzlich die Rolle dieses Eisenspeicherproteins als eventueller Vorläufer des Magnetits diskutiert, da Bfr größere Mengen Eisen in einem geordneten Eisenkern speichern kann und der genaue Weg der Magnetosomensynthese bisher ungeklärt ist.

Bei *M. gryphiswaldense* wurden zwei *bfr*-Gene gefunden, die operonartig organisiert sind. Dies deutete auf ein Bfr mit zwei verschiedenen Untereinheiten hin, was sehr ungewöhnlich ist und daher weiterer Klärung bedarf.

Auch soll die Zuordnung dieses ferritinartigen Proteins zu den Bakterioferritinen überprüft werden, da es in bisher aufgenommenen Mößbauerspektrum ungewöhnliche Aufspaltungscharakteristika aufwies.

Eine weitere ungewöhnliche Beobachtung war, dass die Mößbauersignale des Bfrs in der Membranfraktion beobachtet wurden, so dass die subzelluläre Lokalisation des Bfrs zu klären war.

2. Materialien

2.1. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Biologic LP low-pressure chromatography system	Bio-Rad
Inkubator Innova 4330	New Brunswick
Gefriertrockner Lyovac GT 2	Leybold
Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences
Ultrospec 1000	Amersham Biosciences
Spectro Size 300, Dynamische Lichtstreuung	Xtal concepts
Odyssey System	LI-COR
Xcell SureLock	Invitrogen
Xcell II Blot Module	Invitrogen
Reinstwassersystem Micro	TKA
iMark Microplate Reader	Biorad
LAS-Kamera	GE Healthcare

2.2. Software

Bezeichnung	Hersteller/Quelle
Office 2013	Microsoft
Inkscape 0.91	inkscape.org/de
Serial Cloner	SerialBasics
Gimp	www.gimp.org
NCBI Conserved Domain Database (Marchler-Bauer, Derbyshire et al. 2015)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml

2.3. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 99,8 p.a.
⁵⁷ Fe	Cortecnet	97 %
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 99,8 %
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG	für die Gelelektrophorese
Agar select	Sigma-Aldrich	Für die Mikrobiologie
Agarose, RNase frei, DNase frei, Protease frei für Agarosegelelektrophorese	Sigma-Aldrich	Für die Molekularbiologie
Amersham ECL Plus, Chemolumineszenzlösung für Western Blot	GE Healthcare	-
Ammoniumacetat	Merck Millipore	p.a.
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	Merck Millipore	p.a.
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck Millipore	p.a.
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 99 %
Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Biotin	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥98,5 %
Borsäure H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich	99 %
Brillant Blau R250	Carl Roth GmbH + Co. KG	Für Laborzwecke
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck Millipore	ACG
Calciumchlorid CaCl ₂	Merck Millipore	p.a.
Citronensäure	Merck Millipore	Zur Synthese
Conalbumin aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich	≥98 %
Cyanocobalamin Vitamin B12	Sigma-Aldrich	99 %
Diaminobenzoesäure Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	99 %
Dinatriumphosphat Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck Millipore	p.a.
di-Natrium-Tartrat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	reinst
DL-Tyrosin	Sigma-Aldrich	99 %

Eisen(II)-sulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Eisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich	97 %
Eisenstandard, Titrisol, 100 mg FeCl ₃ in 15 % HCl, aufgefüllt auf 1 l mit Reinstwasser, für Ferrozine-Test	Merck	-
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	100 %, p.a.
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Ethidiumbromidlösung, 0,025 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, (EDTA) Titriplex	Merck Millipore	p.a.
Ferritin aus Pferdemiß	Sigma-Aldrich	-
FerroZine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonsäure)-1,2,4-Triazin		Sigma Ultra
Folsäure	Sigma-Aldrich	98 %
Glukose	Serva	Analytical grade
Glycerin	Sigma-Aldrich	99 %
Glycin	Merck Millipore	-
Harnstoff	Sigma-Aldrich	98 %
Hefeextrakt	Thermo Scientific (Oxoid)	For invitro diagnostic
Hepes	Carl Roth GmbH + Co. KG	99 %, cellpure
Imidazol	Merck Millipore	p.a.
IPTG, Dioxan frei	Thermo Scientific	-
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck Millipore	reinst
Kaliumhexacyanidoferrat(III) K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich	Reagent plus
Kaliumhydroxid KOH	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 85 %, p.a.
Kaliumlactatlösung (50 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Reinst.
Kaliumpermanganat	Merck Millipore	p.a.
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat CoCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck Millipore	p.a.

Kupferchlorid Dihydrat $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	p.a.
Magnesiumsulfat MgSO_4	Sigma-Aldrich (Fluka)	p.a.
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	Reagent plus
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG	Blotting grade
Mops-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG	$\geq 99 \%$
Natrium-Acetat	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Natriumchlorid	Merck Millipore	p.a.
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich (Fluka)	$\geq 85 \%$
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Research grade
Natrium-Formiat	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG	99 %, p.a.
Natrium-Malonat, pH 5,0	Hampton Research	für die Kristallographie
Natrium-Molybdat Dihydrat $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH + Co. KG	$\geq 99,5 \%$, p.a.
Neocuproin	Sigma	-
Nickel(II)-chlorid $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Nicotinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	$\geq 99 \%$
p-Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich	$\geq 99 \%$
Pantothensäure	Sigma-Aldrich	$\geq 99 \%$
PEG 400	Carl Roth GmbH + Co. KG	Rotipuran
PEG 4000	Carl Roth GmbH + Co. KG	Rotipuran
Pepton	Thermo Scientific (Oxoid)	-
Pepton (Soja)	Carl Roth GmbH + Co. KG	-
Phenylalanin	Carl Roth GmbH + Co. KG	$\geq 99 \%$, cellpure
Proteaseinhibitor-Cocktail, EDTA- frei	Sigma-Aldrich	-
Pyridin	Sigma-Aldrich	p.a.
Pyridoxine HCL	Sigma-Aldrich	-
Riboflavin	Sigma-Aldrich	-
Rinder Immunglobulin G	Sigma-Aldrich	-

Saccharose	Merck Millipore	Zur Dichtegradienten-zentrifugation
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan) 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Thiamin HCL	Sigma-Aldrich	-
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	p.a.
Tris Pure	Biomol GmbH	-
Tris(2-chlorethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP)	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 98 %
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 99 % p.a.
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG	Reinst.
Tryptophan	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥ 99 %, Cellpure
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	-
Zinksulfat Heptahydrat $ZnSO_4 \times 7 H_2O$	Merck Millipore	p.a.

2.4. Verbrauchsmaterialien und Säulen

Bezeichnung	Hersteller
Macrosep 100 K Zentrifugenkonzentrator	Pall Filtron
Sterilfilter 0,2 µm, PVDF	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sephacryl S300 HR	GE Healthcare Life Sciences
Bio-Scale Mini Macro-Prep High Q 1 ml Cartridge	Bio-Rad
HisTrap HP 1 ml	GE Healthcare
Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF)	Bio-Rad
SPECTRAPOR Dialyseschlauch, 3500 Da	Spektrum Medical Industries

2.5. Kits

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
DNA isolation Kit	Seqlab	Isolation genomischer DNA
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific	Ligation von Vektor und Insert
HiYield PCR Clean Up Kit	SLG	Aufreinigung von PCR-Produkten
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery Nagel	Plasmidpräparation
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Proteinkonzentrationsbestimmung
Structure Screen 1 & 2 HT-96	Molecular Dimensions	Kristallisation von Bfr

2.6. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung oder Hersteller
Coomassie-Entfärbelösung (Merril 1990)	Entfärben von Polyacrylamidgelen	40 % (v/v) 10 % (v/v) Ad 1 l H ₂ O Methanol Reine Essigsäure
Coomassie-Färbelösung (Merril 1990)	Färben von Polyacrylamidgelen	0,1 % 50 % (v/v) 10 % (v/v) Ad 1 l H ₂ O Brillant Blau R250 Methanol Reine Essigsäure
FastDigest Puffer (10 x)	DNA-Verdau	Thermo Scientific
FerroZine-Test, Lösung A	Ferrozintest zur Eisenbestimmung	1,2 N 4,5 % (w/v) HCl Kaliumpermanganat KMnO ₄ Beide Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.

FerroZine-Test, Lösung B	Ferrozintest zur Eisenbestimmung	9,7 g 8,8 g 80 mg 80 mg Ad H ₂ O 25 ml	Ammoniumacetat Ascorbinsäure FerroZine Neocuproin
Sammelgelpuffer	Polyacrylamid- gelelektrophorese	0,5 M	Tris-HCl pH 7,6
SDS-Protein- Probenpuffer (2 x)	Polyacrylamid- gelelektrophorese	126 mM 20 % 4 % 0,02 %	Tris-HCl pH 6,8 Glycerin SDS Bromphenolblau
Spurenelemente, modifiziert ohne Eisen, mit EDTA (Widdel 1983)	Bestandteil des MSR- Standardmediums	5,2 g 30 mg 100 mg 190 mg 24 mg 2 mg 144 mg 36 mg Ad H ₂ O 1 l	Na ₂ -EDTA H ₃ BO ₃ MnCl ₂ x 4 H ₂ O CoCl ₂ x 6 H ₂ O NiCl ₂ x 6 H ₂ O CuCl ₂ x 2 H ₂ O ZnSO ₄ x 7 H ₂ O Na ₂ Mo x 2 H ₂ O Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6 - 6,5 eingestellt und die Spurenelemente autoklaviert
TAE-Puffer (50 x) Tris-Acetat-EDTA (Sambrook und Russell 2001)	Agarose- Gelelektrophorese	242 g 57,1 ml 100 ml pH 8,0	Tris Reine Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8,0
TBS-Puffer (1 x)	Western Blot	25 mM 0,15M	Tris NaCl Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt

TBST-Puffer (1 x)	Western Blot	1x 0,1 %	TBS-Puffer Tween 20
TE-Puffer (1 x) Tris-EDTA	DNA-Isolation	10 mM 1mM	Tris-HCl EDTA pH 8,0
Trenngelpuffer	Polyacrylamidgel- elektrophorese	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
Tris-Glycin-Puffer (10 x)	Polyacrylamidgel- elektrophorese	30 g 144 g	Tris Base Glycin

2.7. Kulturmedien

LB Medium (lysogeny broth) (Lennox 1955)	10 g 5 g 5 g (100 µg/ml)	Pepton Hefeextrakt NaCl (Ampicillin)
LB-Agarmedium	10 g 5 g 5 g 12 g (100 µg/ml)	Pepton Hefeextrakt NaCl Agar Ampicillin
M9 Medium (10 x) (Miller 1972)	75 g 30 g 5 g 10 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl NH ₄ Cl
M9 Medium modifiziert (1x)	100 ml 10 ml 1 ml 1 ml 4 ml 1 ml	10 x M9 Medium Glukose (40 %) MgSO ₄ (1 M) CaCl ₂ (0,1 M) Aminosäuremischung Vitamine

Aminosäuremischung	100 µg/ ml	Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin
MSR-Medium (Schüler und Baeuerlein 1996)	10 ml 3 ml 3 g 0,1 g 4 ml 1 ml 6 ml 5 ml 1 ml	HEPES (1M) Kaliumlactatlösung (50 %) Soja-Pepton Hefeextrakt NaNO ₃ (1 M) KH ₂ PO ₄ (100 g/l) MgSO ₄ x 7 H ₂ O (0,1M) Fe(III)-Citrat Spurenelemente (Widdel) ohne Eisen → pH 7,0 mit NaOH → Add 1 l → Hungate-Röhrchen wurden vor dem Autoklavieren mit Argon begast
Vitamine für M9-Medium, 100 ml, steril filtriert	12 g 2,3 g 1,2 g 1 g 1 g 0,2 g 0,1 g 10 mg 6 mg	Pyridoxin HCL Nicotinsäure Pantothersäure Riboflavin Thiamin HCL p-Aminobenzoensäure Cyanocobalamin Folsäure Biotin

2.8. PCR-Reagenzien, Plasmide, Marker, Antikörper und Enzyme

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
BamHI fast digest	Schneiden von DNA	Thermo Scientific
ATP	Phosphorylierung von DNA	Thermo Scientific
BspHI fast digest	Schneiden von DNA	Thermo Scientific
dNTP-Mix	PCR	Thermo Scientific
FastAP thermosensitive Alkaline Phosphatase	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	Thermo Scientific
Mass Ruler, prestained, vorgefärbter Größenmarker für die SDS-Gelelektrophorese	Denaturierende Gelelektrophorese	Thermo Scientific
NcoI fast digest	Schneiden von DNA	Thermo Scientific
NdeI fast digest	Schneiden von DNA	Thermo Scientific
pBadHisb	Vektor für Klonierung	Der Vektor war eine freundliche Gabe von Prof. Dr. Klaus Hantke, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Pet15b	Vektor für Klonierung	Der Vektor war eine freundliche Gabe des Instituts für Biologie, Universität zu Lübeck
Pfu Polymerase	PCR	Thermo Scientific
Primer	PCR	Metabion
pUC19	Plasmid DNA für Bfr-Schutzversuche	Thermo Scientific
T4 DNA Polymerase	5'-3' DNA-Synthese	Thermo Scientific
T4 Polynucleotide Kinase	Phosphorylierung von PCR-Produkten vor Ligation	Thermo Scientific
Peroxidase Conjugate (POD) Anti-Kaninchen-IgG	Western Blot in Kombination mit LAS-Kamera	Sigma-Aldrich
IRDye800 Anti-Kaninchen-IgG	Western Blot in Kombination mit Odyssey System	Rockland Immunochemicals

2.9. Verwendete Bakterienstämme

Die verwendeten Stämme waren eine freundliche Gabe der Arbeitsgruppe Schüler (Mikrobiologie, Bayreuth).

MSR-1	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> , Wildtyp (Schleifer, Schüler et al. 1991)
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> 1B (MSR-1B)	Spontane, nicht magnetischer Mutante von MSR-1, Verlust großer Teile magnetosomenrelevanter Proteine (Schübbe, Kube et al. 2003)
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> $\Delta mamM$ (MSR $\Delta mamM$)	MamM-Funktion: Eisentransporter (cdf-Familie), keine Magnetosomen (Jogler und Schüler 2007; Uebe, Junge et al. 2011)
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> Δdps (MSR Δdps)	Mutante ohne <i>dps</i> -Gen
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> Δbfr (MSR Δbfr)	Mutante ohne <i>bfr</i> -Gene
<i>Escherichia coli</i> BL21 Gold (<i>E. coli</i>)	T7-Expressionsstamm, Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue (<i>E. coli</i>)	Expressions- und Klonierungsstamm, Stratagene

3. Methoden

3.1. Wachstumsbedingungen für *Magnetospirillum gryphiswaldense* Stämme

Alle *Magnetospirillum*-Stämme wurden in nahezu vollen Duran-Flaschen (0,1 - 2 l) bei 30 °C im Inkubator in MSR-Standardmedium (Schüler und Baeuerlein 1996) bei 120 rpm kultiviert. Die Stämme wurden jeweils mit 10 % des Kulturvolumens aus einer 24 h - Kultur angeimpft.

Die Zellernte wurde durch Zentrifugation bei 5000 x g, 4 °C für 20 min durchgeführt. Die Zellpellets wurden einmal in 20 mM eiskaltem Hepes-Puffer, pH 7,5 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter den genannten Bedingungen, wurden die trockenen Zellpellets bei -80 °C bis zum Zellaufschluss gelagert.

3.2. Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Die Anzucht der *M. gryphiswaldense*-Stämme erfolgte durch Inokulation mit einer für 24 h bei 30 °C kultivierten Startkultur. Es wurden 10 % (v/v) der Startkultur zu 500 ml frischem MSR-Medium in einer 500 ml Duran-Flasche gegeben. Die Kulturen wurden bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,26 bis 0,46 auf einem Thermoschüttler bei 120 rpm kultiviert.

Um den Einfluss von H₂O₂ auf *M. gryphiswaldense*-Stämme zu untersuchen, wurden die jeweiligen Stämme aus der Startkultur auf 50 ml Zellkulturflaschen (Sarstedt) aufgeteilt. Dies erfolgte durch Gießen unter der Sterilbank. Die Kulturen wurden in den Zellkulturflaschen bis zur darauffolgenden vollen Stunde bei 30 °C schüttelnd kultiviert.

Unter der Sterilbank wurden nach 16 h jeweils 0,5 ml der entsprechenden H₂O₂-Konzentrationen hinzugegeben und zügig durch Schütteln mit der Kultur vermischt.

Die OD der Kulturen wurde stündlich in den jeweiligen Zellkulturflaschen mit dem Photometer bei 600 nm gemessen und zwischen den Messungen auf dem Schüttler bei 30 °C kultiviert.

3.3. Zellaufschluss der *M. gryphiswaldense* und *E. coli*-Zellen

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und die Pellets pro 1 g Frischgewicht in 7 ml 50 mM Hepes Puffer, pH 7,5 mit 1 x Proteaseinhibitorcocktail, EDTA-frei, aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte auf Eis mit einem Ultraschallstab. Dabei wurden die Zellen sechsmal für je 20 s beschallt. Ganze Zellen und Bruchstücke wurden durch Zentrifugation abgetrennt (2 x 10 min, 5000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert, bei 272.000 x g für 30 min, oder bei einem größeren Volumen bei 100.000 x g, um Membranen und lösliche Proteine zu trennen. Membranen aus 3 ml Lysat wurden in 1 ml 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 resuspendiert. Alle Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

3.4. Herstellung von Präparationen für die Mößbauer-Spektroskopie

1: Präparationen für die Messung ganzer Zellen: Ganze Zellen wurden in MSR-Standardmedium (Schüler und Baeuerlein 1996) mit $40 \mu\text{M}$ ^{57}Fe -Citrat kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung in eisenfrei gewaschenen Glasgefäßen. Die Zellen wurden nach Kultivierung bei 30°C nach 30 h geerntet und zweimal mit 20 mM Hepes, pH 7,5 gewaschen und in den Mößbauer-Probenbehälter zentrifugiert ($5000 \times g$, 20 min).

2: Für die Präparation von lyophilisierten Proteinen wurden die Zellen wie bereits beschrieben aufgebrochen und lösliche und Membranproteine voneinander getrennt. Die löslichen Proteine in 50 ml Sarstedt Probenbehältern bei -80°C eingefroren und dann lyophilisiert.

3: Membranen wurden als Pellet oder resuspendiert in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 in den Mößbauer-Probenbehälter gebracht.

4: lösliche Proteine wurden in den Probenhalter pipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Alle Präparationen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.5. Extraktion von Bfr aus der Membranfraktion durch Tenside

Um Bfr aus der Membranfraktion zu extrahieren, wurden die Membranen mit Tensid behandelt.

Dafür wurde 1 ml Membran mit 2 % Triton X100, 250 mM NaCl und 1x Protease Inhibitor Cocktail (EDTA frei) in einem Gesamtvolumen von 3 ml für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht gelöstes Material wurde für 70 min bei $100.000 \times g$ oder für 30 min bei $272.000 \times g$, bei kleineren Volumina, abzentrifugiert.

Außer Triton X-100, wurden als Tenside noch Dodecylmaltosid, SB 12 und N-D-Gluco-N-methyl-alkanamid (Mega 9) verwendet. Da diese keine Vorteile gegenüber Triton X-100 zeigten, wurde für die meisten Versuche dieses Tensid verwendet.

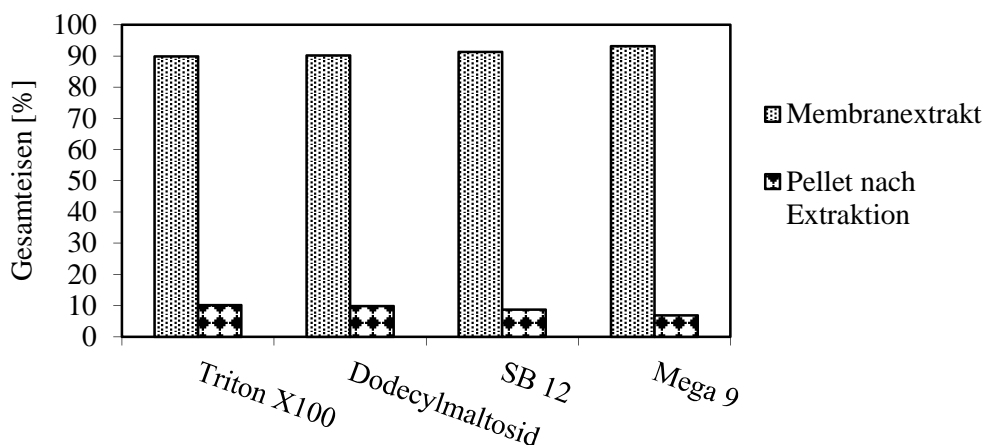


Abbildung 6: Extraktion von MSR-1B-Membranen mit verschiedenen Tensiden. Die prozentuale Eisenverteilung in Überstand und Pellet wurde mittels BCA- und FerroZine-Test bestimmt. Die schwarz-karierten Säulen stellen den Eisen-Gehalt im Pellet nach der Extraktion dar, die grau gepunkteten Säulen stellen den Eisen-Gehalt im Extrakt dar.

3.6. Extraktion von Bfr aus der Membranfraktion mit Salz und chaotropen Reagenzien

Vor der Verwendung von Tensiden wurden bereits andere Möglichkeiten getestet, das Bfr aus der Membran in Lösung zu bringen. Hierfür wurden Variationen des Puffer-pHs getestet, was keinerlei Veränderung bewirkte (ohne Abbildung).

Weiterhin wurden hohe Salzkonzentrationen und Harnstoff zur Membranextraktion verwendet. Hierfür wurde die Membran folgendermaßen behandelt:

Tabelle 1: Inkubation von MSR-1-Membranen mit verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff und NaCl, um anhaftende Proteine abzulösen.

Ansatznummer	Harnstoff [M]	NaCl [mM]	Hepes [mM]	pH-Wert
1		1000	50	7,5
2	1	250	50	7,5
3	2	250	50	7,5
4	3	250	50	7,5
5	4	250	50	7,5

Alle Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und danach 1 h bei 100.000 x g, 4 °C, zentrifugiert.

Eine weitere Extraktion mit Na₂CO₃ wurde durchgeführt. Hierfür wurde die Membran mit frisch angesetztem 100 mM Na₂CO₂ behandelt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min bei 20.000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 M Hepes-Puffer auf pH 7,5 eingestellt, das Pellet in 50 mM Hepes pH 7,5 resuspendiert. Der neutralisierte Überstand wurde erneut zentrifugiert, bei 272.000 x g für 30 min bei 4 °C.

Von diesen sechs Ansätzen wurden jeweils von den Überständen und Pellets nach der Extraktion native Gradientengele (6 - 12 % Gradientengele) angefertigt und diese mit der Coomassie- und der Fridovichfärbung angefärbt.

Außerdem wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll Triton X-100 Tensidextrakte der Pellets nach der ersten Extraktion mit NaCl und Harnstoff hergestellt. Auch hier wurden die Überstände und Pellets auf ein natives Gradientengel aufgetragen und mittels Coomassie- und Fridovichfärbung analysiert.

3.7. Klonierung der *bfr*-Gene von *M. gryphiswaldense* in *E. coli*

3.7.1. DNA-Isolation, PCR und Klonierung

Die genomische DNA von MSR-1 wurde mit dem „DNA isolation Kit“ aus einer frischen Übernachtskultur isoliert und auf einem 0,8 % Agarosegel analysiert. Die isolierte DNA diente als Template für einige der nachfolgenden PCRs, bei denen die *bfr*-Gene vervielfältigt wurden.

Für die erste PCR wurden die folgenden Primer verwendet und die PCR unter den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt:

P1 f: 5'-GTATGCGCGGAAGCCCGAAA-3'

P2 r: 5'-ACTTCAGTCCTCCAAGGCG-3'

Die PCR mit den Primern P1 und P2 wurde nach der folgenden Tabelle durchgeführt:

Tabelle 2: PCR mit den Primern 1 und 2 zur Vervielfältigung der *bfr*-Gene aus genomischer DNA von MSR-1. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für die Ligation in *pBadHisb* verwendet.

	Konzentration der Reagenzien, in 50 µl	µl Reagenz/Ansatz	
Nukleasefreies Wasser		29,6 - 37,6	
dNTPs 20 mM	0,2 mM je dNTP	2	
Primer 1 10 µM	0,4 µM	2	
Primer 2 10 µM	0,4 µM	2	
10x Pfu-Puffer ohne MgSO ₄	2 mM	5	
25 mM MgSO ₄	1,5, 2, 2,5, 4 mM	3, 4, 5, 8 µl	
Pfu Polymerase 2,5 U/µl	2 U	0,8	
Template DNA genomisch MSR-1	0,1 µg	0,6	
Schritt	Temperatur °C	Zeit	Wiederholungen
Anfangsdenaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	30 s	30
Anlagerung	55	30 s	
Verlängerung	72	2,5 min	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Ende	4		

Die PCR-Reagenzien wurden zu einem Mastermix vermischt und auf 50 μ l-Aliquots aufgeteilt. Danach wurde die Template-DNA, Wasser und zusätzliches $MgSO_4$ zugegeben, wobei Magnesium als Cofaktor der DNA-Polymerase fungiert.

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte auf einem 1,5 % Agarosegel analysiert, vereinigt und mit dem HiYield PCR Clean-up Kit aufgereinigt.

Zuerst wurde ein PCR-Produkt mit den beiden *bfr*-Genen in den pBasHisb-Vektor kloniert.

Dafür wurde der pBadHisb-Vektor mit *NcoI* verdaut und die Vektorenden mittel T4 DNA Polymerase für eine Blunt-End-Klonierung aufgefüllt. Der Vektor wurde mit der AP thermosensitiven alkalinen Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu verhindern und mit dem HiYield PCR Clean Up Kit, aufgereinigt.

Tabelle 3: Blunting des pBadHisb-Vektors mittels T4 DNA Polymerase

5x Reaktionspuffer	100 μ l <i>NcoI</i> Puffer
Lineare DNA	1 μ g
dNTP Mix 5 mM je dNTP	2 μ l
T4 DNA Polymerase	1 μ l
Nukleasefreies Wasser	----
Gesamtvolumen	104 μ l

Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 104 μ l und wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stopp der Reaktion, wurde die T4 DNA Polymerase bei 75 °C für 10 min inaktiviert.

Tabelle 4: Dephosphorylierung von DNA 5'-Termini, pBadHisb-Vektor

Lineare DNA	1 μ g in 50 μ l
10x Reaktionspuffer für AP	5 μ l
FastAP thermosensitive Alkaline Phosphatase	2,5 μ l
Nukleasefreies Wasser	----
Gesamtvolumen	57,5 μ l

Der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion bei 75 °C für 5 min gestoppt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit der T4 Polynucleotid Kinase phosphoryliert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Phosphorylierungsprotokoll für die P1/P2 PCR-Produkte

PCR-Produkt	90 µl (~12 pmol 5' Termini)
10x Reaktionspuffer A für T4 Polynucleotid Kinase	10 µl
ATP, 100 mM	1 µl
T4 Polynucleotide Kinase	5 µl
Nukleasefreies Wasser	---
Gesamtvolumen	106 µl

Die Mischung wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Polynucleotid Kinase bei 75 °C für 10 min inaktiviert.

Die Ligation von Vektor und Insert wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ligation des bfr-Inserts in den pBadHisb-Vektor

Linearisierte Vektor DNA	90 ng	15 µl
Insert DNA (3:1) molar	67,5 ng	7,5 µl
5x rapid Ligation buffer		6 µl
T4 DNA Ligase 5u/µl		1,5 µl
Nukleasefreies Wasser		---
Gesamtvolumen		30 µl

Die Ligationmischung wurde bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und wurde danach bis zur Transformation im Kühlschrank oder auf Eis gelagert.

Die Transformationen wurden mit *E. coli* XL-1 Blue nach dem Standard-Transformationsprotokoll durchgeführt.

Von den nach der Transformation gewachsenen Kolonien wurde einige ausgewählt und auf frischen LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37 °C, wurde jeweils eine Kolonie in 10 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert, um eine Plasmidpräparation durchzuführen. Hierfür wurde das NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop UV-Vis Spectrometer bestimmt.

Um die Orientierung des Inserts im pBadHisb-Vektor zu bestimmen, wurde die Plasmid-DNA aus mehreren Kolonien der ersten Transformation nach Reinigungsausstrich isoliert und mit AgeI und NcoI verdaut. Die entstandenen Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel analysiert.

Das aus dem Klon K18 isolierte Plasmid enthielt das Insert in der gewünschten Orientierung und die Fragmente nach dem Verdau hatten die erwarteten Größen von 4057 bp, 772 bp und 243 bp.

Eine Sequenzierung wurde durch GATC Biotech durchgeführt und bestätigte die erwartete Sequenz und Orientierung.

Allerdings zeigte sich bei der Testexpression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen keine gute Expression, so dass das Plasmid als Template für eine weitere PCR mit den Primern P5fwBspHI f und P6revNdeI r verwendet wurde, um ein passendes Insert für den pet15b Vektor herzustellen.

Die Primer P5fwBspHI f und P6revNdeI r wurden so gewählt, dass die PCR-Produkte Schnittstellen enthielten, deren Enden mit Schnittstellen des verwendeten Vektors pet15b kompatibel waren. Die Sequenz war ideal, um durch leichte Veränderungen der Sequenz der Primer, die sich nicht auf die spätere Proteinsequenz auswirkten, Schnittstellen für BspHI und NdeI einzufügen, die die Klonierung erleichterten. BspHI schnitt dabei so, dass Enden entstanden, die mit denen der im Vektor vorhandenen NcoI-Schnittstelle kompatibel waren. So war eine Ligation mit „sticky ends“ möglich, die gewährleistete, dass die Inserts in der gewünschten Orientierung in den Vektor eingefügt werden.

Die folgenden Primersequenzen und das Protokoll in Tabelle 7 wurden für die PCR verwendet:

P5fwBspHI f: 5'-GGTCATGAGGGGAAGCCCGAAA-3' BspHI-Schnittstelle
P6revNdeI r: 5'-GAGAACCCCATATGACTTCAGTCCT-3' NdeI-Schnittstelle

Tabelle 7: Für die PCR wurden die folgenden Bedingungen und die Primer P5fwBspHI f und P6revNdeI r verwendet. Die Produkte wurden als Insert für die Ligation in den pet15b-Vektor verwendet.

	Konzentration der Reagenzien, in 50 µl	µl Reagenz/ Ansatz	
Nukleasefreies Wasser		37,2	
dNTPs 20 mM	0,2 mM je dNTP	2	
P5fwBspHI f 10 µM	0,4 µM	2	
P6revNdeI r 10 µM	0,4 µM	2	
10x Pfu-Puffer mit MgSO ₄	2 mM	5	
Pfu Polymerase 2,5 U/µl	2 U	0,8	
Template DNA Plasmid	1 ng	1	
Schritt:	Temperatur °C	Zeit	Wiederholungen
Anfangsdenaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	30 s	23
Anlagerung	65	30 s	
Verlängerung	72	2,5 min	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	1
Ende	4		

Die PCR-Produkte wurden mit dem HiYield PCR Clean-up Kit aufgereinigt und mit BspHI und NdeI verdaut.

Tabelle 8: Verdau von P5fwBspHI f/ P6revNdeI r PCR-Produkten mit NdeI und BspHI

	Verdau von PCR-Produkten mit NdeI und BspHI
Nukleasefreies Wasser	23 µl
10 x Fast digest Puffer	2 µl
DNA	200 ng, 4 µl
Fast Digest Enzym	1 µl pro Enzym
Gesamtvolumen	30 µl

Die DNA wurde für 1 h bei 37 °C mit NdeI verdaut. Es wurde 1 µl BspHI zugegeben und die Mischung für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 80 °C für 5 min gestoppt.

Die geschnittenen PCR-Produkte wurden mit dem HiYield PCR Clean-up Kit aufgereinigt.

Der Vektor pet15b wurde mit NcoI und NdeI geschnitten und mit der FastAP thermosensitiven alkalinen Phosphatase dephosphoryliert. Hierfür wurde die Reaktionsmischung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion bei 65 °C für 15 min. Die Vektor-DNA wurde mit dem HiYield PCR Clean-up Kit gereinigt.

Die Ligation wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit durchgeführt.

Für die Transformation wurden 7,5 µl Ligationsmix mit 75 µl kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, die weitere Transformation wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt (Absatz 3.7.3).

Vier Kolonien wurden ausgewählt und auf frischen LB-Ampicillin Agarplatten ausgestrichen. Nach dem Reinigungsausstrich, wurden jeweils aus Einzelkolonien Übernacht-Flüssigkulturen aus 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angesetzt und bei 37 °C kultiviert.

Hieraus wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid Kit isoliert, mit BamHI geschnitten und auf einem 1 % Agarosegel nach ihrer Größe analysiert.

Die Plasmide der Klone A1 - A4 wurden in *E. coli* BL21-Gold für die Testexpression transformiert. Die Transformation wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Nach dem Reinigungsausstrich wurde die Testexpression durchgeführt. Diese zeigte gute Resultate.

Der Klon A2 wurde für die weitere Produktion des rekombinanten Bfrs (rBfr) nach dem Standardprotokoll ausgewählt.

Um die Bfr Untereinheit 1 mit einem N-terminalen His-Tag herzustellen, wurde eine weitere PCR mit den folgenden Primern unter den Konditionen in Tabelle 9 durchgeführt:

P3fwNde f: 5'-GAGATGCATATGCGCGGAAGC-3' NdeI Schnittstelle

P4rcBamHI r: 5'-ACGGATCCTTACGCGATCTCG-3' BamHI Schnittstelle

Tabelle 9: Für die PCR wurden die folgenden Bedingungen und die Primer P3fwNde f und P4rcBamHI r verwendet. Die erhaltenen Produkte wurden für die Ligation von des *bfr1*-Gens in den *pet15b*-Vektor mit His-Tag verwendet.

	Endkonzentration, 50 µl	µl Reagenz/ Ansatz	
Nukleasefreies Wasser		32,2	
dNTPs 20 mM	0,2 mM je dNTP	2	
Primer P3fwNde f 10 µM	0,4 µM	2	
Primer P4rcBamHI r 10 µM	0,4 µM	2	
10x Pfu-Puffer mit MgSO ₄	2 mM	5	
Pfu Polymerase 2,5 U/µl	2 U	0,8	
Template genomische DNA MSR-1	0,1 µg	6	
Schritt	Temperatur °C	Zeit	Wiederholungen
Anfangsdenaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	30 s	30
Anlagerung	63	30 s	
Verlängerung	72	1,5 min	
Abschließende Verlängerung	72	5 min	
Ende	4		

Die PCR-Produkte und der Vektor *pet15b* wurden wie bereits für die PCR mit den Primern P5fwBspHI f und P6revNdeI r beschrieben, behandelt, aber mit den Enzymen NdeI und BamHI geschnitten.

Der Vektor *pet15b* wurde mit NdeI und BamHI geschnitten.

Die Ligation wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit durchgeführt.

Dafür wurden 7,5 µl Ligationmix mit 75 µl kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen für 30 min inkubiert und dann nach dem Standardprotokoll (Absatz 3.7.3) weiter behandelt.

Fünf Kolonien wurden für weitere Analysen ausgesucht und auf frischen LB-Agar Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Plasmide wurden aus flüssigen LB-Ampicillin-Übernachtskulturen mit dem NucleoSpin Plasmid Kit isoliert, mit BamHI geschnitten und auf einem 1% Agarosegel analysiert.

Die Plasmide aus den Klonen B1 - B5 wurden in *E. coli* BL21-Gold für eine Testexpression transformiert.

Die Transformation wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die ausgesuchten Klone zeigten bei der Testexpression eine gute Expression des *bfr1*-Gens. Der Klon B1 wurde für die weitere Produktion der rekombinanten rBfr1-Untereinheit mit His-Tag nach dem Standardprotokoll ausgewählt.

3.7.2. Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Zellmembranen chemokompetenter Zellen sind durch die Behandlung, in diesem Fall mit CaCl₂, durchlässiger und so in der Lage mit erhöhter Effizienz DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Dies macht man sich bei der Transformation von Nutzen.

10 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. 100 ml LB Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 - 0,8 bei 37 °C kultiviert.

Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und bei 5000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml kalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (v/v)) resuspendiert. Je 200 µl Zellen wurden in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7.3. Transformation

Bei der Transformation werden die Zellen dazu gebracht, Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Hierfür werden sogenannte kompetente Zellen verwendet, die mit erhöhter Effizienz DNA aufnehmen können. Dies wird mit einer kurzen Inkubation bei höherer Temperatur kombiniert (Hitzeschock), was zu einer optimalen Aufnahme der Fremd-DNA durch die Zellen führt.

Kompetente Zellen wurden für 5 min auf Eis aufgetaut. Wenn nicht anders angegeben, wurden 1 - 2 µl Ligationsmix oder Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Länge des darauffolgenden Hitzeschocks bei 42 °C, war vom Bakterienstamm abhängig, der für die Transformation verwendet wurde. *E. coli* XL-1 Blue wurde für 40 s inkubiert, *E. coli* BL21-Gold für 25 s.

Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen sofort auf Eis abgekühlt und für 5 min inkubiert. Danach wurden 900 µl steriles LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert, damit diese die Ampicillin-Resistenz ausbilden konnten.

Je 10, bzw. 100 µl und die herunter zentrifugierten restlichen Zellen, wurden auf frischen LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Einige Kolonien wurden ausgewählt und auf frischen LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin zur Vereinzelung ausgestrichen.

3.7.4. Testexpression der *bfr*-Gene in pBadHisb

Nach der Klonierung der *bfr*-Gene in den pBadHisb-Vektor, wurden die Plasmide in *E. coli* XL Blue-Zellen transformiert. Die anschließende Testexpression wurde unter Einsatz verschiedener L-Arabinose-Konzentrationen durchgeführt, welches bei pBadHisb der Induktion dient. Als Medium diente LB-Medium, welches aus einer frischen Übernachtskultur angeimpft wurde. Proben wurden vor der Induktion und nach 6 h genommen. Diese wurden abzentrifugiert, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem denaturierenden 13 - 20 % SDS-Gel aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* XL Blue-Zellen ohne Vektor verwendet, die ebenfalls mit L-Arabinose versetzt wurden.

3.7.5. Wachstums- und Expressionsbedingungen

100 ml modifiziertes M9-Medium, welches 10 % LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin enthielt, wurde mit einer Kolonie von einer Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 x g, 4 °C, für 10 min abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in modifiziertem M9-Medium mit einem LB-Anteil von 10 % und 100 µg/ml Ampicillin resuspendiert und mit demselben Medium auf 1 l aufgefüllt. Der 2 l-Glaskolben wurde auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Sobald die OD₆₀₀ zwischen 0,6 - 0,8 lag, wurde das Medium mit 300 µM Eisen(II)-sulfat, 5 g Hefeextrakt und 10 g Pepton, gelöst in 100 ml deionisiertem Wasser, aufgefüllt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,4 mM IPTG. Alle Reagenzien wurden vor der Zugabe sterilfiltriert oder autoklaviert.

Für die Expression beider *bfr*-Gene, wurden die Zellen 3 h nach der Induktion geerntet. Wenn die *rBfr1*-Gene mit His-Tag exprimiert wurde, wurden die Zellen nach 5 h geerntet.

Die Zellen wurden bei 5000 x g, 4 °C für 20 min abzentrifugiert und einmal in Waschpuffer (20 mM HEPES, pH 7,5) gewaschen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Membranen abgetrennt, wie bereits für *M. gryphiswaldense*-Zellen beschrieben (Absatz 3.1). Die Isolierung der Einschlusskörperchen, die die rBfr1-His Untereinheit enthielt, erfolgte nach einem gesonderten Protokoll.

3.8. Elektrophoretische Techniken und Färbemethoden

3.8.1. Herstellung von Gradientengelen für die native Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE)

Um Proteine aufzutrennen und sichtbar zu machen, wird die Gelelektrophorese verwendet.

Bei SDS-Gelen werden die Proben vor dem Auftragen mit SDS-haltigem Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 80 °C erhitzt. SDS denaturiert die Proteine und unterbindet die Protein-Protein-Wechselwirkungen. SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zum Plus-Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli 1970).

Bei der Auftrennung auf nativen Gelen wird kein SDS verwendet. Die Ladung der Proteine richtet sich daher im Gel nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des Gelpuffers. Eine Bestimmung des Molekulargewichts ist daher mit nativer Elektrophorese nicht möglich. Einige Proteine werden zum Plus- andere zum Minuspol wandern. Positiv geladene Proteine wandern dabei in den Puffer und gehen verloren. Die Auftrennung erfolgt hier abhängig von der Proteingröße, -ladung, dem pH-Wert und der Gelmatrix. Probleme bereitet hier die Auftrennung von Membranproteinen, die im nativen Gel keine scharfen Banden bilden (Rehm und Letzel 2010).

Native Gele wurden mit Brillantblau G250 oder R250 oder für die Sichtbarmachung von eisenhaltigen Proteinen, mit der modifizierten Methode nach Fridovich (Kuo und Fridovich 1988) gefärbt.

Tabelle 10: Pipettierschema für vier native Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 6 - 12 % Acrylamid

4 Gele	6 % Trenngel [µl]	12 % Trenngel [µl]	Sammelgel [µl]
Acrylamid (40 %)	2400	4800	2000
Puffer (Trenngel/Sammelgel)	4000	4000	5000
H ₂ O	9600	7200	13000
TEMED	30	30	80
APS	30	30	120

Wenn nicht anders angegeben, wurde die native Gelelektrophorese bei 60 V mit 1x Tris-Glycin Puffer für 2,5 - 3 h durchgeführt. Bei zu hoher Raumtemperatur wurde die Elektrophorese im Kühlschrank bei 2 °C durchgeführt.

Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit demselben Volumen 2x SDS Probenpuffer und 2 mM TCEP (Tris(2-chlorethyl)phosphat) gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Dies galt auch für aus nativen Gelen ausgeschnittene Proteinbanden. Diese wurden in 1x Probenpuffer und der entsprechenden Menge Reduktionsmittel inkubiert. Nach der Denaturierung wurde der Überstand auf das SDS-Gel aufgetragen.

Der PageRuler Prestained Protein Ladder wurde als Größenmarker für die Elektrophorese und als Marker für die Übertragung der Proteine während des Blottens verwendet.

3.8.2. Herstellung von Gradientengelen für die denaturierende SDS-PAGE

Es wurden jeweils vier Polyacrylamidgele in einer Apparatur hergestellt. Dabei unterschied sich die Prozedur für native und denaturierende Gele nur in der Menge der Chemikalien und der Zugabe von SDS.

Vor dem Zusammenbauen der Apparatur wurden alle verwendeten Glasscheiben und Aluminaplaten mit reinem Alkohol gereinigt, um diese zu entfetten.

Acrylamid, Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer, deionisiertes Wasser und SDS, bei denaturierenden Gelen, wurden für die verschiedenen Konzentrationen jeweils in einem 50 ml Röhrchen unter dem Abzug gemischt.

Die beiden Trenngellösungen wurden mit TEMED und APS versetzt und vorsichtig gemischt. Die höher konzentrierte Acrylamid-Lösung wurde in die hintere Kammer des Gradientenmischers gegeben und der Hahn kurz geöffnet, um die Luft aus dem Mischer zu verdrängen. Die Lösung mit der niedrigeren Konzentration wurde in die vordere Kammer gegeben und mit einem Magnetrührer auf einer Rührplatte gemischt. Die Pumpe wurde angeschaltet und die Acrylamidlösung durch den Schlauch von unten in die Gießapparatur gepumpt, nachdem der Hahn des Gradientenmischers geöffnet wurde.

Nach dem Gießen des Trenngels wurden der Schlauch der Gießapparatur mit einer Schlauchklemme verschlossen, Pumpe und Gradientenmischer abgetrennt und diese mit deionisiertem Wasser gespült. Die Trenngele wurden mit Propanol überschichtet, um die Geloberfläche während der Polymerisation zu glätten.

Das Trenngel polymerisierte für mindestens 30 min. Danach wurde die Oberfläche mit deionisiertem Wasser gespült und überstehende Feuchtigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt.

Die Sammelgellösung wurde mit TEMED und APS gemischt und auf die Trenngele pipettiert. Die Gelkämme zur Bildung der Taschen wurden eingesetzt. Die Sammelgele polymerisierten für mindestens 30 min bei Raumtemperatur.

Tabelle 11: Pipettierschema für vier denaturierende SDS-Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 13 - 20 % Acrylamid

4 Gele	13% Trenngel [µl]	20% Trenngel [µl]	Sammelgel [µl]
Acrylamid (40 %)	5200	8120	2000
Puffer (Trenngel/Sammelgel)	4000	4000	5000
H ₂ O	6800	3880	13000
SDS 10 %	160	160	320
TEMED	30	30	80
10 % APS	30	30	120

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Proben über die SDS-Polyacrylamidgele bei 100 V mit 1 x Tris-Glycin-Puffer und 0,1 % SDS ca. 1,5 h bei Raumtemperatur aufgetrennt.

3.8.3. Coomassie-Brillant-Blau-Färbung und Eisenfärbung nach Fridovich

Um die Proteine in den nativen und denaturierenden Polyacrylamidgelen anzufärben, wurden die Gele für mindestens eine Stunde im Färbegrad inkubiert und auf einem Schüttler bewegt. Das stark gefärbte Gel wurde daraufhin mehrfach in Entfärber inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt war und die Proteinbanden klar zu sehen waren. Nach dem Entfärben wurde das Gel mehrfach in deionisiertem Wasser gewaschen und danach im Gelrockner bei 60 °C auf Filterpapier getrocknet.

Um eisenhaltige Proteine im nativen Gel nachzuweisen, wurde die modifizierte Fridovich-Färbung verwendet (Kuo und Fridovich 1988).

Hierfür wurden die Gele mit 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 5,0 bedeckt und auf einer Heizplatte erwärmt. Dabei wurden 0,7 - 1 g Diaminobenzoesäure Dihydrochlorid zugegeben. Nachdem dieses sich aufgelöst hatte, wurden 100 µl 30 % H₂O₂ zugegeben und das Gel weiter erwärmt und geschwenkt, bis zur Bandenentwicklung. Danach wurde das Gel mehrfach in kaltem deionisiertem Wasser gewaschen und auf Filterpapier im Gelrockner bei 60 °C getrocknet.

3.8.4. Herstellung von Gelen für die Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gele wurden für die Auftrennung von DNA verwendet. Dafür wurde Agarose (0,7 - 1,5 %) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, bis eine klare Lösung entstanden war. Die Agarose wurde auf Handwärme abgekühlt und mit vier Tropfen einer 0,025 % Ethidiumbromidlösung versetzt. Die Agarose wurde in einen Gelträger gegossen und ein Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt.

Das Gel erstarrte 1 h bei Raumtemperatur, wurde in die Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer eingesetzt und die DNA bei 100 V für 30 – 60 min aufgetrennt. Als Marker wurde der MassRuler DNA-Ladder verwendet.

3.8.5. Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine eines SDS-Gels durch Elektrophorese auf eine Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) übertragen (Towbin, Staehelin et al. 1979). Die Membranen binden die Proteine durch z.B. hydrophobe (Nitrocellulose) Wechselwirkungen. Die Vorteile eines Blots sind vielfältig. Geblottete Proteine können mit Antikörpern reagieren und für zahlreiche andere Anwendungen verwendet werden, da sie nicht mehr eingeschlossen im Gel, sondern offen auf der Membran aufliegen (Rehm und Letzel 2010).

Für den Western Blot wurden die Proteine zuerst auf einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Hierfür wurde ein Gradient von 13 - 20 % Acrylamid verwendet. Als Blot-Modul wurde das Xcell SureLock mit dem XCell II Blot Modul verwendet.

Die für den Western Blot verwendete PVDF-Membran wurde vor der Verwendung kurz in Methanol getaucht und danach in Blotpuffer inkubiert, wofür 1 x Tris-Glycin-Puffer mit 20 % Methanol verwendet wurde.

Zwei Filterpapiere und fünf Blotschwämme wurden mit Blotpuffer getränkt und Schwämme, Filterpapiere, Gel und Membran zu einem Sandwich geschichtet und in das Blotmodul eingesetzt. Die Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt und der äußere Behälter zur Kühlung mit Wasser gefüllt.

Die Proteine wurden für 1 h bei 30 V auf die Membran übertragen. Danach wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie R250 gefärbt und die PVDF-Membran für 1 h in 5 % Milchpulver, gelöst in 1x TBST, inkubiert. Das SDS-Gel wurde in Entfärbelösung inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt war.

Der Erstantikörper (Kaninchen, Anti-rBfr1-His, Serum, 2. Abnahme), wurde in einer 1:5000 oder 1:10000 - Verdünnung in 5 % Milchpulver in 1 x TBST mit 0,2 % Tween 20 angesetzt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schütteln inkubiert.

Die Membran wurde fünfmal für 10 min mit 1 x TBST mit 0,2 % Tween 20 gewaschen und danach mit dem Zweitantikörper (Anti-Kaninchen, Peroxidase Conjugate (POD) 1:80000) oder IRDye800 (1:10000), gelöst in 5 % Milchpulver in TBST mit 0,2 % Tween 20, für eine Stunde bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.

Die Membran wurde dreimal mit 1x TBST (0,2 % Tween 20) und zweimal mit 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen.

Die Membran wurde mit deionisiertem Wasser gespült und für den Fall, dass der IRDye800 verwendet wurde, mit dem Odyssey System eingescannt.

Falls der POD-Antikörper verwendet wurde, wurde die Membran mit Amersham ECL Plus benetzt und mit der LAS-Kamera fotografiert.

3.8.6. Blotten von Proteinen auf eine PVDF-Membran für N-terminale Sequenzierung

Um die Proteine für den automatischen N-terminalen Edman-Abbau vorzubereiten, wurden diese auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Edman-Abbau macht durch schrittweisen Abbau der Proteinkette und Bestimmung der jeweiligen Aminosäure durch die Umsetzung mit Phenylisothiocyanat und anschließende photometrische Bestimmung, eine Analyse der Proteinsequenz möglich (Edman 1949; Edman und Begg 1967).

Die Proteine wurden auf die PVDF-Membran geblottet, wie bereits für den Western Blot beschrieben (3.8.5).

Die Membran wurde in frisch angesetzter 0,1 % Coomassie R250 - Lösung in 40 % Methanol und 1 % Essigsäure für 30 s gefärbt und danach in 50 % Methanol entfärbt, bis der Hintergrund farblos war und die Banden gut sichtbar waren.

Die entfärbte Membran wurde an der Luft getrocknet und die zu sequenzierenden Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die N-terminale Sequenzierung der sichtbaren Banden aus dem rBfr, wurde freundlicherweise von Herrn Rainer Bartels (Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

3.9. Acetonfällung

Dass Proteine mit organischen Lösungsmitteln gefällt werden können, ist schon seit langer Zeit bekannt. Für Proteinlösungen, die auch Lipide enthalten, wie das beispielsweise bei Membranproteinen der Fall ist, ist besonders die Fällung mit kaltem Aceton bei -20°C geeignet, da hierbei auch die Lipide aus der Lösung extrahiert werden (Lottspeich und Engels 2006).

Die Acetonfällung wurde im Verhältnis 1:4 (Proteinlösung/

Aceton) durchgeführt und die Proteine über Nacht bei -20°C gefällt. Diese wurden abzentrifugiert und für eine Überprüfung auf dem SDS-Gel direkt in Probenpuffer aufgenommen und bei 80°C für 10 min denaturiert.

3.10. Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung und auch zur Größenbestimmung der Proteine wurden verschiedene Chromatographiesäulen eingesetzt:

3.10.1. Gelfiltration - Größenausschlusschromatographie

Gelfiltration basiert auf der Trennung der Moleküle nach ihrer Größe durch eine poröse Matrix. Große Moleküle passieren die Matrix dabei schneller, während kleine Moleküle durch die Poren wandern, was ihre Aufenthaltsdauer auf der Säule verlängert. Durch die Verzögerung kleinerer Proteine in der Säulenmatrix, werden kleine und große Proteine voneinander getrennt (Healthcare 2010).

3.10.2. Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine nach ihren Ladungsunterschieden getrennt. Dabei binden Proteine bei einem pH-Wert oberhalb ihres isoelektrischen Punktes an ein positiv geladenes Medium (Anionenaustauscher) und unterhalb an ein negativ geladenes (Kationenaustauscher). Der Ionenaustauscher ist eine Matrix, die mit negativ oder positiv geladenen Gruppen assoziiert ist. Gebundene Proteine können durch die Erhöhung der Ionenstärke (Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer) oder des pH-Wertes eluiert werden (Healthcare 2010).

3.10.3. Metallchelatchromatographie

Die Metallchelatchromatographie ist eine Form der Affinitätschromatographie. Dabei wird die Affinität von Poly-His-Peptiden (6 x His-Tag) zu mit Ni^{2+} -Ionen geladenen Nitriloessigsäure (NTA)Resten ausgenutzt (Hochuli 1990). Durch die starke Bindung des His-Tags an das Ni-NTA-Säulenmaterial, können Kontaminationen unter verschiedenen Bedingungen von der Säule gewaschen werden, ohne

dass sich das aufzureinigende Protein ablöst. Daher kann schon in einem Reinigungsschritt relativ sauberes Protein erhalten werden.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Bindung des His-Tags unabhängig von der Tertiärstruktur des Proteins erfolgt, so dass auch aufgelöste Einschlusskörperchen, die beispielsweise in 8 M Harnstoff aufgenommen werden müssen, mit einer Ni-NTA-Säule gereinigt werden können. Die Ablösung des zu reinigenden Proteins erfolgt idealerweise in einem linearen Imidazol-Gradienten (Crowe, Dobeli et al. 1994).

3.11. Aufreinigungsprotokolle für die Isolation der rekombinanten Proteine aus *E. coli* BL21 Gold

Das rBfr, bestehend aus beiden Untereinheiten und das rBfr1-His, wurde mithilfe verschiedener Protokolle über Säulenchromatographie aufgereinigt.

3.11.1. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs

Rekombinantes Bfr (rBfr) wurde aus der löslichen Proteinfraction nach dem Aufschluss aus *E. coli* BL21-Gold gewonnen. Dafür wurden jeweils 4 ml lösliche Proteinfraction über eine 118 ml (1,5 x 67 cm) Sephacryl S300 - Säule mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) aufgetrennt. Die Proteine wurden in jeweils 2 ml-Fractionen gesammelt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Fractionen, die rBfr enthielten, wurden zusammen geführt und für die weitere Aufreinigung auf eine 1 ml Bio-Scale Mini Macro-Prep High Q Anionenaustauschersäule gegeben. Die gebundenen Proteine wurden im linearen Gradienten von 0 - 150 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, eluiert.

Die eluierten Fractionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Fractionen, welche das saubere rBfr enthielten, wurden durch Zentrifugation über eine 100 K-Macrosep-Membran auf eine Proteinkonzentration von 2,5 - 13 mg/ml gebracht. Das gereinigte Protein wurde bei -20 °C gelagert.

3.11.2. Aufreinigung des rBfr1-His

rBfr1-His wurde aus Einschlusskörperchen aufgereinigt. Diese bestehen meist aus unvollständig oder fehlgefalteten Proteinen und werden häufig bei der Überexpression rekombinanter Proteine gebildet (Baneyx und Mujacic 2004). Für die Aufreinigung dieser Einschlusskörperchen wurden die Zellen in kaltem 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 aufgeschlossen, wie bereits beschrieben (3.3). Ganze Zellen und Bruchstücke wurden bei 5000 x g, 4 °C für 2 x 10 min abzentrifugiert.

Um die Einschlusskörperchen zu gewinnen, wurde der geklärte Überstand für 20 min bei 12.000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte fanden unter denselben Bedingungen statt.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 mit 1 % Triton X-100 und 1 M NaCl aufgenommen.

Nachdem das Pellet erneut abzentrifugiert wurde, wurde es einmal in 50 mM Hepes, pH 7,5 gewaschen und danach in demselben Puffer resuspendiert. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gradienten-polyacrylamidgel analysiert.

Die Einschlusskörperchen wurden in 8 M Harnstoff, 0,5 M NaCl, 20 mM Natriumdihydrogenphosphat und 30 mM Imidazol, pH 7,5 (Bindepuffer) aufgelöst. Hierfür wurden die Einschlusskörperchen für 30 min bei Raumtemperatur im Bindepuffer inkubiert und die ungelösten Bestandteile dann bei 12.000 x g und 20 °C für 20 min abzentrifugiert.

Danach wurde der Überstand mit dem rBfr1-His auf eine NiNTA-Säule (HisTrap HP 2 x 1 ml) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min aufgetragen.

Die Säule wurde mit Bindepuffer mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min gespült. rBfr1-His wurde im linearen Gradienten (30 – 500 mM Imidazol) aus Binde- und Elutionspuffer (20 mM Natriumdihydrogenphosphat, 500 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 8 M Harnstoff, pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 30 ml eluiert.

Die Reinheit des rBfr1-His wurde auf einem SDS-Gradientenpolyacrylamidgel analysiert.

Die Proteine wurden gegen 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlichem Rühren dialysiert (Porengröße 3500 Da). Die dialysierten Proteine wurden zentrifugiert und Pellet und Überstand auf einem SDS-Gradientenpolyacrylamidgel analysiert.

Das meiste Protein befand sich im löslichen Überstand. Daher wurde die Proteinkonzentration mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt und 1 mg Protein wurde für die Produktion von polyklonalen Antikörpern zu BJ Diagnostic BioScience gegeben.

Das erhaltene Serum der zweiten Abnahme mit den Antikörpern wurde für den Western Blot verwendet.

3.12. Bestimmung des Molekulargewichts von rBfr und Auftrennung der Untereinheiten

Das Molekulargewicht des rBfrs wurde durch zwei Methoden bestimmt. Zum einen wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde eine Sephacryl S300 HR-Säule verwendet. Zum anderen wurde das Molekulargewicht mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt.

Zur Kalibrierung der S300 - Säule für die Größenbestimmung des rBfrs, wurde 1 ml eines Proteingemisches aus 4,2 mg Pferdeferritin, 1,5 mg Rinder Immunglobulin G und 1,5 mg Conalbumin aus Hühnerei, verwendet. Als Puffer wurden 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 500 mM NaCl verwendet.

Derselbe Lauf wurde auch mit 1 mg gereinigtem rBfr zur Bestimmung des Molekulargewichts durchgeführt. Die S300-Säule wurde mit 1 ml/min betrieben.

Um eine ungefähre Größenbestimmung des Bfrs aus *Magnetospirillum gryphiswaldense*-Membranen durchzuführen, wurde ein Membranextrakt aus MSR-1B, der mit Triton X-100 hergestellt wurde (siehe S. 26), verwendet.

Die S300-Säule wurde für den Säulenlauf mit einem Puffer mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl und 0,02 % Triton X-100 equilibriert. Der Kalibrierungslauf und der anschließende Trennlauf mit dem

Membranextrakt, wurden mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min und unter einheitlichen Pufferbedingungen durchgeführt. Die gewählte Fraktionsgröße betrug 2 ml.

Auch die löslichen Proteine von MSR-1 wurden über diese Gelfiltrationssäule aufgetrennt und die Fraktionen auf ihren Cytochromgehalt hin überprüft. Dazu wurden die Fraktionen in einer Mikrotiter-Platte im iMark Microplate Reader bei 415 nm gemessen. Dies diente auch dem Ausschluss von Bfr im löslichen Überstand.

3.13. Dynamische Lichtstreuung - DLS

Die dynamische Lichtstreuung ist eine Methode, mit der es möglich ist, das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen. Hierfür wird der Diffusionskoeffizient der Partikel bestimmt, indem die Streuung des Lichts über die Zeit gemessen wird. Globulare Proteine sind ideal für die Molekulargewichtsbestimmung mittels DLS (Takeuchi, Nakatani et al. 2014). Vorteile der DLS sind, dass eine DLS-Messung nur sehr wenig Zeit in Anspruch nimmt und die Proteine dabei nicht beschädigt werden. DLS-Messungen sind auch geeignet, um die Interaktionen zwischen Proteinen zu beschreiben (Murphy 1997).

DLS wurde genutzt, um das Molekulargewicht des aufgereinigten rBfrs zu bestimmen, wobei hier zehn Messungen mit 20 µl gereinigtem rBfr durchgeführt wurden. Die Konzentration betrug 1,25 mg/ml rBfr.

Die DLS-Messung wurde freundlicherweise von Dr. Jeroen Mesters (Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck) durchgeführt.

3.14. Auftrennung der rBfr-Untereinheiten

Zur Auftrennung der rBfr-Untereinheiten, wurde das rBfr im nativen Gel aufgetrennt und jeweils eine Bande mit Coomassie- und Fridovich-Färbung angefärbt.

Der Bereich im Coomassie-gefärbten Gel, der der eisengefärbten rBfr-Bande im nativen Gel entspricht, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und erneut bei 95 °C im Heizblock denaturiert.

Der erhaltene Überstand wurde auf ein SDS-Gradientengel (13 - 20 %) aufgetragen, um zu sehen, ob eine oder zwei Untereinheiten im Gel zu erkennen sind. Das SDS-Gel wurde mit der Coomassie-Färbung angefärbt.

3.15. Bestimmung und Berechnung des Häm-Gehalts mit der Pyridin-Hämochrom-Methode

Bei der Pyridin-Hämochrom-Methode, wird für die Bestimmung des jeweiligen Häm-Typs die Analyse der absorbierten Wellenlänge herangezogen. Da die Häm-Gruppen bei der Pyridin-Hämochrom-Methode extrahiert werden, können den verschiedenen Häm-Typen, unabhängig vom bindenden Protein, charakteristische Absorptionsmaxima für reduzierte und oxidierte Zustände zugeordnet werden (Williams 1964).

Für die Bestimmung der Häm-Typen mittels Pyridin-Hämochrom-Methode, wurden 500 µl Proteinlösung mit 300 µl Pyridin und 100 µl 0,6 MKOH vermischt und denaturiert. Die Mischung wurde mit 5 µl 1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert und das Spektrum im Photometer aufgenommen.

Die Mischung wurde nach der ersten Messung mit einer kleinen Spatelspitze festen Natriumdithionits reduziert. Es wurden mehrere Spektren bis zur vollständigen Reduktion aufgenommen.

Das oxidierte wurde von dem am Stärksten reduzierten Spektrum abgezogen und das erhaltene Differenzspektrum verwendet, um die Häm-Gruppen zu identifizieren.

Gemessen wurden rBfr, mit 1 % SDS extrahierte Membranen von MSR-1, lösliche Proteine von MSR-1 und mittels Gelchromatographie aufgetrennte Fraktionen von MSR-1, die zuvor bei 415 nm im Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer gemessen worden waren.

3.16. Eisenbestimmung des rBfrs durch FerroZine-Test und Berechnung des Eisengehalts des rBfr-Proteins

Um die Menge des im rBfr gespeicherten Eisens zu messen, wurde eine Bestimmung des Eisengehalts mithilfe der modifizierten Methode nach Fish (Fish 1988) durchgeführt.

Hierfür wurde eine Kalibrierkurve mit Eisenstandards von 0,025 µg Fe - 4 µg Fe zusätzlich zu den Proben vorbereitet.

Jeweils 170 µl der zu bestimmenden Probe wurden mit 170 µl des frisch angesetzten Reagenz A gemischt und bei 60 °C für 2 h in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit Öffnung inkubiert. Die Ansätze wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit jeweils 17 µl Reagenz B gemischt. Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 20.000 x g für 3 min abzentrifugiert. Von den Überständen wurden jeweils 250 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und bei 560 nm im iMark Microplate Reader gemessen.

Mit Microsoft Excel wurde die Kalibrierkurve für den Eisentest erstellt und danach die Eisenkonzentrationen für die einzelnen Proben berechnet.

Für die Eisenbestimmung des rBfrs wurden je drei Ansätze zweier rBfr-Präparationen mit bekannter Proteinkonzentration verwendet. Je 2, 5 und 15 µl der Präparationen wurden für die Eisenbestimmung eingesetzt. Aus den errechneten Eisenkonzentrationen wurde mithilfe des Molekulargewichts des Bfrs, die durchschnittliche Eisenbeladung eines Bakterioferritins berechnet.

3.17. Konzentrationsbestimmung bei Proteinen durch den BCA-Test

Um die Konzentration der gereinigten Proteine und auch einiger fraktionierter Proteine zu bestimmen, wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet.

Der BCA-Test beruht auf der Reaktion von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) mit einwertigen Kupferionen zu einer violetten Verbindung, die photometrisch bestimmt werden kann. Der Reaktion werden zweiwertige Kupferionen zugesetzt, die quantitativ mit dem zu messenden Protein zu einwertigen Kupferionen reagieren. Der farbige Komplex wird bei 562 nm gemessen (Smith, Krohn et al. 1985; Olson und Markwell 2007). Die Reaktion wurde bei 37 °C im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt und bei 560 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Als Eichprotein wurde BSA verwendet.

3.18. Bindung von rBfr an DNA

Um die Wechselwirkung von Bfr mit DNA zu untersuchen, wurden 10 nM pUC19-Plasmid-DNA mit rBfr verschiedener Konzentrationen unter Zugabe von 50 mM Mops-Puffer mit 50 mM NaCl versetzt. Diese Ansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 4,4 µM BSA mit 10 nM pUC19-Vektor inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf einem 1 % Agarosegel analysiert (100 V, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid).

Tabelle 12: Pipettierschema Bindung von rBfr an DNA

Ansatz- nummer	pDNA	rBfr		BSA [µM]	Nukleasefreies Wasser [µl]	Mops, 20 x
		rBfr [µM]	rBfr [µl]			
1	pUC19 10 nM 0,354 µl	0,25	0,23	-	8,916	0,5 µl 50 mM Mops, pH 7,0 50 mM NaCl
2		0,5	0,46		8,686	
3		0,75	0,69		8,456	
4		1	0,92		8,226	
5		1,5	1,38		7,766	
6		2	1,84		7,306	
7		2,5	2,3		6,846	
8		3	2,76		6,386	
9		4	3,68		5,466	
10		5	4,6		4,546	
11		6	5,52		3,626	
12		7	6,44		2,706	
13		8	7,36		1,786	
14		9,94	9,146		0	
15	-	-	4,4			

3.19. Schutz der DNA vor oxidativem Stress

Die Plasmid-DNA wurde mit rBfr für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um oxidativen Stress auszulösen, wurden frische Fe(II)-sulfat-Lösung und H₂O₂ zugesetzt und die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,7 µl einer 20 % SDS-Lösung zugegeben und die Mischung für 2 min bei 85 °C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit Wasser und BSA statt rBfr verwendet.

Tabelle 13: Pipettierschema Schutz der DNA vor oxidativem Stress

DNA-Schutz	pet15b [µl]	pUC19 [µl]
DNA 12 nM	2,065	2,1
BSA 4,4 µM/H ₂ O/rBfr 6 µM	2,76	2,76
Puffer 0,2 M Mops, 0,2 M NaCl pH 7,0	1,2	1,2
Fe(II)-Sulfat 76 µM	0,5	0,5
H ₂ O ₂ 1,15 mM	0,5	0,5

3.20. Flotation von Membranen

Bei einer Flotation werden die zu flotierenden Bestandteile mit einer hochkonzentrierten Saccharoselösung eingestellt und mit entsprechend geringeren Konzentrationen überschichtet. Während der Zentrifugation reichern sich die Bestandteile entsprechend ihrer Dichte in den verschiedenen konzentrierten Saccharoseschichten an. Hierdurch kann eine Trennung bzw. Fraktionierung erreicht werden (Gibeaut und Carpita 1990).

Für den Flotationsversuch wurde Saccharose in 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 gelöst. Membranpellets von MSR-1 und MSR-1B wurden in 0,8 ml 60 % Saccharoselösung (w/v) resuspendiert und mit je 0,6 ml 50 % Saccharoselösung (w/v), 45 % Saccharoselösung (w/v), 35 % Saccharoselösung (w/v) und 25 % (w/v) Saccharoselösung überschichtet. Dabei wurden die 35 % und 50 % Saccharoselösung für die bessere optische Trennung der Schichten mit einer geringen Menge Bromphenolblau angefärbt.

Die Gradienten wurden für 14 h bei 200620 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Schichten wurden von unten nach oben mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Fraktionen wurden mit 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 verdünnt und mit Aceton bei -20 °C über Nacht gefällt (Absatz 3.9).

Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 16000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets für 1 min bei 95 °C getrocknet. Die trockenen Pellets wurden in 1 x SDS-Probenpuffer mit 3 mM TCEP aufgenommen und für 10 min unter Schütteln bei 95 °C denaturiert.

Die Proben wurden für SDS-PAGE und Western Blot verwendet.

3.21. Polyklonale Antikörper

Ein Antigen ist eine Verbindung, die, in ein Versuchstier injiziert, die Bildung von Antikörpern stimuliert und auch spezifisch mit diesen reagiert.

Für die Herstellung von Antikörpern ist die Verwendung eines reinen Antigens von großer Bedeutung. Um die immunologische Stärke des löslichen Antigens zu erhöhen, werden Adjuvantien verwendet, die gewährleisten, dass das Antigen über längere Zeit im Körper des Versuchstieres bleibt. Ein Adjuvans ist jede Substanz, die die Immunantwort auf ein Immunogen erhöht. Häufig verwendet wird das Freundschsche Adjuvans, welches auf einer Öl/Wasser-Emulsion basiert.

Als Versuchstiere für die Antikörperproduktion werden meist Kaninchen, Ziegen, Meerschweinchen etc. verwendet. Für die meisten Applikationen findet eine subkutane Injektion statt.

Die Antikörperbildung wird in zwei Phasen unterteilt. Nach der ersten Injektion kommt es nach 5 - 7 Tagen zur Primärantwort, bei der es zur Zunahme der Konzentration der Serum-Antikörper kommt. Bei der zweiten Injektion des Immunogens nach Abklingen der Primärantwort tritt die Sekundärantwort (anamnestische oder Gedächtnis-Antwort) ein. Diese besitzt eine höhere Konzentration an Antikörpern, wobei weniger Antigen gegeben werden muss (Booster-Injektion) (Cooper 1981). Nach der Blutabnahme am Versuchstier wird das Serum abgetrennt und lyophilisiert (Rehm und Letzel 2010).

Die Gewinnung der Antikörper wurde von der Firma BJ Diagnostic BioScience durchgeführt.

3.22. Mößbauerspektroskopie

Die Mößbauerspektroskopie beruht auf dem Mößbauereffekt, der im Jahr 1957 von Rudolph Mößbauer entdeckt wurde (Gütlich, Bill et al. 2011).

Die Mößbauerspektroskopie ist eine Technik, die auf der rückstoßfreien Absorption von γ - Strahlen durch einen Atomkern beruht. Voraussetzung für die rückstoßfreie Absorption ist, dass sich die Atomkerne sowohl des γ - Emitters als auch des γ - Absorbers in einem Kristallgitter befinden. In Festkörpern wird dann durch quantenmechanische Effekte die Rückstoßenergie vernachlässigbar. Dies führt dann zu einer rückstoßfreien Kernresonanzabsorption, wenn die Strahlung einer γ - Quelle eines bestimmten Elements von einem Absorber, bestehend aus Atomen desselben Elements im Kerngrundzustand, wieder absorbiert wird. Die γ - Strahlen emittierende Quelle als auch der Absorber befinden sich jedoch in einer jeweils anderen atomaren (chemischen) Umgebung. Um dennoch eine resonante Absorption im Absorber zu erreichen, bedarf es einer Energiemodulierung der γ - Strahlung durch den Doppler-Effekt mittels mechanischer Bewegung der radioaktiven γ - Quelle. Diese Absorption lässt sich mittels eines geeigneten Detektorsystems als Abnahme der γ - Strahlungsintensität (Transmission) in Abhängigkeit der modulierten γ - Energie, gemessen in mm^{-1} , nachweisen.

Es sind verschiedene Mößbauerisotope bekannt, wobei ^{57}Fe besonders häufig verwendet wird. ^{57}Fe ist ein natürliches, nicht radioaktives Isotop, welches natürlicherweise mit einer Häufigkeit von 2.12 % vorkommt. Als Mößbauerquelle für ^{57}Fe wird radioaktives ^{57}Co eingesetzt, das bei seinem Zerfall in ^{57}Fe übergeht. ^{57}Fe -Atome in unterschiedlicher atomarer Umgebungen und in unterschiedlichen Oxidationszuständen absorbieren bei verschiedenen, typischen Energien, die sich in Transmissionsmößbauerspektren (TMS) diskriminieren lassen. TMS werden mit speziellen Programmen ausgewertet, wobei man die experimentellen Spektren durch Lorentzlinien mit Hilfe der Methode der kleinsten

Fehlerquadrate anpasst. Die wichtigsten Mößbauerparameter, die auf diese Weise ermittelt werden, sind die Isomerieverschiebung δ [mm.s⁻¹], Quadrupolaufspaltung ΔE_Q [mm.s⁻¹] und magnetische Aufspaltung (Hyperfeinfeld) B_{hf} [T]. δ und ΔE_Q geben Auskunft über Oxidationsstufe, Art der Liganden (z.B. O, N, S) und Symmetrie des Eisenkomplexes. B_{hf} beschreibt kooperative Phänomene wie Ferro-, Ferri-, Antiferro- und Supermagnetismus. Insbesondere die kooperativen Phänomene zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit, z.B. der superparamagnetische Übergang von tierischen Ferritinen unterhalb von 77 K, bei der ein Quadrupoldublett in ein magnetisches Sextett aufspaltet.

Die zentrale Bedeutung von Eisen für eine Vielzahl metabolischer Prozesse macht die Mößbauerspektroskopie auch für die Untersuchung eiseninvolvierender Prozesse und biochemischer Reaktionen interessant (Böttger und Matzanke 2011; Matzanke 2011; Matzanke, Brandenburger et al. 2011). Dies gilt sowohl für isolierte Enzyme und deren Reaktionen als auch für die Analyse des zellulären Eisenstoffwechsels und dessen Dynamik (Matzanke, Ecker et al. 1986; Matzanke, Bill et al. 1987; Matzanke, Berner et al. 1991; Matzanke, Anemüller et al. 2004; Faivre, Böttger et al. 2007; Boughammoura, Matzanke et al. 2008; Uebe, Voigt et al. 2010; Uebe, Junge et al. 2011). Zeitabhängige Prozesse können so mit einer zeitlichen Auflösung verfolgt werden, die allein durch die Zeit für die Probenpräparation begrenzt ist (z.B. durch Abkühlung auf 1 °C) (Matzanke, Ecker et al. 1986; Matzanke, Bill et al. 1987; Matzanke, Berner et al. 1991).

Eine Limitierung bei der mößbauerspektroskopischen Untersuchung von biologischen Proben liegt in der niedrigen natürlichen Häufigkeit von ⁵⁷Fe. Dieses Problem kann man jedoch durch Wachstum in ⁵⁷Fe-haltigen Medien (z.B. ⁵⁷Fe³⁺(Citrat)₂ oder ⁵⁷Fe²⁺-Ascorbat) deutlich verringern. Durch Anzucht von Zellen in einem Eisenmangelmedium und Zugabe von ⁵⁷Fe bei einer gewählten Zelldichte, lässt sich die *de novo* Bildung von Eisenmetaboliten und die weitere Verstoffwechslung des Eisens verfolgen. Allerdings liegen die niedrigsten intrazellulären Konzentrationen von Eisenmetaboliten, die noch mößbauerspektroskopisch nachweisbar sind, bei 300 – 400 µM bei einem Zellvolumen von 700 – 1000 µl. Nur Hauptmetabolite des Eisenstoffwechsels können also zweifelsfrei identifiziert werden. Solche Messungen erfordern messtechnisch eine starke Mößbauerquelle (50 – 100 mCi) und lange Messzeiten, was eine hohe Stabilität aller Komponenten eines Mößbauerspektrometers sowie eine stabile Stromversorgung voraussetzt.

Die Transmissionsmößbauerspektren wurden bei Temperaturen von 4,2, 80 oder 130 K von Dr. Eckhard Bill (Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion, Mühlheim an der Ruhr), Dr. Lars Böttger (bis 2013 Institut für Physik, Universität zu Lübeck, derzeit Stanford University, CA, USA) und Prof. Dr. Berthold Matzanke-Markstein (bis 2013 Isotopenlabor SN, Universität zu Lübeck) gemessen und gefittet.

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Mößbauerproben wurden während der Kultivierung mit ⁵⁷Fe angereichert. Um vor der Kultivierung den Eintrag von anderen Eisen-Spezies zu verringern, wurden die verwendeten Glasgefäße vor der Verwendung eisenfrei gewaschen. Hierfür wurde 25 % HCl verwendet. Die Glasgefäße wurden dreimal mit HCl gespült und danach dreimal mit je einem halben Flaschenvolumen deionisiertem Wasser gewaschen und im Trockenschrank getrocknet.

Da die lösliche Proteinfraction aus *M. gryphiswaldense* nur in verdünnter Form gewonnen werden konnten, wurden diese Fraktionen durch Gefriertrocknung konzentriert. Dieses Verfahren wurde gewählt, da hier ein Verlust von Eisen auszuschließen war.

3.23. Kristallisation des Bakterioferritins

Proteinkristalle werden für die Strukturanalyse des Proteins benötigt. Hierbei soll am Kristall ein eindeutiges Röntgenbeugungsmuster erzeugt werden, welches Aussagen über die dreidimensionale Struktur der Proteine zulässt.

Für die Strukturanalyse sollte das rBfr von *M. gryphiswaldense* kristallisiert werden. Es wurden hierfür verschiedene Bedingungen ausgetestet. Verwendet wurde hierfür das Structure Screen 1 & 2 HT-96-Kit zur Abdeckung möglichst vieler pH- und Pufferkonditionen für erste Tests. Das Protein wurde vor der Kristallisation in Tris-Puffer, pH 7,5 auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt und 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um Staub und ungelöste Partikel zu sedimentieren. Es wurde Protein mit und ohne den Zusatz von 0,1 mM Dodecylmaltosid verwendet. Dies verbesserte die Löslichkeit des Proteins jedoch nicht, da Konzentrationen über 0,5 mg/ml ausfielen, so dass später nur noch Protein ohne Zusatz von Dodecylmaltosid verwendet wurde.

Bedingungen, unter denen sich nach einigen Tagen Kristalle gebildet hatten, wurden weiter verfolgt. Kristalle hatten sich z.B. bei 0,1 M Natriumacetat, pH 4,6 und 8 % (w/w) PEG 4000 gebildet. Auch bei pH 8,5 mit 0,2 M Natrium-Citrat wurde Kristallbildung beobachtet. Die Kristalle waren überwiegend scheiben- oder nadelförmig.

Die folgenden Ansätze wurden zur weiteren Optimierung bei den pH-Werten 4,6 und 8,5, unter Einsatz der Salze Natrium-Citrat, Natrium-Acetate, Natrium-Formiat, Natrium-Tartrat und Natrium-Malonat angefertigt.

Den Ansätzen bei pH 4,6 wurden 8 % (w/v) PEG 4000 und den Ansätzen bei pH 8,5 30 % (v/v) PEG 400 zugesetzt. Auf den Kristallisationsplatten wurden dabei jeweils Ansätze mit 2 µl Protein (0,5 mg/ml) und 1 µl Puffer gemischt, bzw. auch Ansätze mit 1 µl Protein und 1 µl Puffer angesetzt. Die Reservoirs wurden dabei jeweils mit 0,5 ml des Fällungspuffers aufgefüllt. Die Platten wurden dicht mit einer Klarsichtfolie verschlossen und die Kristallbildung unter dem Binokular bis zu 2 Wochen lang verfolgt.

Natrium-Citrat und -Malonate schienen am erfolgversprechendsten zu sein, so dass ausschließlich diese Ansätze bei pH 8,5 weiter verfolgt wurden. Dabei wurde die Fällung des Proteins im Verhältnis 2 µl Protein/ 1 µl Puffer beibehalten.

Von einem scheibenförmigen Kristall (0,2 M Citrat, pH 8,5, 30 % PEG400, 0,1 M Tris), wurde ein Röntgenbeugungsmuster aufgenommen. Die Auflösung lag hierbei bei 7,71 Å. Dieses wurde von Dr. Jeroen Mesters (Institut für Biochemie, Universität zu Lübeck) aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung - Sequenzierung der DNA Sequenz K18

Um die Orientierung und Korrektheit der *bfr*-Gene, die in den pBadHisb-Vektor kloniert wurden, zu überprüfen, wurden einige der nach dem Testverdau infrage kommenden Klone sequenziert. Die folgende Sequenz ist die des Klons, der für die erste Testexpression verwendet wurde. Da hierbei die Expressionsausbeute sehr gering war, wurde das Plasmid aus dem Klon isoliert und als Template für die Umklonierung der *bfr*-Gene in den pet15b-Vektor verwendet. Außerdem wurde ein Vergleich der Sequenz mit der NCBI-Blast-Datenbank durchgeführt.

Das K18 - Plasmid (pBadHisb, welcher ein Insert, bestehend aus den codierenden Sequenzen für *bfr1* und *bfr2*, enthält), zeigte die erwartete Sequenz und 100 % Identität im BLAST - Alignment mit den *bfr*-Genen von *Magnetospirillum gryphiswaldense* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ACGCTTTTATCGCACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAACACCGGGAATTAACCATGGTATGCGCGGAAGCCGAAAAGTGATAAGCG < 100
 M R G S P K V I S V

TTCTCAATGGGCTGCTGACGGGGAGCTGACCCTGACCAGTATTTTCGTCATGCCCGCATGTTGGAAAAGTGGGGCTTCAAAGTGCTTTATGAACG < 200
 L N G L L T G E L T A A D Q Y F V H A R M L E N W G F K V L Y E R

CATCGAGCATGAACGCCATGACGAGTTGGACCATGCCGGCTTGCTGATCAACCGCATCTGTTCTTGGAAAGGCGTGCCCGACGTGGCCAGCCGGGCGGCG < 300
 I E H E R H D E L D H A G L L I N R I L F L E G V P D V A S R A A

CTGAATATCGGTTCGGATGTGCCAAGATGATGGCCAACGATCTGGCCTATGAGCTGCAAGTGGTGACGAGTTGAAAAGCGGCCATCGCCCTTTGCGAAT < 400
 L N I G S D V P K M M A N D L A Y E L Q V V D E L K A A I A L C E S

CCGAGCGCGATTACGACACCCTGCGCATCTGCTGGAAGAGACCGAGCAGGACCACGTGCGCTGGCTGGAAAGTGCAGGTCGGCCTGATCGA < 500
 E R D Y D T R R I L V H L L E E T E Q D H V R W L E V Q V G L I D

CAAGCTGGGCCTGAAGAATTATCTGCAAAGCGCCGCTGGCAGATCGGTAAACCGGACCTGCGAATGAAAAGCCAAACCGCACCGTGTGGCCGCGCTTAACG < 600
 K L G L K N Y L Q S A A G E I A * M K A N R T V L A A L N D

ACGTGCTGCGCATCAGCTGACCGCCATCAATCAGTATTTCTGACGCCCAGCATGATGAAGAATTGGGGCTTCAAACGCCCTGGTAAGCATGAATACAA < 700
 V L R H Q L T A I N Q Y F L H A R M M K N W G F N A L G K H E Y K

GGAAATCCATCGAGGAGATGAAGGCCGCCGACAAAGCTGATCGAGCGCATCTTGCTGCTGGAAGGCTACCCAATCTGCAGGATCTGGCAAGCTGCTGATC < 800
 E S I E E M K A A D K L I E R I L L L E G L P N L Q D L G K L L I

GGCAAAACGTGCCGAAAATGCTGAAGAAGGACTTTCGCCATGAAAAGGACGCCCATGCGGATTTGGTGAAAGACCATCGCGCTTTGCGAAAAGCAGGCCG < 900
 G E N V P E M L K N D F A M E K D A H A D L V K T I A L C E K Q A D

ATTACGTCAGCCGCGATCTGCTGAGCGAGTTTCTGGAAGAATGCGAGGAACGCATGGACTTCTATGAAACCAGCTGGAAGTGAAGAAAGATGGGCGA < 1000
 Y V S R D L L S E F L E E C E E R M D F Y E T Q L E L V K K M G E

GCAGAATTATCTGCAATCCGCCGTCGGCGCCCTTGAGGACTGAAGTCATGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGG < 1100
 Q N Y L Q S A V G A L E D *

Abbildung 7: Sequenzierung des pBadHisb-Vektors mit den bfr-Genen. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde mit der Blast-Datenbank verglichen. Die Sequenzen stimmten zu 100 % überein. Markiert wurden die Ribosomenbindungsstelle (grün) sowie Start- und Stoppcodons (gelb).

