

Bakterielle Magnetosomen

Click-Funktionalisierung bakterieller Magnetosomen für die Biomedizin

FRANK MICKOLEIT, JAKOB J. BEIERL, SIMON MARKERT, DIRK SCHÜLER
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT BAYREUTH

Magnetosomes do not only serve magnetotactic bacteria as geomagnetic field sensors but also represent a novel class of magnetic iron oxide nanoparticles with unprecedented material properties. The recent development of genetic engineering techniques for their multifunctionalization now has turned magnetosomes into a versatile 'clickable' platform for the straightforward generation of magnetic nanoparticles tailored for specific catalytic and theranostic applications.

DOI: 10.1007/s12268-025-2506-9
© The Author(s) 2025

■ Magnetische Nanopartikel (MNP) sind für eine Vielzahl biotechnologischer und biomedizinischer Anwendungen von großem Interesse. Sie dienen z. B. als magnetische Nanokatalysatoren, für die magnetische Separation von Analyten und Zellen, als Kontrastmittel in magnetischen Bildgebungsverfahren in der klinischen Diagnostik sowie als flexible

magnetisch dirigierbare Wirkstofftransporter, z. B. für die Behandlung von Tumoren [1]. Bisher werden MNP kommerziell mittels verschiedener chemischer Verfahren produziert, die allerdings den Nachteil mangelnder Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit haben. Nach wie vor ist es technisch schwierig, MNP mit möglichst einheitlicher Form

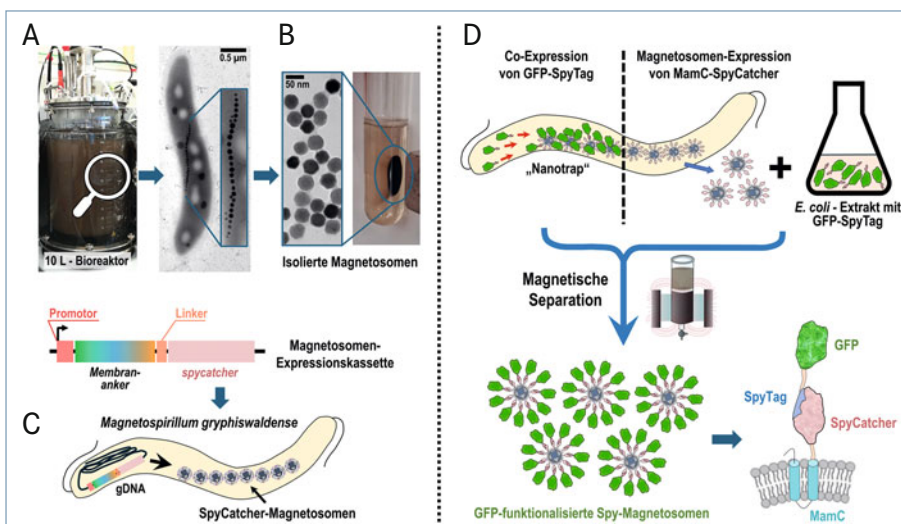
und Größe sowie definierten magnetischen Eigenschaften herzustellen, die zudem eine hohe Biokompatibilität und kolloidale Stabilität in Körperflüssigkeiten aufweisen, was die breitere klinische Anwendung von MNP bisher stark einschränkt.

