

Experimentelle Untersuchungen zum Eisenoxidationsweg bei dem neuartigen acidophilen eisenoxidierenden Bakterium „*Ferrovum*“ sp.

(MBFSt-Kennziffer 3507)

Dr. Judith Tischler

TU Bergakademie Freiberg, Institut für Biowissenschaften, AG Umweltmikrobiologie

Abstract

Das Genom des acidophilen Eisenoxidierers „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 wurde sequenziert und hinsichtlich an der Eisenoxidation beteiligte Proteine analysiert. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen konnte ein mögliches membrangebundenes Cytochrom, welches eine Sequenzidentität von 27% zu dem ersten Elektronenakzeptor der Eisenoxidation von *Acidithiobacillus ferrooxidans* aufweist, identifiziert und als Inclusion bodies in *Escherichia coli* exprimiert werden.

Einleitung

Eisenbakterien, die Eisenverbindungen als gelbbraunen Niederschlag ausfällen, wurden bereits im 19. Jahrhundert durch Ehrenberg und Winogradskij beobachtet [1]. Seitdem wurden in verschiedensten Lebensräumen Mikroorganismen, die zur Energiegewinnung Eisen(II) oxidieren, detektiert. Eine Gruppe von eisenoxidierenden Mikroorganismen leben unter sauren Bedingungen (pH < 4,5). Für die bekanntesten Vertreter der acidophilen eisenoxidierenden Bakterien, *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum*, konnte der Weg der Eisenoxidation basierend auf Genom-, Proteom-, molekularbiologische und biochemischen Untersuchungen aufgeklärt werden (z.B. [2–6]).

„*Ferrovum*“, der einzig bekannte Vertreter von acidophilen eisenoxidierenden Betaproteobakterien [1], konnten in den letzten Jahren aus sauren Bergbauwässern angereicht und isoliert [7, 8] sowie erste Genomstudien durchgeführt werden [9–11]. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde ein Eisenoxidationsweg für die Gattung „*Ferrovum*“ postuliert [10]. Zur Bestätigung des vermuteten Mechanismus wurde im Rahmen des Max-Buchner-Forschungsstipendiums der mutmaßlich erste Elektronenakzeptor von „*Ferrovum*“ sp. heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und versucht erste biochemische Untersuchungen durchzuführen.

Material und Methoden

Genomsequenzierung, Assemblierung und Annotation

„*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 wurde aus der Anreicherungskultur PN-J47, die aus sauren Bergbauwässern stammt, mittels Verdünnungsreihe isoliert und auf künstlichem Bergbauwasser (APPW, [8]) bei Raumtemperatur kultiviert. Genomische DNA des Stammes PN-J47-F6 wurde mittels des MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicenter Technologies Corp.) entsprechend der Herstellerinformationen extrahiert. Anschließend wurde die Bibliothek für die Genomsequenzierung unter Verwendung des Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina) erstellt, welche auf dem MiSeq (Illumina) sequenziert wurde.

Die Analyse der erhaltenen Sequenzierungsdaten erfolgte unter Verwendung des Galaxy Servers der Universität Freiburg [12]. Dies umfasste eine Qualitätskontrolle mittels TrimGalore! [13] sowie die Assemblierung mittels dem SPAdes Genome Assembler [14]. Die Annotation

erfolgte anschließend durch die Verwendung des „Integrated Microbial Genomes - Expert Review“ Systems [15]. Mutmaßlich an der Eisenoxidation beteiligte Proteine wurden mittels BLAST-Analyse mit bereits bekannten an der Eisenoxidation beteiligten Proteine von *At. ferrooxidans* und anderen „*Ferrovum*“-Stämmen ermittelt [4, 10].