4.2. PCR-Produkte

Für die Klonierung der *bfr*-Gene in die *pet15b*- und *pBadHisb*-Plasmide, wurden PCRs mit verschiedenen Primern durchgeführt, um die DNA zu vervielfältigen und Inserts mit den richtigen Schnittstellen zu gewinnen. Die Größe, Menge und Reinheit der Produkte wurde vor der Klonierung auf Agarosegelen überprüft und die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt.

Der DNA-Abschnitt, der die *bfr1* und *bfr2*-Gene enthält, wurde unter Verwendung der Primer 1 und 2 vervielfältigt. Es entstand nur ein Produkt mit der erwarteten Größe von 974 bp. Die Ausbeute war bei niedrigen $MgSO_4$ -Konzentrationen am höchsten (Abbildung 8). In der Negativkontrolle waren keine Produkte nachweisbar.

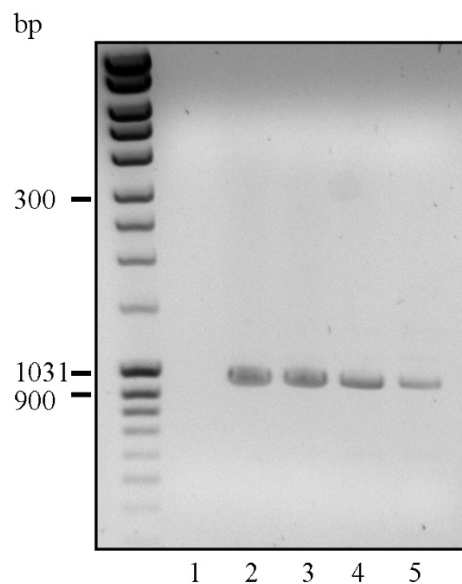


Abbildung 8: Produkte der PCR mit den Primern 1 und 2. Die Produkte wurden für die Klonierung der *bfr*-Gene in den *pBadHisb*-Vektor verwendet. Als Template diente genomische DNA von *MSR-1*. Die Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid angefärbt. 1: Negativkontrolle ohne Template; 2: PCR-Produkt nach Zugabe von $1,5 \text{ mM } MgSO_4$; 3: PCR-Produkt nach Zugabe von $2 \text{ mM } MgSO_4$; 4: PCR-Produkt nach Zugabe von $2,5 \text{ mM } MgSO_4$; 5: PCR-Produkt nach Zugabe von $4 \text{ mM } MgSO_4$.

Abbildung 9 zeigt die PCR-Produkte, welche durch die PCR mit den Primern P5fwBspHI f und P6revNdeI r entstanden. Diese wurden für die Klonierung der *bfr*-Gene in den *pet15b*-Vektor verwendet. In Bahn 1, der Negativkontrolle, waren keine Produkte zu erkennen. Die erhaltenen PCR-Produkte in Bahn 2 und 3 zeigen nur eine Bande und entsprechen der erwarteten Größe von 992 bp.

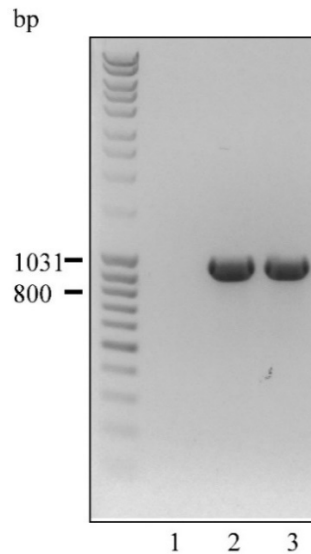


Abbildung 9: PCR zur Vervielfältigung der *bfr*-Gene. Die Produkte der PCR mit den Primern P5fwBspHI f und P6revNdeI r für die Klonierung der *bfr*-Gene in den *pet15b*-Vektor wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt. Als Template diente der pBadHisb Vektor mit *bfr*-Genen aus der ersten Klonierung (Abbildung 8). 1: Negativkontrolle ohne Template; 2 und 3: für die Klonierung verwendete PCR-Produkte die bei 2 mM MgSO₄ entstanden

4.3. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs aus *E. coli* BL21-Gold

Bevor die *bfr*-Gene von MSR-1 in *pet15b* kloniert wurden, wurde eine Expression der Gene in pBadHisb getestet. Die Expression erfolgte in *E. coli* XL Blue mittels Induktion durch L-Arabinose. Abbildung 10 zeigt das Gesamtprotein des Expressionsstamms vor und nach der Induktion mit aufsteigenden L-Arabinose-Konzentrationen. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* XL Blue-Zellen ohne Expressionsplasmid verwendet, die ebenfalls bei einer 0,2 % L-Arabinosekonzentration wuchsen. In den Bahnen 1-6 sind die Zellen vor der Induktion durch L-Arabinose aufgetragen. In Bahn 7-12 ist das Gesamtprotein der Zellen sechs Stunden nach der Induktion zu sehen. Es war lediglich eine schwache Bande bei etwa 17 kDa erkennbar, die in den Negativkontrollen (Bahnen 1 und 7) und bei den Kontrollen vor der Induktion nicht zu erkennen war. Eine Variation der L-Arabinose-Konzentration zeigte kaum Auswirkungen (Bahnen 8 - 12). Auch die Verwendung anderer Expressionsstämme und Veränderung der Kultivierungsbedingungen (ohne Abbildung) brachte keine Verbesserung, so dass die *bfr*-Gene in der Folge in den *pet15b*-Vektor umkloniert wurden.

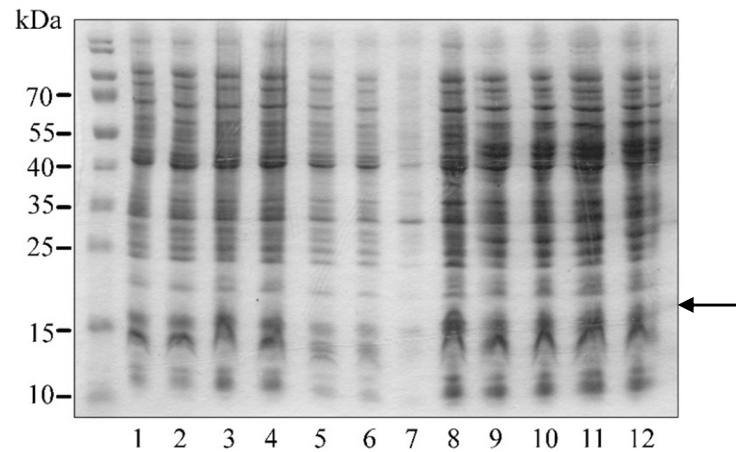


Abbildung 10: Testexpression der *bfr*-Gene in *pBadHisb*. Die ganzen Zellen wurden in SDS-Probenpuffer lysiert. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* XL Blue verwendet, die Induktion erfolgte durch *L*-Arabinose. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 13 - 20 % denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel, welches mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt wurde: Die Bahnen 1 - 6 zeigen das Gesamtprotein der Zellen vor der Induktion durch die jeweils angegebene *L*-Arabinosekonzentration. 1: XL Blue ohne Vektor 0,2 % Arabinose; 2: XL Blue 0,2 % Arabinose; 3: XL Blue 0,02 % Arabinose; 4: XL Blue 0,002 % Arabinose; 5: XL Blue 0,0002 % Arabinose; 6: XL Blue 0,00002 % Arabinose. Die Bahnen 7 - 12 zeigen die Gesamtproteine 6 h nach der Induktion durch die angegebenen Arabinosekonzentrationen. 7: XL Blue ohne Vektor 0,2 % Arabinose; 8: XL Blue 0,2 % Arabinose; 9: XL Blue 0,02 % Arabinose; 10: XL Blue 0,002 % Arabinose; 11: XL Blue 0,0002 % Arabinose; 12: XL Blue 0,00002 % Arabinose

Nachdem die *bfr*-Gene in den *pet15b*-Vektor umkloniert wurden, ließen sich die Gene in *E. coli* BL 21 Gold exprimieren (Abbildung 11).

Ohne IPTG-Zusatz war keine Expression der *bfr*-Gene als Doppelbande um 15 kDa nachweisbar (Bahn 1). Nach dreistündiger Expression war die optimale Konzentration an rekombinantem Protein erreicht (Bahn 2). Eine längere Induktionszeit erhöhte die Ausbeute nicht wesentlich. Es zeigte sich aber verstärkt eine Nebenbande geringeren Molekulargewichts, wobei es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt handelt (Bahn 3).

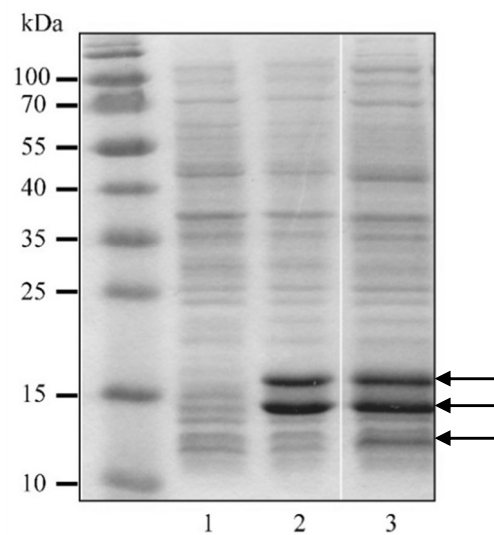


Abbildung 11: Expression der *bfr*-Gene in *pet15b*. Das Gesamtprotein vor und nach der Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten, wurde auf einem 13 - 20 % denaturierendem SDS-Polyacrylamidgel, welches mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt wurde, aufgetrennt. 1: Gesamtprotein vor der Induktion, keine Doppelbande bei 15 kDa; 2: Gesamtprotein 3 h nach Induktion mit IPTG, eine starke Doppelbande bei 15 kDa; 3: Gesamtprotein 5 h nach Induktion, eine starke Doppelbande bei 15 kDa und eine zusätzliche Bande geringeren Molekulargewichts.

Nach der Expression der *bfr*-Gene wurden die Zellen aufgeschlossen und das Bfr-Protein aufgereinigt. Die löslichen Proteine, in denen sich das rekombinante Bfr befand, wurden über eine S300 HR Gelchromatographiesäule grob aufgetrennt.

Abbildung 12 zeigt die Fraktionen 1-19, die bei der Auftrennung des Rohextrakts mit rBfr aus *E. coli* über die Säule, gesammelt wurden. In den Bahnen 3 bis 14 sind die Banden des rBfrs um 15 kDa zu sehen.

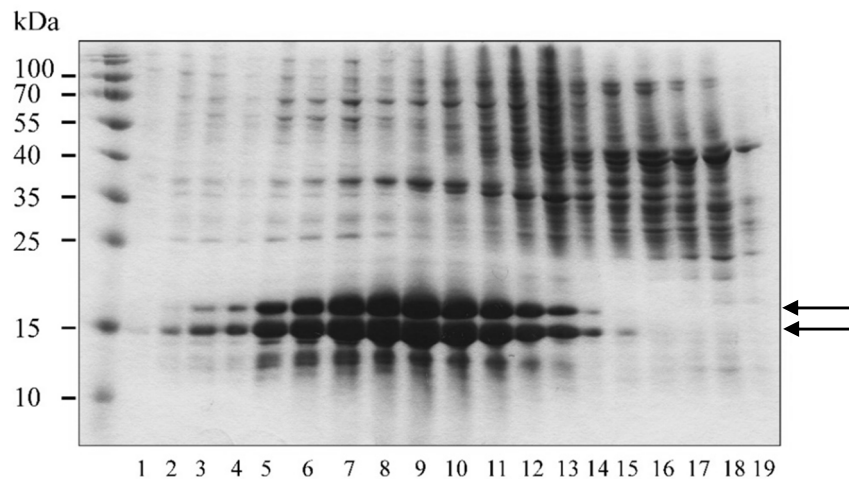


Abbildung 12: Trennung der löslichen Proteine von *E. coli* mit dem rekombinanten *Magnetospirillum*-Bfr über eine S300-Gelchromatographiesäule. Je 200 μ l Fraktion wurden mit Aceton gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und auf einem 13 - 20 % denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt: rBfr ist in den Fraktionen 2 - 14 als deutliche Doppelbande um 15 kDa zu erkennen (Pfeile).

Abbildung 13 zeigt die Aufreinigung von rBfr-haltigen Fraktionen über eine Anionenaustauschersäule, als zweiter Schritt nach der S300-Gelchromatographie. Das aufgereinigte rBfr ist dabei in den Bahnen 1 bis 11 zu sehen. Bahn 12 zeigt das Protein, welches mit 1 M NaCl von der Anionenaustauschersäule eluiert wurde und ebenfalls noch rBfr enthält.

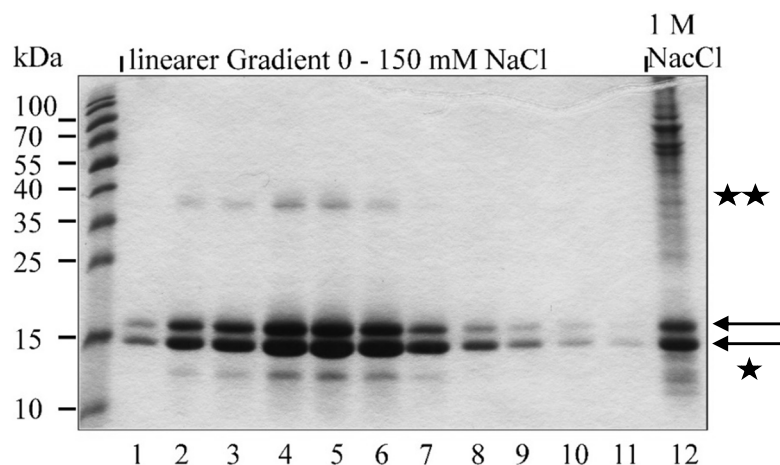


Abbildung 13: Aufreinigung des rBfrs über eine Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q Anionenaustauschersäule. Das Protein wurde in einem linearen Gradienten von 0-150 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, eluiert. Die Fraktionen wurden auf einem 13 - 20 % denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Fraktionen 1-11: rBfr ist als deutliche Doppelbande um 15 kDa sichtbar; Abbaubande bei 13 kDa (Stern), Bande höheren Molekulargewichts bei 38 kDa (zwei Sterne); Fraktion 12: Elution des Restproteins mit 1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

4.4. RBfr – Bestimmung des Molekulargewichts

4.4.1. Gelfiltration

Um das Molekulargewicht des überexprimierten rBfrs zu ermitteln, wurde unter anderem eine kalibrierte S300 HR-Gelchromatographiesäule eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte durch verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht. Dies waren Pferdeferritin (440 kDa), Rinder IgG (150 kDa) und Conalbumin aus Hühnereiweiß (75 kDa). Anhand der errechneten Kalibrierkurve konnte nach einem Säulenlauf mit rBfr das Molekulargewicht ermittelt werden.

Abbildung 14 zeigt die Elutions-Chromatogramme der Kalibrierung der S300 - Gelfiltrationssäule und des Laufs mit dem rekombinanten Bfr. Dieses diente der Bestimmung des Molekulargewichts des rBfrs. RBfr eluierte bei 66,65 min von der S300-Säule, wodurch mit der in Abbildung 15 gezeigten Gleichung das Molekulargewicht von 186 kDa ermittelt wurde.

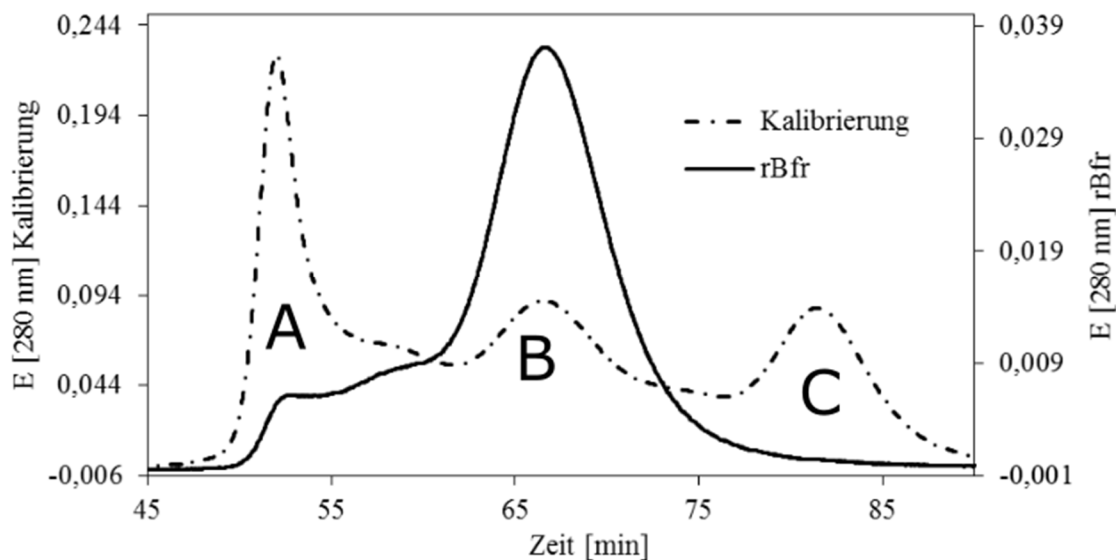


Abbildung 14: Bestimmung des Molekulargewichts des rBfrs durch Gelfiltration über eine Sephacryl 300 HR Säule. Für die Kalibrierung wurden Pferdeferritin (A: 440 kDa), Rinder IgG (B: 150 kDa) und Conalbumin (C: 75 kDa) verwendet. Als Laufpuffer wurden 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 mit 500 mM NaCl verwendet. RBfr eluierte in einem scharfen Peak nach 66,65 min von der Säule.

Abbildung 15 zeigt die Kalibrierungskurve der Sephacryl S300 HR-Gelfiltrationssäule, die aus dem Elutionsdiagramm der S300 - Gelfiltrationssäule ermittelt wurde. Aus dieser ließ sich das Molekulargewicht des rBfrs berechnen. Das mittels Größenausschlusschromatographie ermittelte Molekulargewicht betrug 186 kDa.

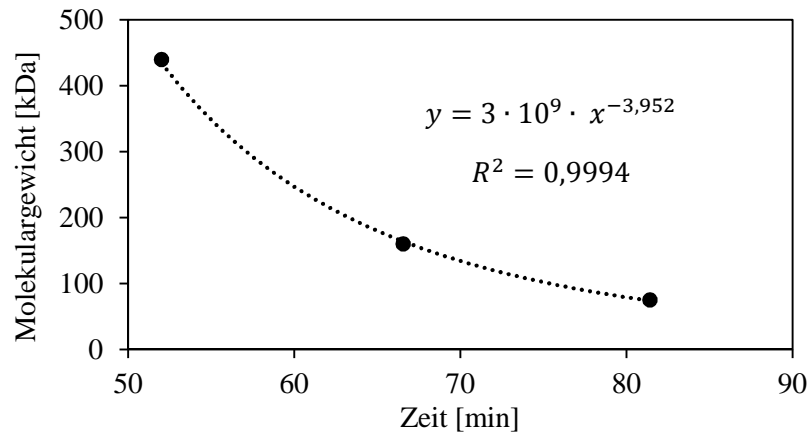


Abbildung 15: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit verschiedenen Proteinen. Die S300 HR - Gelfiltrationssäule wurde mit Pferdeferritin (440 kDa), Rinder IgG (150 kDa) und Conalbumin (75 kDa) kalibriert. Daraus wurde eine Gleichung errechnet, aus der das Molekulargewicht des rBfrs berechnet werden konnte.

4.4.2. Dynamische Lichtstreuung - DLS

Um das durch Größenausschlusschromatographie ermittelte Molekulargewicht zu überprüfen, wurde das Molekulargewicht nochmals mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt.

Bei der DLS wird der hydrodynamische Radius bestimmt. In Abbildung 16 ist ein schmaler, einheitlicher Peak zu erkennen, der einen hydrodynamischen Radius von 6,4 nm, gemittelt über zehn Messungen, angibt. Verunreinigungen sind nur im Bereich um 1 nm zu erkennen, größere Proteine wurden nicht detektiert.

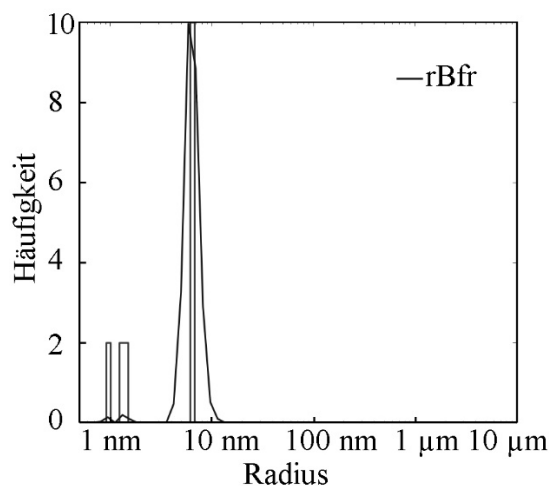


Abbildung 16: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von rBfr mittels DLS. Der hydrodynamische Radius von rBfr wurde nach zehn Messungen auf 6,4 nm bestimmt. Daraus wurde ein Molekulargewicht von 231 kDa ermittelt, was einem Protein mit 12 Untereinheiten entspricht.

Zum Vergleich des Radius eines bekannten Ferritins mit 24 Untereinheiten mit dem Radius des isolierten rBfrs von *Magnetospirillum gryphiswaldense*, wurde der hydrodynamische Radius von Pferdeferritin mittels DLS bestimmt (Abbildung 17). Der Peak ist etwas breiter und unregelmäßiger als

der des rBfrs geformt, zeigt aber über zehn Messungen gemittelt einen hydrodynamischen Radius von 21 nm an. Auch hier sind Verunreinigungen im Bereich um 1 nm zu erkennen. Der gemessene hydrodynamische Radius von Pferdeferritin ist mehr als doppelt so groß wieder der des rBfrs. Für das Pferdeferritin wurde ein Molekulargewicht von 440 kDa ermittelt, was dem bekannten Molekulargewicht entspricht.

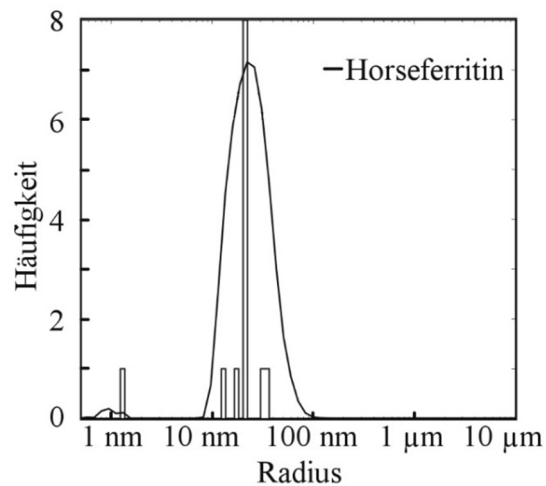


Abbildung 17: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von Pferdeferritin mittels DLS. Das Radius - Histogramm zeigt eine Verteilung der gemessenen Radien um 21 nm. Hieraus wurde ein Molekulargewicht von 440 kDa ermittelt, was dem bekannten Molekulargewicht von Pferdeferritin mit 24 Untereinheiten entspricht.

4.5. Nachweis von Eisen in rBfr und Bfr durch Färbung im nativen Polyacrylamidgel

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, konnte das im rBfr gebundene Eisen mittels Fridovichfärbung angefärbt werden. Daraufhin wurde die Eisenbeladung des rBfrs mit dem modifizierten FerroZine-Test nach Fish (Fish 1988) bestimmt. Nach der Analyse zweier rBfr-Präparationen, enthielt das rBfr zwischen 183 - 308 Eisenatome pro rBfr mit jeweils 12 Untereinheiten.

Nachdem die Bande (1) des nativen Gels ausgeschnitten wurde und auf einem denaturierenden SDS-Gradientengel aufgetrennt wurde, wurden die beiden Banden des rBfrs (3) sichtbar.

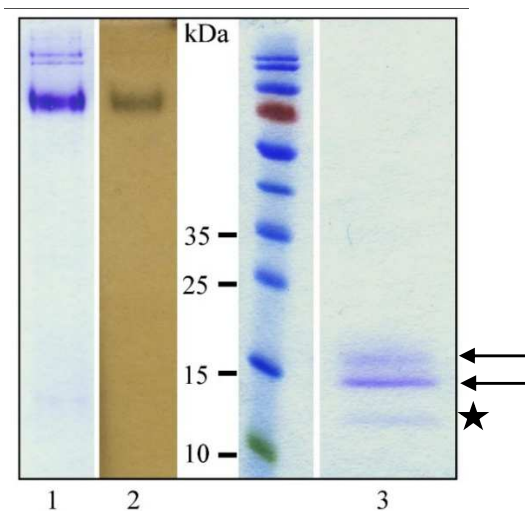


Abbildung 18: Auftrennung des rBfrs auf einem 6 - 12 % nativen Polyacrylamidgel. Die Banden wurden mit Coomassie Brilliant Blau (Bahn 1) und nach Fridovich (Bahn 2) angefärbt. Die der Höhe der eisenhaltigen Bande entsprechende Proteinbande wurde ausgeschnitten und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. In Bahn 3 ist die Auftrennung und Coomassie-Färbung dieses Proteins in einem 13 - 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel gezeigt: Bahnen 1 und 2: eisenhaltiges rBfr im nativen Polyacrylamidgel, 3: Doppelbande des rBfrs bei 15 kDa (Pfeile), Abbaubande niedrigeren Molekulargewichts bei 13 kDa (Stern).

4.6. Vergleich des rekombinanten und des nativen Bfrs im nativen Polyacrylamidgel

Ein MSR-1 Membranextrakt wurde über eine S300-Gelchromatographiesäule aufgetrennt. Die Fraktionen wurden auf ihren Eisengehalt hin überprüft und die eisenreichen Fraktionen auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierbei wurde in einigen Fraktionen eine eisenhaltige Proteinbande nachgewiesen (4 - 6). Abbildung 19 zeigt hierbei den Vergleich zwischen rBfr (1) und dem Extrakt von MSR-1 (2 - 6). Die eisenhaltigen Banden aus *M. gryphiswaldense* Membran und das rBfr haben dieselbe Laufhöhe und weisen eine starke Eisenfärbung auf, so dass sich das rBfr im Vergleich mit dem nativen Bfr identisch im nativen Gel zeigt.

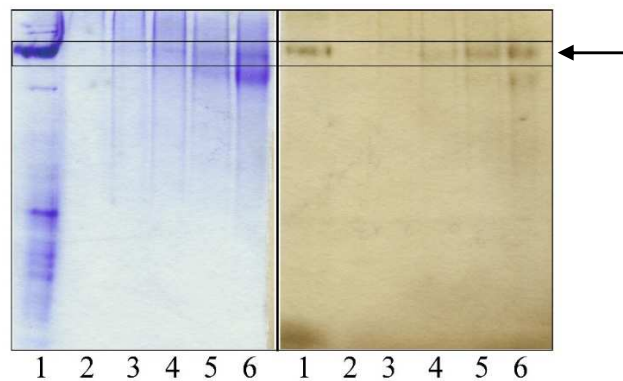


Abbildung 19: Auftrennung der mittels Triton X-100 aus MSR-1-Membran extrahierte Proteine über eine S300 HR-Gelchromatographiesäule und anschließende Auftrennung auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel. Die Gelteile wurden mit Coomassie Brilliant Blau sowie nach Fridovich gefärbt (Bahnen 2 - 6). Hierbei wurde das Bfr in den Bahnen 4 - 6 als hochmolekulare eisenhaltige Bande gefunden. Die löslichen Proteine von *E. coli* mit rBfr wurden als Referenz für die Wanderungsstrecke des Bfrs verwendet (Bahn 1). Diese unterscheidet sich zwischen rBfr und dem nativen Bfr aus der *M. gryphiswaldense* Membran nicht.

4.7. Eisen- und Proteinverteilung bei *M. gryphiswaldense*

In Abbildung 20 ist die Protein- und Eisenverteilung der löslichen und der Membranproteine von MSR-1 im Vergleich gezeigt. Dabei sind die Proteine mit jeweils knapp 50 % gleichmäßig auf die Fraktionen aufgeteilt, geringfügig mehr Protein befindet sich in der Membranfraktion. Der Eisengehalt der Membranfraktion ist geringfügig größer, als der der löslichen Proteine.

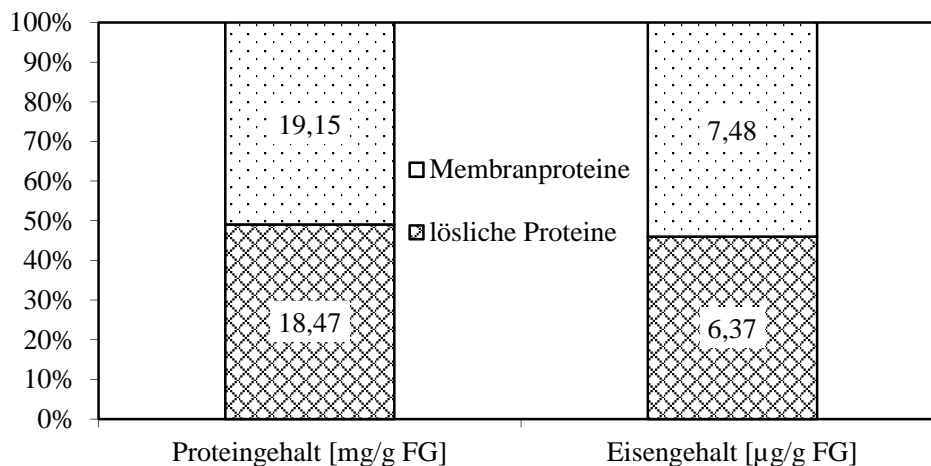


Abbildung 20: Eisen- und Proteinkonzentrationen der Membran.- und der löslichen Proteine von MSR-1. Zellen von MSR-1 wurden aufgeschlossen, fraktioniert und die Eisen- und Proteingehalte bezogen auf das Frischgewicht bestimmt. Gepunktet sind dabei jeweils die Membranproteine dargestellt, die löslichen Proteine sind mit einem Netzmuster gekennzeichnet. Die Eisen- und Proteingehalte der löslichen und die der Membranproteine unterscheiden sich dabei nicht wesentlich.

Abbildung 21 zeigt die Verteilung von Eisen und Proteinen in der Membran- und der löslichen Fraktion von MSR-1B, der nichtmagnetischen Mutante. Hier entspricht die prozentuale Proteinverteilung in etwa der von MSR-1, wo geringfügig mehr Protein in der Membranfraktion vorhanden war, als in der löslichen Fraktion. Die Verteilung des Eisens ist im Vergleich zum Wildtyp stark verändert. Befanden sich bei MSR-1 etwa 53 % des Eisens in der Membranfraktion, waren es bei MSR-1B etwa 75 %.

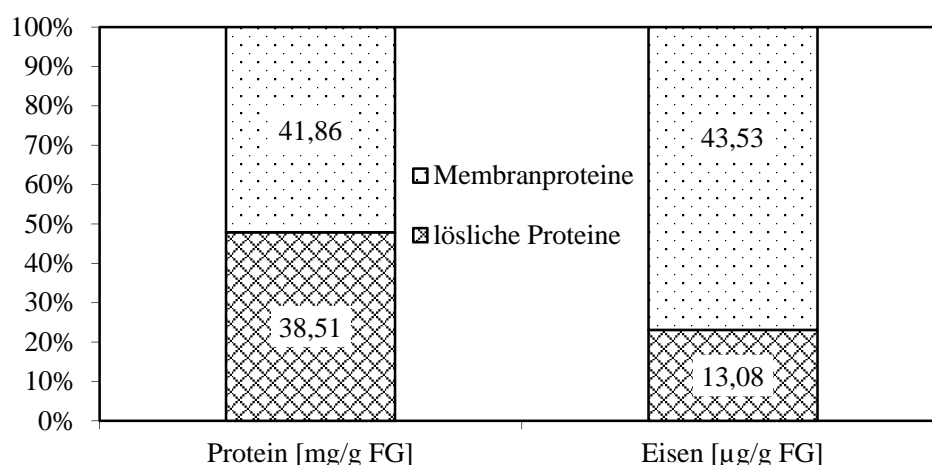


Abbildung 21: Eisen- und Proteinkonzentrationen der Membran.- und der löslichen Proteine von MSR-1B. Zellen der unmagnetischen MSR-1B-Mutante wurden aufgeschlossen, fraktioniert und die Eisen- und Proteingehalte bezogen auf das Frischgewicht bestimmt. Gepunktet sind dabei jeweils die Membranproteine dargestellt, die löslichen Proteine sind mit einem Netzmuster gekennzeichnet. Die Proteingehalte sind in etwa gleichmäßig verteilt, während der Eisengehalt der Membranfraktion deutlich höher ist als der der löslichen Proteinfraction.

4.8. Bestimmung des Häm-Gehalts von rBfr und MSR-1-Fractionen mit der Pyridin-Hämochrom-Methode

Abbildung 22 zeigt die Differenzspektren der Pyridin-Hämochrommessungen von rBfr, in 1 % SDS gelöster MSR-1 Membran und den löslichen Proteinen von MSR-1. Dabei wurden die jeweiligen Häm-Typen nach den α -Peak Absorptionsmaxima bestimmt. Dieses liegt für Häm c zwischen 549 - 551 nm, für Häm b zwischen 556 - 558 nm (Falk 1964) und für Häm a zwischen 580 - 590 nm (Lemberg 1969).

Dabei ist in Abbildung 22 zu sehen, dass die löslichen Proteine von MSR-1 nur Häm-Gruppen des c Typs enthalten. Für eine rBfr-Präparation wurde der Häm-Gehalt ebenfalls bestimmt. Nach dem Absorptionsmaximum des Spektrums bei 556 nm, handelt es sich hierbei um Häm b. Zur Quantifizierung des Häm b-Gehaltes, wurde der differentielle Extinktionskoeffizient $\epsilon_{557-540\text{nm}} = 22.100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ verwendet (Williams 1964). Das rBfr enthielt durchschnittlich 0,15 Häm-Gruppen pro 12 Untereinheiten.

Bei der Messung der mit 1 % SDS extrahierten MSR-1-Membranen, wurde festgestellt, dass der Peak des erhaltenen Differenzspektrums sein Maximum im Bereich des c-Typ-Häms hatte. Dabei fällt auf, dass der Peak zu längeren Wellenlängen hin im Vergleich zu den löslichen Proteinen, verbreitet ist. Dies deutet darauf hin, dass sich neben dem Peak für das c-Typ Häm, noch ein anderer Peak im b-Bereich befindet.

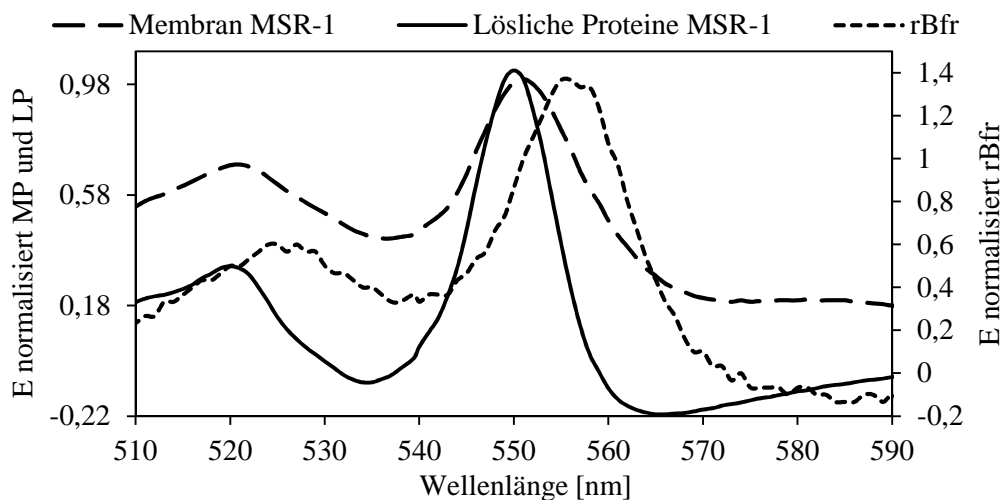


Abbildung 22: Pyridin-Hämochrom-Spektren der Membranproteine und der löslichen Proteine von MSR-1, sowie des rBfrs. Die Membran wurde vor der Analyse mit 1 % SDS extrahiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kurven normalisiert. Die löslichen Proteine enthalten Cytochrome des C-typs, die Membranproteine enthalten Cytochrome des b-, c- und a-Typs, rBfr enthält Hämgruppen des b-Typ.

Die löslichen Proteine von MSR-1 wurden zusätzlich über eine S300 HR-Gelchromatographiesäule aufgetrennt. Die Absorption aller Fraktionen wurde zur Detektion cytochromhaltiger Fraktionen bei 415 nm im Photometer gemessen, wobei sich zwei deutliche Peaks bei 87 und 97 min zeigten. Diese Fraktionen wurden im Weiteren mit der Pyridin-Hämochrom-Methode gemessen, um die Häm-Typen zu analysieren.

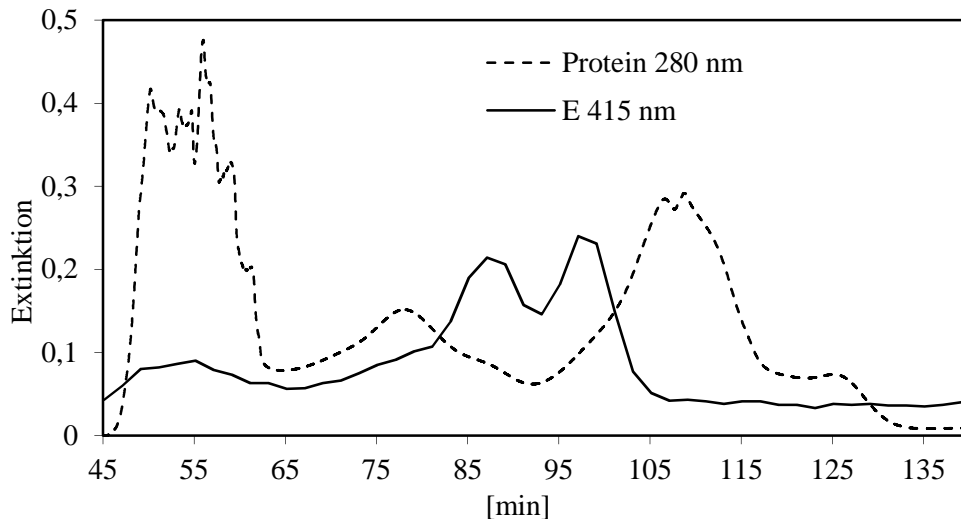


Abbildung 23: Auftrennung der löslichen Proteine von MSR-1 über eine S300 HR-Säule mit 50 mM HEPES, pH 7,5; Messung der Extinktion der 2 ml-Fractionen bei 415 nm zur Detektion von cytochromhaltigen Fractionen

Die Pyridin-Hämochromspektren der beiden Fractionen zeigen die charakteristischen Werte für Häm c (Abbildung 24, Abbildung 25). Die kalkulierten Molekulargewichte, die aus dem Kalibrierspektrum abgeleitet wurden (Abbildung 14, Abbildung 15), betragen ca. 60 kDa für das bei 87 min eluierende Protein und ca. 42 kDa für das bei 97 min eluierende Protein. Bei dem Protein mit 60 kDa handelt es sich vermutlich um NirS, das Protein der anderen Fraction konnte nicht näher bestimmt werden.

