

Schlußbericht zum Projekt :

Isolierung, Kristallisation und Kristallstrukturbestimmung der Oberflächenproteine (S-Layer) von Bakterien und Archaeobakterien

Projektleiter: Prof. Dr. Tony Debaerdemaeker

Universität Ulm

Institut für Anorganische Chemie I

Albert Einstein Allee 11

89081 Ulm

Zeitraum: 1998 -2006

Förderkennzeichen: 50WB9838

1.1. Aufgabenstellung

Archaeobakterien haben die Fähigkeit unter extremen Lebensbedingungen zu leben [17, 18, 19, 23]. In diesem Projekt richtete sich unser Interesse vor allem auf die Zellwand (S-Layer) von Archaeobakterien. Diese Zellwand ist ständig in unmittelbarem Kontakt mit ihrer extremen Umwelt, d.h. ständig äußeren Einflüssen wie Temperatur, verschiedenen pH-Werten sowie Salzen in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Der Transport von Substraten und Stoffwechselprodukten findet außerdem durch diese Zellwand statt. Ziel dieses Projekts war es, die 3-Dimensionale Kristallstruktur eines S-Layer-(Glyco-) Proteins zu bestimmen und eine Erklärung dafür zu finden, wie die Anpassung an extreme und verschiedenartige Umgebungen möglich ist. Um dieses Ziel zu erreichen, wollten wir einerseits die S-Layer von mesophilen, thermophilen, hyperthermophilen und halophilen Archaeobakterien untersuchen, (*Methanothermus fervidus*, *Methanococcus vannielli*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii*, *Sulfolobus acidocaldarius* und *Halococcus salifodinae*), andererseits einen Vergleich mit denen von mesophilen und thermophilen Bakterien machen (*Bacillus sphaericus* und *Geobacillus stearothermophilus*) [1, 3, 4]. Die daraus gewonnenen Ergebnisse zielten nicht nur auf eine mögliche biotechnologische Anwendung, sondern auch auf ein besseres Verständnis für Lebensformen unter extremen Bedingungen auf der Erde, aber auch auf mögliche Formen von Leben unter extraterrestrischen Bedingungen [15].

1.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Dieses Projekt beruhte auf der Zusammenarbeit mit Kollegen Prof. Dr. Helmut König von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und Prof. Dr. Jean-Paul Declercq von der Universität Louvain in Louvain-la-Neuve (Belgien).

Die Hauptaufgabe der Ulmer Gruppe bestand darin, die optimalen Kristallisationsbedingungen von den meist bereits isolierten und gereinigten S-Layer Membranproteinen der Bakterien bzw. Archaeobakterien aus der Gruppe von Prof. Dr. H. König zu ermitteln und geeignete Kristalle für eine dreidimensionale Kristallstruktur zu züchten.

Da die Kristallisation von Membranproteinen bekanntlich schwierig ist und noch keine Kristalle ein S-Layer-Membran Proteins bekannt waren, wurden neben Kristallisationsversuchen im Labor in Zusammenarbeit mit der NASA (später unter der Regie von New Century Pharmaceuticals, Inc., Huntsville, Alabama) Kristallisationsversuche dieser Proteine im All während einer ganzen Reihe von Flügen der Raumfähren unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit gemacht. Diese Kristallisationsversuche im All wurden anschließend in ein ESA-Projekt (AO-99-124) aufgenommen, wobei der Schwerpunkt dieses Projekts auf der Kristallisation des S-Layers des *Methanothermus Fervidus* und der Verwendung der speziell für diese Missionen entwickelten Hardware (ACPF) lag.

Die Vorbereitung, Durchführung sowie die Dokumentation der umfangreichen Kristallisationsversuche wurden durch die Einstellung einer BTA bzw. CTA, die aus diesem Vorhaben finanziert wurde (Frau Tina Schwyer, Frau Dipl. Biol. Tanja Trieu und Frau Susan Janke), gesichert. In dem Zeitraum des Projekts haben drei Studenten (Biologie, Chemie und Informatik) im Rahmen eines jeweiligen Schwerpunktpraktikums besondere Probleme, die im Laufe unserer Arbeit auftauchten, genauer untersucht, u.A. die geeignetste Methode, um die Konzentration der S-Layer Membranproteine auszukunden, die Kristallisation von S-Layer Membranproteinen in Öle und Gele (als Alternative zur Kristallisation im All) sowie das Ansammeln von Erfahrungen im Zusammenhang mit der geplanten Verwendung der GCB (Granada Crystallisation Box) [13, 14, 21, 22] .