Heterologe Expression von *cyc2like*-PNJ47F6

Das Gen *cyc2like*PNJ47F6 wurde durch Eurofins MWG synthetisiert und im Klonierungsvektor pEX-K248 geliefert. Zur Vervielfältigung wurde das Konstrukt pEX-K248-*cyc2like*PNJ47F6 in *E. coli* DH5 α entsprechend des Protokolls von NEB transformiert. Nach Isolation von pEX-K248-*cyc2like*PNJ47F6 mittels GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher), Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NdeI/NotI und Ligation in den Expressionvektor pET16bp wurde das Konstrukt pET16bp-*cyc2like*PNJ47F6 in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Für die anschließende Expression wurde *E. coli* BL21(DE3) pET16bp-*cyc2like*PNJ47F6 in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin bei 37°C inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,6 bis 0,8 wurde 1 mM IPTG zugegeben und anschließend bei 30°C und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, mit Phosphatpuffer gewaschen und bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Die anschließende Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer von löslichen Protein erfolgte nach Park et al. [16]. Die erhaltenen Pellets wurden in Phosphatpuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle der Expression wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

Ergebnisse

Genom und Eisenoxidationsweg bei PN-J47-F6

Das Genom von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 umfasst derzeit 1.839.500 bp und besteht aus 22 Contigs. Die allgemeinen Eigenschaften des vorläufigen Genoms sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Allgemeine Eigenschaften des Genoms von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6

Genomgröße	1.839.500 bp
Anzahl der Contigs	22
G+C Gehalt	39,9%
Anzahl kodierender Sequenzen	1839
Anzahl Protein-kodierender Gene	1792
Anzahl von RNA Genen	47

Ausgehend von den in der Literatur postulierten Eisenoxidationswegen für *At. ferrooxidans* und „*Ferrovum*“ spp.

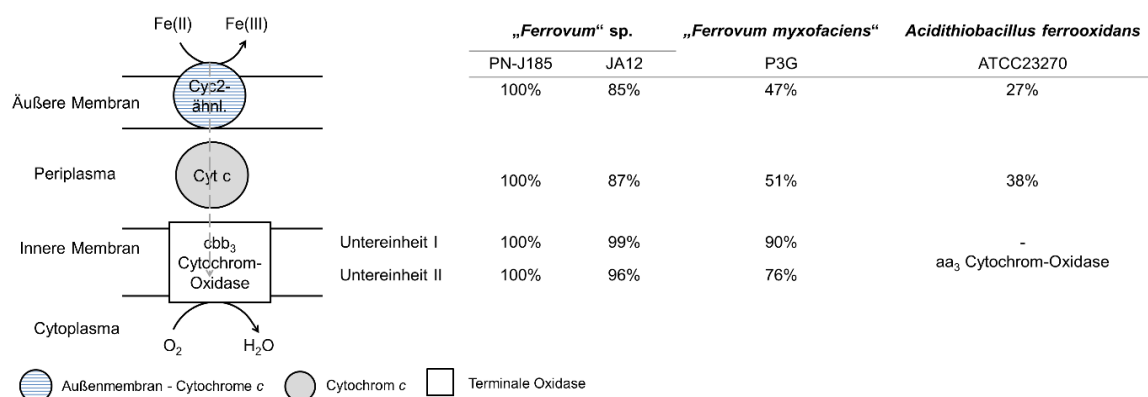


Abb. 1: Postulierter Eisenoxidationsweg von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 (links) sowie Sequenzidentität der mutmaßlich an der Eisenoxidation beteiligten Proteine von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 zu den homologen Proteinen von „*Ferrovum*“ sp. PN-J185, „*Ferrovum*“ sp. JA12, „*Ferrovum myxofaciens*“ P3G und *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270.

