

Bakterielle Magnetosomen

Multifunktionale bakterielle Nanomagnete für Biotechnologie und Medizin

FRANK MICKOLEIT¹, SABINE ROSENFELDT^{2, 3}, ANNA S. SCHENK^{3, 4}, DIRK SCHÜLER¹, RENÉ UEBE¹

¹ LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT BAYREUTH

² LEHRSTUHL FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE I, UNIVERSITÄT BAYREUTH

³ BAYERISCHES POLYMERINSTITUT (BPI), UNIVERSITÄT BAYREUTH

⁴ LEHRSTUHL FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE – KOLLOIDALE SYSTEME, UNIVERSITÄT BAYREUTH

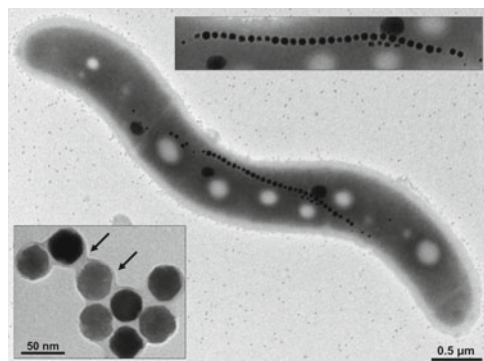
Bacterial magnetosomes represent magnetic core-shell nanoparticles biomineralized by magnetotactic bacteria like *Magnetospirillum gryphiswaldense*. The establishment of fermentation regimes for high-yield particle production, standardized isolation procedures as well as the development of a genetic toolkit for the generation of “tailored” particles might soon pave the way for the application of engineered magnetosomes in the biomedical and biotechnological field.

DOI: 10.1007/s12268-021-1593-5

© Die Autoren 2021

■ Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel sind vielversprechende Nanomaterialien für eine Vielzahl biotechnologischer und biomedizinischer Anwendungen, beispielsweise als magnetische Transportsysteme, zur Wärmeerzeugung in der Hyperthermie oder als Kontrastmittel in bildgebenden Verfahren [1]. Letztere erfordern spezielle und möglichst einheit-

liche magnetische Eigenschaften, die insbesondere von der Partikelgröße, ihrer Form und der chemischen Reinheit abhängen. Diese können in chemischen Syntheseverfahren jedoch oft nur schwer gesteuert werden. Im Unterschied dazu bilden magnetotaktische Bakterien wie *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Mikrobe des Jahres 2019) Magnetit-Nanopartikel von erstaunlich hoher chemischer Reinheit und Kristallinität sowie einheitlicher Form und Größe (**Abb. 1**). Die Biosynthese dieser Partikel erfolgt innerhalb von membranumhüllten Organellen, den Magnetosomen, und wird durch mehr als 30 verschiedene Gene gesteuert. Die oben genannten physikochemischen Eigenschaften verleihen den Magnetosomen eine hohe Magnetisierung, welche es den Bakterien durch Aneinanderreihung mehrerer Organellen ermöglicht, sich am Erdmagnetfeld zu orientieren [2]. Da sich die Magnetitkerne zusammen mit der sie umhüllenden Magnetosomenmembran aus den Zellen isolieren lassen, besteht schon seit längerem ein erhebliches Interesse, Magnetosomen in Biotechnologie und Medizin einzusetzen.



▲ **Abb. 1:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Wildtyp-Zelle von *Magnetospirillum gryphiswaldense* mit intrazellulärer Magnetosomenkette (Inset, oben rechts), sowie isolierter Partikel (Inset, unten links). Letztere bestehen aus einem Magnetitkern, welcher von einer biologischen Membran (Pfeile) umgeben ist.