Neuartige Magnetnanopartikel mit unübertroffenen Eigenschaften

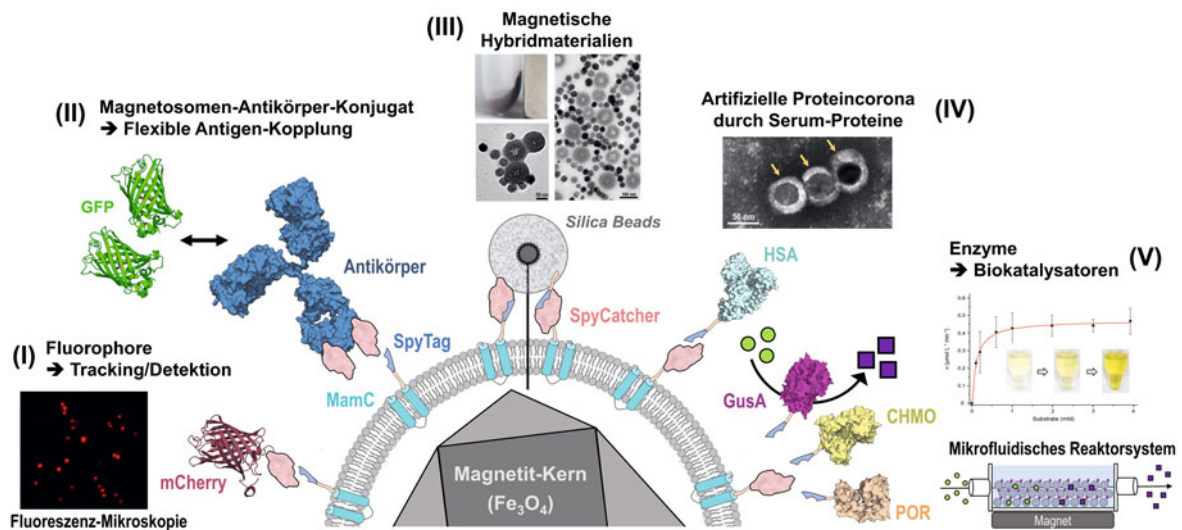
MNP mit nahezu perfekten Materialeigenschaften werden dagegen natürlicherweise als sensorische Organellen in magnetotaktischen Bakterien biosynthetisiert. Im Modellorganismus *Magnetospirillum gryphiswaldense*, die Mikrobe des Jahres 2019 (<https://vaam.de/infoportal-mikrobiologie/mikrobe-des-jahres/archiv/2019-magnetospirillum/mikrobe-des-jahres-2019/>) (**Abb. 1A**), bestehen diese Magnetosomen aus einem kuboktaedrischen, etwa 40 nm großen Einkristall des ferrimagnetischen Minerals Magnetit (Fe_3O_4). Aus den Zellen isolierte Magnetosomen-Partikel (**Abb. 1B**) sind von einer Lipidmembran umhüllt, die ca. 30 spezifische Proteine enthält, die verschiedene Funktionen bei der Magnetosomenbiosynthese erfüllen [2]. Durch den präzise gesteuerten Biomineralisationsprozess zeichnen sich Magnetosomen durch eine nahezu einheitliche Form und Größe sowie Magnetisierung aus. Da alle relevanten Eigenschaften vollständig genetisch determiniert sind, können diese mittels gentechnischer Ansätze gezielt verändert und somit je nach Anwendung maßgeschneidert werden [3]. In verschiedenen Studien übertrafen z. B. native und genetisch größenoptimierte Magnetosomen konventionell hergestellte MNP hinsichtlich ihrer Effizienz und Wirksamkeit in magnetischen Bildgebungsverfahren sowie der magnetischen Hyperthermie [4–6].

Genetischer Baukasten für multifunktionelle Magnetosomen

Viele Anwendungen im biotechnologischen und (bio-)medizinischen Bereich erfordern qualitativ hochwertige MNP, die mit zusätzlichen Funktionen ausgestattet sind. Die Magnetosomen-Membran bietet hier eine flexible Kopplungsfläche zur Immobilisierung



▲ **Abb. 1:** Bioproduktion und gentechnische Funktionalisierung von Magnetosomen. **A,** Kultivierung von *Magnetospirillum gryphiswaldense* in einem 10-L-Bioreaktor. **B,** Suspension aufgereinigter Magnetosomen (TEM-Analyse), die sich mittels eines Stabmagneten manipulieren lassen. **C,** Peptidliganden wie das SpyCatcher-Protein werden als translationale Fusion mit Magnetosomen-Ankern auf der Partikeloberfläche präsentiert. Die jeweiligen optimierten Expressionskassetten werden in den Produktionsstamm *M. gryphiswaldense* transferiert und zur stabilen Expression ins Chromosom integriert. **D,** Kopplung von SpyCatcher-Magnetosomen mit GFP-SpyTag in den Zellen als Nanotrap sowie *in vitro* im Extrakt eines rekombinanten *E. coli*-Produktionsstamms. Die Aufreinigung der mittels Click-Biologie erzeugten, funktionalisierten Magnetosomen erfolgt nach dem Zellaufschluss durch anschließende magnetische Separation.