konnten für den Stamm PN-J47-F6 an der Eisenoxidation beteiligte Proteine ermittelt werden. Wie bereits für „*Ferrovum*“ spp. beschrieben [10], besitzt auch „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 ein Membranprotein, was eine Sequenzidentität von 27% zu dem membrangebunden Cytochrom *cyc2* von *At. ferrooxidans*, dem ersten Elektronenakzeptor bei der Eisenoxidation von *At. ferrooxidans* [4]. Der Sequenzvergleich des *cyc2*-ähnlichen Membranproteins des Stammes PN-J47-F6 mit mutmaßlichen *cyc2*-ähnlichen Membranproteinen von weiteren „*Ferrovum*“-Stämmen zeigte eine Sequenzidentität zwischen 47% („*F. myxofaciens*“ P3G) und 100% („*Ferrovum*“ sp. PN-J185) (Abb. 1), was auf Unterschiede innerhalb der Eisenoxidation zwischen den verschiedenen „*Ferrovum*“ Arten hindeutet.

Heterologe Expression von cyc2like-PN-J47-F6

Der mutmaßlich erste Elektronenakzeptor der Eisenoxidation von „*Ferrovum*“ sp. PN-J47-F6 (*cyc2likePNJ47F6*) wurde in *E. coli* transformiert und bei 30°C und Raumtemperatur exprimiert. Die Kontrolle der Expression mittels SDS-PAGE zeigte, dass *cyc2likePNJ47F6* erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurde (Abb. 2). Dabei konnte festgestellt werden, dass *cyc2likePNJ47F6* eine ähnliche Größe wie das für *At. ferrooxidans* beschriebene *cyc2* von ca. 46 kDa aufweist [17]. Weiterhin zeigte sich, dass bei 30°C mehr Protein *cyc2likePNJ47F6* exprimiert wurde. Da der größte Teil des exprimierten Proteins im Pellet zu finden ist, wird angenommen, dass *cyc2likePNJ47F6* als Inclusion bodies exprimiert wurde, wodurch eine weitere biochemische Charakterisierung nicht möglich war.

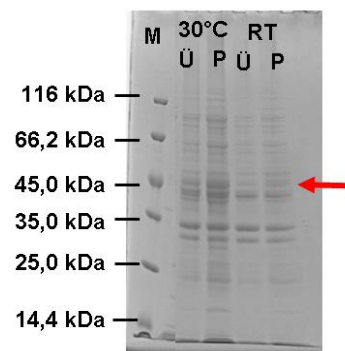


Abb. 2: Coomassie Blau-gefärbtes SDS-PAGE des Überstandes (Ü) und des Pellets (P) von aufgeschlossenen *E. coli* BL21(DE3) pET16bp-*cyc2likePNJ47F6* (M: Marker)

Literatur

- [1] Hedrich et al. *Microbiology*. **2011**, 157: 1551.
- [2] Goltsman et al. *Applied and Environmental Microbiology*. **2009**, 75: 4599.
- [3] Jeans et al. *The ISME Journal*. **2008**, 2: 542.
- [4] Valdés et al. *BMC Genomics*. **2008**, 9: 597.
- [5] Kai et al. *Journal of Biochemistry*. **1992**, 112: 816.
- [6] Yarzabal et al. *Microbiology*. **2004**, 150: 2113.
- [7] Johnson et al. *Applied and Environmental Microbiology*. **2014**, 80: 672.
- [8] Tischler et al. *Journal of Microbiological Methods*. **2013**, 95: 138.
- [9] Ullrich et al. *PLoS ONE*. **2016**, 11: e0146832.
- [10] Ullrich et al. *Frontiers in Microbiology*. **2016**, 7: 797.
- [11] Moya-Beltrán et al. *Genome Announcement* **2014**: 2.
- [12] Afgan et al. *Nucleic Acids Research*. **2016**, 44: W3.
- [13] https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.
- [14] Bankevich et al. *Journal of Computational Biology*. **2012**, 19: 455.
- [15] Markowitz et al. *Bioinformatics*. **2009**, 25:2271.
- [16] Park et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2015**, 1848: 842.
- [17] Yarzabal et al. *Journal of Bacteriology*. **2002**, 184:313.