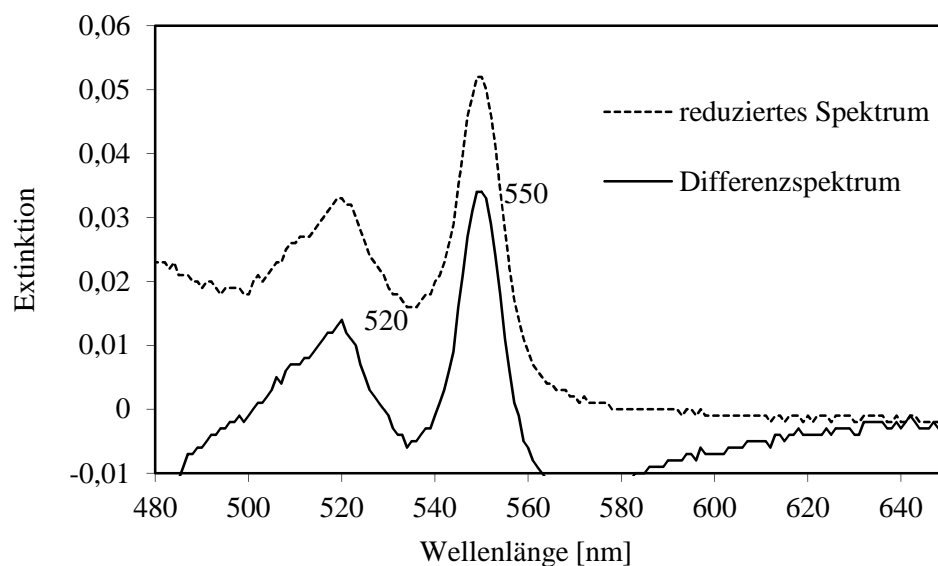


Abbildung 24: Pyridin-Hämochrom-Spektren der mittels Gelchromatographie gewonnenen Fraction 22 (siehe Abbildung 23) durch die Pyridin-Hämochrom-Methode. Gezeigt werden das reduzierte Spektrum und das Differenzspektrum, welches aus dem reduzierten und dem oxidierten Spektrum der Fraction gewonnen wird.

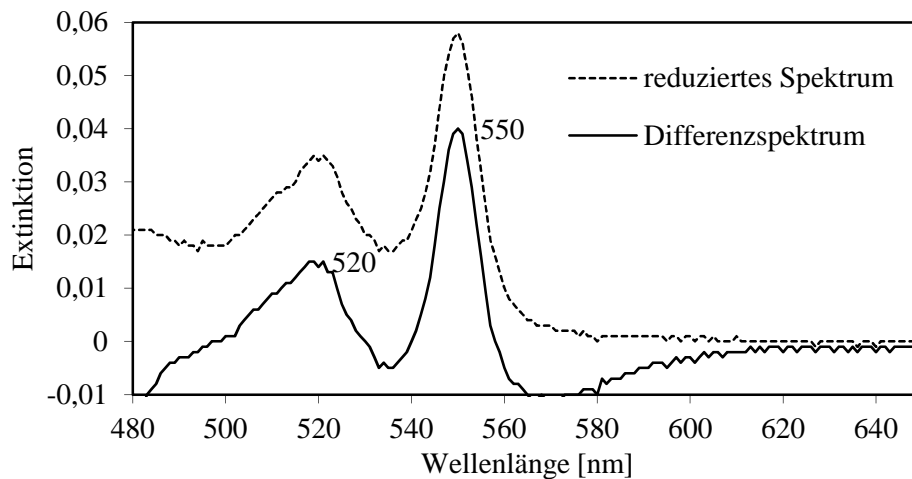


Abbildung 25: Pyridin-Hämochrom-Spektren der mittels Gelchromatographie gewonnenen Fraktion 27 (siehe Abbildung 23) durch die Pyridin-Hämochrom-Methode. Gezeigt werden das reduzierte Spektrum und das Differenzspektrum der Pyridin-Hämochrommessungen, welches aus dem reduzierten und dem oxidierten Spektrum der Fraktion gewonnen wird.

Wie Abbildung 26 zeigt, wurde die mit Triton X-100 extrahierte Membran von MSR-1B über eine S300-Gelchromatographiesäule aufgetrennt, die mit einem tritonhaltigen Puffer betrieben wurde. Dabei wurde die Säule mittels einer Mischung bekannter Proteine kalibriert (Kalibrierkurve) und die Eisenkonzentrationen der gesammelten Fraktionen des aufgetrennten Membranextrakts bestimmt.

Ein Anstieg der Eisenkonzentration ist ab Minute 52 zu erkennen. Hier ist die Eisenkonzentration im Vergleich zu der Menge eluierten Proteins höher, als in den folgenden, eisenhaltigen Fraktionen, die eine wesentlich höhere Extinktion bei 280 nm aufwiesen (Membranextraktkurve).

Größere Proteinmengen wurden ab 65 min in einem großen Peak mit 2 Schultern eluiert. Pferde-Ferritin eluierte bei 51 min. In diesem Bereich wurden in den Fraktionen des Extrakts zwar Proteine eluiert, aber kein Eisen gemessen.

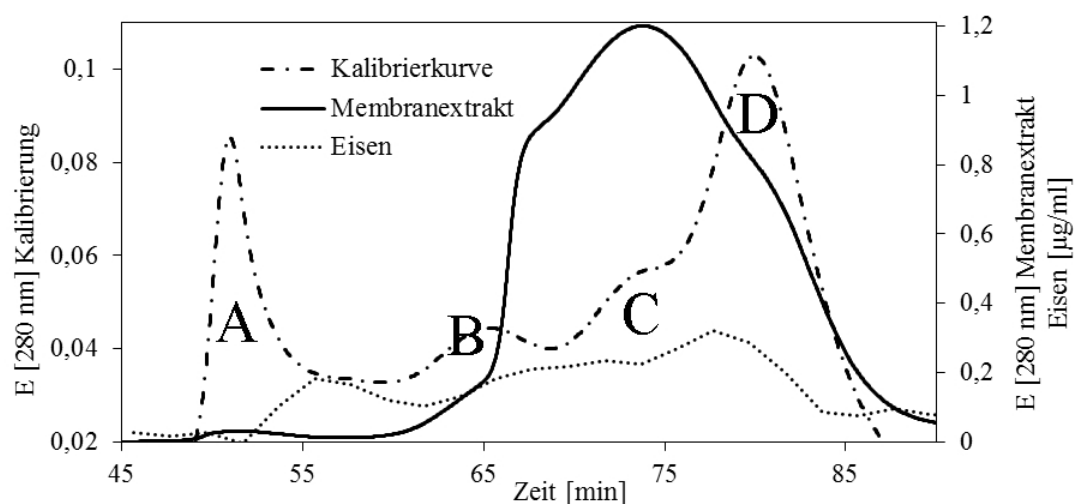


Abbildung 26: Bestimmung des Molekulargewichts des Bfrs im MSR-1 Tensidextrakt der Membran durch Auftrennung über eine S300 HR-Gelchromatographiesäule. Für die Kalibrierung wurden Pferdeferritin (A: 440 kDa), Rinder IgG (B: 150 kDa), (C: mögliche Verunreinigung des Conalbumins, nicht berücksichtigt) und Conalbumin (D: 75 kDa) verwendet. Als Laufpuffer wurden 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 0,02 % Triton X-100 verwendet. Die Eisenkonzentrationen der eluierten Fraktionen wurden mit dem FerroZine-Test bestimmt.

Anhand der bekannten Molekulargewichte, der für die Kalibrierung der S300-Säule verwendeten Proteine, wurde eine Kalibrierkurve erstellt, mit der das Molekulargewicht des unbekanntes Proteins berechnet werden konnte. In diesem Fall wurde die Säule mit einem Puffer, der Triton X-100 enthielt, betrieben, um einheitliche Bedingungen zu schaffen. Die Elutionszeitpunkte der Markerproteine veränderten sich nicht wesentlich im Vergleich zu einem Säulenlauf ohne Triton X-100 (Abbildung 14), so dass hier das Molekulargewicht der Tritonmizellen nicht addiert wurde. Auch sind die verwendeten Proteine nicht als hydrophob bekannt.

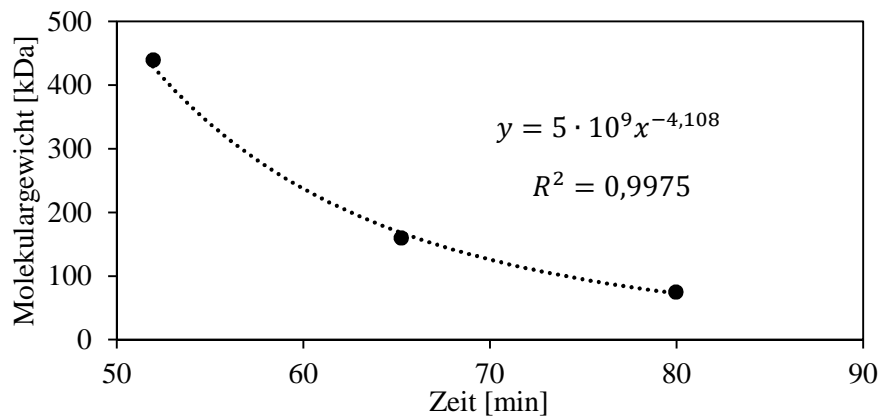


Abbildung 27: Die S300 HR Gelfiltrationssäule wurde mit Pferdeferritin (440 kDa), Rinder IgG (150 kDa) und Conalbumin (75 kDa) kalibriert. Daraus wurde eine Gleichung errechnet, aus der das Molekulargewicht des nativen Bfrs berechnet werden konnte.

Die Lokalisation des Bfrs nach der Auftrennung des Membranextrakts wurde durch einen Western Blot ermittelt (Abbildung 28). Bfr-Signale auf der Höhe des Referenz-rBfrs (Bahn 1), zeigten sich in den Bahnen 3 - 6, was einer Elutionszeit von 59,6 min entsprach. Diese Elutionszeit war im Vergleich zum rBfr früher, was allerdings auch auf den Einsatz des Tensids zurückzuführen sein kann.

Aus den daraus bekannten Elutionszeiten wurde das Molekulargewicht berechnet. Dies lag bei 250 kDa. Das im Vergleich zum Säulenlauf mit rBfr höhere ermittelte Gewicht kann durch den Einfluss des Triton X-100 zustande kommen. Tritonmizellen haben ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa, was bei Interaktion mit dem Protein zu einer Erhöhung des Molekulargewichts führt, was in diesem Fall etwa 250 kDa ergeben würde. Auch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial können zu einer Laufverzögerung führen, was durch Triton X-100 unterbunden wird.

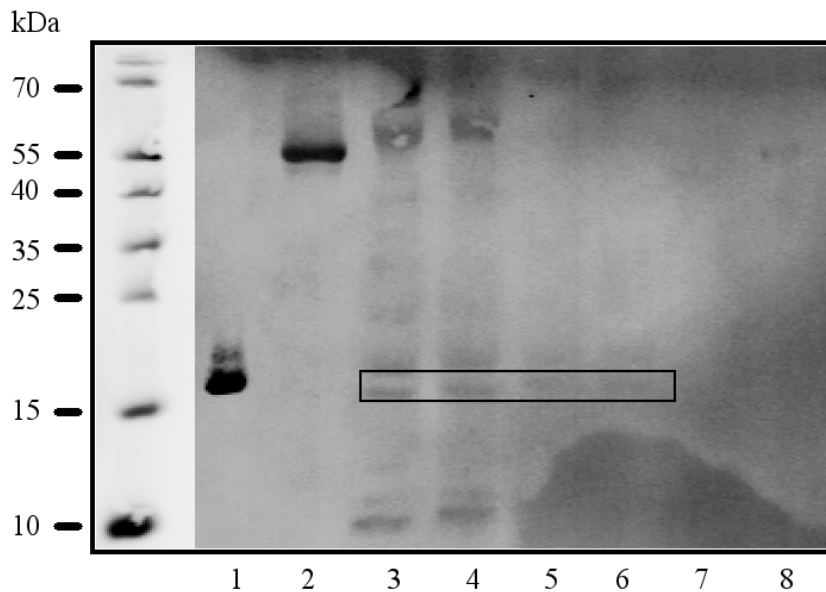


Abbildung 28: Immunologische Detektion von Bfr in Fraktionen des Detergensextrakts von MSR-1-Membranen. MSR-1 Membranen wurden mit Triton X-100 extrahiert, der Extrakt über eine S300 HR-Säule fraktioniert und der Eisengehalt der Fraktionen analysiert (Abbildung 26). Die Fraktionen 6 - 11 (Bahnen 3 - 8) wurden auf einem denaturierenden 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Western Blot wurde mit dem Erstantikörper Anti-rBfr1-His 1:10.000 und dem Sekundärantikörper IRDye800 Anti-Kaninchen-IgG 1:200 inkubiert. 1: rBfr; 2: Δbfr Membranextrakt; 3: Fraktion 6; 4: Fraktion 7; 5: Fraktion 8; 6: Fraktion 9; 7: Fraktion 10; 8: Fraktion 11. Die relevanten Bfr-Banden befinden sich in den Fraktionen 3 - 6, was nach der Kalibrierkurve (Abbildung 27) ein Molekulargewicht von 250 kDa ergibt.

4.9. Empfindlichkeit von *M. gryphiswaldense*-Stämmen gegen oxidativen Stress, ausgelöst durch Zugabe von H_2O_2 zum Kulturmedium

Wie in Abbildung 29 und Abbildung 30 gezeigt, wurde das Wachstum von *M. gryphiswaldense* durch eine Zugabe von H_2O_2 zum Kulturmedium beeinflusst.

Dabei waren nach der Zugabe bei dem Δbfr -Stamm stärkere Veränderungen zu beobachten, als bei MSR-1, was auf eine Bedeutung des Bfrs für den Schutz vor oxidativem Stress hindeutet.

Für den Vergleich des Effekts von H_2O_2 auf das Wachstum verschiedener *Magnetospirillum*-Stämme, wurden verschiedene Kulturansätze mit möglichst ähnlicher Start-OD nach 16 h mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 versetzt.

Nachdem dem Wildstamm MSR-1 verschiedene Konzentrationen H_2O_2 zugegeben wurden (Abbildung 29), veränderte sich das Wachstumsverhalten. Am besten wuchsen die Negativkontrolle, sowie die Ansätze, die mit 0,2 ng/ml und 0,1 ng/ml H_2O_2 versetzt wurden.

Ab 0,4 ng/ml wurde das Wachstum des Wildstammes beeinträchtigt. Dieser Effekt war schwach und etwa ab Stunde 19 - 20 zu sehen.

0,6 ng/ml und 0,8 ng/ml hatten einen ähnlich wachstumshemmenden Effekt auf MSR-1. Dieser ist stärker wachstumshemmend als der Effekt der niedrigeren Konzentration und auch ab Stunde 19 zu erkennen.

Der wachstumshemmende Effekt von 1 ng/ml H_2O_2 auf den Wildstamm MSR-1 ist bereits eine Stunde nach Zugabe zu erkennen. Dieser fällt stärker aus, als der Effekt aller niedrigeren Konzentrationen.

Am Stärksten wachstumshemmend wirkte die Konzentration von 1,2 ng/ml H_2O_2 . Direkt nach der H_2O_2 -Zugabe war bei allen H_2O_2 -Konzentrationen ein Wachstum bis zur nächsten Messung messbar.

Insgesamt war bei MSR-1 der wachstumshemmende Effekt mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen verstärkt sichtbar, es fand allerdings auch bei 1,2 ng/ml immer noch ein recht gutes Wachstum statt, bei dem eine OD_{600} von 0,98 nach 24 h erreicht wurde, wobei die Negativkontrolle eine OD von 1,1 erreichte.

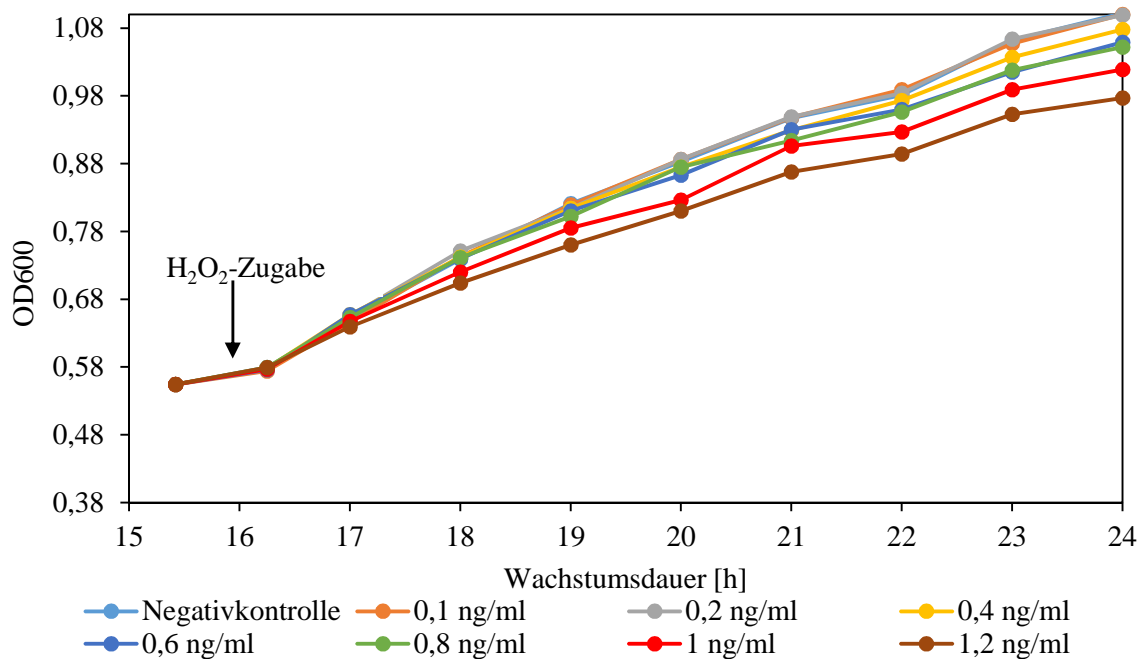


Abbildung 29: Der Einfluss von H_2O_2 auf Kulturen des MSR-1-Stamms wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen 16 h nach der Inokulation untersucht. Nach der Zugabe wurden die Bakterien weitere 8 Stunden bei 30 °C kultiviert. Die OD_{600} wurde stündlich in den Kulturflaschen gemessen. MSR-1 wächst bei steigenden Konzentrationen etwas schlechter als die Negativkontrolle (hellblau dargestellt).

Auch Kulturen des Δbfr -Stamms wurden mit H_2O_2 inkubiert. Bei Konzentrationen ab 0,4 ng/ml wurde das Wachstum bereits eine Stunde nach Zugabe verlangsamt. Ab 0,8 ng/ml wurde das Wachstum noch stärker gehemmt. Vier bis fünf Stunden nach der Zugabe war in diesen Ansätzen eine starke Reduzierung des Wachstums mit Abknicken der Wachstumskurve zu erkennen.

Auffällig war ein Einbruch des Wachstums bei allen Ansätzen des Δbfr -Stamms direkt nach der H_2O_2 -Zugabe. Dieser verstärkte sich bei den höheren H_2O_2 -Konzentrationen, war aber auch bei der Negativkontrolle und den niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen zu beobachten. Bei dem Wildstamm MSR-1 trat dieser Effekt nicht auf. Hier wuchsen alle Ansätze bis zur nächsten Messung gleichmäßig weiter.

Da der Effekt der Wachstumshemmung nach dem Umfüllen der Kultur auch in schwächerer Form bei der Negativkontrolle zu sehen war, war dieser vermutlich auf den verstärkten Eintrag von Sauerstoff in das Kulturmedium beim Umfüllen der Kulturen in die Zellkulturflaschen zurückzuführen. Dieser Effekt verdeutlicht schon die höhere Sauerstoffempfindlichkeit von Δbfr im Vergleich zum Wildstamm MSR-1.

Insgesamt zeigte sich der Δbfr -Stamm empfindlicher als MSR-1 bei der Kultivierung mit H_2O_2 . So wurde bei 1,2 ng/ml nur eine OD_{600} von 0,77 nach 24 im Vergleich zur Negativkontrolle mit 1,004 erreicht.

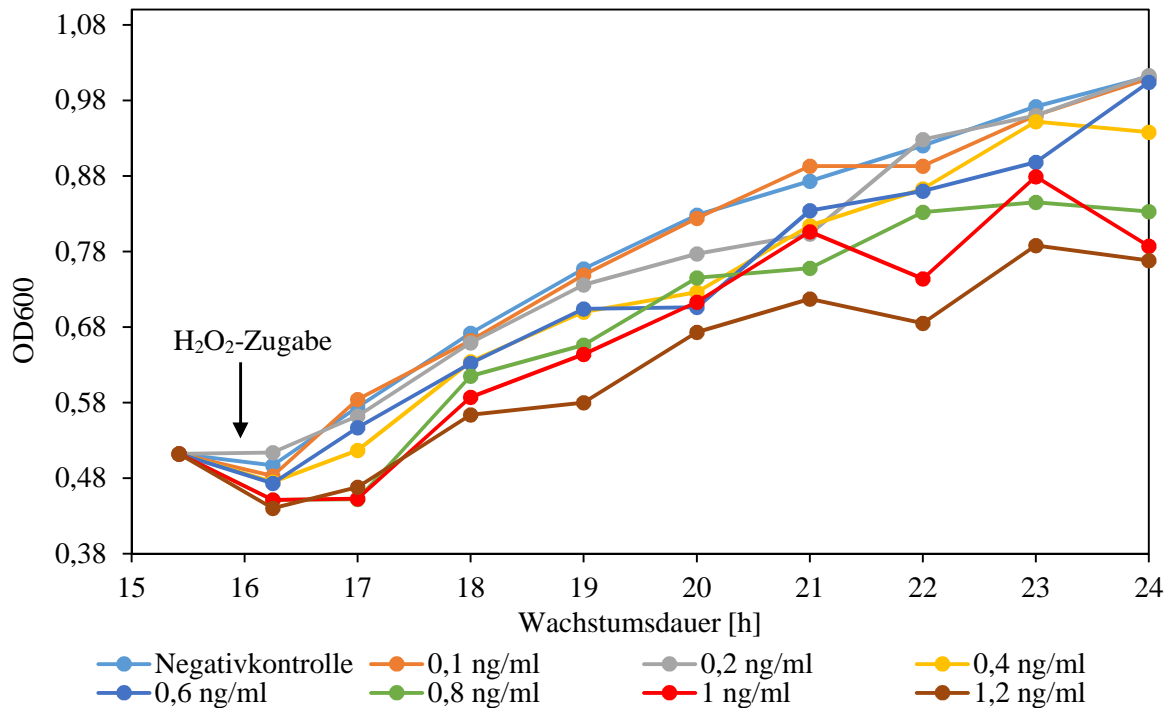


Abbildung 30: Der Einfluss von H_2O_2 auf Kulturen des Δbfr -Stamms wurde durch Zugabe verschiedener Konzentrationen 16 h nach der Inokulation untersucht. Nach der Zugabe wurden die Bakterien weitere 8 h bei 30 °C kultiviert. Die OD_{600} wurde stündlich in den Kulturflaschen gemessen. Δbfr wächst bei steigenden Konzentrationen deutlich schlechter als die Negativkontrolle (hellblau dargestellt). Der der höchsten zugebenen Konzentration (braun), flacht das Wachstum im Vergleich zu Negativkontrolle stark ab. Zusätzlich dazu ist bei allen Konzentrationen ein Einbruch des Wachstums direkt nach der Zugabe des H_2O_2 zu erkennen, der bei MSR-1 nicht auftrat (Abbildung 29).

4.10. Interaktion von rBfr mit DNA

Die Interaktion von DNA mit rBfr wurde durch die Inkubation von pUC19-Plasmid-DNA mit rBfr untersucht. Abbildung 31 zeigt in jeder Bahn 10 nM pUC19-DNA, die mit verschiedenen Konzentrationen rBfrs inkubiert wurde. Dabei war im Agarose-Gel eine Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 3000 bp schon ab einer rBfr-Zugabe von 0,25 μM zu sehen. Diese Bande war bei der Zugabe von 4 μM rBfr am Stärksten ausgeprägt (Bahn 9). Die ursprüngliche Bande des superspiralisierten pUC19 bei etwa 1700 bp, wurde entsprechend schwächer. Als Negativkontrolle wurde die DNA mit 4,4 μM BSA inkubiert, hier war keine Veränderung des Laufverhaltens der DNA zu beobachten (Bahn 1).

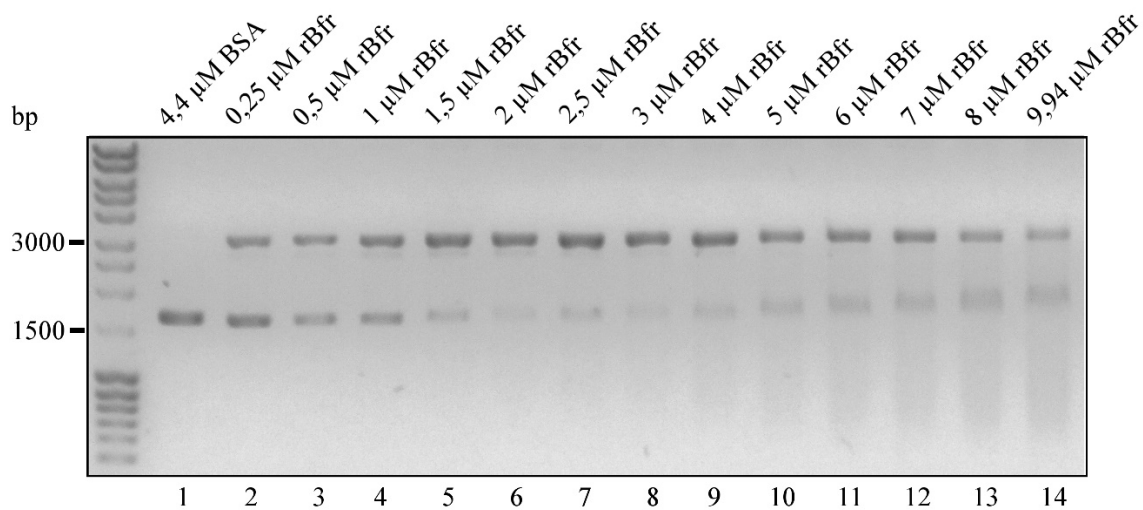


Abbildung 31: Bindung von rBfr an DNA. pUC19-DNA wurde mit steigenden Konzentrationen von rBfr inkubiert und anschließend auf einem 1% Agarose-Gel analysiert und mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid angefärbt. Bereits bei 0,25 μM rBfr zeigte sich eine zusätzliche Bande mit einer scheinbaren Größe von ca. 3000 Basenpaaren. Bei 4 μM rBfr zeigte diese Bande ihre maximale Intensität. Als Negativkontrolle wurde BSA eingesetzt, was keinen Einfluss auf das Laufverhalten der DNA zeigte.

4.11. Schutz der DNA vor oxidativem Abbau durch rBfr

Um die Schutzwirkung von rBfr vor oxidativem Abbau von DNA zu überprüfen, wurde Plasmid-DNA der Fenton-Reaktion ausgesetzt. Hierfür wurden Ansätze aus Plasmid-DNA mit und ohne rBfr sowie mit BSA mit frisch angesetzter Fe(II)-sulfatlösung und H₂O₂ inkubiert.

Abbildung 32 zeigt die Plasmid-DNA auf einem Agarose-Gel nach der Fenton-Reaktion. Bahn 1 zeigt unbehandelte, superspiralisierte pUC19-DNA als Referenz.

In allen Ansätzen, die der Fenton-Reaktion ausgesetzt waren, war im Gegensatz zu unbehandelter DNA eine größere Bande sichtbar (Bahnen 2 - 4). Entsprechend nahm die Intensität der kleineren Bande ab. Dies war besonders in den Bahnen 2 und 3 ausgeprägt. Dabei handelte es sich um die Negativkontrolle sowie den mit BSA inkubierten Ansatz. BSA schützte die DNA nicht vor oxidativem Abbau.

In Bahn 4 ist der Ansatz zu sehen, bei dem die DNA mit rBfr inkubiert wurde. Hier ist die kleinere DNA-Bande intensiver, als bei der Negativkontrolle und dem mit BSA inkubierten Ansatz, wo kaum noch intakte DNA vorhanden war. Dies zeigt die Schutzwirkung des Bfrs auf die DNA, wenn diese oxidativem Stress ausgesetzt wird.

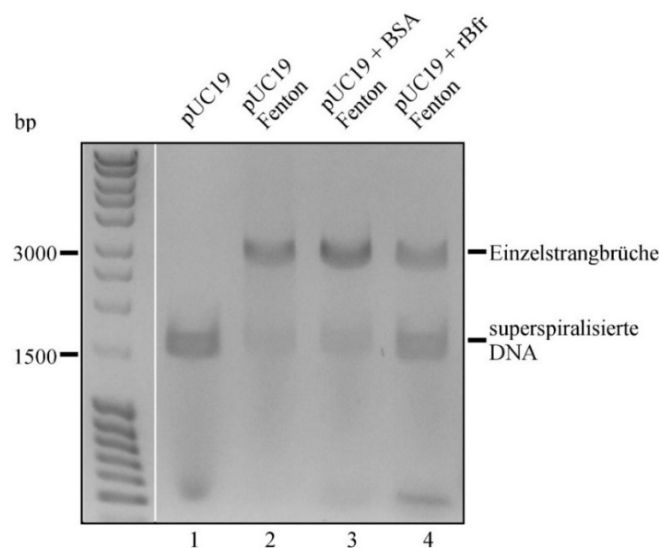


Abbildung 32: 12 nM pUC19-DNA wurden in mehreren Ansätzen, mit und ohne rBfr, oxidativem Stress durch die Fenton-Reaktion ausgesetzt. Dieser wurde durch die Zugabe von frisch angesetzter Fe(II)-sulfatlösung und H₂O₂ ausgelöst. Die Zugabe von rBfr vor der Reaktion schützte die DNA teilweise vor oxidativem Abbau (Bahn 4). Im Vergleich zu den Negativkontrollen mit Wasser und BSA (Bahn 2 und 3), war mehr intakte superspiralisierte DNA und weniger Einzelstrangbrüche zu erkennen. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem 1 % Agarose-Gel, welches mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt wurde. 1: pUC19; 2: pUC19 mit H₂O nach Fenton-Reaktion; 3: pUC19 mit BSA nach Fenton-Reaktion; 4: pUC19 mit rBfr nach Fenton-Reaktion

4.12. Bfr-Extraktion mit Salz und chaotropen Reagenzien

Um Bfr von der *Magnetospirillum*-Membran zu lösen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die Membran mit Salz und verschiedenen Konzentrationen chaotroper Reagenzien behandelt und abzentrifugiert. Die erhaltenen Extrakte und die jeweiligen Pellets wurden auf nativen Polyacrylamidgelen analysiert und mit Coomassie Brilliant Blau und nach Fridovich gefärbt, um das Bfr anhand der Eisenfärbung als hochmolekulare eisenhaltige Bande nachzuweisen.

Abbildung 33 zeigt die Überstände nach der Extraktion mit Salz und Harnstoff. Dabei waren zahlreiche Proteine anhand der Coomassiefärbung im Gel zu sehen, eine hochmolekulare eisenhaltige Bande ist nicht vorhanden. Dies zeigt, dass das Bfr durch Inkubation der Membran mit verschiedenen Konzentrationen Harnstoff und 1 M NaCl nicht von der Membran gelöst werden konnte.

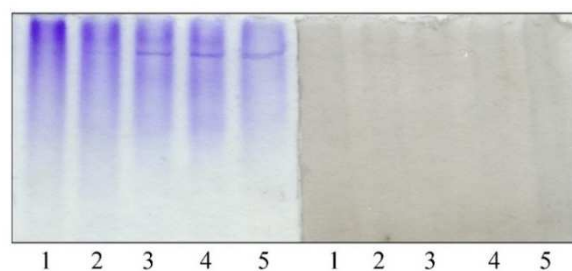


Abbildung 33: Bfr sollte aus der Membran MSR-1 durch Salz und den Zusatz von Harnstoff gelöst werden. Die entstandenen Extrakte wurden auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Hälften jeweils mit Coomassie Brilliant Blau sowie auf eisenhaltige Proteine mit der Färbung nach Fridovich gefärbt. 1: 1 M NaCl; 2: 1 M Harnstoff; 3: 2 M Harnstoff; 4: 3 M Harnstoff; 5: 4 M Harnstoff. In diesen Überständen konnte keine Eisenfärbung detektiert werden.

Abbildung 34 zeigt die Membranpellets nach der Extraktion durch NaCl und Harnstoff. Hierbei sind weniger Proteine im nativen Gel anhand der Coomassie-Färbung zu erkennen, jedoch zeigt sich deutlich eine eisenhaltige hochmolekulare Bande in allen Fraktionen, was bedeutet, dass das Bfr sich nach den Extraktionen in den Pellets befand.

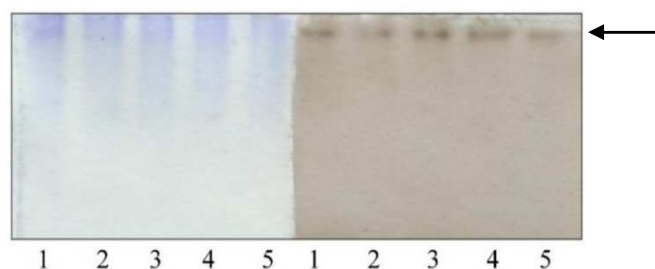


Abbildung 34: Extraktion der MSR-Membran mit Salz und Harnstoff. Nach der Extraktion wurden die Pellets auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue und nach Fridovich angefärbt. 1: 1 M NaCl; 2: 1 M Harnstoff; 3: 2 M Harnstoff; 4: 3 M Harnstoff; 5: 4 M Harnstoff. In den Pellets war bei allen Extraktionsversuchen die eisenhaltige hochmolekulare Bande nachweisbar (Pfeil).

Ein weiterer Ansatz war die Inkubation der Membran in Na_2CO_3 . Hier wurde die Membran nach der Inkubation zuerst kurz abzentrifugiert, damit der Überstand neutralisiert werden konnte. Dieser wurde dann erneut abzentrifugiert und Überstände und Pellets analysiert (Bahnen 1 - 3). Auch hier war die eisenhaltige Bande ausschließlich innerhalb der Pellets nachweisbar. Eine kleinere eisenhaltige Bande zeigte sich hier auch in den Überständen, wobei das Protein hier vermutlich teilweise denaturiert war.

Nachdem das Bfr mit Salz, Harnstoff und Na_2CO_3 nicht von der Membran getrennt werden konnte, wurde die vorextrahierten Membran mit Triton X-100 inkubiert. Die Überstände der Extraktionen wurde auf einem nativen Gel aufgetrennt (Bahnen 4 - 7). Es war eine deutliche, eisenhaltige Bande zu sehen, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Bfr um ein membrangebundenes Protein handelt, da sich dieses nur mittels Tensiden aus der Membran lösen ließ.

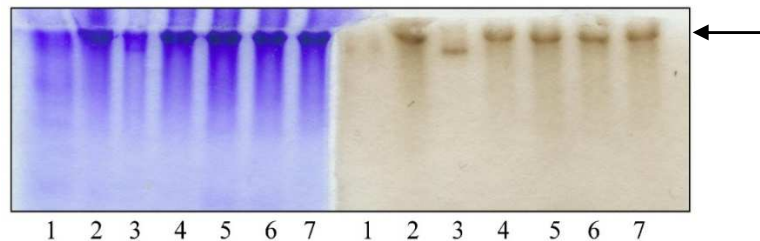


Abbildung 35: Extraktion von MSR-1-Membranen mit Na_2CO_3 . Die dabei entstandenen Fraktionen wurden in den Bahnen 1 - 3 aufgetragen. Außerdem wurde aus den Pellets der Salz- und Harnstoffextraktionen (Abbildung 34) ein weiterer Extrakt durch den Zusatz von Triton X-100 hergestellt (Bahnen 4 - 6). Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem nativen 6 - 12 % Polyacrylamidgel. Diese wurden mit Coomassie Brilliant Blau und nach Fridovich angefärbt. 1: Überstand nach Extraktion mit 100 mM Na_2CO_3 ; 2: 100 mM Na_2CO_3 Pellet 1 nach Zentrifugation bei 20.000 x g; 3: 100 mM Na_2CO_3 Pellet 2 nach Zentrifugation bei 272.000 x g; 4: Überstand Triton X-100 aus mit 1 M NaCl vorextrahierten Membranen 1M NaCl; 5: Überstand Triton X-100 aus mit 1M Harnstoff vorextrahierten Membranen; 6: Triton X-100 aus mit 2 M Harnstoff vorextrahierten Membranen. Nach der Na_2CO_3 -Extraktion war die eisenhaltige Bande in der Membranfraktion zu finden. Nach den Tensidextraktionen befand sich das eisenhaltige Protein im Überstand und konnte mit der Fridovichfärbung nachgewiesen werden (Pfeil).

4.13. Flotation von MSR-1B-Membranen über einen Saccharose-Stufengradienten

Nachdem die Membranen von MSR-1 und MSR-1B 14 h über einen Saccharosestufengradienten flotiert wurden, zeichneten sich sichtbare Unterschiede zwischen den Membranen ab. Die Membran von MSR-1 hatte sich diffus in einer sehr breiten Bande innerhalb der 45 %-Saccharoseschicht angereichert. Die MSR-1-Membran bildete eine deutlich schärfere Bande an der Grenze zwischen 45 % und 35 %. Unterhalb dieser Bande befand sich ein verwaschener Bereich, der aber weit weniger diffus war, als bei MSR-1. Innerhalb der 35 % Saccharoseschicht war bei MSR-1B eine weißliche Bande zu sehen. Bei MSR-1 hatte sich unten im Zentrifugenröhrchen ein Magnetosomenpellet abgelagert (nicht sichtbar auf dem Bild). Bei beiden Stämmen ist ein Großteil der sichtbaren Membran in die 45 % Saccharoseschicht aufgestiegen.

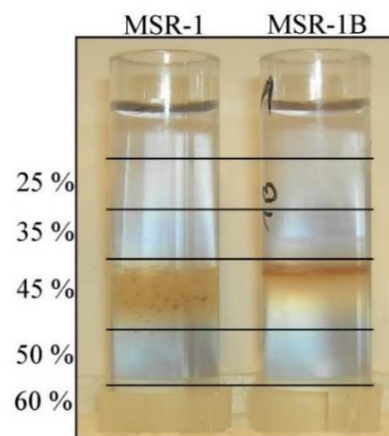


Abbildung 36: Saccharosestufengradienten nach Flotation von MSR-1 und MSR-1B-Membranen. Für die Flotation wurden Saccharosekonzentrationen von 60 - 25 % eingesetzt. Nach 14-stündiger Zentrifugation hatte sich der sichtbare Hauptteil der Membranen in der 45 % Saccharoseschicht angereichert. Oberhalb von 35 % ist bei MSR-1B eine schwache weiße Bande zu sehen. Bräunlichen Membranbanden von MSR-1 und MSR-1B unterscheiden sich deutlich in ihrer Schärfe. MSR-1 erscheint diffus, während sich die Membran bei MSR-1B in einer schärferen Bande an der Grenzschicht zu 35 % Saccharose abgelagert hat.

Um die Lokalisation des Bfrs in den Saccharosefraktionen nach der Flotation zu ermitteln, wurde ein Western Blot angefertigt. Vorher wurden die Fraktionen acetongefällt, um die Saccharose zu eliminieren und das Protein zu konzentrieren. RBfr wurde als Referenzprotein für den rBfr1-His-Antikörper verwendet.

Nach der Flotation von MSR-1B-Membranen, war der größte Teil des Bfrs in der 60 % Saccharoseschicht zu finden. Auch in der 50 % Saccharoseschicht war ein deutliches Signal zu erkennen. Diese Signale befanden sich unterhalb der hauptsächlich mit bloßem Auge sichtbaren Membranschicht (Bahn 5 und 6), was darauf hindeutet, dass sich auch außerhalb der sichtbaren Schicht größere Mengen Protein befanden.

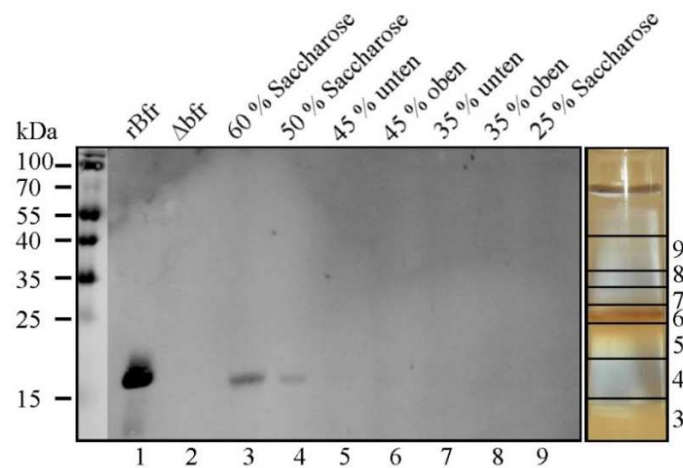


Abbildung 37: Immunologische Detektion der Bfr-1 Untereinheit nach Flotation von Membranen über einen Saccharosegradienten. Um die Lokalisation des Bfrs in der Membran überprüfen, wurde die Membran von MSR-1B über einen linearen Saccharosegradienten flотиert. Nach der Zentrifugation wurde fraktioniert und die Proteine über ein 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese wurden auf eine PVDF-Membran gebロットet, mit dem primären Antikörper Anti-Bfr1-His (1:3000) und dem sekundären Antikörper IRDye800 Anti-Kaninchen-IgG (1:200) inkubiert. Im Gegensatz zum überwiegenden Teil der Membran, die sich in der oberen 45 %-Schicht angereichert hatte, befand sich ein Großteil des Bfrs in der dichtesten Fraktion und war in abnehmenden Mengen auch in den Fraktionen darüber detektierbar.

Um die Verteilung der Proteine in den einzelnen Fraktionen nach der Flotation zu ermitteln, wurden die Fraktionen über ein 13 - 20 % denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass prominente Banden der flотierten Membranen in allen Saccharoseschichten zu finden waren. So erkennt man beispielsweise die Doppelbande bei 40 kDa in allen aufgetragenen Fraktionen, wie auch die Bande bei etwa 17 kDa.