1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

1998

- Isolierung und Reinigung der S-Layer aus Zellen, die uns unser Projektpartner Prof. Dr. König (Mainz) zur Verfügung stellte.
- Suche, Herstellung und Optimierung von Kristallscreens, die sich gezielt für die Kristallisation von S-Layer eignen
- Ermittlung welches Kristallisationsverfahren sich am ehesten eignet, um S-Layer Membranproteine zu kristallisieren.
- Da S-Layer Proteinlösungen nicht-wasserlöslich sind, müssen geeignete Detergenzien gesucht werden.
- Kristallisation und Strukturbestimmung des S-Layers des *Methanothermobacter ferrooxidans*.
- Untersuchung der Gründe, warum Kristalle mit gleichem Volumen, die im All gezüchtet wurden sich denen die im Labor gezüchtet wurden, so stark kristallographisch unterscheiden.

1999

- Neben der bisherigen "sitting and hanging drop" Kristallzucht hardware (letztere hatten wir erfolgreich bei der STS-95 Mission eingesetzt) mußte für den Flug STS-107 die Kristallisation auf das Dialyseverfahren umgestellt werden.
- Da die Firma Dornier uns nicht gleich Dialysereaktoren zur Verfügung stellen konnte, mußte das Dialyseverfahren erst mit Dialyse-"buttons" ausprobiert werden.
- Als zusätzliche Schwerpunkte wurde auch die Kristallisation des S-Layers von *Bacillus sphaericus* und *Methanococcus jannaschii* in Angriff genommen.

2000 – 2006

- Suche und Optimierung der Kristallisationsbedingungen und Methoden
- Kristallisation der S-Layer Proteine in Gele, u.A. GCB [13, 14, 19, 20]
- Versuche, ob mit von DLS (Diffuse Light Scattering) die Proteinlösungen für eine Kristallisation besser vorbereitet werden können
- Zusätzliche Kristallisationsversuche mit den S-Layer von *Bacillus stearothermophilus*, *Methanococcus vannielli*, *Bacillus fusiformis*
- Untersuchung der Gründe, warum sich die Kristallisation des S-Layers von *Bacillus sphaericus* sich nicht wiederholen läßt

1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde

Obwohl S-Layer einen Anteil von bis zu 15 % des Gesamtzellproteins betragen, gibt es bis heute noch keine dreidimensionale Strukturbestimmung mit atomarer Auflösung eines S-Layer Proteins. Der wichtigste Grund liegt in der Schwierigkeit, diese S-Layer überhaupt aus einer nicht-wässerlichen Lösung unter Verwendung eines geeigneten Detergenten zu kristallisieren.

Vor einigen Jahren erschien die Veröffentlichung einer Kristallstruktur mit einem Fragment von 52 Aminosäuren eines S-Layers von *Staphylothermus marinus* [24], später folgten die Daten von Fragmenten des S-Layers von *Methanosarcina mazei* [16] und *Geobacillus stearothermophilus* [20].

Diese Arbeiten zeigen, daß es anderen Forschungsgruppe auch noch nicht gelungen ist, die Strukturbestimmung eines ganzen S-Layer Proteins zu bewältigen und es zeigt, daß wir auf dem richtigen Weg sind, wie die bereits erhaltenen Kristalle vom S-Layer des *Methanothermobacter feravidus* und des *Bacillus feravidus* beweisen.

1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Unser Projekt war Teil eines Gesamtprojekts, das wir zusammen mit Herrn Prof. Dr. H. König (Universität Mainz) und Herrn Prof. Dr. J.-P. Declercq (Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgien) in Angriff genommen haben.

Die Ulmer Aufgabe war es, die einzelnen Kristallisationsversuche durchzuführen, zu optimieren und, falls Kristalle erhalten wurden, sie auf ihre Tauglichkeit für eine röntgenographische Untersuchung zu prüfen bzw. das Beugungsspektrum zu messen. Herr Dr. M. Wunderling (Universität Ulm) hat die Qualität und Stabilität der Proteinlösungen regelmäßig mittels MALDI geprüft.

Die Aufgabe von Herrn Prof. Dr. J.-P. Declercq bestand ebenfalls darin Kristallisationsversuche zu machen, aber mit dem Schwerpunkt Schweratomderivate der Kristalle herzustellen, die für die Strukturbestimmung unerlässlich sind.

Prof. Dr. H. König und seine Arbeitsgruppe hat sich um die Isolierung, Reinigung und die Ermittlung der Primärsequenz der für eine kristallographische Untersuchung in Betracht kommende S-Layer gekümmert.