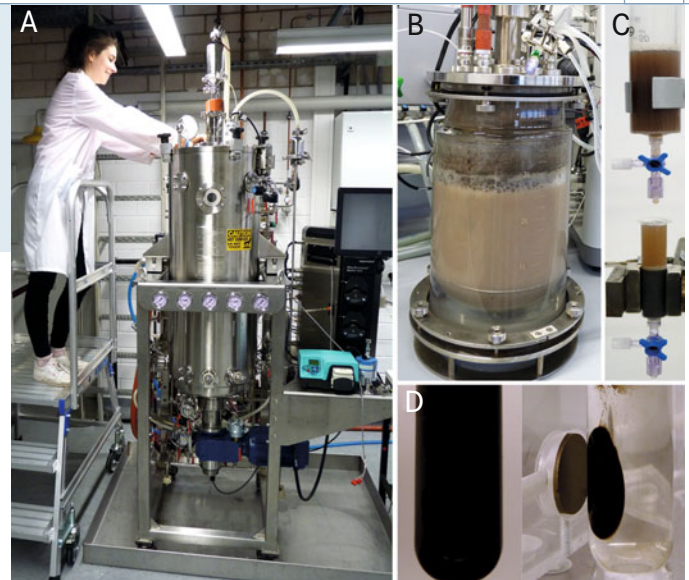
Biotechnologische Produktion von Magnetosomen

Die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Magnetosomen in gleichbleibender Qualität war lange eine der größten Limitationen für zukünftige *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen. So wächst *M. gryphiswaldense* relativ langsam und benötigt für die Biosynthese von ca. 30 Magnetosomen pro Zelle eine gleichbleibend niedrige Sauerstoffkonzentration. Mithilfe spezieller Bioreaktoren (**Abb. 2A, B**) konnten wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik (Prof. Dr. R. Freitag, Dr. V. Jérôme) an der Universität Bayreuth kürzlich einen Fermentationsprozess entwickeln, der eine exakte Einhaltung dieser optimalen Sauerstoffkonzentration auch in größerem Maßstab ermöglicht [3]. Dieses Fermentationsregime ist die Grundlage zur Entwicklung von optimierten *fed batch*-Verfahren zur Steigerung der Zellausbeuten. Gegenüber der konventionellen Anzucht in Kulturflaschen konnten dadurch bereits rund 50-mal höhere Zellerträge erzielt werden. Damit stehen heute bereits ausreichende Partikelmengen für spezielle Anwendungen und Pilotstudien zur Verfügung, die hochspezialisierte und funktionalisierte magnetische Nanomaterialien erfordern.

Eine weitere Herausforderung ist die Gewinnung und Charakterisierung der Partikel nach definierten Qualitätskriterien. Hierfür optimierten und charakterisierten Rosenfeldt *et al.* [4] ein mehrstufiges Trennverfahren (**Abb. 2C**), welches besonders hohe Partikel ausbeuten ermöglicht und zelluläre Verunreinigungen auf ein Minimum reduziert. Außerdem wird die Unversehrtheit und Funktionalität der umgebenden Membran gewährleistet, was von entscheidender Bedeutung für die kolloidale Stabilität der Magnetosomen und das Aufbringen zusätzlicher Funktionen auf die Partikeloberfläche ist.

Zusätzlich untersuchten Rosenfeldt *et al.* die Biokompatibilität der Partikel an verschiedenen humanen Zelllinien (Krebszellen und primäre Zellen). Erste Analysen am Uni-

► **Abb. 2:** Massenkultivierung magnetotaktischer Bakterien und Magnetosomenproduktion. **A,** Doktorandin Sophia Tessaro an einem 100-L-Oxy-stat-Fermenter zur mikrooxygenierten Anzucht von *Magnetospirillum gryphiswaldense* in hohen Zelldichten. **B,** 3-L-Fermenter. **C, D,** Zellaufschluss sowie ein mehrstufiges Trennverfahren (C, magnetischer Separationsschritt) ermöglichen die Gewinnung hochkonzentrierter Magnetosomen-suspensionen (D). Die magnetischen Eigenschaften der Partikel können dabei zur magnetischen Abtrennung und Manipulation genutzt werden.