Die Hauptmenge des Proteins befindet sich in den Fraktionen 5 - 7, während in Abbildung 37 zu sehen ist, dass sich die Hauptmenge des Bfrs in der Fraktion 3 befindet. Es scheint keine vollständige Trennung der Membran vom Bfr stattgefunden zu haben, da die Proteinmuster der Fraktionen sehr ähnlich sind.

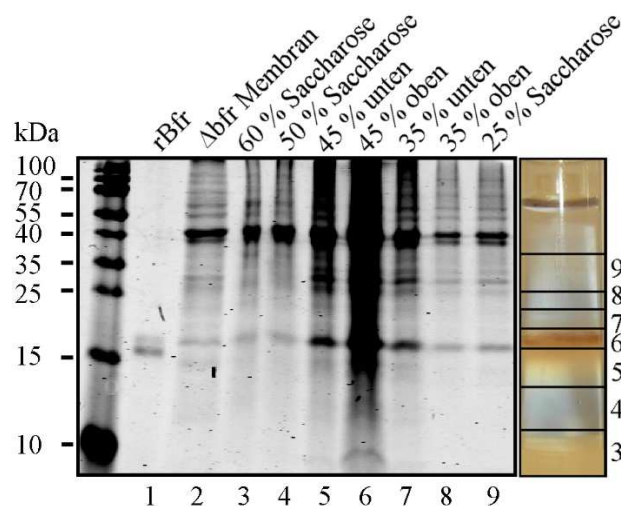


Abbildung 38: SDS-PAGE der Fraktionen der Flotation von Membranen über einen Saccharosegradienten. Die Membran von MSR-1B wurde durch Flotation über einen linearen Saccharosegradienten aufgetrennt und anschließend fraktioniert. Die Fraktionen wurden auf einem 13 - 20 % Polyacrylamidgel analysiert und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Das meiste Protein befindet sich in der oberen 45 % Saccharoseschicht, was auch nach der Zentrifugation zu sehen ist. Viele Banden sind in jeder Fraktion zu finden.

Nach der Flotation der Membranen wurde auch rBfr über einen Saccharose-Stufengradienten flотиert (Abbildung 39). Ein Großteil des Proteins befand sich in der 60 % Saccharoseschicht. Abnehmende Mengen waren bis in die 20 % Saccharoseschicht zu finden.

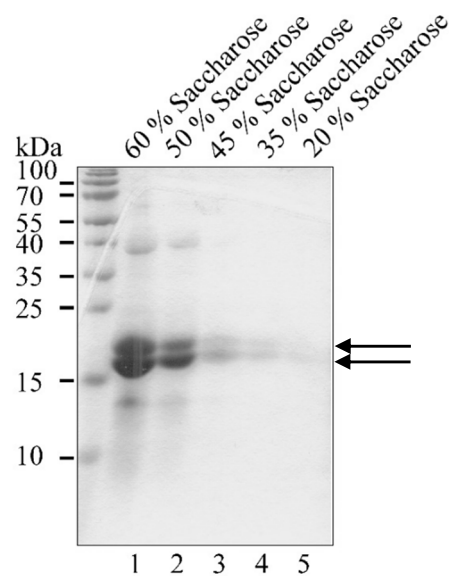


Abbildung 39: Flotation von rBfr über einen Saccharosestufengradienten. Die Fraktionen der jeweiligen Konzentration auf einem 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert und mit Coomassie Brillant Blau gefärbt. Der Großteil des rBfrs befand sich nach der Zentrifugation in der dichtesten Schicht. Absteigende Mengen rBfr waren auch in den weniger konzentrierten Saccharosekonzentrationen zu finden.

4.14. Sequenzen der N-terminalen Edman-Sequenzierung

Abbildung 40 zeigt die Sequenzen der jeweiligen Banden des aufgereinigten rBfrs mit den dazugehörigen Banden im denaturierenden 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel. Dabei sind die Untereinheiten 1 und 2 des Bfrs in der Doppelbande bei etwa 17 kDa zu erkennen. Die zusätzliche Bande bei etwa 38 kDa weist die N-terminale Sequenz der Untereinheit 2 auf, wurde aber im Western Blot auch vom Antikörper erkannt, der gegen die Untereinheit 1 gerichtet ist (Abbildung 43). Dabei ist die Intensität der Bande bei 38 kDa im Vergleich zur Doppelbande sehr gering.

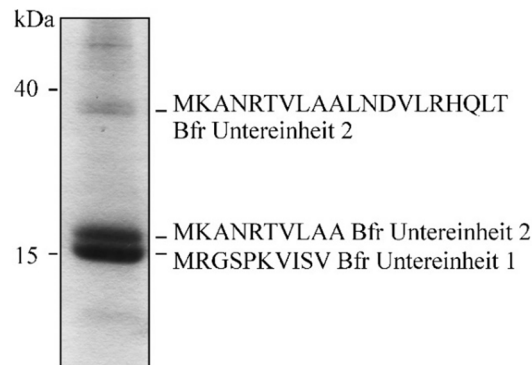


Abbildung 40: N-terminale Edman-Sequenzierung der Banden von rBfr von einer PVDF-Membran. Das aufgereinigte rBfr wurde auf einem 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dabei zeigten sich mehrere prominente Banden bei 15 kDa, 17 kDa und 38 kDa. Diese wurden mittels N-terminaler Edman-Sequenzierung ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen den Banden zugeordnet. Bei der Bande um 15 kDa handelt es sich um die Untereinheit 1 des Bfrs, bei der 17 kDa-Bande handelt es sich um die Untereinheit 2. Die zusätzliche Bande bei 38 kDa weist die Sequenz der zweiten Bfr-Untereinheit auf.

4.15. Polyklonale Antikörper

Durch Überexpression wurde die Bfr1-Untereinheit von *M. gryphiswaldense* mit His-Tag aus *E. coli*-Zellen gewonnen. Die Lokalisation der Untereinheit wurde durch Zentrifugation festgestellt. Zum Vergleich wurde das Gesamtprotein der aufgeschlossenen Zellen (Bahn 1) und nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g, der Überstand (Bahn 2) sowie das Pellet (Bahn 3) auf ein 13 - 20 % denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei war eine starke Bande bei etwa 18 kDa zu sehen. Diese fand sich nach der Zentrifugation überwiegend im Pellet, was für das Vorhandensein von Einschlusskörperchen sprach.

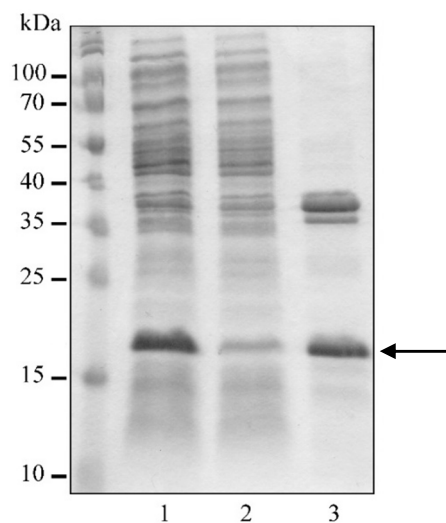


Abbildung 41: SDS-PAGE der rBfr1-haltigen Fraktionen nach Überexpression in *E. coli*. Die rBfr1-Untereinheit mit His-Tag wurde durch Überexpression in *E. coli* gewonnen. Um die Lokalisation des Proteins nach der Expression festzustellen, wurden die verschiedenen Fraktionen nach dem Aufschluss und der Zentrifugation auf einem 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Der Großteil des rBfr1-Proteins war nach der Zentrifugation als Einschlusskörperchen (Bahn 3) zu finden. 1: Gesamtprotein nach Aufschluss, 2: Überstand der Zentrifugation mit 12.000 x g, 3: Pellet mit Einschlusskörperchen nach Zentrifugation bei 12.000 x g

Das rBfr1-His wurde aus den Einschlusskörperchen über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Dabei zeigt Abbildung 42, dass das rekombinante Protein mit His-Tag fast vollständig an das Säulenmaterial gebunden hatte, da im Durchlauf keine Bande der Untereinheit 1 zu erkennen war (Bahn 1 und 2). Das über einen linearen Imidazol-Gradienten eluierte Protein zeigte nach dem Säulenlauf deutlich weniger Verunreinigungen, da diese größtenteils nicht an die Säule gebunden hatten (Bahn 4 - 9).

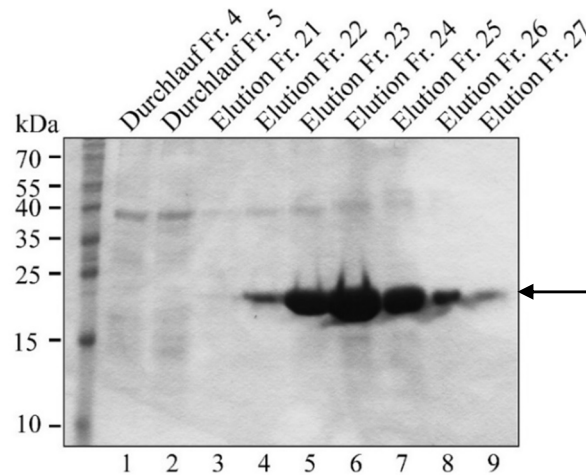


Abbildung 42: Reinigung von Bfr1-His über eine Ni-NTA-Säule. Die Bfr-1 Untereinheit mit His-Tag wurde aus Einschlusskörperchen aufgereinigt. Diese wurden in harnstoffhaltigem Puffer gelöst und die Proteine an eine Ni-NTA-Säule gebunden. Diese wurden im linearen Imidazol-Gradienten (30 - 500 mM) eluiert und die Fraktionen auf einem 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Um die Reaktivität des Anti-rBfr1-His-Antikörpers zu testen, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 43), bei dem abfallende Mengen von rBfr mit dem Anti-rBfr1-His Primärantikörper inkubiert wurden. Mit dem hier verwendeten POD-Sekundärantikörper ist ein Signal bis zu einer minimalen rBfr-Menge von 62,5 ng Protein zu erkennen. Ein weiteres Signal zeigte sich bei größeren aufgetragenen Proteinmengen auch bei 38 kDa. Dieses Signal ist bei Proteinmengen zwischen 1 - 8 µg sichtbar. Dabei ist die Intensität deutlich geringer, als das der Bande bei 17 kDa. Auch die Bande bei etwa 13 kDa, die schon während der Expression sichtbar wurde, wurde vom Antikörper erkannt. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um ein Abbauprodukt des Bfr-Proteins handelt.

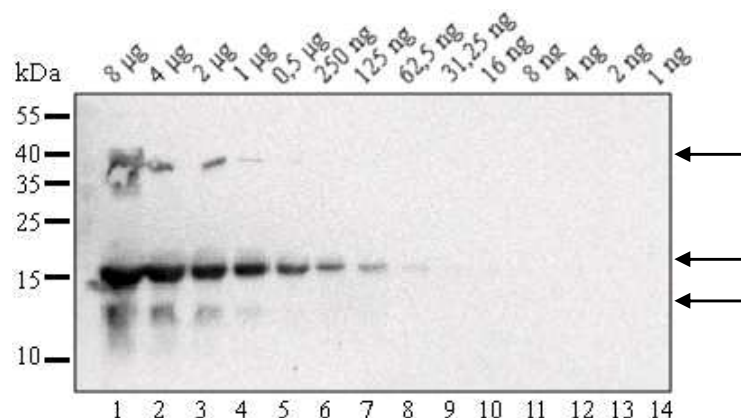


Abbildung 43: Immunologische Detektion der rBfr-1-Untereinheit mittels Anti-Bfr1-Antikörpers. Das aufgereinigte rBfr wurde in abnehmenden Konzentrationen über ein 13 - 20 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Western Blot wurde mit Anti-rBfr1-His der ersten Abnahme (1:3000) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein POD Anti Kaninchen Antikörper (1:80.000) verwendet. Die Expositionszeit betrug 2 min.

4.16. Mößbauerspektren

Mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie sollte geklärt werden, ob die schon früher in Mößbauerspektren beobachtete ferritinartige Komponente dem Bfr zugeordnet werden kann. Des Weiteren sollte die Lokalisation des Bfrs in den Fraktionen der *M. gryphiswaldense*-Zellen untersucht werden. Dazu wurden lösliche Proteine, Membranproteine, die Δbfr -Deletionsmutante und aufgereinigtes rBfr gemessen.

Von Interesse waren vor allem die Spektren, welche die ferritinartige Komponente zeigten. Die Mößbauerspektren von Ferrihydritmineralien, wie sie bei der Ferritinfamilie vorkommen, zeigen eine spezifische Temperaturabhängigkeit. Unterhalb von 77 K findet ein superparamagnetischer Übergang statt, wobei das Spektrum von einem Quadrupoldublett in ein Sechslinienmuster übergeht, welches bei tierischen Ferritinen bei 4,2 K voll aufgelöst ist. Bei Bakterioferritinen findet diese Aufspaltung fast immer unterhalb von 4,2 K statt (Watt, Frankel et al. 1986), weil die Bfr-Proteine einen phosphatreicheren und daher amorpheren Eisenkern aufweisen, als es bei tierischen Ferritinen der Fall ist. (Treffry und Harrison 1979; Mann, Williams et al. 1987; Rohrer, Islam et al. 1990)

4.16.1. Mößbauerspektren der lyophilisierten löslichen Proteine von MSR-1

Die löslichen Proteine von MSR-1 (Abbildung 44) wurden lyophilisiert und bei 4,2 K gemessen. Es sind drei Komponenten zu erkennen, wobei ein Dublett (violett), den Cytochromen zuzuordnen ist. Hierbei handelt es sich um die Komponente mit der größten Häufigkeit von 92 %. Die beiden anderen Komponenten geringer Häufigkeit (schwarz und rosa) konnten nicht zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich um Artefakte durch die Gefriertrocknung.

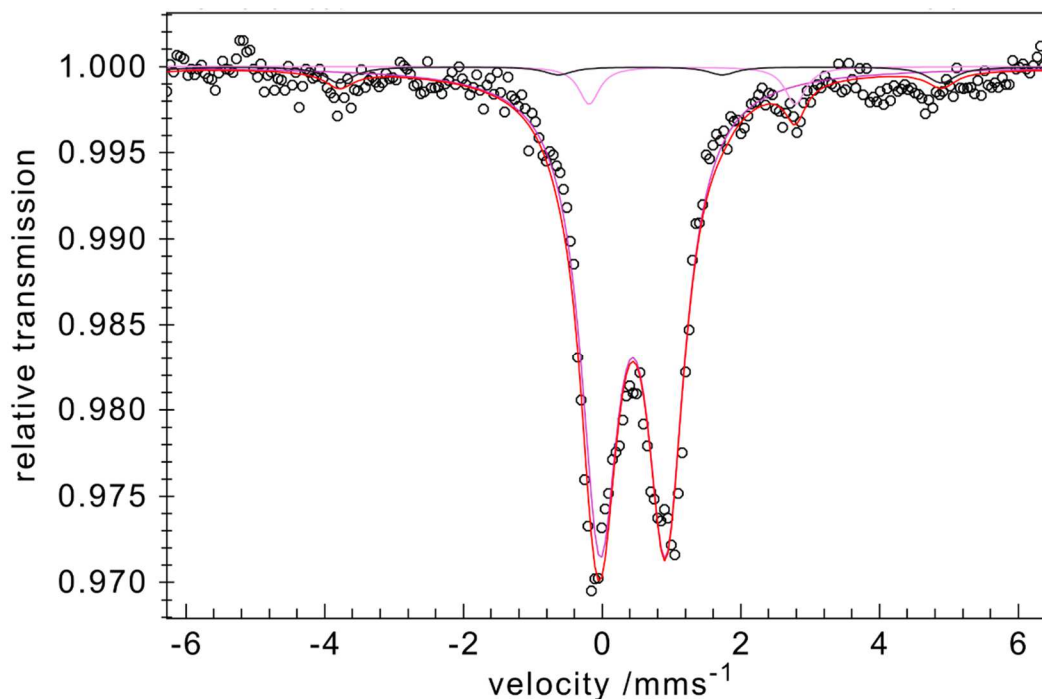


Abbildung 44: Mößbauerspektrum der lyophilisierten Proteine von MSR-1 bei 4,2 K. Rot: Simulation, Violett: Cytochrome ($\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,95$ mm/s, relative Häufigkeit = 92 %); Rosa: unbekannte Komponente geringer Häufigkeit ($\delta = 1,3$ mm/s, $\Delta E_Q = 2,97$ mm/s, relative Häufigkeit = 4 %); Schwarz: unbekannte Komponente geringer Häufigkeit ($\delta = 1,3$ mm/s, $\Delta E_Q = 2,97$ mm/s, relative Häufigkeit = 4 %)

4.16.2. Mößbauerspektren der Membranfraktion von $\Delta mamM$ und MSR-1

In Abbildung 45 ist das Spektrum zu sehen, welches bei 130 K von der Membranfraktion der $\Delta mamM$ -Deletionsmutante aufgenommen wurde. Als dominierende Komponente ist das Ferrihydriteisen des Bfrs zu sehen (grün). Magnetit wird bei $\Delta mamM$ nicht nachgewiesen, da dieser Stamm aufgrund der Deletion des $mamMs$ keine Magnetosomen bildet. Dies ist für die Mößbauermessung von Vorteil, da Magnetit im Spektrum sonst als dominierende Komponente auftritt (Abbildung 46).

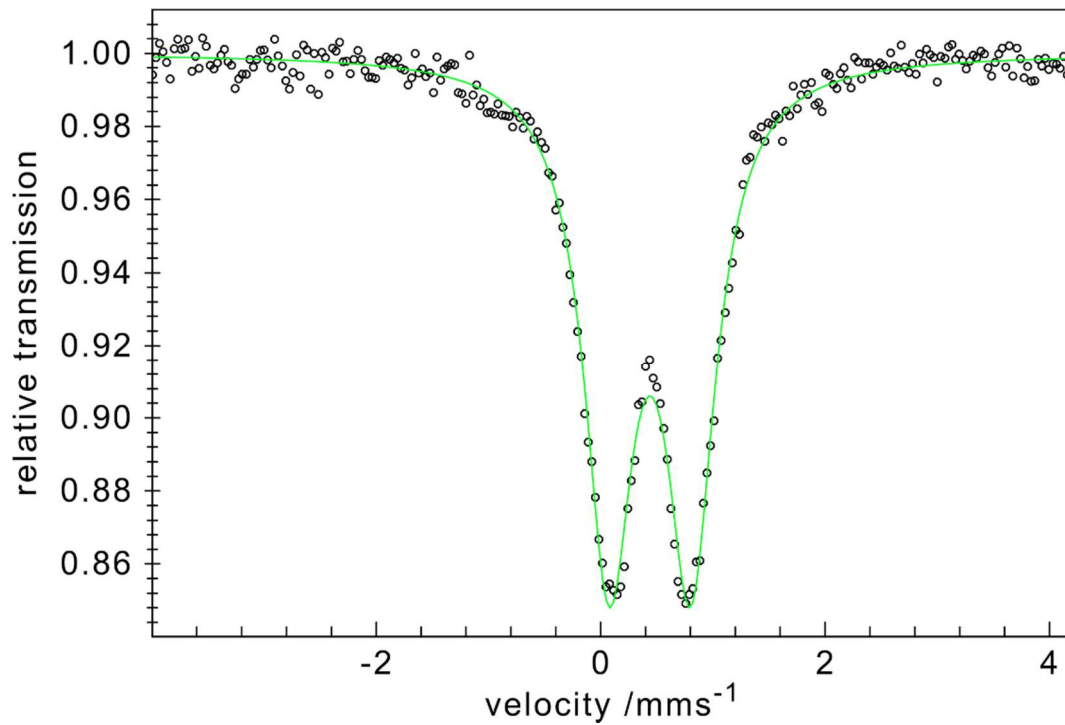


Abbildung 45: Mößbauerspektrum der Membranfraktion des unmagnetischen Stamms $\Delta mamM$ bei 130 K. Grün: Ferrihydrit (Bfr) ($\delta = 0,44 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,73 \text{ mm/s}$)

Bei 4,2 K zeigt sich das für Ferrihydrit typische Sechslinienmuster (Abbildung 46, A, grün). Ferrihydrit ist mit 87 % die dominierende eisenhaltige Komponente. Zusätzlich konnten Eisen-Schwefelproteine mit einer relativen Häufigkeit von 13 % nachgewiesen werden. In Abbildung B wird ein typisches Magnetitspektrum bei 4,2 K gezeigt (blau und gelb). Magnetit ist mit einer relativen Häufigkeit von 93 % die dominierende eisenhaltige Komponente. Ferrihydrit ist mit 7 % relativer Häufigkeit auch bei MSR-1 in der Membranfraktion vorhanden.

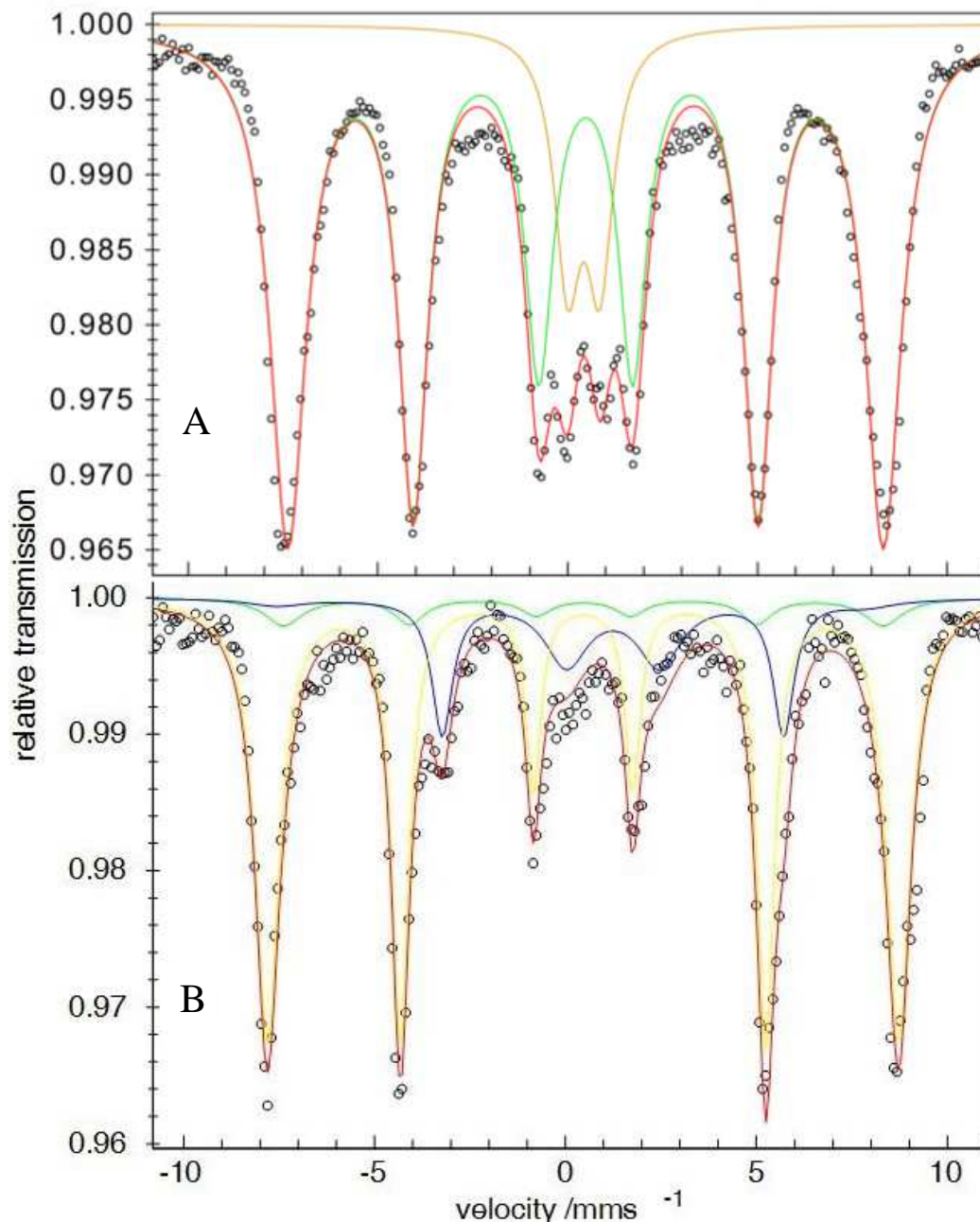


Abbildung 46: Mößbauerspektren der Membranfraktionen von $\Delta mamM$ und MSR-1, gemessen bei 4,2 K. A: $\Delta mamM$ Membranen zeigen ein Sechs-Linienmuster, typisch für Ferrihydrit, Rot: Simulation; Grün: Ferrihydrit, Bfr ($\delta = 0,46$ mm/s, $\Delta E_Q = 0$ mm/s, $B_{hf} = 54,8$, relative Häufigkeit = 87 %); Orange: Eisen-Schwefelprotein ($\delta = 0,42$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,91$ mm/s, relative Häufigkeit = 13 %); B: typisches Magnetitspektrum bei 4.2 K mit geringem Ferrihydrit (Bfr)-Anteil. Rot: Simulation, Grün: Ferrihydrit (Bfr) ($\delta = 0,46$ mm/s, $\Delta E_Q = 0$ mm/s, $B_{hf} = 48,5$, relative Häufigkeit = 7 %); Blau: Magnetit ($\delta = 0,46$ mm/s, $\Delta E_Q = 0$ mm/s, $B_{hf} = 51,2$, relative Häufigkeit = 68 %); Gelb: Magnetit ($\delta = 0,7$ mm/s, $\Delta E_Q = -1,1$ mm/s, $B_{hf} = 48$, relative Häufigkeit = 25 %)

4.16.3. Mößbauerspektrum des Stamms Δbfr

Ganze Zellen der Δbfr -Deletionsmutante wurden bei 130 K gemessen. Dies diente der zweifelsfreien Zuordnung der ferritinartigen Ferrihydritkomponente zum Bfr. Im Spektrum waren drei Komponenten nachweisbar. Zum einen handelt es sich dabei um die beiden Sextette des Magnetits (blau und gelb), die auch hier mit 97 % die Haupteisenkomponente bilden, sowie um eine $[4Fe-4S]^{2+}$ -Komponente (orange). Das typische Dublett der ferritinartigen Ferrihydritkomponente (Abbildung 45) fehlt, so dass diese Komponente zweifelsfrei dem Bfr zuzuordnen ist.

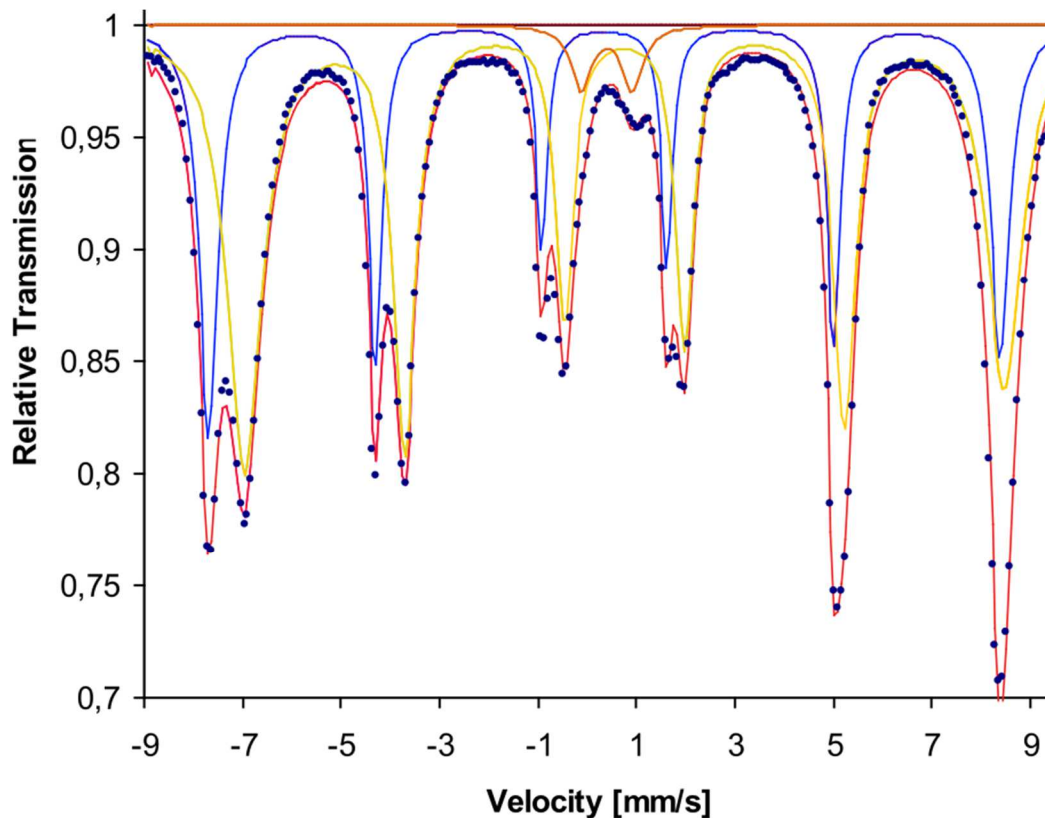


Abbildung 47: Mößbauerspektrum der ganzen Zellen von Δbfr bei 130 K. Rot: Simulation; Blau: Magnetit A ($\delta = 0,35$ mm/s, $B_{hf} = 49,3$ T, relative Häufigkeit = 32,3 %); Gelb: Magnetit B ($\delta = 0,76$ mm/s, $B_{hf} = 47,4$ T, relative Häufigkeit = 64,6 %); Orange: Eisen-Schwefelprotein ($\delta = 0,4$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,04$ mm/s, relative Häufigkeit = 3,1 %)

4.16.4. Mößbauerspektren des aufgereinigten rBfrs

Abbildung 48 zeigt die Messungen des rBfrs bei 130 K und 5 K. Dieses wurde während der Expression mit ^{57}Fe angereichert. Trotz geringer Eisen-Konzentration erkennt man bei 130 K das für Ferrihydrit (Bfr) typische Dublett. Bei 5 K zeigt sich die beginnende Aufspaltung zu einem Sechslinienmuster. Die Aufspaltungstemperatur liegt hier niedriger als bei dem nativen Bfr aus *M. gryphiswaldense* (Abbildung 45), so dass bei 5 K nur eine beginnende Aufspaltung zu sehen ist.

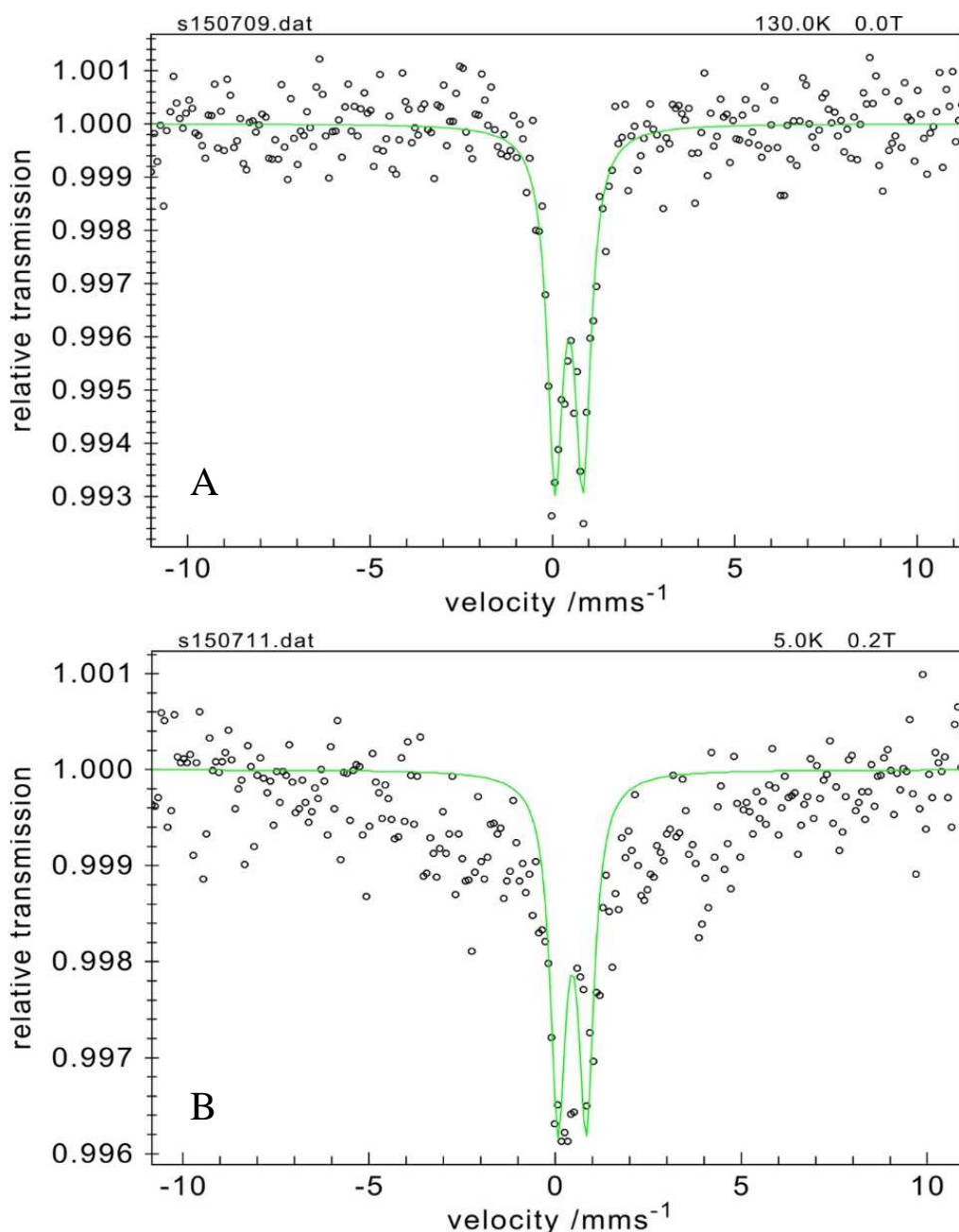


Abbildung 48: Mößbauerspektren des aufgereinigten und mit ^{57}Fe angereicherten rBfrs bei 130 und bei 5 K. A: rBfr bei 130 K: Ferrihydrit (Bfr) ($\delta = 0,46 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,76 \text{ mm/s}$); B: rBfr bei 5 K: Ferrihydrit (Bfr) ($\delta = 0,46 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,76 \text{ mm/s}$)

4.17. Kristallisierung des rBfr

Für die Kristallisierung des rBfrs wurden die Bedingungen mithilfe des „Structure Screen 1&2 HT-96“-Kits optimiert.

Die Bedingungen für die Kristallisation wurden auf 0,2 M Natrium-Citrat, 0,1 M Tris, pH 8,5 unter Zugabe von 30 % (v/v) PEG 400 und 0,2 M Malonat, 0,1M Tris, pH 8,5 unter Zugabe von 30 % (v/v) PEG 400 eingeschränkt. Dabei kristallisierte das Protein vor allem in Form dünner Scheiben.

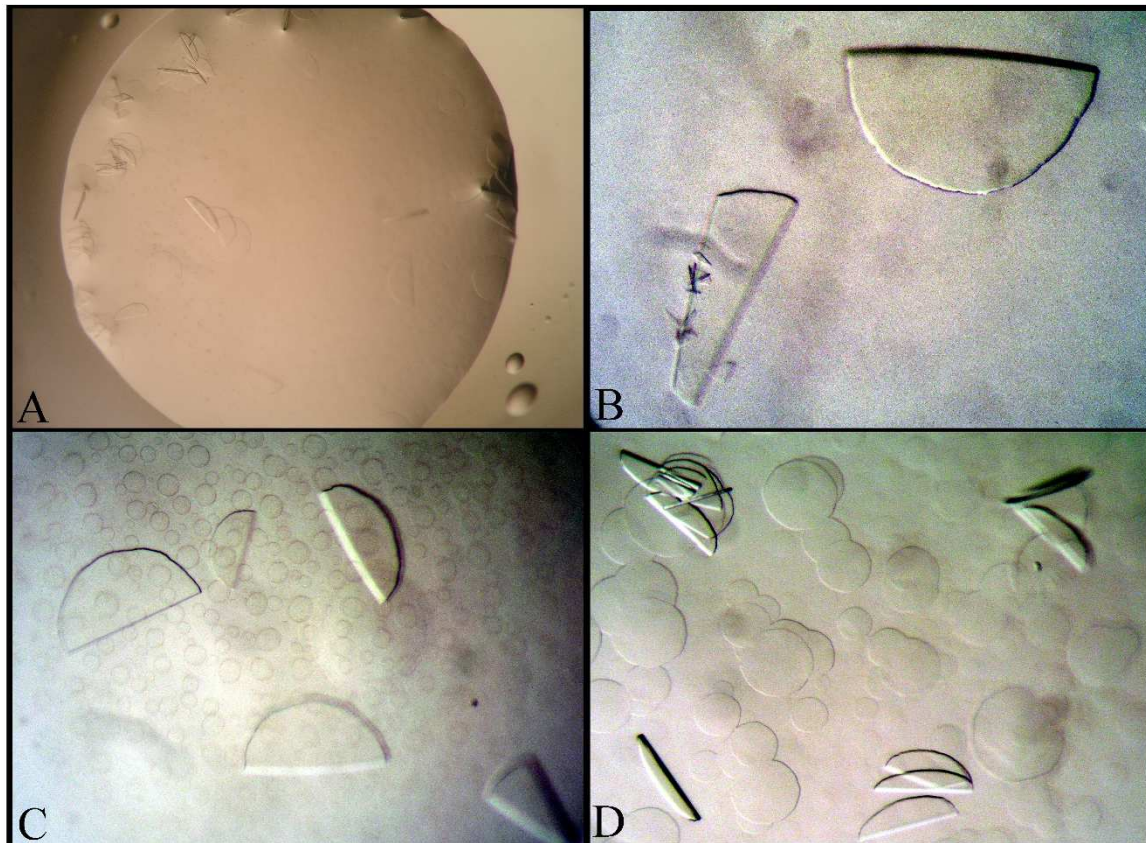


Abbildung 49: Kristalle des rBfrs. Das rBfr-Protein wurde unter verschiedenen Bedingungen kristallisiert. Hier sind die häufigsten Kristallmorphologien zu sehen, bei denen es sich überwiegend um halbkreisförmige Scheiben unterschiedlicher Dicke handelte. A: 0,2 M Natrium-Citrat, pH 8,5 30 % PEG 400, 0,1 M Tris; B: 0,2 M Natrium-Tartrat, pH 8,5, 30 % PEG400, 0,1 M Tris; C: 0,2 M Natrium-Citrat, pH 8,5 30 % PEG 400, 0,1 M Tris; D: 0,2 M Natrium-Citrat, pH 8,5 30 % PEG 400, 0,1 M Tris

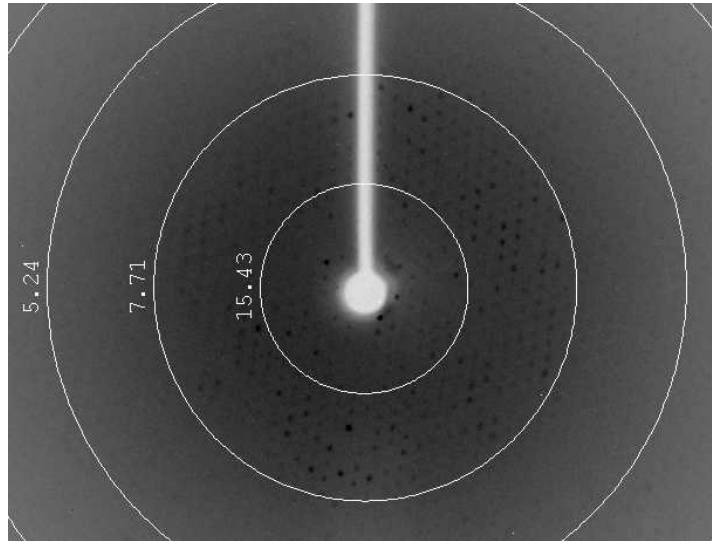


Abbildung 50: Röntgenbeugungsmuster eines rBfr-Kristalls. Von einem scheibenförmigen rBfr-Kristall (0,2 M Citrat, pH 8,5, 30 % PEG 400, 0,1 M Tris) wurde ein Röntgenbeugungsmuster aufgenommen. Die Auflösung lag hierbei bei 7,71 Å.

5. Diskussion

5.1. Klonierung des Bfrs von *M. gryphiswaldense*, Sequenzen der rBfr-Untereinheiten und Sequenzvergleiche mit anderen bekannten Mitgliedern der Ferritinfamilie

Typische Bakterioferritine sind aus 24 Untereinheiten bestehende Homopolymere, die bis zu 12 Häm b-Gruppen binden können, so auch bei dem sehr gut untersuchten Bfr von *E. coli* (Andrews, Smith et al. 1993). Wenige Ausnahmen von dieser Zusammensetzung sind bisher bekannt. So hat *Neisseria gonorrhoeae* z.B. zwei verschiedene Typen von Untereinheiten (18 kDa und 22 kDa), die zu einem Protein mit 24 Untereinheiten zusammengesetzt sind (Chen und Morse 1999).

Auch *Synechocystis sp.* PCC 6803, Modellorganismus der Cyanobakterien, besitzt zwei *bfr*-Gene, bei denen die Sequenz sogar Hinweise auf eine Funktionsteilung gibt. Bei der BfrA-Untereinheit fehlt das Häm b-koordinierende Methionin an Position 52, der BfrB-Untereinheit fehlt das Ferroxidasezentrum durch Austausch einiger konservierter Aminosäuren. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass nur jeweils eine Untereinheit Häm binden kann, während die andere ein funktionierendes Ferroxidasezentrum aufweist (Keren, Aurora et al. 2004).