▲ **Abb. 2:** Beispiele für die „Click“-Funktionalisierung von isolierten Magnetosomen im Reagenzglas. Die Magnetosomen-Expression von SpyTag oder SpyCatcher als Fusion mit Magnetosomen-Ankerproteinen wie MamC ermöglicht die nachträgliche Beladung mit beliebigen komplementär-markierten Cargos, z. B. Fluoreszenzproteinen (I), Antikörpern (II), Serum-Proteinen (IV) oder komplexen Enzymen für mikrofluidische Anwendungen (V). Darüber hinaus lassen sich die Spy-Magnetosomen mit weiteren Nano-Strukturen wie *Silica Beads* zu komplexeren magnetischen Strukturen verknüpfen (III).

funktioneller Cargos. Gegenüber der Kopplung von MNP mittels chemischem *Crosslinking* bietet die gentechnische *in vivo*-Funktionalisierung von Magnetosomen mittels Methoden der synthetischen Biologie eine sehr viel höhere Selektivität und Flexibilität. So können Peptidliganden als Fusionen mit Magnetosomen-Proteinen wie MamC, MamF, MamG oder MamA exprimiert werden, die dabei als Anker auf der Magnetosomen-Oberfläche dienen, aber selbst in ihrer Funktion bei der Magnetosomen-Biosynthese nicht beeinträchtigt werden. Optimierte Expressionskassetten ermöglichen zudem ein einstellbares und hohes Expressionsniveau der Fusionsproteine (**Abb. 1C**). Auf diese Weise konnten wir Magnetosomen-basierte MNP mit einem breiten Spektrum an funktionellen Cargos wie Fluorophoren (GFP oder mCherry), artifiziiellen Peptiden (z. B. Aminosäure-Arrays, Spinnenseide) oder multimeren Enzymen (RNase P) herstellen [3]. Magnetosomen konnten auch zur selektiven Bindung und Stimulierung eukaryotischer Sensorzellen mit dem humanen Protein-Liganden CD40L funktionalisiert werden, mit möglichen Anwendungen für die Produktion von Antikörpern [7].

Die Expression von mehreren hintereinander angeordneten Tandemfusionen aus identischen oder unterschiedlichen Cargo-Proteinen ermöglicht sowohl eine Erhöhung der Kopienzahl pro Magnetosom-Partikel als auch die Einführung verschiedener Funktionalitäten. Als Beispiel für die Herstellung hochaktiver magnetischer Biokatalysatoren untersuchten wir das Enzym β -Glucuronidase (GusA aus *E. coli*), das als Arrays aus bis zu fünf Monomeren und einem terminalen GFP als Fusion mit dem Magnetosomen-Protein

MamC auf der Magnetosomen-Oberfläche exprimiert wurde [3]. Da die verschiedenen integralen Magnetosomen-Anker in definierten, aber unterschiedlichen Kopienzahlen zwischen 80 und 120 pro Partikel in der Magnetosomen-Membran vorkommen [8], lassen sich durch die entsprechende Auswahl der Anker verschiedene Cargo-Proteine in unterschiedlichen Stöchiometrien präsentieren. Auf diese Weise konnten wir ein magnetisches Hybrid-Material biosynthetisieren, das zwei unterschiedliche Enzymaktivitäten (Glucuronidase GusA, Glukose-Oxidase GOx), ein Antikörperfragment (*Nanobody*) sowie ein Fluoreszenzprotein (GFP) trägt – sämtliche dieser Eigenschaften sind wiederum vollständig genetisch codiert und können bedarfsweise eingestellt werden [8].

Funktionalisierte Magnetosomen-Oberfläche mit Click-Biologie

Die translationale Fusion von Cargos mit Magnetosomen-Ankern ist allerdings zeitaufwendig, nur begrenzt flexibel sowie beschränkt auf Peptidliganden, die zudem für den Produktionsorganismus nicht toxisch sein dürfen. Dagegen ermöglicht es die Magnetosomen-Expression von fusionierten molekularen Kopplungsgruppen, die aus den Bakterien isolierten Magnetosomen-Partikel im Reagenzglas nachträglich und beliebig mit komplementär markiertem Cargo zu beladen. Dadurch lässt sich die unerreichte Selektivität und Präzision der genetischen Fusion mit der Effizienz und Zeitersparnis chemischer Kopplungsreaktionen verbinden und auch auf für die Bakterien toxische und andere Nicht-Protein-Cargos erweitern. Als Kopplungsgruppen dienen zunächst gene-