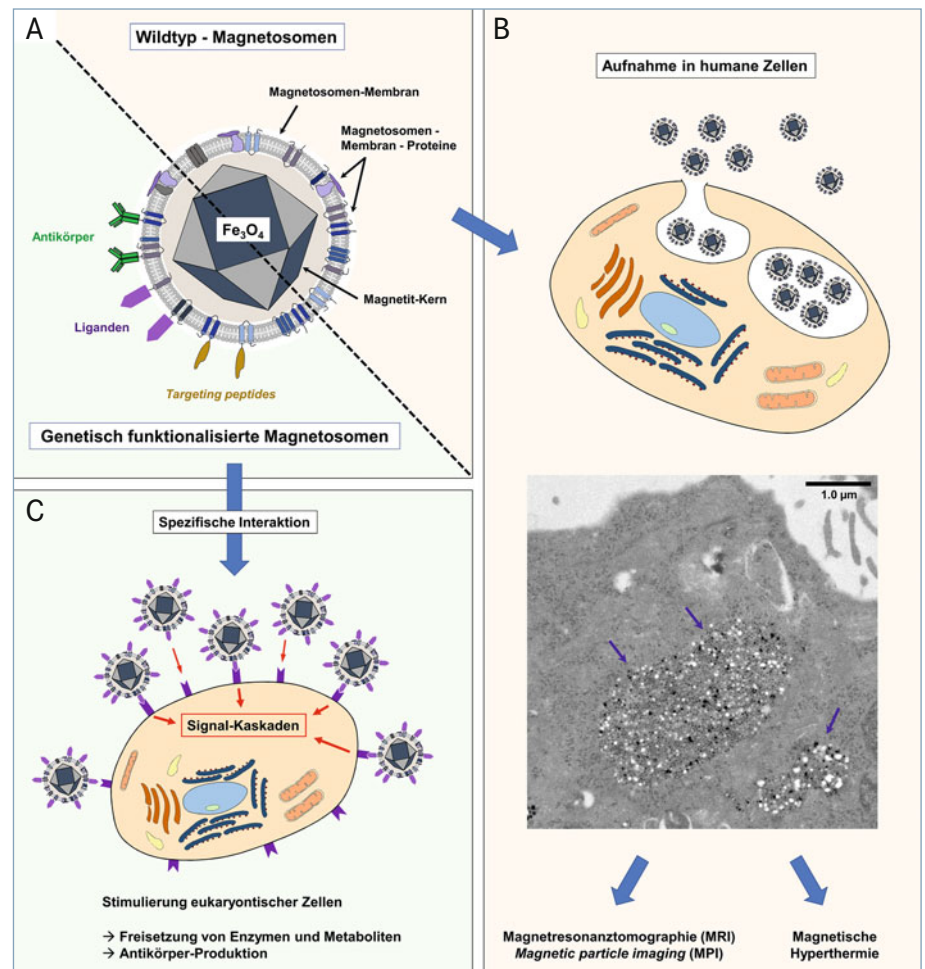


versitätsklinikum Jena (Arbeitsgruppe Dr. J. Clement) zeigten selbst für hohe Partikelkonzentrationen (bis zu $400 \mu\text{g ml}^{-1}$) nur geringe Effekte auf die Vitalität der Zellen. Hieraus kann auf eine gute Biokompatibilität geschlossen werden, was für mögliche Anwendungen im Bereich der Diagnostik von großer Bedeutung ist. Vielversprechende Beispiele hierfür stellen bildgebende Verfahren wie *magnetic particle imaging* oder Magnetresonanztomographie dar, bei denen Magnetosomen fünf- bis siebenfach höhere Signal- bzw. Kontrasteigenschaften gegenüber synthetisch hergestellten Eisenoxidnanopartikeln aufwiesen [5, 6]. Vorläufige Ergebnisse zeigten zudem eine bevorzugte Interaktion von Magnetosomen mit Tumorzelllinien (**Abb. 3**). Dadurch könnten sich Magnetosomen für diagnostische und langfristig auch für therapeutische Anwendungen eignen – wie die magnetische Hyperthermie oder den magnetisch gesteuerten Wirkstofftransport. Letztlich wäre sogar eine theranostische Nutzung denkbar, welche diagnostische und therapeutische Ansätze vereint. Für potenzielle medizinische Anwendungen ist allerdings noch die Erfassung weiterer Toxizitätsfaktoren – wie die eventuelle Antigenizität und Pyrogenität – erforderlich, was Gegenstand zukünftiger Forschung sein wird.

lassen [5]. Durch Duplikation des Magnetosomen-Gensatzes konnten darüber hinaus Überproduzenten generiert werden, die mehr als