Zwei verschiedene Untereinheiten sind ansonsten bei tierischen Ferritinen bekannt, wo sie auch verschiedene Funktionen erfüllen. Die Häufigkeit der jeweiligen Untereinheit im Heteropolymer ist dabei von der Lokalisation in verschiedenen Geweben abhängig. Die H-Untereinheit beinhaltet ein Ferroxidasezentrum, die L-Untereinheit nicht. Diese scheint aber für die Bildung eines regelmäßigen Eisenkerns von Bedeutung zu sein (Harrison und Arosio 1996).

Bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* und anderen *Magnetospirillum*-Verwandten, z.B. *Magnetospirillum magnetotacticum* wurden auch zwei *bfr*-Gene gefunden, die operonartig organisiert sind (Bertani, Huang et al. 1997). Dies kann als deutlicher Hinweis auf ein ungewöhnliches, aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehendes Bfr gewertet werden.

Daraufhin wurden für die Produktion eines rekombinanten Bfrs die beiden *bfr*-Gene von *Magnetospirillum gryphiswaldense* in einem Stück, abgesehen vom Promotor und der ersten Ribosomenbindungsstelle des Operons, in den pet15b-Expressionsvektor kloniert (Absatz 3.7).

Als Ribosomenbindungsstelle wurde die im Vektor enthaltene Sequenz AGGAGA genutzt. Die zweite Ribosomenbindungsstelle, welche bereits in der Sequenz der *bfr*-Gene vorhanden war, blieb bei der Klonierung erhalten. Da beide Untereinheiten synthetisiert wurden, war diese Ribosomenbindungsstelle auch funktionell. Diese Sequenz der Ribosomenbindungsstelle ist mit der im pet15b vorhandenen Ribosomenbindungsstelle identisch.

Als Promotor diente der T7-Promotor des pet15b-Vektors, der den Vorteil hat, dass er als starker Promotor die Produktion großer Mengen rekombinanten Proteins ermöglicht. Das pet-System wurde zuerst von Studier und Moffat entwickelt (Studier und Moffat 1986).

Für die Expression ist die Verwendung eines T7-Expressionsstamms Voraussetzung, da die RNA-Polymerase des Phagen T7 vorhanden sein muss. Das pet-Expressionssystem ist gut geeignet für die Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine und wird häufig verwendet. *E. coli* BL 21-Gold wurde als Expressionsstamm verwendet, da hier die T7-Polymerase vorhanden ist. Zusätzlich fehlen diesem Stamm einige Proteasen, die häufig für den Abbau rekombinanter Proteine verantwortlich sind.

Als Nachteil ist zu nennen, dass bei T7-Expressionssystemen oftmals schon vor der Induktion eine Expression der gewünschten, rekombinanten Proteine stattfindet, was besonders bei toxischen Produkten ein Problem darstellt und auch die Bakterienzellen unnötig vor der eigentlichen Expression belastet, was auch zum Verlust des Expressionsplasmids führen kann (Novagen 2003).

Eine Expression des Bfrs vor der Induktion durch IPTG wurde auch hier beobachtet, wenn der Expressionsstamm direkt in LB-Medium kultiviert wurde. Daher wurden die Zellen vor der Induktion in M9-Medium mit einem 10 % LB-Anteil und Zusätzen kultiviert. In diesem Medium wurde vor der Induktion mit IPTG keine Expression der *bfr*-Gene mehr beobachtet (Abbildung 11).

Nach der Aufreinigung des rBfrs, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Wie man durch die Auftrennung des rBfrs im nativen Gel sehen konnte, zeigte sich das rBfr als eine hochmolekulare, eisenhaltige Bande. Nachdem diese einzelne Bande ausgeschnitten und auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurde, zeigte sich die erwartete Doppelbande der beiden Bfr-Untereinheiten (Abbildung 18). Auch diese Beobachtung untermauert das Vorhandensein zweier Bfr-Untereinheiten in einem Protein. Auch zeigten sich die Untereinheiten während der Aufreinigung in den gesammelten Fraktionen immer im selben Verhältnis zueinander (Abbildung 12, Abbildung 13). Dies spricht gegen das Vorliegen von zwei Bfr-Homopolymeren und für ein Bfr mit zwei verschiedenen Untereinheiten.

Die Sequenzen der N-terminalen Edman-Sequenzierung machten eine Zuordnung der Gelbanden zu den entsprechenden Bfr-Untereinheiten möglich (Abbildung 40). Dabei entsprach die untere Bande der Untereinheit 1, welche ein errechnetes Molekulargewicht von 17,96 kDa hat. Dies ist die kleinere der beiden Untereinheiten. Die mittlere Gelbande entsprach der Untereinheit 2, welche mit einem errechneten Molekulargewicht von 18,31 kDa, größer als die erste Untereinheit ist.

Die obere Bande in Abbildung 13 bei 38 kDa, zeigte nach der N-terminalen Edmansequenzierung die Sequenz der zweiten Bfr-Untereinheit, nicht jedoch die der ersten. Dennoch wurde die Bande auch von dem rBfr1-Antikörper erkannt. Dieser reagiert nicht mit der zweiten Untereinheit (Abbildung 43).

Dies könnte darauf hindeuten, dass in selten Fällen eine kovalente Bindung zwischen der zweiten und der ersten Bakterioferritinuntereinheit auftreten kann. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch um ein Artefakt, welches durch die Isolation des Bfrs, möglicherweise durch Oxidation, entstand (Grimsrud, Xie et al. 2008).

Auch entspricht die Reihenfolge der Sequenzen nicht der Reihenfolge der *bfr*-Gene, bei denen zuerst die Bfr-Untereinheit 1 vor der Untereinheit 2 codiert wird.

Man kann davon ausgehen, dass es sich bei der Bildung der 38 kDa-Bande nicht um ein häufig auftretendes Phänomen handelt, da die Intensität dieser Bande im Vergleich zu den anderen Banden sehr gering ist.

Der Vergleich der Sequenzen der Untereinheiten von *Magnetospirillum gryphiswaldense* mit anderen Bfr-Sequenzen, zeigte, dass diese nur relativ geringe Identitäten zu anderen bekannten Bakterioferritin-Untereinheiten aufwiesen.

Die Bfr-Untereinheit 1 wies z.B. nur 47 % Identität zu *E. coli*-Bfr auf, während es bei Untereinheit 2 immerhin 56 % Identität waren. Die größten Übereinstimmungen gab es mit Bakterioferritinsequenzen anderer Magnetospirillen. Die Sequenzen der beiden Bfr-Untereinheiten untereinander wiesen nur geringe Ähnlichkeiten auf (44 % Identität). Dies könnte auf eine unterschiedliche Funktion der Untereinheiten hindeuten, wie es z.B. für die die H- und L-Untereinheiten von tierischen Ferritinen bekannt ist (Harrison und Arosio 1996).

Ferritin und Bakterioferritin verbindet hingegen nur eine entfernte Verwandtschaft (Andrews, Smith et al. 1991). Dies wird auch deutlich, da beispielsweise das Ferritin von *Rhodospirillum rubrum* eine eigene Gruppe mit dem *Homo sapiens* Ferritin bildet, statt mit den Bakterioferritinen (Abbildung 51).

Magnetotaktische Bakterien sind nach Analysen der 16s rRNA polyphyletisch. Die Anreicherung von bisher unkultivierbaren magnetotaktischen Bakterien aus Sedimenten für Analysen ist durch die Ausnutzung der Magnetotaxis möglich (Amann, Peplies et al. 2007). Unter den so analysierten magnetotaktischen Bakterien fanden sich viele Alphaproteobacteria aber auch Deltaproteobacteria und Nitrospira. Auch einige Gammaproteobacteria wurden gefunden (Lefevre, Vilorio et al. 2012).

Leider ist die Anzahl der verfügbaren Bfr-Sequenzen der MTB sehr überschaubar, da bisher nur wenige MTB kultiviert wurden. Dabei handelt es sich ausschließlich um Magnetospirillen, mit Ausnahme des magnetischen Coccus MC-1 (Meldrum, Mann et al. 1993), für den aber keine Bfr-Sequenz vorliegt.

Daher ist die Einordnung der MTB-Bakterioferritine hier ausschließlich auf den Magnetospirillen-Zweig der MTB bezogen. Auch die Anzahl der Bfr-Untereinheiten bei anderen MTB außerhalb der Magnetospirillen ist bisher ungeklärt.

Die Einordnung der Sequenzen der Bakterioferritine in den Stammbaum (Abbildung 51), zeigt zwei klar abgegrenzte Gruppen von Bakterioferritinen.

Die beiden Untereinheiten der MTBs finden sich immer in verschiedenen Gruppen. Das heißt, dass die Sequenzen der beiden Untereinheiten aus einem MTB unterschiedlicher sind als die Sequenz der jeweiligen Untereinheit des MTB und der anderen nicht-MTBs aus derselben Gruppe. Ferritin und Dps bilden eine eigene, klar abgegrenzte Gruppe.

Dies deutet darauf hin, dass die Entstehung der beiden MTB Bfr-Untereinheiten schon vergleichsweise lange zurückliegt, oder dass es einen starken Selektionsdruck zur Differenzierung der beiden Untereinheiten gab.

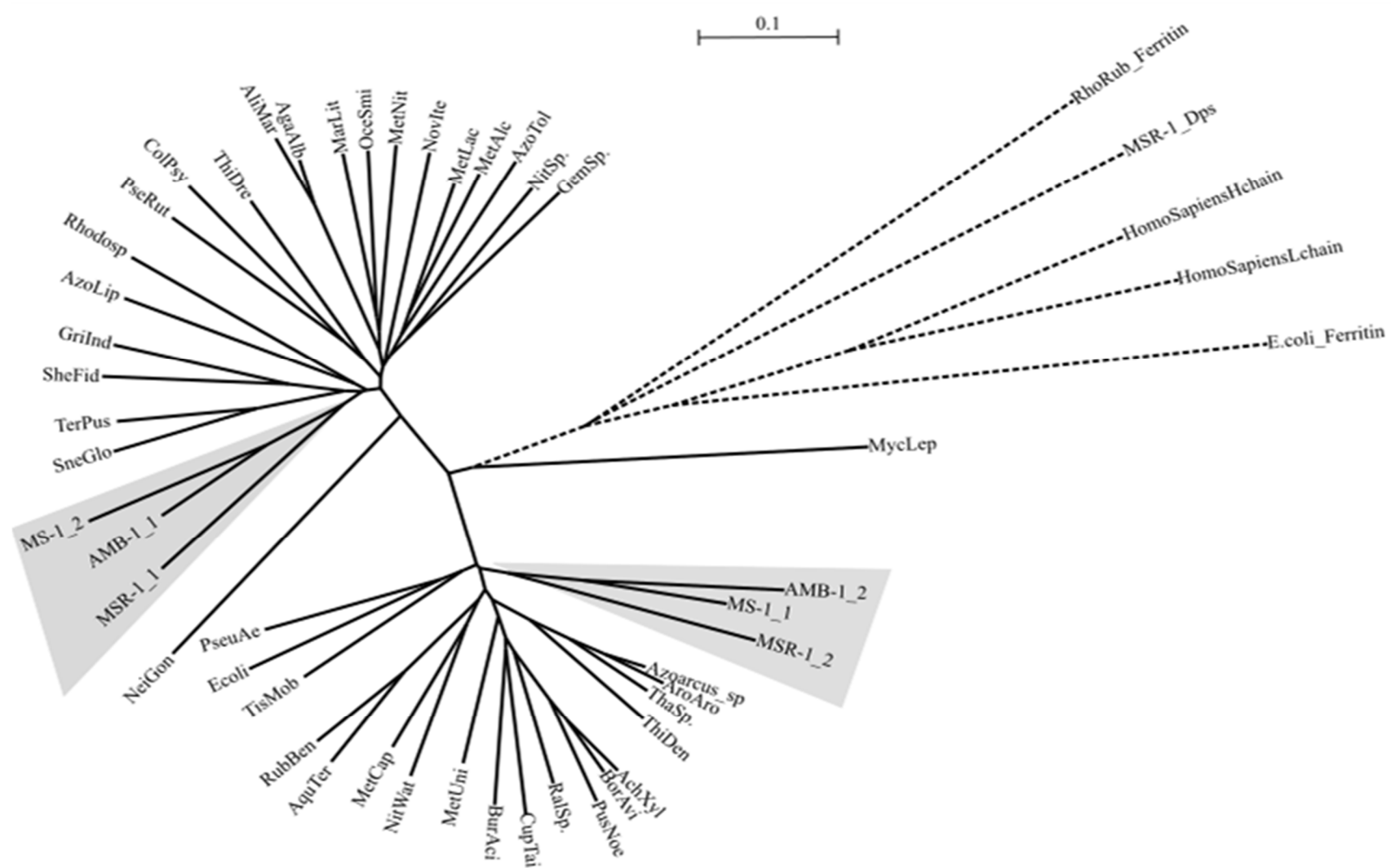


Abbildung 51: Stammbaum der Eisenspeicherproteine, Sequenzen der Bakterioferritinuntereinheiten der Magnetospirillen sind grau unterlegt, Die Zweige der Gruppe der Ferritine und Dps-Proteine sind gestrichelt gezeichnet. Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite.

Der Stammbaum wurde unter Verwendung der folgenden Parameter für Pairwise Alignments erstellt:

Parameter des Stammbaums:	Multiple Alignments	Protein Gap Parameters
Pairwise Alignments Modus: Slow/Accurate Protein Weight matrix: Gonnet 250 Gap opening penalty=10.00 Gap extension penalty=0.10	Protein Weight matrix: Gonnet series Gap opening penalty =10.00 Gap extension penalty =0.20 Delay divergent sequences =30%	Residue-specific Penalties: on Residues=GPSNDQEKR Hydrophilic Penalties: on End Gap Separation: off Gap Separation Distance=4 Output order=aligned \
Exclude position with Gaps: on Correct for multiple substitutions: off		

Abkürzungsverzeichnis Stammbaum:

Abkürzung	Protein
AchXyl	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> Bfr
AgaAlb	<i>Agarivorans albus</i> Bfr
AliMar	<i>Aliagarivorans marinus</i> Bfr
AMB-1_1	<i>Magnetospirillum magneticum</i> Bfr Untereinheit 1
AMB-1_2	<i>Magnetospirillum magneticum</i> Bfr Untereinheit 2
AquTer	<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> Bfr
AroAro	<i>Aromatoleum aromaticum</i> Bfr
Azoarcus_sp	<i>Azoarcus sp.</i> Bfr
AzoLip	<i>Azospirillum lipoferum</i> Bfr
AzoTol	<i>Azoarcus toluclasticus</i> Bfr
BorAvi	<i>Bordetella avium</i> Bfr
BurAci	<i>Burkholderia acidipaludis</i> Bfr
ColPsy	<i>Colwellia psychrerythraea</i> Bfr
CupTai	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> Bfr
E.coli_Ferritin	<i>Escherichia coli</i> Ferritin
Ecoli	<i>Escherichia coli</i> Bfr
GemSp.	<i>Geminocystis sp.</i> Bfr
GriInd	<i>Grimontia indica</i> Bfr
HomoSapiensHchain	<i>Homo sapiens</i> Ferritin H-Untereinheit
HomoSapiensLchain	<i>Homo sapiens</i> Ferritin L-Untereinheit
MarLit	<i>Marinobacterium litorale</i> Bfr
MetAlc	<i>Methylococcobium alcaliphilum</i> Bfr
MetCap	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bfr
MetLac	<i>Methylosarcina lacus</i> Bfr
MetNit	<i>Methylophaga nitratireducentis</i> Bfr
MetUni	<i>Methyloversatilis universalis</i> Bfr
MS-1_1	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> Bfr Untereinheit 1
MS-1_2	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> Bfr Untereinheit 2
MSR-1_1	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> Bfr Untereinheit 1
MSR-1_2	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> Bfr Untereinheit 2
MSR-1_Dps	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1 Dps
MycLep	<i>Mycobacterium leprae</i> Bfr
NeiGon	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Bfr
NitSp.	<i>Nitrosomonas sp.</i> Bfr
NitWat	<i>Nitrosococcus watsonii</i> Bfr
NovIte	<i>Novispirillum itersonii</i> Bfr
OceSmi	<i>Oceanimonas smirnovii</i> Bfr

PseRut	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> Bfr
PseuAe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bfr
PusNoe	<i>Pusillimonas noertemannii</i> Bfr
RalSp.	<i>Ralstonia sp.</i> Bfr
Rhodosp	Rhodospirillaceae bacterium Bfr
RhoRub_Ferritin	<i>Rhodospirillum rubrum</i> Ferritin
RubBen	<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> Bfr
SheFid	<i>Shewanella fidelis</i> Bfr
SneGlo	<i>Sneathiella glossodoripedis</i> Bfr
TerPus	<i>Terasakiella pusilla</i> Bfr
ThaSp.	<i>Thauera sp.</i> Bfr
ThiDen	<i>Thiobacillus denitrificans</i> Bfr
ThiDre	<i>Thiorhodococcus drewsii</i> Bfr
TisMob	<i>Tistrella mobilis</i> Bfr

Für die *M. gryphiswaldense*-Untereinheiten wurde eine Analyse mit der Conserved Domain Database (Marchler-Bauer, Derbyshire et al. 2015) durchgeführt (Abbildung 52, Abbildung 53).

Hierbei stellte sich heraus, dass bei der Untereinheit 1 das Met⁵², welches für die Koordination der Hämgruppe zwischen den Untereinheiten zuständig ist, fehlt. Für die Untereinheit 1 ist so eine Hämbindung ausgeschlossen, da gezeigt wurde, dass der Austausch des Met⁵² zu hämfreien Bakterioferritinen führt (Andrews, Le Brun et al. 1995). Die konservierten Aminosäuren des Ferroxidasezentrums sind aber vorhanden.

Hierbei handelt es sich um Glu¹⁸, Glu⁹⁴, His⁵⁴, His¹³⁰ (hier His¹³¹), Glu⁵¹ und Glu¹²⁷ (hier Glu¹²⁸) (Le Brun, Crow et al. 2010). Mutationen innerhalb des Ferroxidasezentrums, besonders auch bezogen auf Glu¹⁸, führen zu einer starken Einschränkung der Funktion des Ferroxidasezentrums (Baaghil, Lewin et al. 2003).

Die zweite Untereinheit des Bfrs von *M. gryphiswaldense* zeigt andere Charakteristika der Sequenz, verglichen mit der ersten Untereinheit. Hier ist das Met⁵² vorhanden und somit eine Hämbindung möglich. Die konservierten Aminosäuren des Ferroxidasezentrums sind hingegen nur teilweise vorhanden. Dabei wird Glu¹⁸ durch Gln ersetzt, His⁵⁴ und His¹³⁰ sind durch Alanin und Arginin ersetzt, Glu⁵¹ ist vorhanden. Glu¹²⁷ ist nicht vorhanden, jedoch finden sich in den Positionen 126 und 128 jeweils Glutamate.

Die Histidine des Ferroxidasezentrums fehlen also vollständig, die Glutamate sind auch nur teilweise vorhanden, bzw. ersetzt, so dass die Bildung eines funktionsfähigen Ferroxidasezentrums eher unwahrscheinlich ist.

Diese Sequenzunterschiede der beiden Bfr-Untereinheiten von *M. gryphiswaldense* deuten auf eine Differenzierung in Bezug auf die Funktion hin. Sie wurde für *M. magnetotacticum* (MS-1) bereits teilweise diskutiert (Bertani, Huang et al. 1997).

Eine Funktionstrennung kennt man bereits von tierischen Ferritinen, die aus H- und L-Untereinheiten bestehen (Finazzi und Arosio 2014).

Auch für *Synechocystis sp.* PCC 6803 ist diese Funktionstrennung vermutet worden. Auch hier sind die Ferroxidasefunktion und die Hämbindung auf die zwei Untereinheiten aufgeteilt und bei Expression nur einer Untereinheit wird kein intaktes Protein gebildet. Hier sind beide Untereinheiten für die Bildung eines funktionierenden Bfrs von Nöten (Keren, Aurora et al. 2004).

Auch die zwei *bfr*-Gene von *Neisseria gonorrhoeae* sind im Tandem mit einer Lücke von 27 Basen organisiert, dabei ist auch hier das Ferroxidase-Zentrum nur in der Bakterioferritin A-Untereinheit vorhanden. Häm-Bindestellen finden sich dafür in den B-Untereinheiten (Chen und Morse 1999).

Ein Sequenzvergleich der Untereinheiten der anderen bekannten Magnetospirillen, *M. magneticum* und *M. magnetotacticum* mit *M. gryphiswaldense* und *E. coli* (Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 55), ergibt deutliche Hinweise, dass bei diesen die Funktion ebenfalls auf die beiden Untereinheiten aufgeteilt ist, da auch hier bei einer Untereinheit das Met⁵² durch andere, nicht konservierte Aminosäuren ersetzt ist. In dieser Untereinheit sind dafür alle konservierten Aminosäuren des Ferroxidasezentrums vorhanden, wie es bereits für *M. gryphiswaldense* geschildert wurde. Die jeweiligen Untereinheiten finden sich auch im Stammbaum entsprechend zusammen angeordnet.

Da nur eine Untereinheit des Bfrs ein Met⁵² enthält, Met⁵² für die Hämbindung aber notwendig ist, wie ein Austausch gegen Leucin und Histidin bei *E. coli* zeigte (Andrews, Le Brun et al. 1995), ist es wahrscheinlich, dass immer zwei gleiche Untereinheiten ein Homodimer bilden. Dies ist durch die Koordination der Hämgruppe bedingt, die nach bisherigen Funden durch zwei Methionine aus zwei benachbarten Untereinheiten im Dimer erfolgen muss (Cheesman, Thomson et al. 1990; George, Richards et al. 1993; Le Brun, Crow et al. 2010). Dass bei einer Funktionstrennung der Untereinheiten beide Untereinheiten zur Bildung des polymeren Proteins notwendig sind, ist naheliegend und wurde auch für *Synechocystis sp.* PCC 6803 bereits gezeigt (Keren, Aurora et al. 2004).

Anhand einer Sequenzanalyse scheint es möglich, dass es mehrere Organismen mit zwei Untereinheiten gibt. Dazu wurden exemplarisch zwei Sequenzen von Bakterioferritinen aus dem Ast, der die Magnetospirillen-Untereinheiten ohne Met⁵² enthält ausgewählt. Dies waren *Sneathiella glossodoripedis* und *Shewanella fidelis*. Auch bei diesen Sequenzen war kein Met⁵² vorhanden, aber die konservierten Aminosäuren des Ferroxidasezentrums wurden in beiden Sequenzen gefunden. Auch bei *Sneathiella glossodoripedis* und *Shewanella fidelis*-Bfr, wurden die Met⁵² durch Leucin, wie bei *M. gryphiswaldense* und Arginin (*Shewanella fidelis*) ersetzt. Auch bei diesen Bakterioferritinen sollte also keine Hämbindung möglich sein.

Es ist denkbar, dass es bei diesen Bakterien auch eine zweite Bfr-Untereinheit gibt, die die Hämbindung gewährleistet. Die genannten Bakterien sind bisher nicht sehr umfänglich untersucht worden. Zwar ist die Funktion des Häms bisher nicht komplett geklärt, für die Eisenspeicherung ist es nicht notwendig, es spricht aber einiges für eine Funktion bei der Freisetzung des Eisens bei Eisenmangel (Rivera, Yao et al. 2015).

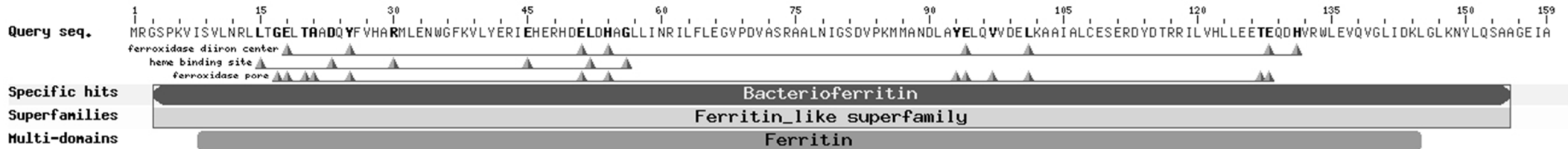


Abbildung 52: Analyse der *M. gryphiswaldense* Bacterioferritin-Untereinheit 1 durch die NCBI Blast Conserved Domain Database

Die Sequenzanalyse wurden unter Verwendung der Conserved Domain Database durchgeführt (Marchler-Bauer, Derbyshire et al. 2015).

Die Bfr Untereinheit 1 weist kein Met⁵² auf, welches aber für die Koordination der Hämgruppe wichtig ist, wie ein Austausch gegen Leucin und Histidin bei *E. coli* zeigte. Hier war nach dem Austausch keine Hämbindung mehr möglich (Andrews, Le Brun et al. 1995). Bei *Sneathiella glossodoripedis* und *Shewanella fidelis* ist in der Bfr-Sequenz auch kein Met⁵² vorhanden. Die von dem Programm identifizierte Häm-Bindungs-Signatur ist daher nicht funktionell. Dafür sind die Aminosäuren des Ferroxidasezentrums bei allen genannten Bfr-Sequenzen vorhanden (Glu¹⁸, Glu⁹⁴, His⁵⁴, His¹³⁰ ist His¹³¹, Glu⁵¹, Glu¹²⁷ ist Glu¹²⁸ (Le Brun, Crow et al. 2010).

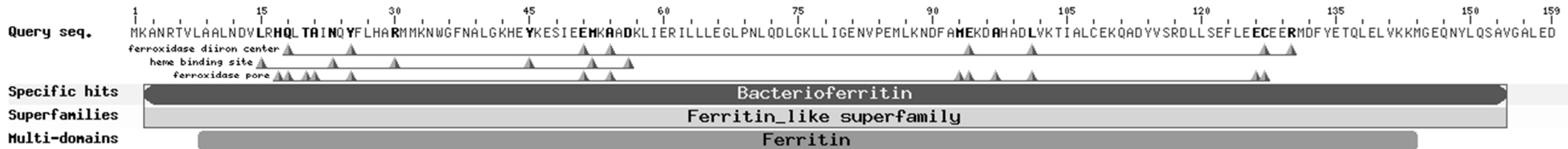


Abbildung 53: Analyse der *M. gryphiswaldense* Bacterioferritin-Untereinheit 2 durch die NCBI Blast Conserved Domain Database

Die Bfr Untereinheit 2 weist in der Sequenz ein Met⁵² auf. Dies deutet auf die Fähigkeit zur Koordination einer Hämgruppe hin.

Dafür sind einige wichtige Aminosäuren, die für ein intaktes Ferroxidasezentrum vorhanden sein müssen, ausgetauscht und daher das Zentrum vermutlich nicht funktionell. Dabei handelt es sich um Glu¹⁸, His⁵⁴, His¹³⁰ und eventuell Glu¹²⁷, da in den Positionen 126 und 128 je ein Glutamat vorhanden ist.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
AMB-1_2	MKGDK	AINKALNEVLK	VQLTAINQFFLHARMLKNWGLKDLGKAIYKLSIE	EMKH	ADEVIERILFLEGLPNLQDLGKLYIGEDV				
MS-1_1	MKGDKEVLRHLNGVLK	HLHTAINQYF	LHARMLKNWGLKDLGKAVYKYSIE	EMKQ	ADEVIERILFLEGLPNLQDLGKLGIGEDV				
MSR-1_2	MKANRTVLAALNDVLRHQLTAINQYF	LHARMMKNWGFNALGKHEYKESIE	EMKA	ADKLIERILFLEGLPNLQDLGKLLIGENV					
MSR-1_1	MRGSPKVISVLNRLLTG	ELTAADQYFVHARMLLENWGFVLYERIEHERHDE	ELDH	AAGLLINRILFLEGVDPVASRAALNIGSDV					
AMB-1_1	MKGKKSVISRLNKLLVGE	ELVAADQYFVHSRMYREWGLSKLYERIEHERQDE	ELGH	ADLLIGRILFLEGTPDLSKRPGPKVGKDV					
MS-1_2	MKGKKSVISRLNKLLVGE	ELVAADQYFVHSRMYQEWGLQKLYERIDHERMDE	ELGH	ADLLIRILFLEGTPDISKRPGPNIGKDV					
Ecoli	MKGDTKVINYLNKLLGNE	ELVAINQYF	LHARMFKNWGLKRLNDVEYHESIDE	EMKH	ADRYIERILFLEGLPNLQDLGKLNIGEDV				
	90	100	110	120	130	140	150		
AMB-1_2	PEIIANDLAMLK	ERGVLVAGIALAE-EKQDFVTRHELAEILEEAE	EE	AIDWLENQQGLIASMGLPNYLQAAMGELAGD					
MS-1_1	AEMLASDLKME	QAEHKALTEAIALCE-TKQDFVTRDELGEILEDT	EE	HIDWLETQIDLMAKMGTQNYLQAAMQIEGD					
MSR-1_2	PEMLKNDFAME	KDAHADLVKTIALCE-KQADYVSRDLLSEFLEEC	EE	RMDFYETQLELVKKMGEQNYLQSAVGALED					
MSR-1_1	PKMMANDLAYE	LQVVDELKAAIALCE-SERDYDTRRILVHLLLEET	EQDH	VRWLEVQVGLIDKLGLKNYLQSAAGEIA					
AMB-1_1	PSMLKADLDL	EIEVVAELKEAIAHCE-SEGDYDTRRILGKILEDT	EQDH	TLWLEQQGLIARMGLQNYLQSAAGDIAQGAS					
MS-1_2	PSMLKNDLDY	ELAVIAELKEVIAHCEGPKRTMTAAASCSTILEET	EQDH	TLWLEQQGLIARMGLQNYIQSAAGDIAQGAS					
Ecoli	EEMLRSDLAL	ELDGAKNLREAIGYAD-SVHDYVSRDMMIEILRDE	EEG	HIDWLETELDLIQKMGLQNYLQAQIREEG					



Abbildung 54: Intaktes Ferroxidasezentrum von *E. coli* mit den zwei gebundenen Eisenionen, die mit 1 und 2 markiert sind (Le Brun, Crow et al. 2010)

Abbildung 55: Vergleich der Bfr-Proteinsequenzen verschiedenen Magnetospirillen mit der Bfr-Untereinheit von *E. coli* durch ClustalW. Die grün markierten Aminosäuren bilden das Ferroxidasezentrum, gelb markiert sind die für die Häm-Koordination verantwortlichen Methionine. Im Vergleich unterscheiden sich die zwei Untereinheiten jeweils im Vorhandensein der funktionalen Aminosäuren. Jeweils in einer der Untereinheiten der Magnetospirillen - Bakterioferritine befindet sich ein Met⁵². In diesen Untereinheiten werden die Ferroxidasezentren aufgrund einiger ausgetauschter Aminosäuren nicht ausgebildet. In der jeweils anderen Bfr-Untereinheit ist dafür das Met⁵² ausgetauscht aber ein vollständiges Ferroxidasezentrum vorhanden. Bei *E. coli* sind beide Funktionen in einer Untereinheit vorhanden.

5.2. Bestimmung des Molekulargewichts des Bakterioferritins aus *M. gryphiswaldense*

Das Molekulargewicht des rBfrs von *M. gryphiswaldense* wurde mittels DLS über den hydrodynamischen Radius und über Gelfiltration bestimmt (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16). Dabei wurde deutlich, dass das Bfr von *M. gryphiswaldense* nicht aus 24 Untereinheiten bestehen konnte, da es im Vergleich zu Pferdeferritin, welches bei 52 min mit einem Molekulargewicht von 440 kDa von der Säule eluierte, bei 67 min eluierte. Unspezifische ionische Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und dem Protein konnten durch die Verwendung verschiedener Puffer mit bis zu 500 mM NaCl ausgeschlossen werden (Healthcare und Bio-Sciences 2010; Hong, Koza et al. 2012).

Das aus der Kalibrierkurve (Abbildung 15) der Gelfiltration berechnete Molekulargewicht des rBfrs betrug 186 kDa, was bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 18 kDa eine Untereinheitenanzahl von 10 - 11 bedeuten würde.

Daraufhin wurde das Molekulargewicht mit einer weiteren Methode, der dynamischen Lichtstreuung bestimmt, welche nach zehn Messungen ein aus dem hydrodynamischen Radius berechnetes Molekulargewicht von 231 kDa lieferte. Dies würde bei durchschnittlich 18 kDa pro Untereinheit eine Untereinheitenanzahl zwischen 12 - 13 Untereinheiten bedeuten. Der gemessene hydrodynamische Radius des rBfrs von *M. gryphiswaldense* betrug 6,4 nm (Abbildung 16) im Gegensatz zu dem des Pferdeferritins, welcher auf 21 nm bestimmt wurde (Abbildung 17). Dies macht einen deutlichen Größenunterschied zwischen dem bekannten Pferdeferritin mit 24 Untereinheiten und dem *Magnetospirillum*-Bakterioferritin aus und untermauert die Annahme, dass das *M. gryphiswaldense* Bfr aus 12 Untereinheiten besteht.

Wenn man das theoretische Molekulargewicht des Bfrs aus den bekannten Molekulargewichten der Untereinheiten berechnet und dabei von 12 Untereinheiten ausgeht, erhält man ein Molekulargewicht von 218 kDa, welches sich zwischen den beiden, experimentell ermittelten Molekulargewichten bewegt. Die errechneten Molekulargewichte beziehen sich auf das jeweilige Apoprotein. Dies stellt bei der Bestimmung mittels DLS und Gelfiltration kein Problem dar, da diese Methoden auf der Bestimmung des Radius beruhen, welcher sich nicht wesentlich durch die Bildung eines Eisenkerns im hohlen Innenraum des Proteins ändern sollte.

Da aufgrund der bekannten Anzahl von Untereinheiten bei Bakterioferritinen von 24 oder 12 (Bou-Abdallah, Lewin et al. 2002) und der Tatsache, dass zwei Untereinheiten in der Ferritinfamilie ein Dimer bilden (Ford, Harrison et al. 1984), eine ungerade Anzahl von Untereinheiten unwahrscheinlich ist und auch bisher in der Ferritinfamilie nicht gefunden wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Bfr von *M. gryphiswaldense* aus 12 statt 24 Untereinheiten besteht, wie es z.B. für das dodekamere Ferritin des Archaeons *Halobacterium salinarum* (Reindel, Anemüller et al. 2002) und für Dps-Proteine bekannt ist (Grant, Filman et al. 1998).

Ungenauigkeiten bei der Größenbestimmung durch Gelfiltration können durch die unterschiedliche Form der Moleküle und Interaktionen, z.B. hydrophobe Wechselwirkungen oder ionische Wechselwirkungen (Hong, Koza et al. 2012) zwischen der Gelmatrix und den Proteinen bedingt sein, wobei unspezifische ionische Wechselwirkungen durch den Zusatz von 500 mM NaCl ausgeschlossen wurden.

Diese Effekte treten bei der dynamischen Lichtstreuung nicht auf. Hierbei sind runde Proteine, wie Bfr ideal, um eine Bestimmung des Molekulargewichts vorzunehmen (Takeuchi, Nakatani et al. 2014).

Um das ungefähre Molekulargewicht des Bfrs aus der Membranfraktion von *M. gryphiswaldense* zu bestimmen, wurde ein Triton X-100-Membranextrakt über eine S300 HR - Gelchromatographiesäule aufgetrennt. Hierbei wurde ein Puffer, der Triton X-100 enthielt, verwendet, um einheitliche Bedingungen zu schaffen (Abbildung 26).

Nach der Kalibrierung der S300 - Säule (Abbildung 27) und Detektion des Bfrs mithilfe des Western Blots (Abbildung 28) von einer Elution des Bfrs bei 58 min ausgegangen. Dies würde ein errechnetes Molekulargewicht von 285 kDa ergeben, was etwas über dem liegt, was für das rBfr ohne Triton X-100 erreicht wurde. Das Molekulargewicht einer Tritonmizelle liegt bei etwa 65 kDa. Bei Interaktion des Proteins mit Triton X-100 führt dies zu einer Vergrößerung des Molekulargewichts, was die Unterschiede im Laufverhalten erklären kann ($185 + 65 \text{ kDa} = 250 \text{ kDa}$). Dies gilt nicht für die Kalibrierproteine, bei denen sich die Elutionszeiten im Vergleich mit einem Lauf ohne Triton X-100 nicht verändern. Auch handelt es sich nicht um Membranproteine, so dass die Bildung einer Tritonmizelle um diese Proteine unwahrscheinlich ist. Geringfügige Verschiebungen um 1 - 2 min, könnten sich durch die Verdichtung der Säulenpackung der S300 - Gelchromatographiesäule nach häufigem Betrieb ergeben.

Im Bereich von 58 min ist ein deutlicher Anstieg der Eisenkonzentration des Eluats zu erkennen, wobei die Proteinmenge gering blieb, was anhand der Extinktion deutlich wurde (Abbildung 26). Ein hohes Eisen/Protein-Verhältnis ist für Eisenspeicherproteine anzunehmen, wenn diese eine hohe Eisenbeladung aufweisen, was für Bfr in verschiedenen nativen Polyacrylamidgelen gezeigt wurde (Abbildung 19, Abbildung 34, Abbildung 35).

Im Elutionsbereich um 50,5 min, in dem das Pferdeferritin mit 440 kDa eluierte, war im Tensidextrakt kein Anstieg der Eisenkonzentration des Eluats, sehr wohl aber der Proteinkonzentration zu sehen. Dies spricht nicht dafür, dass hier Bfr zu finden war, was auch durch den Western Blot bestätigt wurde (Abbildung 28).

RBfr und Bfr von *M. gryphiswaldense* zeigen außerdem dasselbe Wanderungsverhalten im nativen Gel (Abbildung 19). Dieses trennt unter anderem auch nach dem Molekulargewicht der nativen Proteine auf. Auch dies spricht dafür, dass das rekombinante und das membrangebundene Bfr von *M. gryphiswaldense* dasselbe Molekulargewicht haben und somit beide aus 12 Untereinheiten bestehen.

Dass sich die Migration des Bfrs im nativen Gel durch teilweise Denaturierung/Verkleinerung vor der Auftrennung im nativen Gel verändert, zeigt Abbildung 35. Hier wurde das Bfr durch Behandlung der Membran mit Na_2CO_3 teilweise denaturiert. Das Bfr erschien hierbei in den, dem hohen pH-Wert am längsten ausgesetzten Fraktionen, kleiner, bzw. legte eine größere Strecke im Gel zurück.

Die mit His-Tag als Einschlusskörperchen exprimierten rBfr1-Untereinheiten bildeten keine geordneten polymeren Strukturen während der Expression aus und auch nicht im Verlaufe der Aufreinigung, obwohl nach der Dialyse des Proteins, dieses überwiegend gelöst vorlag. Eine Messung dieser gelösten Untereinheiten mittels DLS zeigte, dass der hydrodynamische Radius des zu messenden Proteins außerhalb des möglichen Messbereichs lag (ohne Abbildung), so dass man davon ausgehen kann, dass die Untereinheiten sich ungeordnet aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften zu riesigen, unspezifischen Komplexen zusammengelagert hatten.

Möglicherweise kann rBfr1 ohne Bfr2 kein polymeres Bakterioferritin ausbilden, da dies normalerweise aus den zwei Untereinheiten besteht und somit vermutlich spezifische Bindungsstellen vorhanden sind, möglicherweise störte der His-Tag aber auch die korrekte Zusammenlagerung der Untereinheiten. rBfr1 ohne His-Tag wurde nicht exprimiert, so dass dies nicht näher überprüft werden konnte. Bei

Synechocystis sp. PCC 6803 wurde gezeigt, dass nach der Expression jeweils nur einer Bfr-Untereinheit kein polymeres Protein mehr gebildet wurde (Keren, Aurora et al. 2004).

5.3. Nachweis von Eisen im Bfr durch Färbung im nativen Polyacrylamidgel, Eisen- und Proteinverteilung bei *M. gryphiswaldense*

Als Indiz für ein funktionsfähiges rekombinantes Bfr wurde unter anderem die Bildung eines Eisenkerns angenommen, da dieser im Inneren des Proteins, welches aus mehreren Untereinheiten bestehen muss, durch Oxidation des Eisens am Ferroxidase-Zentrum (Baaghil, Lewin et al. 2003) gebildet werden muss.

Um das Eisen im rekombinanten Bfr nachzuweisen, wurde es mittels Fridovichfärbung (Fish 1988) im nativen Gel angefärbt, wobei hierbei nur das Eisen durch Komplexbildung angefärbt wird (Abbildung 18). Auf dem Gel war eine starke Eisenfärbung in Höhe der mit Coomassie gefärbten Proteinbande zu sehen, so dass man davon ausgehen kann, dass das Protein funktionsfähig ist und einen Eisenkern gebildet hat. Die Laufhöhe der Eisenfärbungen des rBfrs im nativen Gel stimmt mit der des Bfrs aus dem *M. gryphiswaldense* Membranextrakt überein (Abbildung 19).

Um die Eisenbeladung je rBfr-Protein zu errechnen, wurde die Eisenkonzentration des rBfrs mit dem modifizierten FerroZine-Test nach Fish (Fish 1988) bestimmt und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Test (Thermo Scientific) bestimmt.

Nach der Analyse zweier rBfr-Präparationen, enthielt das rBfr zwischen 183 - 308 Eisenatome pro rBfr mit jeweils 12 Untereinheiten. Für 24-teilige Bfrs wurde eine Eisenbeladung von bis zu 2700 Eisenatomen bestimmt (Laulhere, Laboure et al. 1992; Baaghil, Lewin et al. 2003).