tisch an Magnetosomen fusionierte GFP-bindende *Nanobodies* und Streptavidin, welche z. B. die Bindung an komplementär markierte Tabak-Mosaik-Viren ermöglichten. Die hierdurch erzeugten Biokomposite können sodann als Modell und magnetische Plattform für weitere Funktionalisierungsansätze dienen [3]. Da solche Ansätze allerdings auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen beruhen, können sich Änderungen in den Reaktionsbedingungen sowohl auf die Kopplungseffizienz als auch die Kopplung selbst auswirken. Ein entscheidender Durchbruch gelang uns kürzlich durch die Magnetosomen-Expression des bekannten Spy-Systems (**Abb. 1C**), das die spontane Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem SpyCatcher-Protein und dem aus nur 13 Aminosäureresten bestehenden SpyTag-Peptid unter einer Vielzahl von Bedingungen ermöglicht [9]. Für maximale Flexibilität wurden durch genetische Fusion mit dem Magnetosomen-Anker MamC sowohl SpyTag- als auch SpyCatcher-exprimierende „Spy-Magnetosomen“ konstruiert, die sich auf einfache Weise und mit hoher Effizienz mit verschiedenen komplementär getaggtten Cargos beladen lassen [10, 11]. So fungieren SpyCatcher-Magnetosomen in *M. gryphiswaldense* als eine intrazelluläre „*Nanotrap*“ für gleichzeitig exprimierte Cargo-Proteine, die bereits in den lebenden Bakterien effektiv an die Magnetosomen binden und sich in einem Schritt magnetisch aufreinigen lassen. SpyCatcher-Magnetosomen aus *M. gryphiswaldense* erlauben außerdem die Kopplung und magnetische Aufreinigung von Spy-getaggtten rekombinanten Proteinen aus einem *E. coli*-Rohextrakt (**Abb. 1D**).

In mikrofluidischen Reaktorsystemen zeigen SpyCatcher-Magnetosomen nach Kopplung mit SpyTag-markierten Enzymen deutlich gesteigerte Umsatzraten im Vergleich zu Enzym-funktionalisierten konventionellen MNP. Die Immobilisierung auf der Magnetosomen-Oberfläche erleichtert und stabilisiert zudem die Oligomerisierung einzelner Enzym-Monomere, wodurch sich auch komplexere Enzymstrukturen darstellen lassen (**Abb. 2**). Insbesondere konnten wir zeigen, dass sich Ko-Faktor-abhängige Enzyme, die durch Interferenz mit dem bakteriellen Metabolismus nicht *in vivo* exprimiert werden können, mit hoher Aktivität *in vitro* auf der Magnetosomen-Oberfläche präsentieren lassen. Als Beispiel wählten wir die FAD-abhängige Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO), die sich im Produktionsstamm *M. gryphiswaldense* wegen ihrer Toxizität als unklonierbar erwies. Mit der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (POR) koppelten wir zudem ein Enzym mit großer biotechnologischer Relevanz, da es vielfältige Elektronenübertragungsreaktionen katalysiert und eine Vielzahl von Substraten oxidieren kann. Die gezielte Beladung mit Antikörpern und Serum-Proteinen belegt zudem das biomedizinische Anwendungspotenzial der Spy-Magnetosomen-Kopplungsplattform. Mithilfe des Spy-Systems lassen sich funktionalisierte Magnetosomen „per Click“ auch leicht mit anderen nano- und mikroskopischen Bausteinen, z. B. getaggt *Silica Beads*, verknüpfen. So entstehen komplexere mesoskopische Strukturen mit den Eigenschaften hybrider magnetischer Biomaterialien (**Abb. 2**, [11]).

Magnetosomen als multifunktionale theranostische Plattform?

Mit selektiv funktionalisierbaren Click-Magnetosomen steht mittlerweile eine außerordentlich flexible Plattform für die Herstellung von maßgeschneiderten MNP für eine Vielzahl biotechnologischer und biomedizinischer Anwendungen zur Verfügung. Durch die Entwicklung spezieller Fermentationsverfahren für die vergleichsweise anspruchsvollen Magnetbakterien in unserem Labor ist nunmehr auch die Bioproduktion in größerem Maßstab möglich (**Abb. 1A**), sodass funktionalisierte Magnetosomen heute bereits für viele praxisnahe Anwendungen in prinzipiell ausreichender Menge verfügbar sind [12]. Hierzu zählen in der medizinischen Diagnostik die magnetische Separation von Bio- oder