Maßgeschneiderte Magnetosomen aus dem gentechnischen Baukasten

Da sämtliche physikochemischen und physikalischen Eigenschaften der Magnetosomenpartikel, wie deren Größe, Form, Magnetisierung sowie auch die Zusammensetzung der umhüllenden Membran, komplett genetisch codiert sind, können diese im Prinzip durch gezielte Mutation bzw. *genetic engineering* des Biosynthesewegs in einem weiten Bereich modifiziert/maßgeschneidert werden. Durch Deletion oder Überexpression einzelner oder mehrerer Gene können z. B. Partikeldurchmesser im Bereich von 10–80 Nanometer erzeugt werden [7, 8]. Die Größe der Partikel bestimmt wiederum maßgeblich deren magnetische Eigenschaften, sodass sich gezielt Magnetosomenkristalle sowohl mit superparamagnetischen als auch ferromagnetischen Eigenschaften herstellen



▲ **Abb. 3:** Interaktion von isolierten Magnetosomen mit eukaryotischen Zellen. **A,** Darstellung eines unmodifizierten Wildtyp-Magnetosoms sowie eines genetisch funktionalisierten Partikels. Die in der Magnetosomenmembran enthaltenen Proteine dienen als Anker für Fremdproteine. Auf diese Weise können Kopplungsgruppen wie Liganden, Antikörper oder *targeting*-Peptide auf der Magnetosomenoberfläche präsentiert werden. **B,** Erste Studien in Kooperation mit dem Universitätsklinikum in Jena (Arbeitsgruppe Dr. J. Clement) zeigten, dass bereits unmodifizierte Magnetosomen effektiv in Krebszellen aufgenommen werden und in vesikelartigen Strukturen (blaue Pfeile) akkumulieren. Elektronenmikroskopische Aufnahme: Dr. S. Geimer, Elektronenmikroskopie, Universität Bayreuth. **C,** Spezielle Kopplungsgruppen auf der Magnetosomenoberfläche ermöglichen die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen. Deren Stimulation kann zur Auslösung von Signalkaskaden genutzt werden und damit zur Freisetzung von Enzymen, Metaboliten oder Antikörpern führen.

doppelt so viele Magnetosomen pro Zelle biomineralisieren [8].

Das Methodenspektrum der synthetischen Biologie kann bereits genutzt werden, um beispielsweise genomreduzierte Stämme von *M. gryphiswaldense* zu erzeugen, welche ein robusteres Wachstum und eine erhöhte genetische Stabilität aufweisen und somit künftig als „Chassis“ für die verbesserte Produktion von Magnetosomen dienen könnten [9, 10].

Ein weiterer Vorteil der bakteriellen Nanopartikel besteht darin, dass sich zusätzlich funktionelle Biomoleküle chemisch oder genetisch an die in der Membran vorkommenden Mam-Proteine koppeln lassen. Durch Auswahl unterschiedlicher Membrananker kann dabei die Kopienzahl mit hoher Präzision und Selektivität gesteuert werden, was den Aufbau eines flexiblen, auf den entsprechenden Einsatz zugeschnittenen Baukastensystems erlaubt. Auf diese Weise konnten bereits multifunktionelle Magnetosomen produziert werden, die neben ihren magnetischen Eigenschaften zusätzlich fluoreszierten, sowie Antikörper-basierte Kopplungsgruppen oder verschiedene katalytische Aktivitäten aufwiesen [11]. Letztere könnten in zukünftigen Studien z. B. den Aufbau biotechnologisch relevanter Enzymkaskaden ermöglichen. Darüber hinaus wurden molekulare Kopplungsgruppen mit freien Andockstellen auf der Magnetosomenoberfläche immobilisiert, beispielweise der humane Proteinligand CD40L [12]. Letzterer konnte die für seine biologische Aktivität erforderliche multimere Struktur auf der Magnetosomenoberfläche ausbilden und ermöglichte die erfolgreiche Stimulierung von Sensorzellen, welche als Modell für Immunzellen dienen. Dies stellt mögliche Applikationen zur Antikörperproduktion in Aussicht (**Abb. 3**).

Die auf der Magnetosomenoberfläche präzentierten Fremdproteine können genetisch

leicht durch andere funktionelle Einheiten ersetzt werden, woraus ein breites Anwendungsfeld in der zellulären Biotechnologie und Biomedizin resultiert.