2.1. Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse

Das Ziel, gute bzw. sehr gute Einkristalle von S-Layern zu züchten und damit erstmalig eine dreidimensionale Kristallstruktur von S-Layer-Proteinen bestimmen zu können, haben wir, was die Züchtung von Kristallen und das Messen eines Röntgenbeugungsdiagramms angeht, beim S-Layer von *Bacillus sphaericus* und von *Methanothermobacter feravidus* bereits erreicht. Diesem Ziel sind wir ebenfalls sehr nahe bei der Kristallisation des S-Layers von *Geobacillus stearothermophilus* (DSM 22, DSM 458 und DSM 2358), *Bacillus fusiformis* B3, *Methanocaldococcus jannaschii*, und von *Sulfolobus acidocaldarius*.

- Die Kristallisation des S-Layers von *Methanothermobacter feravidus*

Die ersten "guten" Kristalle des S-Layers von *Methanothermobacter feravidus* wurden während des Flugs STS-95 (1998) im All erhalten. Einer dieser Kristalle (Bild 1) eignete sich für eine erste kristallographische Untersuchung. Bei DESY bzw. EMBL in Hamburg wurde der Versuch unternommen, ein Beugungsdiagramm zu erstellen. Da die Messung bei Raumtemperatur stattfand, ist der Kristall leider nach einer Aufnahme kaputtgegangen. Diese einzige Beugungsaufnahme reichte jedoch aus, um die Gitterkonstanten und die Raumgruppe eindeutig zu bestimmen. Ein Vergleich der Beugungsdiagramme von im All und auf der Erde gezüchteten Kristallen macht den Vorteil der Züchtung von Kristallen des *Methanothermobacter feravidus* im All deutlich. Bei den im All gezüchteten Kristallen betrug die Auflösung 4,2 Å, bei den auf der Erde gezüchteten 9 Å und eine Indizierung der Reflexe war unmöglich.

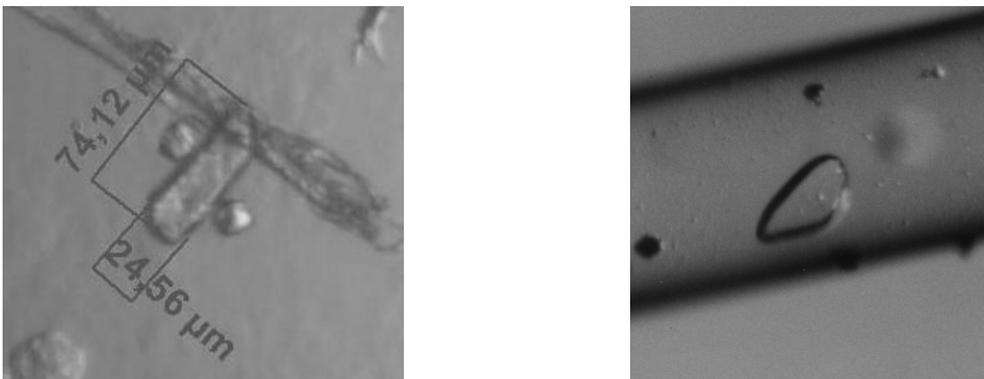


Bild 1: Links Kristall des S-Layer von *Methanothermobacter feravidus* gezüchtet im Labor, rechts im All (30 x 20 x 5 µm, STS-95)

Unter genau den gleichen Kristallisationsbedingungen und mit den gleichen Reaktoren wurden die vorherigen Kristallisationsversuche auf der Internationalen Raumstation (ISS) vom 25. Mai bis 4. Juli 2001 wiederholt (Bild 2). Der Hinflug fand im Rahmen des russischen CPCF-II Flugs statt, der Rückflug mit dem amerikanischen STS-104 Flug. Nach der Rückkehr der Kristalle aus Amerika wurden die Proteinkristalle sofort für eine Messung nach Hamburg zu DESY gebracht. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Kristalle auf dem Weg von Ulm nach Hamburg kaputtgegangen waren. Trotz einer genauen Untersuchung konnten wir bisher die Gründe hierfür nicht erkennen (Tabelle 1).