Wie durch die DLS (Abbildung 16) gezeigt, besitzt das rBfr von einem hydrodynamischen Radius von 6,4 nm. Die hydrodynamischen Radien unterscheiden sich nach unseren Messungen wesentlich von den Messungen anderer Methoden und sind daher nur untereinander vergleichbar. So wurde im Vergleich zu dem hydrodynamischen Radius von 6,4 nm (Durchmesser 12,8 nm) bei rBfr, für Pferdeferritin ein hydrodynamischer Radius von 21 nm (Durchmesser 42 nm) gemessen (Abbildung 17). Dies zeigt deutlich, wieviel kleiner das rBfr von *Magnetospirillum gryphiswaldense* im Vergleich mit einem Ferritin mit 24 Untereinheiten ist.

Da die Messungen der hydrodynamischen Radien nicht mit anderen Methoden der Radiusmessung der reinen Proteinhülle vergleichbar sind, sind für die folgenden Annahmen die Literaturwerte von Dps-Proteinen mit 12 Untereinheiten zum Vergleich herangezogen worden.

Für *Campylobacter jejuni* Dps wurde ein Durchmesser von 8,5 nm elektronenmikroskopisch gemessen (Ishikawa, Mizunoe et al. 2003). Dieser wurde für ein dodekamerer Bfr angenommen, was bei einer Wandstärke von 2 nm einen Innenraum mit einem Durchmesser von 4,5 nm ergeben würde. Das Volumen des Bfr-Innenraums würde somit 47,71 nm³ betragen.

Für Bfrs mit 24 Untereinheiten sind Maße von 11 - 12 nm Außendurchmesser und 8 nm Innendurchmesser bekannt (Hudson, Andrews et al. 1993; Nam, Xu et al. 2010). Das Volumen des Innenraums würde somit 268,08 nm³ betragen, was dem 5,6fachen Volumen eines Bfrs mit 12 Untereinheiten entspricht.

Werden die Volumina der Bfrs mit 24 und 12 Untereinheiten ins Verhältnis gesetzt, beträgt die maximale Eisenaufnahmekapazität des rBfrs etwa 482 Eisen/Bfr.

Für Dps-Proteine ähnlicher Größe, ist eine maximale Eisenbeladung von etwa 500 Eisen/Protein bekannt (Zhao, Ceci et al. 2002). Dies bewegt sich in einer sehr ähnlichen Größenordnung, wie die theoretisch ermittelte maximale Eisenbeladung für *Magnetospirillum gryphiswaldense* rBfr.

Gemessen wurde für rBfr eine Eisenbeladung zwischen 183 - 308 Eisenatome/rBfr, was nicht der theoretischen maximalen Beladung entspricht, aber doch eine gute Eisenbeladung des rBfrs zeigt.

Magnetospirillum-Zellen akkumulieren auch im unmagnetischen Zustand bis zu 7,4 x mehr Eisen (= 0,2 % des Trockengewichts) (Frankel, Blakemore et al. 1981; Blakemore 1982) als andere Bakterien, wie z.B. *E. coli* (0,027 % Eisen in Trockenmasse (Abdul-Tehrani, Hudson et al. 1999)). Ein Teil des gespeicherten nichtmagnetischen Eisens muss also auch in Bfr vorliegen, welches über eine gute Eisenspeicherfähigkeit verfügt, da ein bakterielles Ferritin bei *M. gryphiswaldense* nicht vorkommt.

Wenn man sich die prozentuale Eisen- und Proteinverteilung im Vergleich von magnetischen und nicht-magnetischen *M. gryphiswaldense*-Zellen anschaut (Abbildung 20, Abbildung 21), so wird deutlich, dass sowohl bei magnetischen als auch nicht-magnetischen Zellen die Proteinverteilung zwischen Membran- und löslicher Fraktion sehr ähnlich ist. Diese liegt für die Membranproteine jeweils bei knapp über 50 %. Die Verteilung des Eisens verändert sich hingegen recht stark, wenn *M. gryphiswaldense* aufgrund des Verlusts der MAI keine Magnetosomen bilden kann. War das Eisen bei magnetischen Zellen von MSR-1 etwa gleichmäßig auf die Membran- und lösliche Fraktion verteilt, so stieg der Eisengehalt der Membranen des nichtmagnetischen MSR-1 auf ca. 75 % des Gesamteisens an (Abbildung 20, Abbildung 21).

Das Eisen/Proteinverhältnis der löslichen Fraktionen betrug sowohl bei MSR-1 als auch MSR-1B jeweils 0,34 µg Fe/mg Protein. Die Menge des Eisens der löslichen Fraktion veränderte sich nicht, was auch auf eine sehr gute Regulation des Eisenhaushalts bei *M. gryphiswaldense* hindeutet, welche wichtig für den Schutz der Zellbestandteile vor oxidativem Stress ist.

Das Eisen/Protein-Verhältnis der Membranfraktion hingegen stieg von 0,39 µg Fe/mg Protein bei MSR-1 auf 1,04 µg Fe/mg Protein bei MSR-1B stark an. Dies deutet auf eine verstärkte Eisenspeicherung im membrangebundenen Bfr hin, wenn kein Magnetit gebildet werden kann, um aufgenommenes Eisen zu binden und die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen.

Nach Fdez-Gubieda et al., die Messungen an MSR-1 mittels XANES (Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie) und TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie) durchführten, wird bei *M. gryphiswaldense* zuerst Ferrihydrit gebildet, dessen Anteil dann mit fortschreitender Magnetosomenbildung zugunsten des Magnetits stark absinkt. Daraus wurde eine Bereitstellung des Ferrihydriteisens für die Bildung der Magnetosomen geschlossen (Fdez-Gubieda, Muela et al. 2013).

Daraus kann man ableiten, dass bei fehlender Magnetosomenbildung das Ferrihydrit vermutlich nicht abgebaut wird. Dies könnte der Grund sein, für den deutlich höheren Anteil des membrangebundenen Eisens bei MSR-1B gegenüber MSR-1 (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Dass die Eisenaufnahme bei Magnetospirillen auch stark kontrolliert wird und vermutlich bei nichtmagnetischen Zellen auch stark herunter geregelt wird, zeigen das Vorhandensein von Fur (siehe Absatz 1.5) und auch die aus der Literatur bekannten Werte für die Eisengehalte von magnetischen und unmagnetischen Magnetospirillen. Die magnetischen Magnetospirillen können bis zu 4 % ihres Trockengewichtes an Eisen akkumulieren (Favre und Schüler 2008), immerhin noch 0,2 % sind es bei nichtmagnetischen Magnetospirillen (Frankel, Blakemore et al. 1981; Blakemore 1982).

Die sich stark unterscheidenden Absolutmengen des Eisens und Proteins in Abbildung 20 und Abbildung 21, sind auf Unterschiede bei der Effizienz des Zellaufschlusses zurückzuführen. Nach dem

Zellaufschluss wurden nicht aufgeschlossene ganze Zellen mit abzentrifugiert und gingen so nicht weiter in die Eisen- und Proteinbestimmung ein. Auch ausgewachsene Magnetosomen, die bei 5000 x g sedimentierten, wurden abzentrifugiert und gingen so nicht in die Eisenbestimmung des MSR-1 ein, so dass hier nur das nichtmagnetische Eisen, welches nicht mit den Magnetosomen assoziiert war, bestimmt wurde.

5.4. Bestimmung des Häm-Gehalts mit der Pyridin-Hämochrom-Methode

Die Bindung von Häm b im Bakterioferritin unterscheidet das Protein vom Ferritin (Frolow, Kalb et al. 1994).

Um zu überprüfen, ob das isolierte Protein Häm b-Gruppen enthielt, wurden Pyridin-Hämochrommessungen von rBfr, in 1 % SDS gelöster MSR-1 Membran und den löslichen Proteinen von MSR-1 durchgeführt (Abbildung 22). Dabei wurden die jeweiligen Häm-Gruppen nach den Absorptionsmaxima der α -Peaks bestimmt.

Werte, die für Häm b charakteristisch sind (556 - 558 nm, Falk 1964), waren als Einzelpeak in der Messung des rBfrs zu sehen. Dies zeigt, dass das Protein hämhaltig ist und somit in die Gruppe der Bakterioferritine einzuordnen ist.

Das Differenzspektrum der löslichen Fraktion zeigte dabei ausschließlich die charakteristischen Werte, die für Häme des c-Typs bekannt sind (Häm c zwischen 549 - 551 nm). Da das Spektrum ausschließlich die Anwesenheit von Häm c zeigt, kann sich kein Bfr in der löslichen Fraktion befinden. Dies ergänzt sich mit dem Mößbauerspektrum der löslichen Fraktion des Wildstamms MSR-1 (Abbildung 44), welches ebenfalls kein Bfr-Spektrum zeigt.

Auch bei *M. magnetotacticum* (früher *Aquaspirillum magnetotacticum*) wurden ausschließlich Cytochrome des C-Typs in den löslichen Proteinen gefunden. Dabei waren 70 % der gesamten C-typ Cytochrome löslich, was 60 % des detektierten Gesamtcytochroms der Zellen entsprach. Die pinke Färbung, die für die löslichen Proteine beschrieben wurde (O'Brien, Paoletti et al. 1987), wurde auch bei *M. gryphiswaldense* beobachtet.

In der mit 1 % SDS extrahierten, stark orangebraun gefärbten Membranfraktion, wurden verschiedene Häm-Typen detektiert (Abbildung 22). Bei dem mittleren Peak handelt es sich vermutlich um einen Doppelpeak, da dieser deutlich nach rechts verbreitert ist und hier vermutlich ein Häm b-Peak unter einem Häm c-Peak liegt. Nach links ist der Peak entsprechend nicht verbreitert. Im Bereich zwischen 580 – 590 nm ist ein flacher Peak zu sehen. Dies zeigt das Vorhandensein von Häm a (Lemberg 1969). Demnach sind im Membranextrakt sowohl Häm-Gruppen des a, b als auch des c-Typs vorhanden. Dies ist nicht verwunderlich, da Membranen, auch anderer Magnetospirillen, viele hämhaltige Proteine enthalten (O'Brien, Paoletti et al. 1987).

Diese Messungen unterstützen die Vermutung der Lokalisation des Bfrs an der Membran, da in der löslichen Fraktion kein Häm b gemessen wurde, in der Membranfraktion aber schon.

Zur Quantifizierung des Häm b in der rBfr-Präparation wurde der differentielle Extinktionskoeffizient $\epsilon_{557-540\text{nm}} = 22.1 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ verwendet (Williams 1964). Das rBfr enthielt durchschnittlich 0,15 Häm-Gruppen pro 12 Untereinheiten. Gemessen wurde eine rBfr-Präparation, daher ist es durchaus möglich, dass andere rBfr-Präparationen auch andere Häm-Gehalte aufweisen. Theoretisch wäre bei 12 Untereinheiten die maximale Bindung von drei Häm-Gruppen/Bfr möglich, wenn man von einer

gleichmäßigen Verteilung der Untereinheiten ausgeht und bedenkt, dass die erste Bfr-Untereinheit mangels Met⁵² kein Häm b binden kann (Absatz 5.1).

Ein niedriger Häm-Gehalt ist für rekombinante Bfr-Proteine nicht ungewöhnlich, da die Menge des synthetisierten Häms häufig limitierend ist, wenn rekombinante Proteine sehr schnell exprimiert werden (Jung, Kwak et al. 2001; Bou-Abdallah, Lewin et al. 2002; Yasmin, Andrews et al. 2011; Timoteo, Guilherme et al. 2012). Es ist auch möglich, dass der errechnete Häm-Gehalt zu niedrig angesetzt ist, da die Methode der Proteinbestimmung durchaus Ungenauigkeiten aufweist, da für die Eichreihe der Proteinkonzentrationen BSA eingesetzt wurde, welches sich von dem gemessenen rBfr unterscheidet.

Um den Gehalt an Häm in rekombinantem Bfr zu erhöhen, können die Bedingungen während der Expression so verändert werden, dass mehr Häm-Gruppen für den Einbau zur Verfügung stehen, beispielsweise durch die Verlangsamung der Expression des Bfrs (Jung, Kwak et al. 2001). So kann es möglich sein, ein rekombinantes Bfr zu erzeugen, welches deutlich mehr Häm enthält, als es sonst für rekombinante Hämoproteine der Fall ist.

Da die Funktion des Häm b im Bfr immer noch nicht eindeutig geklärt ist, dieses aber vermutlich für die Eisenfreisetzung aus dem Bfr eine Rolle spielt (Yasmin, Andrews et al. 2011), ist es für die Bildung eines Eisenkerns vermutlich unerheblich, welche Mengen an Häm im Protein gebunden sind.

Bei dem als mutmaßlich membrangebundene ferritinartige Komponente von *M. gryphiswaldense* (Faivre, Böttger et al. 2007), handelt es sich tatsächlich um ein Bakterioferritin und nicht um ein bakterielles Ferritin oder Dps-Protein.

Ein wichtiges Kriterium für die Einordnung als Bfr ist die Bindung von Häm b im Bakterioferritin. Dieses wurde (Abbildung 22) durch die Messung von Pyridin-Hämochromspektren bestimmt. Da die lösliche Fraktion hierbei mehrere Häm-Typen enthielt, wurde diese zur genaueren Charakterisierung der löslichen Hämoproteine durch Gelfiltration weiter aufgetrennt. Zwei verschiedene, cytochromhaltige Fraktionen wurden identifiziert.

Bei beiden Fraktionen handelte es sich nach den Absorptionsmaxima der Pyridin-Hämochrommethode um Häm-Gruppen des c-Typs. Die Wellenlängen des reduzierten Pyridin-Hämochrom-Spektrums von 520 nm und 550 nm und dem, durch Gelfiltration ermittelten Molekulargewichts von 60 kDa (Abbildung 24), deuten darauf hin, dass es sich bei einer der Fraktionen um das Protein NirS handelt. Die *cd₁* Nitrit-Reduktase NirS ist für *M. gryphiswaldense* bekannt und kommt bei vielen denitrifizierenden Bakterien vor. Häm d weist ein Absorptionsmaximum bei 620 nm auf (Walsh, Johnson et al. 1981). Bei dieser Wellenlänge ist Absorption in Form eines sehr breiten Peaks zu sehen. Dies trat bei dem aufgereinigten rBfr nicht auf.

NirS gehört zu den Oxidoreduktasen und ist essentiell für die Reduktion von Nitrit (NO₂⁻). Sie ist im Periplasma lokalisiert und daher nach dem Zellaufschluss in den löslichen Proteinen zu finden.

Für *M. gryphiswaldense* NirS wurde eine Fe(II)-Nitrit-Oxidoreduktase-Funktion gezeigt. Diese ist vermutlich auch bei anderen Cytochrom cd1 Nitritreduktasen vorhanden (Li, Bali et al. 2013).

Aufgrund dieser Funktion wurde bei *M. gryphiswaldense* eine Bedeutung für die Magnetosomenbiosynthese vermutet, da ohne NirS möglicherweise ein für die Magnetosomenbiosynthese ungünstiges Verhältnis aus Fe(II) und Fe(III) entsteht. Das Verhältnis der Oxidationsstufen ist relevant, da es sich bei Magnetit und ein Eisen-Oxid mit gemischten Valenzen handelt [FeII(FeIII)₂O₄]. Oxidiertes Eisen könnte also bei anaerobem Wachstum ohne NirS fehlen (Yamazaki, Oyanagi et al. 1995; Li, Bali et al. 2013).

Dies zeigt, dass auch Proteine, deren Gene nicht auf der MAI repräsentiert sind, für die Magnetosomensynthese eine Funktion erfüllen können.

Die zweite Fraktion der hämhaltigen löslichen Proteine (Abbildung 25) konnte nicht identifiziert werden. Durch Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa bestimmt.

5.5. Beeinflussung des Wachstums durch oxidativen Stress, Bindung von rBfr an DNA, Schutz der DNA vor oxidativem Stress durch rBfr

Magnetotaktische Bakterien, wie auch *M. gryphiswaldense*, kommen vor allem in mikroaeroben Sedimenten und der darüberliegenden Wasserschicht, an und in der oxisch-anoxischen Grenzschicht sehr häufig vor, einige werden auch in anaeroben Bereichen gefunden (Bazyliński und Frankel 2004; Flies, Peplies et al. 2005). Hier spielen sie durch ihre starke Präsenz und hohe Eisenaufnahme und -speicherung für den Eisenumsatz der Sedimente eine wichtige Rolle (Simmons, Sievert et al. 2004).

In mikroaeroben und anaeroben Sedimenten ist die Eisenverfügbarkeit auch bei neutralem pH-Wert sehr hoch (Löslichkeit etwa bis 0,1 M), so dass die Eisenaufnahme nicht so kritisch ist, wie in anderen Habitaten (Emerson 2012). Da Eisen allerdings auch eine Rolle bei oxidativem Stress spielt, müssen MTB aufgrund ihres Lebensraums und der hohen Eisenaufnahme einen sehr gut kontrollierten Eisenstoffwechsel haben.

Auch die toxische Wirkung des Sauerstoffs auf Magnetospirillen ist bekannt. Diese äußert sich bei hohen Konzentrationen in gesteigerten Mutationsraten, Wachstumsstörungen oder dem Tod der Zellen. Superoxid ist dabei eine aggressive Form des Sauerstoffs (Mishra und Imlay 2012). Gefährliche Hydroxylradikale entstehen bei der Fentonreaktion und induzieren Lipid-Peroxidation, DNA-Strangbrüche und reagieren mit zahlreichen Biomolekülen (Halliwell und Gutteridge 1984).

Während der Kultur kann oxidativer Stress durch Zugabe von H_2O_2 zu einer Kultur ausgelöst werden. H_2O_2 kann dabei problemlos dem Medium zugegeben werden, da es die Lipiddoppelschicht so gut wie Wasser durchdringen kann (Seaver und Imlay 2001). Magnetospirillen gelten als ausgesprochen H_2O_2 -sensitiv (Blakemore 1982), daher sind nur geringe Mengen an H_2O_2 nötig, um oxidativen Stress zu induzieren.

M. gryphiswaldense-Kulturen des Wildstamms MSR-1 und des Δbfr -Stamms wurden während des Wachstums mit H_2O_2 versetzt und die optischen Dichten in den darauffolgenden Stunden gemessen.

Auffällig war ein Einbruch des Wachstums bei allen Ansätzen des Δbfr -Stamms zwischen Stunde 15 und 16. Dieser verstärkte sich bei den höheren H_2O_2 -Konzentrationen, war aber auch bei der Negativkontrolle und den niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen zu beobachten. Dieser Effekt trat bei dem Wildstamm nicht auf. Hier wuchsen alle Ansätze bis zur nächsten Messung gleichmäßig weiter. Dies war vermutlich auf den verstärkten Eintrag von Sauerstoff in das Kulturmedium beim Umfüllen der Kulturen in die Zellkulturflaschen zurückzuführen. Dieser Effekt verdeutlicht schon die höhere Sauerstoffempfindlichkeit von Δbfr im Vergleich zum Wildstamm MSR-1.

Der MSR-1-Stamm wurde bis zu der Konzentration von 0,2 ng H_2O_2 /ml im Vergleich zur Negativkontrolle nicht im Wachstum gehemmt.

Auch bei Δbfr war hier kein Unterschied zu erkennen. Insgesamt wurden Veränderungen des Wachstums bei beiden Stämmen ab einer Konzentration von 0,4 ng H_2O_2 /ml sichtbar. Hierbei fiel auf, dass diese Reduzierung des Wachstums bei Δbfr bereits eine Stunde nach Zugabe von H_2O_2 zu sehen

war, bei MSR-1 frühestens vier Stunden nach Zugabe. Hier wurde der wachstumshemmende Effekt mit steigenden H₂O₂-Konzentrationen verstärkt, es fand allerdings auch bei 1,2 ng/ml immer noch ein recht gutes Wachstum statt, bei dem eine OD₆₀₀ von 0,98 nach 24 h erreicht wurde, im Vergleich zur Negativkontrolle, die 1,1 erreichte.

Der Δbfr -Stamm wurde in seinem Wachstum ab 0,8 ng/ml stärker gehemmt. Vier bis fünf Stunden nach der Zugabe von H₂O₂ war hier eine starke Reduzierung des Wachstums im Vergleich zu MSR-1 zu sehen. Es wurde bei 1,2 ng/ml nur eine OD₆₀₀ von 0,77 nach 24 h im Vergleich zur Negativkontrolle mit 1,004 erreicht.

Das Erreichen einer deutlich geringeren OD₆₀₀ bei Δbfr im Vergleich zu MSR-1, zeigt auch die höhere Empfindlichkeit der Δbfr -Deletionsmutante gegenüber dem Wildstamm. Auch die sichtbare Wirkung des Luftsauerstoffs auf das Wachstum der Kultur verdeutlicht dies.

Die für die Wachstumsversuche gewählten H₂O₂-Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass oxidativer Stress ausgelöst wurde, die Zellen aber nicht abgetötet wurden. Als höchste Konzentration wurden hier 0,035 μ M H₂O₂ eingesetzt. In Vorversuchen waren die Zellen bei einer Konzentration von 0,145 μ M bereits so stark geschädigt, dass sie innerhalb einer Stunde abstarben.

Im Vergleich mit anderen Bakterien ist die Eisenaufnahme von Magnetospirillen, mit bis zu 4 % seines Trockengewichtes, etwa 148 x höher als bei anderen Bakterien, wie z.B. *E. coli* (Faivre und Schüler 2008), was vermutlich schon bei niedrigeren H₂O₂-Konzentrationen zur einer verstärkten Bildung von Hydroxylradikalen führt, welche die bereits besprochenen DNA-Schäden verursachen können (Park, You et al. 2005).

Ein weiterer Faktor ist, dass *M. gryphiswaldense* ein mikroaerophiler Organismus ist.

Die Toleranz gegenüber der Zugabe von H₂O₂ und dem damit ausgelösten oxidativen Stress ist bei den unterschiedlichen Bakterien-Arten sehr unterschiedlich. So wurden *E. coli* und *Pseudomonas spp.* nach Zugabe von 6 mM H₂O₂ in ihrem Wachstum inhibiert, während *Bacillus spp.* und *Salmonella spp.* unbeeinträchtigt weiter wuchsen (Nur, Munna et al. 2014).

Bekanntermaßen kann H₂O₂ für die Oxidation von Eisen am Bakterioferritin effektiver als Sauerstoff genutzt werden (Bou-Abdallah, Lewin et al. 2002) und so quasi einen doppelten Schutzmechanismus vor oxidativem Stress bieten. Indem Eisen im Inneren des Bfrs gespeichert wird, wird der Pool des freien intrazellulären Eisens reduziert. Da bei diesem Prozess vorzugsweise H₂O₂ im Vergleich zu O₂ verwendet wird, wird durch die Kombination der Mechanismen die Fentonreaktion verhindert.

Ähnliche Wachstumsversuche, bei denen *M. gryphiswaldense* und verschiedene Deletionsmutanten mit H₂O₂ kultiviert wurden, wurden ebenfalls von Dr. René Uebe (Mikrobiologie, Universität Bayreuth) durchgeführt. Dabei wurde das schlechtere Wachstum von Δbfr mit H₂O₂ im Vergleich zum Wildtyp bestätigt. Außerdem stellte sich heraus, dass H₂O₂ einen noch stärkeren Effekt auf eine Δdps und eine $\Delta bfr \Delta dps$ -Mutante hatte (Uebe persönliche Mitteilung 2015).

Für Dps ist die Schutzfunktion vor oxidativem Stress bekannt (Almiron, Link et al. 1992; Grant, Filman et al. 1998). Dabei ist auch der Schutz vor der Fentonreaktion, die durch H₂O₂ und FeSO₄ induziert wurde, in einem ähnlichen Versuch wie in Abbildung 32 gezeigt worden (Zhao, Ceci et al. 2002).

Dps wird nur bei ungünstigen Bedingungen stabil exprimiert, wie sie durch Nährstoffmangel und oxidativen Stress entstehen können. Ansonsten wird Dps durch ClpXp (Protease) abgebaut (Stephani, Weichart et al. 2003).

Eine Beteiligung am Schutz der Zellen vor oxidativem Stress (H₂O₂) wurde von Chen und Morse auch bereits an dem Bfr von *Neisseria gonorrhoeae* gezeigt. Dieses Bfr besteht auch aus zwei Untereinheiten,

die aber keine großen Identitäten zu *M. gryphiswaldense* aufweisen und auch ein höheres Molekulargewicht aufweisen (18 kDa und 22 kDa) (Chen und Morse 1999).

Die Synthese von Bfr wird wie viele andere Eisenproteine durch Fur kontrolliert, d.h., dass bei hohen Eisenkonzentrationen verstärkt Bfr synthetisiert wird. Dies wurde unter anderem für *E. coli* und *P. putida* gezeigt (Hantke 2001; McHugh, Rodriguez-Quinones et al. 2003; Chen, Bleam et al. 2010).

Die Vermutungen über einen kombinierten Schutz vor oxidativem Stress durch Dps und Bfr bestätigen sich durch Versuche mit einer $\Delta bfr\Delta dps$ -Mutante, die eine sehr große Empfindlichkeit gegenüber Luftsauerstoff aufwies und ausschließlich anaerob wuchs (persönliche Mitteilung Uebe 2015). Da dies bei reinen Δdps - oder Δbfr -Deletionsmutanten nicht der Fall war, wird die sich ergänzende Wirkung der beiden Proteine bei oxidativem Stress deutlich.

Bfr scheint auch bei einigen anderen Bakterien eine zusätzliche Rolle für den Schutz vor oxidativem Stress zu spielen, wobei z.T. auch Dps-ähnliche Funktionen, hier für *Desulfovibrio vulgaris*, beschrieben wurden (Timoteo, Guilherme et al. 2012).

Auch eine Δbfr -Mutante von *Bacteroides fragilis* wies eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff auf (Gauss, Reott et al. 2012).

Das aufgereinigte rBfr wurde für weitere Versuche in Bezug auf den Schutz vor oxidativem Stress verwendet. Durch Inkubation des rBfrs mit Plasmid-DNA wurde die Bindung von Bfr an DNA untersucht (Abbildung 31). Es zeigte sich, dass Bfr mit steigenden Konzentrationen verstärkt an die DNA band. Ab ca. 4 μ M rBfr nahm die Intensität der oberen Gelbande nicht mehr zu.

Eine Bindung von Bfr an DNA als Schutz vor oxidativem Stress wurde auch bereits für das Bfr von *Desulfovibrio vulgaris* gezeigt (Timoteo, Guilherme et al. 2012). Außerdem bindet das Dps-Protein von *E. coli* bekanntermaßen an DNA (Grant, Filman et al. 1998). Dies dient als physikalischer Schutz der DNA durch das gebundene Dps-Protein, was man so vermutlich auch auf das Bfr beziehen kann.

Abgesehen von der Bindung des rBfrs von *M. gryphiswaldense* an Plasmid-DNA (Abbildung 31), wurde der Schutz der DNA vor Schädigung durch bei der Fentonreaktion entstehende Produkte (Absatz 3.19) überprüft (Abbildung 32). Als Negativkontrolle wurde die DNA sowohl mit Wasser, als auch mit BSA inkubiert. Bei allen Ansätzen zeigten sich nach der Inkubation Einzelstrangbrüche, die die DNA durch Entspannung des Plasmids zu größeren Größen wandern lassen. Die DNA wurde weniger oxidativ geschädigt, wenn diese vorher mit rBfr inkubiert wurde.

Dies zeigt eindeutig eine Schutzfunktion des Bfrs. Diese kann vermutlich durch die Aufnahme des Eisens, Verbrauch von H_2O_2 und möglicherweise auch durch mechanischen Schutz durch Bindung der DNA erreicht werden.

Magnetospirillum gryphiswaldense reiht sich somit bei den Bakterien ein, bei denen die Schutzfunktion des Bfrs vor oxidativem Stress gezeigt wurde. Das Bfr schützt dadurch nicht nur die DNA, sondern auch andere Biomoleküle wie Proteine, wenn die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies vermieden wird.

Insgesamt ist es denkbar, dass das Bfr bei *M. gryphiswaldense* verschiedene Funktionen erfüllt:

Es ist bekannt, dass es bei *M. gryphiswaldense* und *M. magneticum* unter verschiedenen Stressbedingungen zu einem verstärkten Verlust des MAI kommt (Kolinko, Jogler et al. 2011; Bo, Wang et al. 2012). Dies gilt besonders für *recA*-Deletionsmutanten, die durch oxidativen Stress entstandene DNA-Schäden nicht reparieren können (Schübbe, Kube et al. 2003; Kolinko, Jogler et al. 2011). Auch UvrA (DNA excision repair) spielt für die Stabilität der MAI unter aeroben Bedingungen aufgrund der oxidativ entstehenden DNA-Schäden, eine Rolle (Bo, Wang et al. 2012). Da Bfr einen Schutzfaktor bei

oxidativem Stress darstellt, ist es denkbar, dass Δbfr -Deletionsmutanten unter oxidativem Stress verstärkt ihre Fähigkeit zur Magnetosomensynthese einbüßen. Dies könnte ein Faktor sein, der das Bfr zwar nicht zu einem für die Magnetosomensynthese essentiellen Protein macht, wie es durch die Herstellung der magnetischen Δbfr -Deletionsmutante sowieso gezeigt wurde (Abbildung 47), jedoch trotzdem einen Selektionsvorteil bieten könnte.

Dass die Magneto-Aerotaxis einen Selektionsvorteil bietet, wird deutlich, da ein gewisser Teil der Bakterien des Wildstamms MSR-1, die länger in Kultur sind, während der Lagerung ihre Fähigkeit zur Magnetosomensynthese verlieren (Schübbe, Kube et al. 2003) und auch daran, dass magnetotaktische Bakterien in den Sedimenten in unter der oxisch-anoxischen Grenzzone sehr häufig und divers vorkommen (Bazylinski und Frankel 2004).

5.6. Aufreinigung des rekombinanten Bfrs aus *E. coli* BL21-Gold im Vergleich zu *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Um das Bfr von der Membran zu solubilisieren, wurden verschiedene Ansätze verwendet, bevor Tenside eingesetzt wurden. Abbildung 33 zeigt die Überstände nach einer Extraktion mit hohen Salz- und Harnstoffkonzentrationen. Die Extraktionen lösten das Bfr nicht von der Membran ab. Dies ist in Abbildung 34 zu sehen, wo die Pellets nach den Extraktionen auf einem nativen Gel aufgetrennt und das Bfr mit Fridovichfärbung angefärbt wurde.

Auch eine Extraktion mit Na_2CO_3 die in Abbildung 35 zu sehen ist, führte nicht zum Erfolg. Das Bfr wurde dabei z.T. denaturiert und tauchte als kleinere Bande in sehr geringer Intensität im löslichen Überstand auf. In den abzentrifugierten Pellets fanden sich sowohl kleine, wie auch große Proteine, die Eisen enthielten.

Um zu zeigen, dass das Bfr sich in Tensid solubilisieren lässt, wurden die Pellets nach den NaCl- und Harnstoff-Extraktionen, die im nativen Gel eine Bfr-Eisenfärbung zeigten, in Triton X-100 solubilisiert, abzentrifugiert und die Überstände wiederum im nativen Gel getrennt und mit der Eisenfärbung angefärbt. Hier zeigte sich das Bfr im Tensidüberstand. Bfr ließ sich somit erfolgreich mit Tensid solubilisieren, zeigte sich aber ansonsten sehr unlöslich und immer in der Membranfraktion, was dafür spricht, dass es sich beim dem Bfr in *M. gryphiswaldense* um ein membrangebundenes Protein handelt.

Interessanterweise verhielt sich das in *E. coli* exprimierte rBfr im Gegensatz zum nativen Bfr in *M. gryphiswaldense*, welches nach demselben Protokoll wie die *Magnetospirillum*-Proben behandelt wurde, löslich und wurde im löslichen Überstand gefunden (Abbildung 12, Abbildung 13).

5.7. Polyklonale Antikörper

Ein funktionierender Antikörper gegen eine der Bfr-Untereinheiten, stellte sich im Laufe der Arbeit als sehr wichtig heraus. Bakterioferritin war in den Präparationen in geringen Anteilen vorhanden, wie man an den Mößbauerspektren und SDS-Gelen sehen konnte. Erste Versuche mit einem Antikörper gegen ein synthetisiertes Peptid mit 15 Aminosäuren der Sequenz der (VLYERIEHERHDELD-cys), stellten sich als erfolglos heraus, da der Antikörper mit Proteinen reagierte, die keinerlei Sequenzähnlichkeit aufwiesen, allerdings nicht mit dem Bfr (ohne Abbildung).

Daraufhin wurde die rBfr1-Untereinheit mit His-Tag als Antigen verwendet, was erfolgversprechender war. Die erhaltenen Antikörper erkannten die rBfr1-Untereinheit auf dem Western Blot (Abbildung 43) auch in geringen Mengen.

5.8. Flotation von Membranen – Membranbindung des Bfr, Lokalisation des Bfrs, polyklonale Antikörper

Aufgrunddessen, dass sich das Bfr auch nach Ablöseversuchen mit verschiedenen Mitteln, wie dem Waschen mit hohen Salzkonzentrationen und Harnstoff (Abbildung 33, Abbildung 34) immer noch der Membranfraktion befand und sich nur durch Teside aus dieser herauslösen lies (Abbildung 35) wurde über eine mögliche Membranassoziation des Bfrs diskutiert. Diese Beobachtung wurde auch früher schon gemacht (Böttger, Faivre et al. 2010). Nicht zuletzt aufgrund dieser Membranassoziation wurde über eine Beteiligung des Bfrs an der Magnetitbiosynthese diskutiert. Unterstützend waren hierbei Mößbauerspektren, die von den Membranfraktionen und den löslichen Proteinen verschiedener *M. gryphiswaldense*-Stämme aufgenommen wurden. In diesen waren die Ferritinsignale nur in den Membranfraktionen zu sehen (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 44).

Die Sequenz der Bfr-Untereinheiten gibt keine Hinweise auf eine Membranassoziation. Eine Analyse mit Hilfe des Programms ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) (Gasteiger, Hoogland et al. 2005) zeigt, dass die Bfr-Untereinheiten zwar hydrophobe Sequenzbereiche enthalten, aber keinen typischen Membrananker. Auch die Beobachtung, dass rBfr als lösliches Protein vorliegt, spricht gegen das Vorhandensein eines Membranankers.

Daher kann über die Gründe für die Membranassoziation des Bfrs nur spekuliert werden. Möglicherweise wird das Protein in *Magnetospirillum gryphiswaldense* posttranslational modifiziert oder aber es gibt einen spezifischen membranassoziierten Bindepartner.

Die Bakterioferritine der anderen, bisher kultivierbaren *Magnetospirillum*-Stämme wurden bisher nicht näher charakterisiert. Diese sind aber, wie in Abbildung 51 zu sehen ist, zumindest in einer separaten Gruppe mit den Untereinheiten des Bfrs von *M. gryphiswaldense* eingeordnet.

Membrangebundene Bakterioferritine sind sehr selten. Die allermeisten Bfrs gelten als löslich. Das MMP-II von *Mycobacterium leprae* ähnelt Bakterioferritinen, weist die konservierten Aminosäuren des Ferroxidasezentrums auf und gilt als membrangebunden. Aufgrund des Vorhandenseins einiger kurzer hydrophober Bereiche, wird dieses Protein als peripheres Membranprotein eingestuft. Auch dieses Protein bindet Häm b (Pessolani, Smith et al. 1994).

Durch Flotation über einen Saccharosegradienten, sollte versucht werden, das Bfr von der *M. gryphiswaldense*-Membran abzutrennen (Abbildung 37). Hierbei zeigte sich, dass große Teile der

Membran sich nach der Zentrifugation sichtbar in der 45 % Saccharoseschicht befanden. Der anschließende Western Blot der Fraktionen von MSR-1B, zeigte die überwiegenden Mengen von Bfr in den Saccharoseschichten mit 60 % und 50 % Saccharose (Abbildung 37).

Die Anreicherung der Membran in der 45 % Saccharoseschicht unterschied sich rein optisch zwischen MSR-1 und MSR-1B. Die Bande bei MSR-1B war deutlich definierter, als bei MSR-1, was vermutlich auf die Abwesenheit von sehr kleinen Magnetosomen und leeren Magnetosomenvesikeln zurückzuführen ist, die zu einer größeren Varianz in der Membrandichte beitragen können. Größere Magnetosomen befanden sich bei MSR-1 als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens.

Nach der Analyse der Proteine per Western Blot, wurden die Proteine der verschiedenen Saccharoseschichten nochmals auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abbildung 38). Hierbei zeigte sich, dass prominente Proteinbanden auch nach 14-stündiger Zentrifugation in allen Schichten vorhanden waren.

Beispielsweise war eine Bande um 18 kDa in der Referenzmembran des Δbfr -Stammes zu sehen. Diese Bande ist auch in allen Saccharosefraktionen zu sehen. Am stärksten ist die Bande bei der 45 % Saccharose-Schicht und den beiden umliegenden Fraktionen zu sehen. Ähnliche Effekte sind auch für eine Doppelbande bei etwa 30 kDa, eine Doppelbande bei 40 kDa, 5 kDa und 100 kDa zu erkennen.

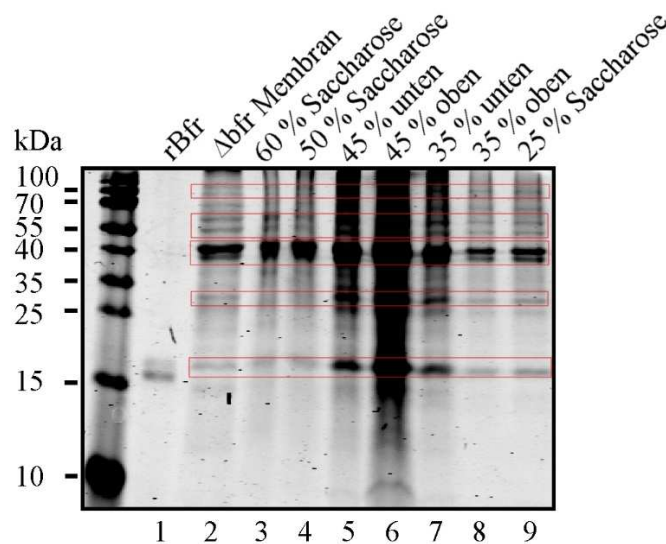


Abbildung 56: Proteinverteilung in den Fraktionen des Saccharosegradienten nach der Flotation von MSR-1-Membranen. Die, nach der Flotation über einen linearen Saccharosegradienten, auf einem 13 – 20 % denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Zusätzlich zu Abbildung 38 wurden hier einige markante Banden hervorgehoben, die in allen Fraktionen des Gradienten vorkommen und deutlich machen, dass in allen Fraktionen des Gradienten Membranen enthalten waren.

Daraus kann man schließen, dass die Membran nicht vollständig in die 45 % Saccharoseschicht aufgestiegen war, sondern sich lediglich in der 45 % Saccharoseschicht angereichert hatte.

Es liegt nahe zu vermuten, dass eine Auftrennung der Membranfraktion in verschiedene Unterfraktionen mit unterschiedlicher Dichte statt gefunden. Die Magnetosomenvesikel können hierbei keine Rolle gespielt haben, da MSR-1 keine Magnetosomenvesikel ausbildet.

In Verbindung mit den Extraktionsversuchen erscheint es wahrscheinlich, dass Bfr an eine Membranfraktion hoher Dichte gebunden vorliegt.

Die Intensitäten der Bfr-Banden im Western Blot und SDS-Gel zeigen, dass der Anteil des Bfrs am Membrangesamtprotein eher gering zu sein scheint. Dies zeigt auch die Relevanz eines funktionierenden Antikörpers für den Nachweis des Bfrs (Absatz 4.15). Da Bfr viel Eisen bindet, können schon geringe Proteinmengen gut beladenen Bfrs eine gute Fricidovichfärbung zeigen und ein starkes Signal in der Mößbauerspektroskopie hervorrufen.

5.9. Mößbauerspektren - Lokalisation des Bfrs und Identifikation der ferritinartigen Komponente

Mittels Mößbauerspektroskopie sollten die eisenhaltigen Komponenten der unterschiedlichen Zellfraktionen der *M. gryphiswaldense*-Stämme bestimmt werden. Dies diente der Bestimmung der Lokalisation des Bfrs und der Bestätigung, dass es sich bei der bereits vor dieser Arbeit als ferritinartige Komponente gefundenen Proteins, um das in dieser Arbeit untersuchte Bfr handelt.

Es wurden Membranfraktionen, lyophilisierte lösliche Proteine und aufgereinigtes rBfr gemessen. Die löslichen Proteine wurden lyophilisiert, um die Konzentration der mit ^{57}Fe markierten Proteine in der Probe zu erhöhen, da dies die Messgenauigkeit gegenüber nicht lyophilisierten Proben (ohne Abbildung) deutlich erhöhte.

Hierbei war vorrangig die Lokalisation des Bfrs in den einzelnen Fraktionen von Interesse. Da die Spektren der Eisenkerne ferritinartiger Proteine temperaturabhängig zu einem Sextett aufspalten (Williams, Danson et al. 1978), wurden die Fraktionen bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

In den Mößbauerspektren der Membranfraktionen von MSR-1 und $\Delta mamM$ war das Bfr als Ferrihydrit-Komponente zu finden (Abbildung 45 und Abbildung 46). In den löslichen Proteinen konnte keine Komponente mit Ferrihydrit-typischen Parametern beobachtet werden (Abbildung 44).