Danksagung

Wir danken unseren Kooperationspartnern an der Universität Bayreuth, insbesondere Dr. Valérie Jérôme und Prof. Dr. Ruth Freitag vom Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, Prof. Dr. Stefan Geimer vom Labor für Elektronenmikroskopie sowie Dr. Joachim H. Clement vom Universitätsklinikum Jena. Unsere Forschungsarbeiten zur Herstellung und Charakterisierung der Magnetosomen werden unterstützt vom BMBF („MagBioFab“ R.U. und D.S.), der DFG (UE200/1-1 an R.U. und INST 91/374-1 LAGG an D.S.), dem ERC (AdG 692637 an D.S.) und der Bayerischen Akademie der Wissenschaften (A.S.). ■

Literatur

- [1] Mosayebi J, Kiyasatfar M, Laurent S (2017) Synthesis, functionalization, and design of magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Adv Healthc Mater* 6: 1700306
- [2] Uebe R, Schüler D (2016) Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14: 621–637
- [3] Riese CN, Uebe R, Rosenfeldt S et al. (2020) An automated oxystat fermentation regime for microoxic cultivation of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Microb Cell Factories* 19: 1–15
- [4] Rosenfeldt S, Mickoleit F, Jörke C et al. (2021) Towards standardized purification of bacterial magnetic nanoparticles for future in vivo applications. *Acta Biomater* 120: 293–303
- [5] Taukulis R, Widdrat M, Kumari M et al. (2015) Magnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents – a comprehensive physical and theoretical study. *MagnetoHydrodynamics* 51: 721–747
- [6] Kraupner A, Eberbeck D, Heinke D et al. (2017) Bacterial magnetosomes – nature’s powerful contribution to MPI tracer research. *Nanoscale* 9: 5788–5793
- [7] Lohße A, Borg S, Raschdorf O et al. (2014). Genetic dissection of the mamAB and mms6 operons reveals a gene set essential for magnetosome biogenesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J Bacteriol* 196: 2658–2669
- [8] Lohße A, Kolinko I, Raschdorf O et al. (2016) Overproduction of magnetosomes by genomic amplification of biosynthesis-related gene clusters in a magnetotactic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 82: 3032–3041
- [9] Zwiener T, Mickoleit F, Dziuba MV et al. (2021) Identification and elimination of genomic regions irrelevant for magnetosome biosynthesis by large-scale deletion in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *BMC Microbiol*, <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02124-2>
- [10] Zwiener T, Dziuba MV, Mickoleit F et al. (2021) Towards a ‘chassis’ for bacterial magnetosome biosynthesis: Genome streamlining of *Magnetospirillum gryphiswaldense* by multiple deletions. *Microb Cell Factories*, <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01517-2>
- [11] Mickoleit F, Lanzloth C, Schüler D (2020) A versatile toolkit for controllable and highly selective multifunctionalization of bacterial magnetic nanoparticles. *Small* 16: 1906922
- [12] Mickoleit F, Jérôme V, Freitag R et al. (2020) Bacterial magnetosomes as novel platform for the presentation of immunostimulatory, membrane-bound ligands in cellular biotechnology. *Adv Biosyst* 4: 1900231

[10] Zwiener T, Dziuba MV, Mickoleit F et al. (2021) Towards a ‘chassis’ for bacterial magnetosome biosynthesis: Genome streamlining of *Magnetospirillum gryphiswaldense* by multiple deletions. *Microb Cell Factories*, <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01517-2>

[11] Mickoleit F, Lanzloth C, Schüler D (2020) A versatile toolkit for controllable and highly selective multifunctionalization of bacterial magnetic nanoparticles. *Small* 16: 1906922

[12] Mickoleit F, Jérôme V, Freitag R et al. (2020) Bacterial magnetosomes as novel platform for the presentation of immunostimulatory, membrane-bound ligands in cellular biotechnology. *Adv Biosyst* 4: 1900231

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Frank Mickoleit, Sabine Rosenfeldt, Anna S. Schenk, Dirk Schüler und René Uebe (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. René Uebe
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30
D-95447 Bayreuth
rene.uebe@uni-bayreuth.de
www.mikrobiologie.uni-bayreuth.de