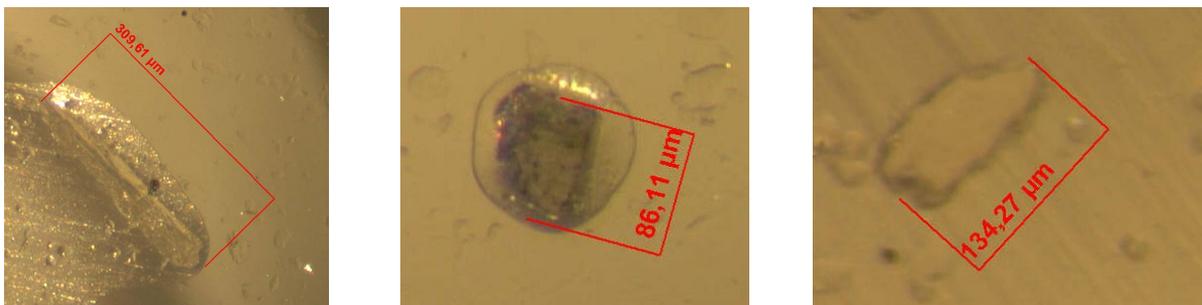


Bild 2: Kristalle des S-Layer von *Methanothermobacter fermentans* gezüchtet im All während der CPCF-2 Mission

	STS-95	CPCF-2 (STS-104)
Ladung:	19. Oktober, Straßburg	08. Mai, Ulm
	10 Tage	17 Tage
Aktiviert:	29. Oktober	25. Mai
	8 Tage	32 Tage
Deaktiviert:	07. November (?)	26. Juni
	-	28 Tage
Landung:	07. November	4. Juli
Übergabe:	11. November, Straßburg	27. Juli, Ulm
	33 Tage	14 Tage
Messung:	14. Dezember	10. August
Transport:	bei ZT (Winter)	bei ZT (Sommer)
	Auto	Auto
	Kapillar	Reaktor

Tabelle 1. Vergleich der experimentellen Bedingungen für die Kristalle gezüchtet während der STS-95 und CPCF-2 Mission

Da wir gezeigt haben, daß die Kristallisation des S-Layers von *Methanothermobacter fermentans* nur unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit möglich ist, wie die Kristallisationsversuche

während der Flüge STS-95 und CPCF-II/STS-104 zeigte, fand ein dritter Versuch im Rahmen des STS-107 Flugs im Januar 2003 statt. Der Absturz der Raumfähre Columbia hat diesem Versuch ein trauriges Ende gesetzt.

Im April 2003 fand in Noordwijk (Niederlanden) ein Treffen mit den von dem Absturz der Columbia Raumfähre betroffenen Wissenschaftler statt, wobei beschlossen wurde, letzteren so bald wie möglich einen neuen Kristallisationsversuch im All zu ermöglichen. Bis heute hatten wir leider noch keine Gelegenheit, diesen wichtigen Versuch nachzuholen.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir zum ersten Mal gezeigt, daß die Kristallisation eines S-Layers, hier des S-Layers von *Methanothermobacter thermautotrophicus*, überhaupt möglich ist. Bei der Kristallisation des S-Layers von *Methanothermobacter thermautotrophicus* konnten Kristalle mit einer Auflösung, die reicht, um eine vollständige Kristallstrukturbestimmung zu machen, bis heute, **nur** im All unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit gezüchtet werden [2, 5, 6, 11, 12]!

- Die Kristallisation des S-Layers von *Bacillus sphaericus*

Der Erfolg bei der Kristallisation der S-Layer von *Bacillus sphaericus* und die sehr gute Qualität der im Labor (Bild 3) und im All gezüchteten Kristalle (Bild 4) des S-Layers von *Bacillus sphaericus* haben dazu geführt, daß inzwischen eine ganze Reihe von Beugungsspektren sowohl bei DESY in Hamburg als auch beim ESRF in Grenoble gemessen wurden (Nativen-Datensätze, Datensätze von Br-, Hg- und Xe-Derivaten). Der beste Datensatz der bis jetzt gemessen wurde, hat eine Auflösung von 1.8\AA . Die Gitterkonstanten sind $a = 117,2\text{\AA}$, $b = 117,2\text{\AA}$ und $c = 182,8\text{\AA}$, das Gitter ist tetragonal, aber die Raumgruppe läßt sich nicht eindeutig bestimmen, sie ist entweder $I4$ oder $I422$. Die Raumgruppe $I422$ würde allerdings bedeuten, daß das Proteinmolekül einen Dimer bilden muß, was aus der Sequenzierung nicht hervorgeht.

Trotz der guten Datensätze ist es uns bisher noch nicht gelungen, weder durch Molecular Replacement noch durch anomale Dispersion, die ganze dreidimensionale Kristallstruktur zu bestimmen. Nur ein Fragment von ca. 10 % der Gesamtsequenz konnte bis jetzt gefunden werden. Eine Ursache für die Schwierigkeiten bei der dreidimensionalen Strukturbestimmung liegt trotz guter Datensätze möglicherweise darin, daß das ursprüngliche S-Layer-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 127 kDa im Laufe der Zeit in verschiedene Fragmente zerfällt. Diese Beobachtung könnte auch erklären, warum das ganze Fragment nicht genau in die

gefundene Einheitszelle paßt. Die Kristallisation von neuen Kristallen vom S-Layer-Protein bzw. dessen Fragmenten ist dementsprechend zwingend.