Tumormarkern sowie das spezifische Aufspüren von Tumoren mittels magnetischer Bildgebung. Die flexibel funktionalisierbare Magnetosomen-Oberfläche könnte zudem als weitere therapeutische Modalität neben der magnetischen Hyperthermie den magnetisch gesteuerten Wirkstofftransport ermöglichen. Dies könnte zukünftig die Anwendung von Magnetosomen als multifunktionale „theranostische“ Plattform ermöglichen, die Diagnostik und gezielte Therapie effektiv miteinander kombiniert und im Rahmen des Startup-Projekt „BioMagnetix“ (<https://www.linkedin.com/company/biomagnetix>) bereits weiter erforscht wird.

Danksagung

Wir danken unseren langjährigen Kooperationspartnern an der Universität Bayreuth, insbesondere Valérie Jérôme und Ruth Freitag vom Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, Sabine Rosenfeldt und Anna Schenk vom Lehrstuhl Physikalische Chemie, und Stefan Geimer vom Labor für Elektronenmikroskopie. Weiterer Dank gilt Johanna Günther und Patrick Vogel von der Universität Würzburg, Esther Mittmann, Kersten Rabe und Christof Niemeyer vom Karlsruher Institut für Technologie, Rainer Tietze, Stefan Lyer und Christoph Alexiou vom Universitätsklinikum Nürnberg-Erlangen, Tobias Knopp und Peter Ludewig vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf sowie Joachim Clement vom Universitätsklinikum Jena.

Unsere Forschungsarbeiten zur Herstellung und Charakterisierung der Magnetosomen wurden unterstützt vom *European Research Council* (ERC-AdG „Syntomagx“ und ERC-PoC „BacToMagicle“ an D. S.), vom BMBF (EXIST-Gründerstipendium „BioMagnetix“ an F. M.) sowie dem bayerischen Förderprogramm FLÜGGE („BioMagnetix“ an F. M.). ■

Literatur

- [1] Alexiou C, Jurgons R, Seliger C et al. (2006) Medical applications of magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 6: 2762–2768
- [2] Uebe R, Schüler D (2016) Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14: 621–637
- [3] Mickoleit F, Schüler D (2018) Generation of nanomagnetic biocomposites by genetic engineering of bacterial magnetosomes. *Bioinspired Biomim Nanobiomater* 8: 86–98
- [4] Taukulis R, Widdrat M, Kumari M et al. (2015) Magnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents – a comprehensive physical and theoretical study. *Magneto hydrodynamics* 51: 721–747
- [5] Mickoleit F, Thieben F, Tessaro S et al. (2023) Development of optimized magnetic particle imaging tracers utilizing genetically engineered magnetosomes. *Int J Magn Part Imaging* 9: 2303066
- [6] Hergt R, Hiegeist R, Zeisberger M et al. (2005) Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. *J Magn Magn Mater* 293: 80–86
- [7] 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
- [8] Mickoleit F, Lanzloth C, Schüler D (2020) A versatile toolkit for controllable and highly selective multifunctionalization of bacterial magnetic nanoparticles. *Small* 16: 1906922
- [9] Keeble AH, Howarth M (2020) Power to the protein: enhancing and combining activities using the Spy toolbox. *Chem Sci* 11: 7281–7291
- [10] Mittmann E, Mickoleit F, Maier DS et al. (2022) A magnetosome-based platform for flow biocatalysis. *ACS Appl Mater Interfaces* 14: 22138–22150
- [11] Mickoleit F, Beierl JJ, Markert S et al. (2024) A versatile magnetic nanoplatform for plug-and-play functionalization: genetically programmable cargo loading to bacterial magnetosomes by SpyCatcher “click biology”. *ACS nano* 18: 27974–27987
- [12] Riese CN, Uebe R, Rosenfeldt S et al. (2020) An automated oxystat fermentation regime for microoxic cultivation of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Microb Cell Fact* 19: 1–15

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>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Frank Mickoleit
 Lehrstuhl für Mikrobiologie
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30
 D-95447 Bayreuth
frank.mickoleit@uni-bayreuth.de
www.mikrobiologie.uni-bayreuth.de

AUTOREN



Simon Markert, Jakob Beierl, Frank Mickoleit und Dirk Schüler (v. l. n. r.) vor einem speziell für die Kultivierung magnetotaktischer Bakterien ausgerüsteten 100 L-Bioreaktor am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Bayreuth.