Bfr war in den $\Delta mamM$ -Membranen mit mindestens 87 % relativer Häufigkeit eine dominierende eisenhaltige Komponente (Abbildung 45 und Abbildung 46). Bei MSR-1 (Abbildung 46), betrug die relative Häufigkeit 7 %. Hier war das Magnetit die dominierende eisenhaltige Komponente. Dies zeigt, dass nur in der Membranfraktion messbare Mengen an Bfr vorhanden waren, was die Lokalisation des Bfrs in den Membranen bestätigt. Die verwendete Methode zur Trennung der Zellfraktionen unterscheidet nicht zwischen cytoplasmatischer und äußerer Membran der gramnegativen Bakterien, wobei es unwahrscheinlich ist, dass sich das Bfr im Periplasma befindet, da die in dieser Arbeit gezeigten Befunde nahe legen, dass das Bfr die DNA vor oxidativem Stress schützen kann. Diese befindet sich im cytoplasmatischen Innenraum, umschlossen von der cytoplasmatischen Membran.

Zusätzlich wurden im Vergleich zum Wildtyp und $\Delta mamM$ noch ganze Zellen von Δbfr mit ^{57}Fe angezogen und bei 130 K gemessen (Abbildung 47), um zu klären, ob das ferritinartige Protein, welches bereits in vorhergehenden Untersuchungen gefunden wurde (Böttger, Faivre et al. 2010), dem Bfr aus *M. gryphiswaldense* entspricht. Das ferritinartige Signal kann nach den vorliegenden Untersuchungen zweifelsfrei dem Bfr zugeordnet werden, da die gemessenen Zellen von Δbfr kein Ferrihydrit-Dublett mehr aufweisen. Bfr kann als Magnetitvorstufe bzw. einzige Eisenquelle für die Magnetosomensynthese inzwischen ausgeschlossen werden, da die Δbfr -Zellen nach wie vor uneingeschränkt Magnetosomen bilden. Dies wurde durch die Mößbauerspektroskopie und durch transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen belegt. Letzte wurde von Dr. René Uebe (Mikrobiologie, Universität Bayreuth, persönliche Mitteilung 2015) durchgeführt und bestätigte, dass sich Δbfr -Zellen in Größe und Zahl der gebildeten Magnetosomen nicht vom Wildtyp unterscheiden.

Die ganzen Zellen von Δbfr (Abbildung 47) und das Spektrum der Membran von $\Delta mamM$ (Abbildung 46) zeigen die Linien von Eisen-Schwefel-Proteinen. Diese können beispielsweise Teil von Elektronentransportvorgängen in der Atmungskette sein.

Die Aufspaltung des *M. gryphiswaldense*-Bfrs bei 4,2 K unterscheidet es von anderen Bakterioferritinen, die normalerweise erst eine Aufspaltung unter 4,2 K, bei etwa 1 K zeigen (Watt, Frankel et al. 1986). Ursachen hierfür sind einerseits die Unterschiede der inneren Oberflächen der Apoferritinhohlkugeln (Oberflächenladungen, hydrophobe oder hydrophile Zonen) aber auch die Anwesenheit oder das Fehlen bestimmter Anionen, die die Kristallinität des zu bildenden Ferrihydritminerals beeinflussen. Besonderen Einfluss hat hierbei die Phosphatkonzentration in dem Kompartiment, in welchem die Ferrihydritbiosynthese in der Ferritinhülle erfolgt. Tierische Ferritine weisen einen geordneteren Eisenkern als Bakterioferritine auf, was durch den geringeren Phosphatgehalt der Eisenkerne bedingt ist (Treffry und Harrison 1979; Mann, Williams et al. 1987; Rohrer, Islam et al. 1990). Sie zeigen schon bei 40 K eine beginnende Aufspaltung zum Sextett (Williams, Danson et al. 1978).

Dies deutet für das gemessene *M. gryphiswaldense* Bfr auf einen geordneteren Eisenkern hin, als er für die meisten Bakterioferritine typisch ist. Die Aufspaltungscharakteristik des *M. gryphiswaldense* Bfrs scheint der der tierischen Ferritine ähnlich.

Das Eisen/Phosphat-Verhältnis des *M. gryphiswaldense* Bfrs wurde nicht bestimmt. Möglicherweise enthält das Bfr also auch lediglich weniger Phosphat als andere Bfrs, ohne den sehr niedrigen Phosphatgehalt der bekannten tierischen Ferritine zu erreichen. Messungen bei 30 oder 40 K wurden nicht durchgeführt, so dass dies lediglich vermutet werden kann. Der Phosphatgehalt scheint je nach Bedingungen und Phosphatreichtum der Umgebung jedoch sowohl bei tierischen als auch Bakterioferritinen variabel (Rohrer, Islam et al. 1990; Watt, Frankel et al. 1992).

Die Variabilität des Eisenkerns des Bfrs von *M. gryphiswaldense* zeigt sich auch durch die Expression des rBfrs in *E. coli*. Die Spektren des rekombinanten Bfrs zeigten ein Dublett mit den bekannten Parametern bei 130 K und ein beginnende Aufspaltung bei 5 K (Abbildung 49). Dies unterscheidet sich etwas von den Spektren des Bfrs aus den *M. gryphiswaldense* Membranfraktionen. Das veränderte Aufspaltungsverhalten deutet auf eine Veränderung des Phosphatgehalts des Bfrs hin, die mit einem amorpheren Kern einher geht, wenn dieses in *E. coli* exprimiert wird. Dies kann auf die Expression in einem anderen Organismus, die sehr schnelle Expression und Beladung des rBfrs oder auch das veränderte Kulturmedium zurückzuführen sein und bedeutet keine Funktionsveränderung des Bfrs.

In den löslichen Proteinen von *M. gryphiswaldense* wurde keine Ferrihydritkomponente nachgewiesen (Abbildung 44). Generell wurde keine aufgespaltene Komponente nachgewiesen. In den löslichen Proteinen war die dominierende Komponente Cytochrom, wobei es sich vermutlich teilweise auch um NirS handelt, wie es bereits diskutiert wurde (Absatz 5.4). Weiterhin wurden mittels Gelchromatographie und der Pyridin-Hämochrom-Spektren mindestens zwei weitere cytochromhaltige Spezies (Abbildung 23) in den löslichen Proteinen gefunden. Hier deutet auch die starke pinke Färbung der löslichen Proteine auf größere Mengen Cytochrom C hin. Auch bei *M. magnetotacticum* wurde die überwiegende Zahl von Cytochrom C in den löslichen Proteinen gefunden (O'Brien, Paoletti et al. 1987).

Weiterhin waren kleinere Mengen unbekannter Substanzen in den löslichen lyophilisierten Proteinen vorhanden, wobei es sich hierbei auch um Lyophilisierungsartefakte handeln kann (Abbildung 44).

5.10. Bakterioferritin und Magnetosomensynthese

Da Bfr ein wichtiges Eisenspeicherprotein darstellt und *M. gryphiswaldense* große Mengen an Eisen für die Magnetosomensynthese aufnehmen muss und auch der Weg der Magnetosomensynthese immer noch nicht gänzlich aufgeklärt ist, wurde über eine Bedeutung des Bfrs für die Magnetosomensynthese diskutiert. Für eine Beteiligung des Bfrs sprach unter anderem auch die Beobachtung, dass das Bakterioferritin in der Membranfraktion gefunden wurde und so eine räumliche Nähe zu den Magnetosomen, die Invaginationen der Zellmembran sind, gegeben ist.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Anteil des zellulären Eisens, der in Form von Ferrihydrit vorliegt, wie es in Bakterioferritinen gespeichert wird, mit zunehmender Magnetosomensynthese, besonders zum Ende hin, abnahm (Fdez-Gubieda, Muela et al. 2013). Auch erhöhte sich der Anteil des membrangebundenen, nicht magnetischen Eisens bei der nichtmagnetischen *M. gryphiswaldense*-Deletionsmutate (Abbildung 21) im Vergleich zum Wildstamm MSR-1 (Abbildung 20) sehr stark. Dies wurde so gedeutet, dass gespeichertes Eisen nicht für die Magnetosomensynthese mobilisiert werden musste und daher im Bfr gespeichert blieb.

Generell kann das Bfr als einziger Weg für die Eisenzuführung an die Magnetosomen aber ausgeschlossen werden. Dies zeigt sich durch die Anzucht der Δbfr -Mutante, die immer noch in der Lage ist, normale Mengen an Magnetosomen zu bilden.

Diese Ergebnisse sprechen eher für das Bfr als Speicher- und Schutzprotein, welches bei Bedarf, möglicherweise auch bei beginnender Eisenknappheit im Medium, Eisen für die Magnetosomensynthese freisetzen kann.

Zuerst sorgt es aber dafür, dass bei starker Eisenaufnahme oxidativer Stress in der Zelle minimiert wird, indem Eisen aufgenommen wird und H_2O_2 möglicherweise, wie für andere Bfrs gezeigt, für die Oxidation von Eisen verwendet wird. Hierfür spricht zumindest die Beobachtung, dass DNA durch vorherige Inkubation mit rBfr vor Produkten der Fentonreaktion geschützt wird (Abbildung 32). Auch eine DNA-Bindung wurde gezeigt (Abbildung 31).

6. Fazit

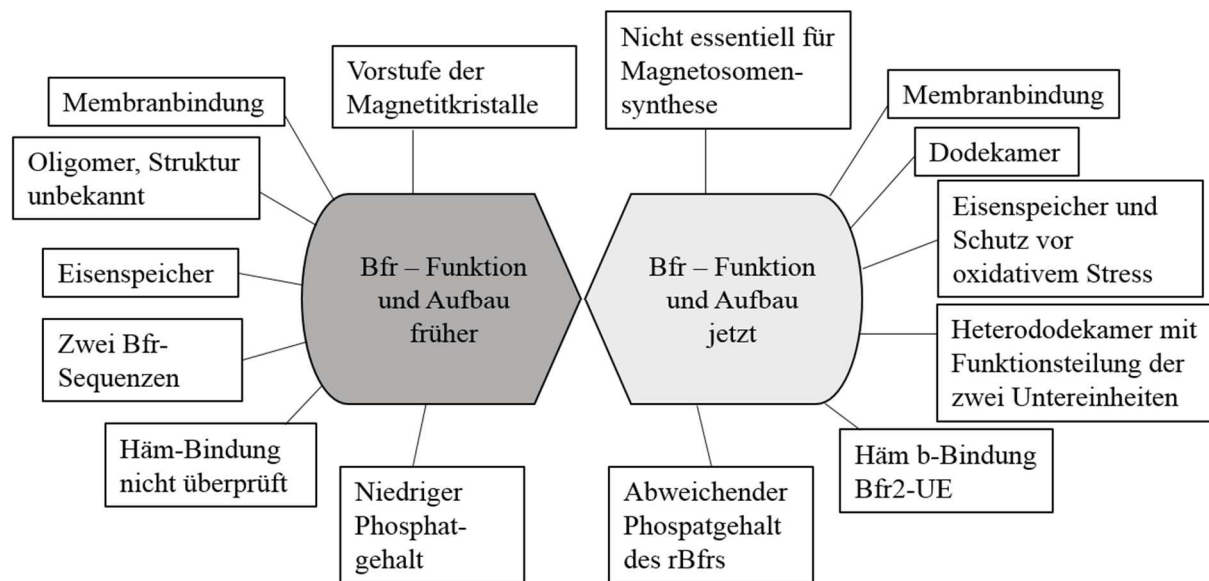


Abbildung 57: Vorstellungen über Struktur und Funktion des Bfrs vor Beginn und nach Abschluss dieser Arbeit

Die Ergebnisse zeigen, dass das Bfr von *M. gryphiswaldense* einige Eigenschaften aufweist, die für Bakterioferritine eher ungewöhnlich sind. Hierzu gehört zum einen die Zusammensetzung des Bfrs aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die jeweils untereinander nur geringe Ähnlichkeiten zeigen, und sich phylogenetisch zwei verschiedenen verschwandschaftlichen Zweigen zuordnen lassen, in denen jeweils Bakterioferritine anderer, nichtmagnetischer Bakterien, mit nur einer Untereinheit zu finden sind.

Auch die Zusammensetzung der Untereinheiten zu einem dodekameren Protein ist ungewöhnlich und eher für Dps-Proteine typisch. Die Sequenzähnlichkeiten der Untereinheiten zu anderen Bakterioferritinen widersprechen dem jedoch.

Gezeigt wurde die für Bakterioferritine typische Bindung von Häm b im Protein, was die Zuordnung zu den Bfr-Proteinen weiterhin unterstützt. Auch die Speicherung von Eisen wurde für *M. gryphiswaldense* Bfr nachgewiesen und ist typisch für diese Proteine.

Eher untypisch, aber nicht gänzlich unbekannt ist die Funktion des Bfrs für den Schutz vor oxidativem Stress.

Dass das Bfr immer in der Membranfraktion zu finden war, ist eine weitere, ungewöhnliche Eigenschaft dieses Proteins. Dies wurde auch durch die Mößbauerspektroskopie bestätigt. Auch wurde die ferritinartige Komponente aus vorherigen Untersuchungen eindeutig dem Bfr zugeordnet.

Insgesamt kann man feststellen, dass es sich bei diesem Protein aufgrund seiner Größe, Lokalisation und Zahl seiner Untereinheiten um ein eher ungewöhnliches Bfr handelt, welches möglicherweise zumindest bei den bisher bekannten Magnetospirillen verbreitet ist. Ein Hinweis darauf ist, dass auch bei anderen Magnetospirillen zwei verschiedene Untereinheiten gefunden wurden, die eine gewisse Ähnlichkeit zu denen von *M. gryphiswaldense* aufweisen. Auch der Schutz vor oxidativem Stress und Eisenspeicherung ist für Magnetospirillen mit ihrer besonderen Lebensweise und hohen Eisenaufnahme besonders relevant. Dass *M. gryphiswaldense* besonders empfindlich auf oxidativen Stress reagiert, wurde gezeigt (Absatz 5.5) (Blakemore 1982).

Bfr ist kein essentielles Protein für die Magnetosomensynthese, eine Rolle als Eisenlieferant, auch für die Magnetosomenbiosynthese, ist unter bestimmten Bedingungen aber nicht auszuschließen.

Für die Strukturanalyse wurde das Protein kristallisiert. Die erhaltenen Kristallen waren jedoch noch zu dünn um ein Spektrum hoher Auflösung zu erhalten. Die Kristallisation konnte jedoch in der vorhandenen Zeitspanne nicht abgeschlossen werden und wird weiter geführt.

6.1. Ausblick

Aufgrund der interessanten Eigenschaften des Bfrs sind einige Folgeexperimente denkbar. Zum einen wurde die Kristallisation bis dato nicht abgeschlossen, soll aber von der Arbeitsgruppe Schüler weitergeführt werden (persönliche Mitteilung Uebe 2015).

Zu klären wäre noch, ob die Expression von Bfr eisenabhängig erfolgt. Bisher gibt es darauf keine Hinweise.

Bei Magnetospirillen kann es unter Stressbedingungen verstärkt zu einem Verlust der MAI kommen. Es bleibt zu klären, ob der Δbfr -Stamm die MAI schneller verliert, als MSR-1.

Für die Strukturaufklärung sollten die Bfr-Untereinheiten jeweils einzeln ohne His-Tag exprimiert werden, um die Funktion und Polymerbildung näher zu untersuchen.

Auch die genaue Lokalisation des Bfrs an den Membranen muss noch geklärt werden. Hierfür soll der in dieser Arbeit hergestellte rBfr1-Antikörper verwendet werden und anhand von Westerblots, die separierten Membranen überprüft werden (persönliche Mitteilung Uebe 2015).

7. Quellenverzeichnis

- Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, et al. (1999). "Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and fur Mutants are Iron Deficient." Journal of Bacteriology **181**(5): 1415-1428.
- Abracado, L. G., F. Abreu, et al. (2011). "Magnetosome chain superstructure in uncultured magnetotactic bacteria." Phys Biol **7**(4): 046016.
- Almiron, M., A. J. Link, et al. (1992). "A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*." Genes Dev **6**(12B): 2646-2654.
- Amann, R., J. Peplies, et al. (2007). Diversity and Taxonomy of Magnetotactic Bacteria. Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria. D. Schüler, Springer Berlin Heidelberg. **3**: 25-36.
- Andrews, S. C., N. E. Le Brun, et al. (1995). "Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants." J Biol Chem **270**(40): 23268-23274.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, et al. (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiology Reviews **27**(2-3): 215-237.
- Andrews, S. C., J. M. Smith, et al. (1993). "Overproduction, purification and characterization of the bacterioferritin of *Escherichia coli* and a C-terminally extended variant." Eur J Biochem **213**(1): 329-338.
- Andrews, S. C., J. M. Smith, et al. (1991). "Bacterioferritins and ferritins are distantly related in evolution. Conservation of ferroxidase-centre residues." FEBS Lett **293**(1-2): 164-168.
- Baaghil, S., A. Lewin, et al. (2003). "Core formation in *Escherichia coli* bacterioferritin requires a functional ferroxidase center." Biochemistry **42**(47): 14047-14056.
- Baneyx, F. und M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." Nat Biotech **22**(11): 1399-1408.
- Bazyliński, D. A. (1999). "Synthesis of the bacterial magnetosome: the making of a magnetic personality." Int Microbiol **2**(2): 71-80.
- Bazyliński, D. A., A. J. Dean, et al. (2000). "N₂-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species." Environ Microbiol **2**(3): 266-273.
- Bazyliński, D. A. und R. B. Frankel (2004). "Magnetosome formation in prokaryotes." Nat Rev Microbiol **2**(3): 217-230.
- Bellini, S. (2009). "On a unique behavior of freshwater bacteria." Chinese Journal of Oceanology and Limnology **27**(1): 3-5.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, et al. (2003). Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.
- Bertani, L. E., J. S. Huang, et al. (1997). "Evidence for two types of subunits in the bacterioferritin of *Magnetospirillum magnetotacticum*." Gene **201**(1-2): 31-36.
- Bezkorovainy, A., L. Solberg, et al. (1987). "Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*: the effect of metals and metabolic inhibitors." Int J Biochem **19**(6): 517-522.
- Blakemore, R. P. (1975). "Magnetotactic bacteria." Science **190**(4212): 377-379.
- Blakemore, R. P. (1982). "Magnetotactic bacteria." Annu Rev Microbiol **36**: 217-238.
- Bo, T., K. Wang, et al. (2012). "Compromised DNA damage repair promotes genetic instability of the genomic magnetosome island in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1." Curr Microbiol **65**(1): 98-107.

- Böttger, L. H., D. Faivre, et al. (2010). "Magnetite formation via membrane-bound ferritin and an iron(II) species at the cytoplasmic membrane and in magnetosomes of *Magnetospirillum gryphiswaldense*." Journal of Physics: Conference Series **217**(1): 012020.
- Böttger, L. H. und B. F. Matzanke (2011). Biom mineralization of iron in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In: Gütlich, Bill, Trautwein: Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry (on DVD supplement), Springer.
- Bou-Abdallah, F., A. C. Lewin, et al. (2002). "Iron detoxification properties of *Escherichia coli* bacterioferritin. Attenuation of oxyradical chemistry." J Biol Chem **277**(40): 37064-37069.
- Boughammoura, A., B. F. Matzanke, et al. (2008). "Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937." J Bacteriol **190**(5): 1518-1530.
- Calhoun, L. N. und Y. M. Kwon (2011). "Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review." Journal of Applied Microbiology **110**(2): 375-386.
- Calugay, R. J., H. Takeyama, et al. (2006). "Catechol siderophore excretion by magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1." J Biosci Bioeng **101**(5): 445-447.
- Castruita, M., M. Saito, et al. (2006). "Overexpression and characterization of an iron storage and DNA-binding Dps protein from *Trichodesmium erythraeum*." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2918-2924.
- Cheesman, M. R., A. J. Thomson, et al. (1990). "Bis-methionine axial ligation of haem in bacterioferritin from *Pseudomonas aeruginosa*." Nature **346**(6286): 771-773.
- Chen, C. Y. und S. A. Morse (1999). "Neisseria gonorrhoeae bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress." Microbiology **145** (Pt 10): 2967-2975.
- Chen, S., W. F. Bleam, et al. (2010). "Molecular analysis of two bacterioferritin genes, bfralpha and bfrbeta, in the model rhizobacterium *Pseudomonas putida* KT2440." Appl Environ Microbiol **76**(16): 5335-5343.
- Chiancone, E. und P. Ceci (2010). "The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 798-805.
- Cooper, T. G. (1981). "Biochemische Arbeitsmethoden." de Gruyter.
- Crow, A., T. L. Lawson, et al. (2009). "Structural Basis for Iron Mineralization by Bacterioferritin." Journal of the American Chemical Society **131**(19): 6808-6813.
- Crowe, J., H. Dobeli, et al. (1994). 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. Protocols for Gene Analysis. A. Harwood, Humana Press. **31**: 371-387.
- Edman, P. (1949). "A method for the determination of amino acid sequence in peptides." Arch Biochem **22**(3): 475.
- Edman, P. und G. Begg (1967). "A protein sequenator." Eur J Biochem **1**(1): 80-91.
- Emerson, D. (2012). "Biogeochemistry and microbiology of microaerobic Fe(II) oxidation." Biochem Soc Trans **40**(6): 1211-1216.
- Faivre, D., L. H. Böttger, et al. (2007). "Intracellular Magnetite Biom mineralization in Bacteria Proceeds by a Distinct Pathway Involving Membrane-Bound Ferritin and an Iron(II) Species." Angewandte Chemie International Edition **46**(44): 8495-8499.
- Faivre, D., N. Menguy, et al. (2008). "Environmental parameters affect the physical properties of fast-growing magnetosomes." American Mineralogist **93**(2-3): 463-469.
- Faivre, D. und D. Schüler (2008). "Magnetotactic bacteria and magnetosomes." Chem Rev **108**(11): 4875-4898.

- Falk, J. E. (1964). *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Amsterdam, New York, Elsevier.
- Fdez-Gubieda, M. L., A. Muela, et al. (2013). "Magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: time-resolved magnetic and structural studies." *ACS Nano* **7**(4): 3297-3305.
- Figueiredo, M. C. O., S. A. L. Lobo, et al. (2012). "Bacterioferritin protects the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough against oxygen." *Anaerobe* **18**(4): 454-458.
- Finazzi, D. und P. Arosio (2014). "Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration." *Arch Toxicol* **88**(10): 1787-1802.
- Fish, W. W. (1988). "Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples." *Methods Enzymol* **158**: 357-364.
- Flies, C. B., J. Peplies, et al. (2005). "Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments." *Appl Environ Microbiol* **71**(5): 2723-2731.
- Ford, G. C., P. M. Harrison, et al. (1984). "Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **304**(1121): 551-565.
- Frankel, R. B., D. A. Bazylinski, et al. (1997). "Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria." *Biophysical Journal* **73**(2): 994-1000.
- Frankel, R. B., R. P. Blakemore, et al. (1981). "Magnetotactic bacteria at the geomagnetic equator." *Science* **212**(4500): 1269-1270.
- Frankel, R. B., R. P. Blakemore, et al. (1979). "Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria." *Science* **203**(4387): 1355-1356.
- Frankel, R. B., G. C. Papaefthymiou, et al. (1983). "Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **763**(2): 147-159.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annu Rev Biochem* **64**: 97-112.
- Frolow, F., A. J. Kalb, et al. (1994). "Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site." *Nat Struct Biol* **1**(7): 453-460.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. J. Walker, Humana Press: 571-607.
- Gauss, G. H., M. A. Reott, et al. (2012). "Characterization of the *Bacteroides fragilis* *bfr* gene product identifies a bacterial DPS-like protein and suggests evolutionary links in the ferritin superfamily." *J Bacteriol* **194**(1): 15-27.
- Geelhoed, J. S., D. Y. Sorokin, et al. (2009). "Microbial sulfide oxidation in the oxic-anoxic transition zone of freshwater sediment: involvement of lithoautotrophic *Magnetospirillum* strain J10." *FEMS Microbiol Ecol* **70**(1): 54-65.
- George, G. N., T. Richards, et al. (1993). "Direct observation of bis-sulfur ligation to the heme of bacterioferritin." *Journal of the American Chemical Society* **115**(17): 7716-7718.
- Gibeaut, D. M. und N. C. Carpita (1990). "Separation of membranes by flotation centrifugation for in vitro synthesis of plant cell wall polysaccharides." *Protoplasma* **156**(1-2): 82-93.
- Ginet, N., R. Pardoux, et al. (2011). "Single-step production of a recyclable nanobiocatalyst for organophosphate pesticides biodegradation using functionalized bacterial magnetosomes." *PLoS One* **6**(6): e21442.
- Grant, R. A., D. J. Filman, et al. (1998). "The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA." *Nat Struct Biol* **5**(4): 294-303.
- Grimsrud, P. A., H. Xie, et al. (2008). "Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes." *The Journal of Biological Chemistry* **283**(32): 21837-21841.
- Grünberg, K., E. C. Müller, et al. (2004). "Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." *Appl Environ Microbiol* **70**(2): 1040-1050.

- Grünberg, K., C. Wawer, et al. (2001). "A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria." Appl Environ Microbiol **67**(10): 4573-4582.
- Guerinot, M. L. (1994). "Microbial iron transport." Annu Rev Microbiol **48**: 743-772.
- Gütlich, P., E. Bill, et al. (2011). Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry: Fundamentals and Applications, Springer Berlin Heidelberg.
- Halliwell, B. und J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.
- Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." Curr Opin Microbiol **4**(2): 172-177.
- Harrison, P. M. und P. Arosio (1996). "The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation." Biochim Biophys Acta **1275**(3): 161-203.
- Hautot, D., Q. A. Pankhurst, et al. (2007). "Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients." Biochim Biophys Acta **1772**(1): 21-25.
- Healthcare, G. (2010). "Gel filtration - Principles and methods." **18-1022-18**.
- Healthcare, G. (2010). "Ion exchange chromatography and chromatofocusing - Principles and methods." **11-0004-21**.
- Healthcare, G. und Bio-Sciences (2010). Gel filtration - Principles and methods. Uppsala, Sweden, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Heyen, U. und D. Schüler (2003). "Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor." Appl Microbiol Biotechnol **61**(5-6): 536-544.
- Hochuli, E. (1990). Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Adsorbent. Genetic Engineering. J. Setlow, Springer US. **12**: 87-98.
- Hong, P., S. Koza, et al. (2012). "Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates." J Liq Chromatogr Relat Technol **35**(20): 2923-2950.
- Hudson, A. J., S. C. Andrews, et al. (1993). "Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin." Eur J Biochem **218**(3): 985-995.
- Ilari, A., S. Stefanini, et al. (2000). "The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site." Nat Struct Biol **7**(1): 38-43.
- Ishikawa, T., Y. Mizunoe, et al. (2003). "The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*." J Bacteriol **185**(3): 1010-1017.
- Jogler, C. und D. Schüler (2007). Genetic Analysis of Magnetosome Biomineralization Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria. D. Schüler, Springer Berlin / Heidelberg. **3**: 133-161.
- Jogler, C. und D. Schüler (2009). "Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation." Annu Rev Microbiol **63**: 501-521.
- Johnson, W., L. Varner, et al. (1991). "Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: role of iron reductase." Infect Immun **59**(7): 2376-2381.
- Jung, Y., J. Kwak, et al. (2001). "High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*." Applied Microbiology and Biotechnology **55**(2): 187-191.
- Kambe, T. (2012). "Molecular architecture and function of ZnT transporters." Curr Top Membr **69**: 199-220.
- Katzmann, E., A. Scheffel, et al. (2010). "Loss of the actin-like protein MamK has pleiotropic effects on magnetosome formation and chain assembly in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." Mol Microbiol **77**(1): 208-224.
- Keren, N., R. Aurora, et al. (2004). "Critical Roles of Bacterioferritins in Iron Storage and Proliferation of Cyanobacteria." Plant Physiology **135**(3): 1666-1673.

- Kolinko, I., C. Jogler, et al. (2011). "Frequent mutations within the genomic magnetosome island of *Magnetospirillum gryphiswaldense* are mediated by RecA." J Bacteriol **193**(19): 5328-5334.
- Kolinko, I., A. Lohsse, et al. (2014). "Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters." Nat Nanotechnol **9**(3): 193-197.
- Komeili, A. (2012). "Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria." FEMS Microbiology Reviews **36**(1): 232-255.
- Komeili, A., Z. Li, et al. (2006). "Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK." Science **311**(5758): 242-245.
- Komeili, A., H. Vali, et al. (2004). "Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3839-3844.
- Kuo, C. F. und I. Fridovich (1988). "A stain for iron-containing proteins sensitive to nanogram levels of iron." Anal Biochem **170**(1): 183-185.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Laulhere, J. P., A. M. Laboure, et al. (1992). "Purification, characterization and function of bacterioferritin from the cyanobacterium *Synechocystis* P.C.C. 6803." Biochem J **281** (Pt 3): 785-793.
- Le Brun, N. E., A. Crow, et al. (2010). "Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(8): 732-744.
- Lefevre, C. T., M. L. Schmidt, et al. (2012). "Insight into the Evolution of Magnetotaxis in *Magnetospirillum* Based on mam Gene Phylogenies." Appl Environ Microbiol.
- Lefevre, C. T., N. Vioria, et al. (2012). "Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria." ISME J **6**(2): 440-450.
- Lemberg, M. R. (1969). Cytochrome Oxidase.
- Lennox, E. S. (1955). "Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1." Virology **1**(2): 190-206.
- Lewin, A., G. R. Moore, et al. (2005). "Formation of protein-coated iron minerals." Dalton Trans(22): 3597-3610.
- Li, Y., S. Bali, et al. (2013). "Cytochrome cd1 Nitrite Reductase NirS Is Involved in Anaerobic Magnetite Biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* and Requires NirN for Proper d1 Heme Assembly." J Bacteriol **195**(18): 4297-4309.
- Li, Y., M. Sabaty, et al. (2014). "The oxygen sensor MgFnr controls magnetite biomineralization by regulation of denitrification in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." BMC Microbiol **14**: 153.
- Liu, Z., Z. Chen, et al. (2012). "Crystallization and preliminary X-ray studies of ferric uptake regulator from *Magnetospirillum gryphiswaldense*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **68**(Pt 8): 902-905.
- Lottspeich, F. und J. W. Engels (2006). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mann, S., J. M. Williams, et al. (1987). "Reconstituted and native iron-cores of bacterioferritin and ferritin." J Mol Biol **198**(3): 405-416.
- Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, et al. (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D222-226.
- Matzanke, B. F. (2011). Siderophore Reductase FhuF - A Case study. In: Gütlich, Bill, Trautwein: Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry (on DVD supplement), Springer.
- Matzanke, B. F., S. Anemüller, et al. (2004). "FhuF, part of a siderophore-reductase system." Biochemistry **43**(5): 1386-1392.
- Matzanke, B. F., I. Berner, et al. (1991). "Transport and utilization of ferrioxamine-E-bound iron in *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*)." Biol Met **4**(3): 181-185.

- Matzanke, B. F., E. Bill, et al. (1987). "Metabolic utilization of ^{57}Fe -labeled coprogen in *Neurospora crassa*. An in vivo Mossbauer study." Eur J Biochem **162**(3): 643-650.
- Matzanke, B. F., M. Brandenburger, et al. (2011). Mössbauer Spectroscopy of Microbial Iron Metabolism. In: Gütlich, Bill, Trautwein: Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry (on DVD supplement), Springer.
- Matzanke, B. F., D. J. Ecker, et al. (1986). "*Escherichia coli* iron enterobactin uptake monitored by Mossbauer spectroscopy." J Bacteriol **167**(2): 674-680.
- Matzanke, B. F., G. I. Müller, et al. (1984). "Hydroxamate siderophore mediated iron uptake in *E. coli*: stereospecific recognition of ferric rhodotorulic acid." Biochem Biophys Res Commun **121**(3): 922-930.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, et al. (2003). "Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis." J Biol Chem **278**(32): 29478-29486.
- Mehdy, M. C. (1994). "Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens." Plant Physiol **105**(2): 467-472.
- Meldrum, F. C., S. Mann, et al. (1993). Electron Microscopy Study of Magnetosomes in a Cultured Coccoid Magnetotactic Bacterium.
- Merril, C. R. (1990). "Gel-staining techniques." Methods Enzymol **182**: 477-488.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mishra, S. und J. Imlay (2012). "Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?" Arch Biochem Biophys **525**(2): 145-160.
- Murphy, R. M. (1997). "Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?" Current Opinion in Biotechnology **8**(1): 25-30.
- Nam, K. H., Y. Xu, et al. (2010). "Crystal structure of bacterioferritin from *Rhodobacter sphaeroides*." Biochemical and Biophysical Research Communications **391**(1): 990-994.
- Novagen (2003). pET System Manual, Novagen.
- Nur, I., M. S. Munna, et al. (2014). "Study of exogenous oxidative stress response in *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, and *Salmonella spp.*" Turk J Biol.
- O'Brien, W., L. C. Paoletti, et al. (1987). "Spectral analysis of cytochromes in *Aquaspirillum magnetotacticum*." Current Microbiology **15**(3): 121-127.
- Olson, B. J. und J. Markwell (2007). "Assays for determination of protein concentration." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 3**: Unit 3 4.
- Park, S., X. You, et al. (2005). "Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9317-9322.
- Penfold, C. N., P. L. Ringeling, et al. (1996). "Isolation, characterisation and expression of the bacterioferritin gene of *Rhodobacter capsulatus*." FEMS Microbiology Letters **139**(2-3): 143-148.
- Pessolani, M. C., D. R. Smith, et al. (1994). "Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*." J Exp Med **180**(1): 319-327.
- Poch, M. T. und W. Johnson (1993). "Ferric reductases of *Legionella pneumophila*." Biometals **6**(2): 107-114.
- Quail, M. A., P. Jordan, et al. (1996). "Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **229**(2): 635-642.
- Rehm, H. und T. Letzel (2010). Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics.
- Reindel, S., S. Anemüller, et al. (2002). "The DpsA-homologue of the archaeon *Halobacterium salinarum* is a ferritin." Biochim Biophys Acta **1598**(1-2): 140-146.

- Richards, T. D., K. R. Pitts, et al. (1996). "A kinetic study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin." J Inorg Biochem **61**(1): 1-13.
- Rivera, M., H. Yao, et al. (2015). "The Heme in Bacterioferritin Is Crucial to Bacterial Iron Homeostasis." Meeting Abstracts MA2015-01(11): 1046.
- Roat-Malone, R. M. (2008). Bioinorganic chemistry: A short course, Wiley-Interscience.
- Rohrer, J. S., Q. T. Islam, et al. (1990). "Iron environment in ferritin with large amounts of phosphate, from *Azotobacter vinelandii* and horse spleen, analyzed using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS)." Biochemistry **29**(1): 259-264.
- Rong, C., Y. Huang, et al. (2008). "Ferrous iron transport protein B gene (*feoB1*) plays an accessory role in magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1." Research in Microbiology **159**(7-8): 530-536.
- Rosenblatt, C., R. B. Frankel, et al. (1985). "A birefringence relaxation determination of rotational diffusion of magnetotactic bacteria." Biophys J **47**(3): 323-325.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor NY.
- Scheffel, A., A. Gardes, et al. (2008). "The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* but regulate the size of magnetosome crystals." J Bacteriol **190**(1): 377-386.
- Schleifer, K. H., D. Schüler, et al. (1991). "The Genus *Magnetospirillum* gen. nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and Transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov." Systematic and Applied Microbiology **14**(4): 379-385.
- Schübbe, S., M. Kube, et al. (2003). "Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island." J Bacteriol **185**(19): 5779-5790.
- Schüler, D. (2004). "Molecular analysis of a subcellular compartment: the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." Archives of Microbiology **181**(1): 1-7.
- Schüler, D. und E. Baeuerlein (1996). "Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." Arch Microbiol **166**(5): 301-307.
- Schüler, D. und E. Baeuerlein (1998). "Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*." J Bacteriol **180**(1): 159-162.
- Seaver, L. C. und J. A. Imlay (2001). "Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(24): 7182-7189.
- Simmons, S. L., D. A. Bazylnski, et al. (2007). "Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR." Environmental Microbiology **9**(9): 2162-2174.
- Simmons, S. L., S. M. Sievert, et al. (2004). "Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond." Appl Environ Microbiol **70**(10): 6230-6239.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**(1): 76-85.
- Stephani, K., D. Weichart, et al. (2003). "Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **49**(6): 1605-1614.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Takeuchi, K., Y. Nakatani, et al. (2014). "Accuracy of Protein Size Estimates Based on Light Scattering Measurements." Open Journal of Biophysics: 83-91.
- Tanaka, M., A. Arakaki, et al. (2010). "Simultaneously discrete biomineralization of magnetite and tellurium nanocrystals in magnetotactic bacteria." Appl Environ Microbiol **76**(16): 5526-5532.

- Tanaka, M., E. Mazuyama, et al. (2011). "MMS6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite biomineralization in vivo." J Biol Chem **286**(8): 6386-6392.
- Thornhill, R. H., J. G. Burgess, et al. (1995). "PCR for direct detection of indigenous uncultured magnetic cocci in sediment and phylogenetic analysis of amplified 16S ribosomal DNA." Applied and Environmental Microbiology **61**(2): 495-500.
- Timoteo, C. G., M. Guilherme, et al. (2012). "*Desulfovibrio vulgaris* bacterioferritin uses H₂O₂ as a co-substrate for iron oxidation and reveals DPS-like DNA protection and binding activities." The Biochemical journal **446**(1): 125-133.
- Timoteo, C. G., M. Guilherme, et al. (2012). "*Desulfovibrio vulgaris* bacterioferritin uses H₂O₂ as a co-substrate for iron oxidation and reveals DPS-like DNA protection and binding activities." Biochem J **446**(1): 125-133.
- Touati, D. (2000). "Iron and oxidative stress in bacteria." Arch Biochem Biophys **373**(1): 1-6.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.
- Treffry, A. und P. M. Harrison (1979). "The binding of ferric iron by ferritin." Biochem J **181**(3): 709-716.
- Uebe, R., K. Junge, et al. (2011). "The cation diffusion facilitator proteins MamB and MamM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* have distinct and complex functions, and are involved in magnetite biomineralization and magnetosome membrane assembly." Mol Microbiol **82**(4): 818-835.
- Uebe, R., B. Voigt, et al. (2010). "Deletion of a *fur*-like gene affects iron homeostasis and magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense*." J Bacteriol **192**(16): 4192-4204.
- Walsh, T. A., M. K. Johnson, et al. (1981). "Studies on heme d1 extracted from *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase." J Inorg Biochem **14**(1): 15-31.
- Wang, X., Q. Wang, et al. (2014). "Complete Genome Sequence of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1." Genome Announc **2**(2).
- Watt, G. D., R. B. Frankel, et al. (1992). "Fe²⁺ and phosphate interactions in bacterial ferritin from *Azotobacter vinelandii*." Biochemistry **31**(24): 5672-5679.
- Watt, G. D., R. B. Frankel, et al. (1986). "Redox properties and Moessbauer spectroscopy of *Azotobacter vinelandii* bacterioferritin." Biochemistry **25**(15): 4330-4336.
- Watt, R. K. (2011). "The many faces of the octahedral ferritin protein." Biomaterials **24**(3): 489-500.
- Widdel, F. (1983). "Methods for enrichment and pure culture isolation of filamentous gliding sulfate-reducing bacteria." Archives of Microbiology **134**(4): 282-285.
- Williams, J. M., D. P. Danson, et al. (1978). "A Mossbauer determination of the iron core particle size distribution in ferritin." Phys Med Biol **23**(5): 835-851.
- Williams, J. N., Jr. (1964). "A Method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes A, B C1 and C in mitochondria." Arch Biochem Biophys **107**: 537-543.
- Williams, T. J., C. L. Zhang, et al. (2006). "Evidence for Autotrophy via the Reverse Tricarboxylic Acid Cycle in the Marine Magnetotactic Coccus Strain MC-1." Applied and Environmental Microbiology **72**(2): 1322-1329.
- Wong, S. G., R. Abdulqadir, et al. (2012). "Fe-haem bound to *Escherichia coli* bacterioferritin accelerates iron core formation by an electron transfer mechanism." Biochemical Journal **444**(3): 553-560.
- Woodmansee, A. N. und J. A. Imlay (2002). "Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron." J Biol Chem **277**(37): 34055-34066.

- Yamazaki, T., H. Oyanagi, et al. (1995). "Nitrite Reductase from the Magnetotactic Bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*." European Journal of Biochemistry **233**(2): 665-671.
- Yasmin, S., S. C. Andrews, et al. (2011). "A new role for Heme, facilitating release of iron from the bacterioferritin iron biomineral." JBC **286** No. 5: 3473 - 3483.
- Yijun, H., Z. Weijia, et al. (2007). "Disruption of a *fur*-like gene inhibits magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1." Biochemistry (Mosc) **72**(11): 1247-1253.
- Zhao, G., P. Ceci, et al. (2002). "Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*." J Biol Chem **277**(31): 27689-27696.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt Ma 916/27-1) unterstützt. Die Projektmittel wurden durch Prof. Dr. Berthold F. Matzanke-Markstein eingeworben. Ich danke ihm für die Vergabe des interessanten Themas und sein Interesse sowie die Unterstützung meiner Arbeit im Isotopenlabor der Sektion Naturwissenschaften der Universität zu Lübeck.

Prof. Dr. Christian Schmidt danke ich für seine gute Betreuung, seine andauernde Unterstützung und die Gutachtertätigkeit.

Prof. Dr. Stefan Anemüller danke ich ebenfalls für seine Gutachtertätigkeit.

Für die gute Zusammenarbeit und die Gabe der verwendeten MSR-Stämme bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Schüler.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Klaus Hantke, Dr. Lars Böttger, Dr. Eckhard Bill, Dr. Jeroen Mesters und Herrn Rainer Bartels für ihre methodische Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Isotopenlabors und dem Institut für Biologie für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken.

Besonders danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre Ermutigung und Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Katharina Maria Jäger, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, den

Katharina Maria Jäger