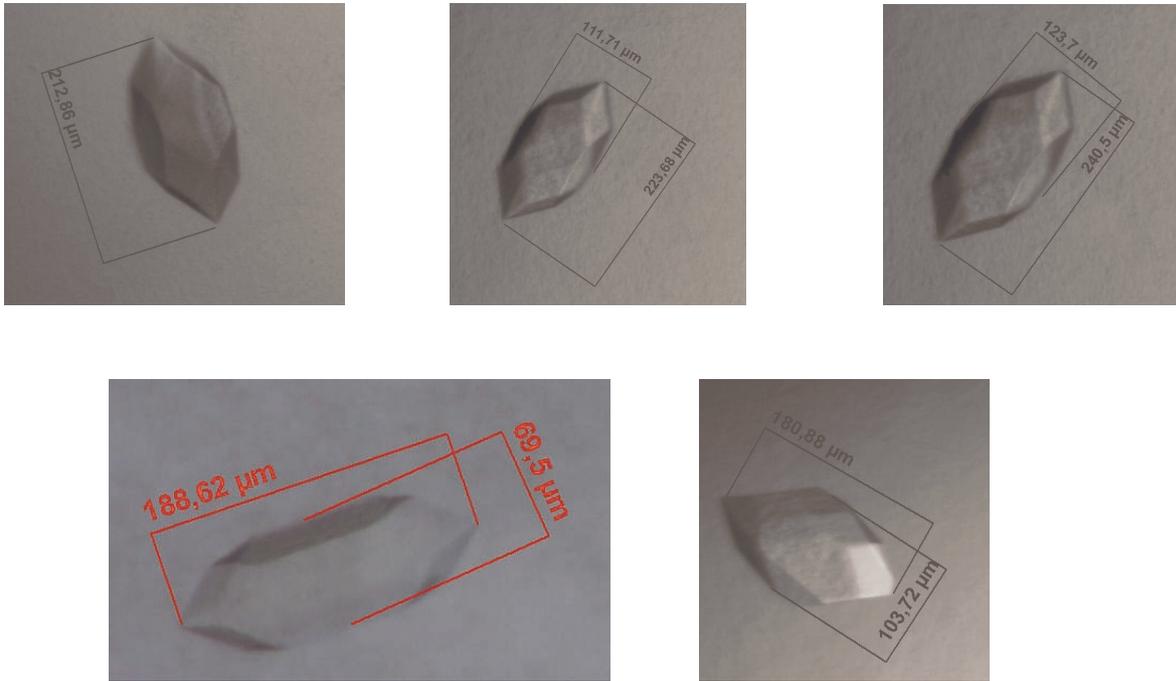


Bild 3. Kristalle des S-Layers von *Bacillus sphaericus* gezüchtet bei Raumtemperatur im Labor

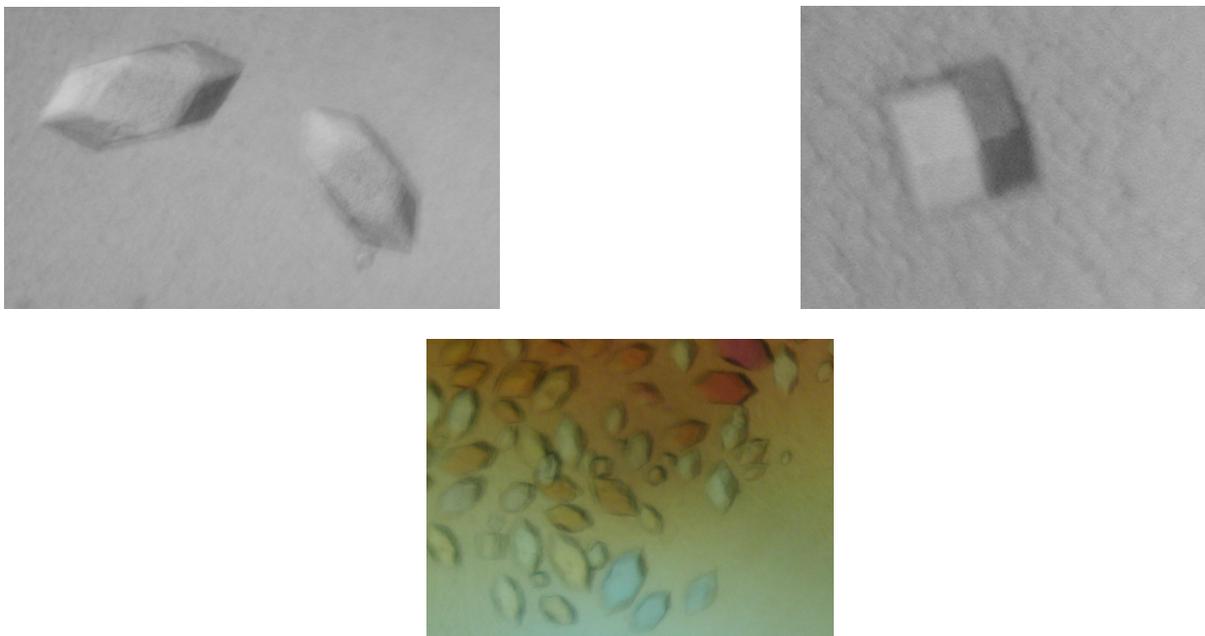


Bild 4. Kristalle des S-Layers von *Bacillus sphaericus* gezüchtet bei Raumtemperatur im All, STS-112, in gleiche Größe und Qualität wie die Kristalle gezüchtet im Labor.

Neuere Chargen mit Proteinlösungen des S-Layers von *Bacillus sphaericus* führen leider nicht mehr, wie bei den älteren Chargen, zu den gewünschten Kristallen, obwohl die Kristallisationsbedingungen identisch sind!

Da wir kurz vor der vollständigen Strukturbestimmung standen, haben wir die Chargen miteinander verglichen, um mögliche Unterschiede zu finden. Dementsprechend haben wir die Kristallisationsdaten, Proben, Analysen usw. für beide Chargen genauestens untersucht.

Aus dieser Untersuchung geht folgendes hervor:

- Wie die SDS-Gele und MALDI-Spektren (Bild 5) zeigen, stellte sich heraus, daß nach einer Zeitspanne von ca. 1 Jahr sich die ursprüngliche Proteinlösung mit einem ursprünglichen Protein mit einer Masse von 127 kDa in mehrere Fragmente mit Massen von ca. 75, 85, und 105kDa zersetzt hat.

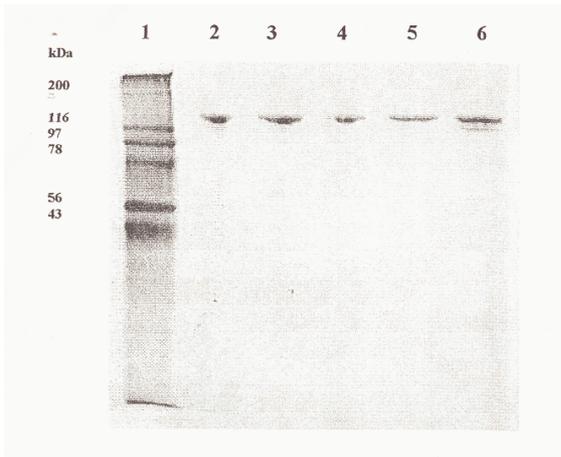
- Einige gute Lösungen (u.a. Lsg 31) scheinen eine Ausnahme zu sein, sind aber keine! Die SDS-Gele und die MALDI-Spektren zeigen von Anfang an Fragmente von 85 und 105 kDa, dies wurde auf eine andere Ursache als der Faktor "Zeit" zurückgeführt.

- Gute Kristalle haben wir erst erhalten, wie bereits vermutet, wenn mit deren Züchtung erst nach ca. 1 Jahr begonnen wurde, d.h. die Lösungen 1 Jahr alt waren. Dann kristallisierte das S-Layer-Protein innerhalb von einigen Wochen. SDS-Gele und die MALDI-Spektren zeigten, daß sich diese Proteinlösungen innerhalb von 1 Jahr in mehrere Fragmente zerlegt hatten, u.a. in ein 105 kDa Fragment (Bild 5).

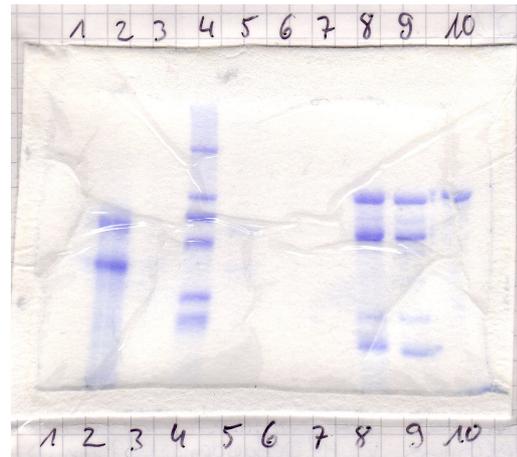
Wir vermuten daher, daß die Kristalle, die wir bisher erfolgreich gezüchtet und untersucht haben und wovon wir mehrere gute Beugungsspektren gemessen haben, das Fragment von 105 kDa ist. Neue Chargen enthalten dieses Fragment allerdings (noch) nicht!

Das Gesamtprotein gezielt in kurzer Zeit in ein 105 kDa-Fragment zu zerlegen, um anschließend neue Kristalle mit Lösungen vom 105 kDa-Fragment zu züchten, war das nächste Ziel.

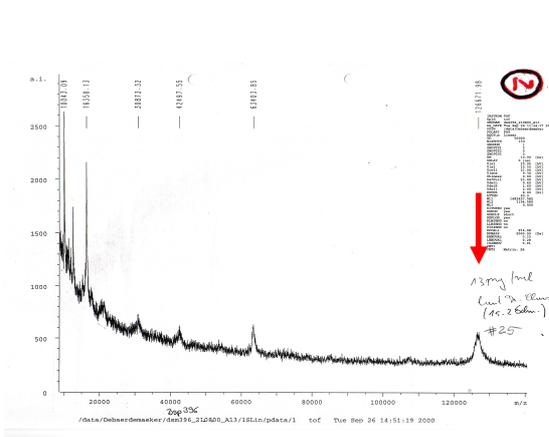
Unseren Kollegen in Mainz war es gelungen, das Gesamtprotein von 127 kDa in Fragmente von ca. 100, 80, 40, 30 und 20 kDa zu zerlegen, allerdings waren die dabei erreichten Konzentrationen noch viel zu gering, um mit neuen Kristallisationsversuchen anzufangen.



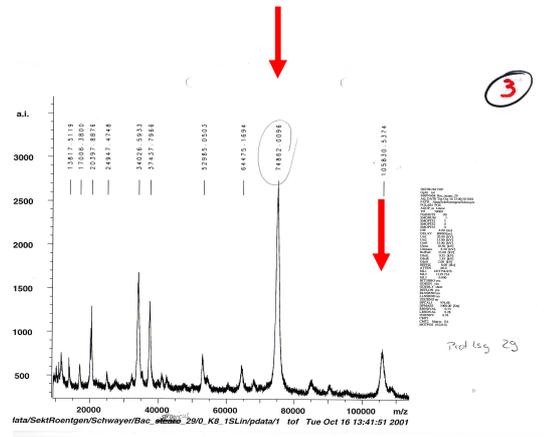
Gel vom August 2000
ursprüngliche Lösungen



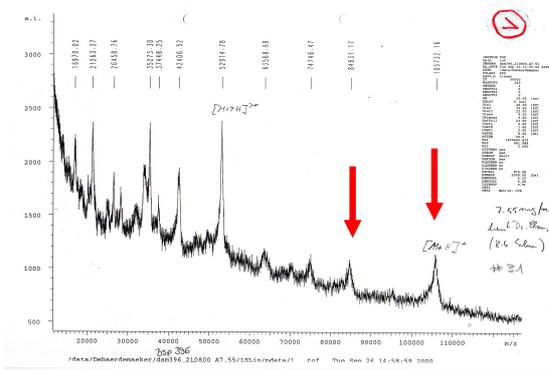
Gel vom Januar 2002
"ältere" Lösungen, die zu Kristallen führen



Maldi 3 : 127 kDa, September 2000, Lsg 25, 26, 27



Maldi 5 : 75 kDa + 105 kDa, Oktober 2001, Lsg 28, 29, 30



Maldi 2 : 85 kDa + 106 kDa September 2000, Lsg 31

Bild 5. Die folgenden Bilder zeigen SDS-Gele und MALDI-Spektren von den ursprünglichen Lösungen und "ältere" Lösungen, aus denen Kristalle erfolgreich gezüchtet werden konnten:

Unserer Gruppe war es gelungen, Fragmente von ca. 100 und 80 kDa zu erhalten (Bild 6) und damit neue, aber noch kleine Kristalle zu züchten (Bild 7), die die gleiche Morphologie wie die alten sehr guten Kristalle besitzen. Diese Kristalle machten deutlich, daß unsere Vermutung, daß nur ein Fragment von ca. 100 kDa der ganzen Sequenz kristallisiert, stimmte.



Bild 6. SDS-Page Gele des S-Layers von *Bacillus sphaericus* vor (links, ca. 120 kDa) und nach (rechts, ca. 100 u. 80 kDa) der Fragmentierung

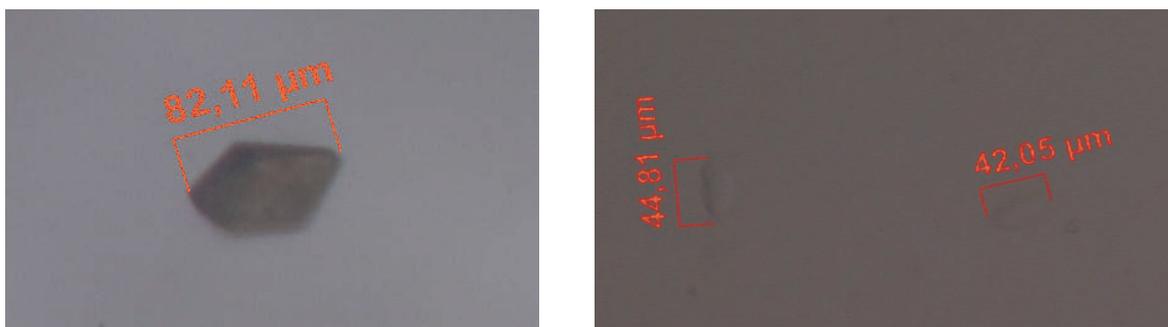


Bild 7. Einige Kristalle des S-Layers von *Bacillus sphaericus* gezüchtet nach der Fragmentierung

Diese Erkenntnis und die gezielte Züchtung von großen und guten Kristallen des kristallisierbaren Fragments hätte in absehbarer Zeit zur Lösung der dreidimensionalen Kristallstruktur führen können.

- Die Kristallisation des S-Layers von *Geobacillus stearothermophilus* (DSM 22, 458, 2358)

Die routinemäßig durchgeführten Kristallisationsversuche der S-Layer des *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 und DSM 2358 haben zu zahlreichen viel versprechenden Kristallisationsbedingungen geführt. Die Optimierung dieser Kristallisationsbedingungen zeigen zwei kristalline Formen (Bild 8) des S-Layers von *Geobacillus stearothermophilus* (DSM 22) nach dem bisher erreichten Stand der Optimierung der Bedingungen.

Die zahlreichen neuen Optimierungsversuche der Kristallisationsbedingungen des S-Layers von *Geobacillus stearothermophilus* DSM 458 haben immer noch nicht dazu geführt, größere und qualitätsmäßig bessere Kristalle zu bekommen.



Bild 8. Bilder von Kristallen des S-Layers von *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 gezüchtet im Labor

- Die Kristallisation des S-Layers von *Methanococcus jannaschii*

Unter den zahlreichen Kristallisationsansätzen des S-Layers von *Methanococcus jannaschii* haben wir mehrere vielversprechende Kristalle züchten können. In Bild 9 sind einige davon dargestellt.

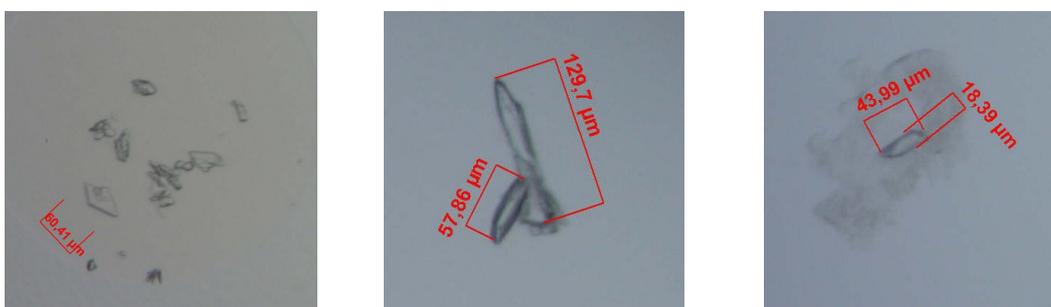


Bild 9: Kristalle des S-Layers von *Methanococcus jannaschii* gezüchtet im Labor

- Die Kristallisation des S-Layers von *Bacillus fusiformis*

Bei den Arbeiten mit der Kristallisation des S-Layers von *Bacillus fusiformis* haben wir einige kleine, aber relativ gute Kristalle im Labor erhalten (Bild 10).



Bild 10: Kristalle des S-Layers von *Bacillus fusiformis* gezüchtet im Labor

- Die Kristallisation des S-Layers von *Sulfolobus acidocaldarius*

Die Kristallisationsversuche des S-Layers von *Sulfolobus acidocaldarius* sind erst angelaufen. Die Züchtung einiger schöner Kristalle ist uns bereits gelungen (Bild 11). Des weiteren arbeiten wir jetzt an der Optimierung der Kristallisationsbedingungen der gezüchteten Kristalle.

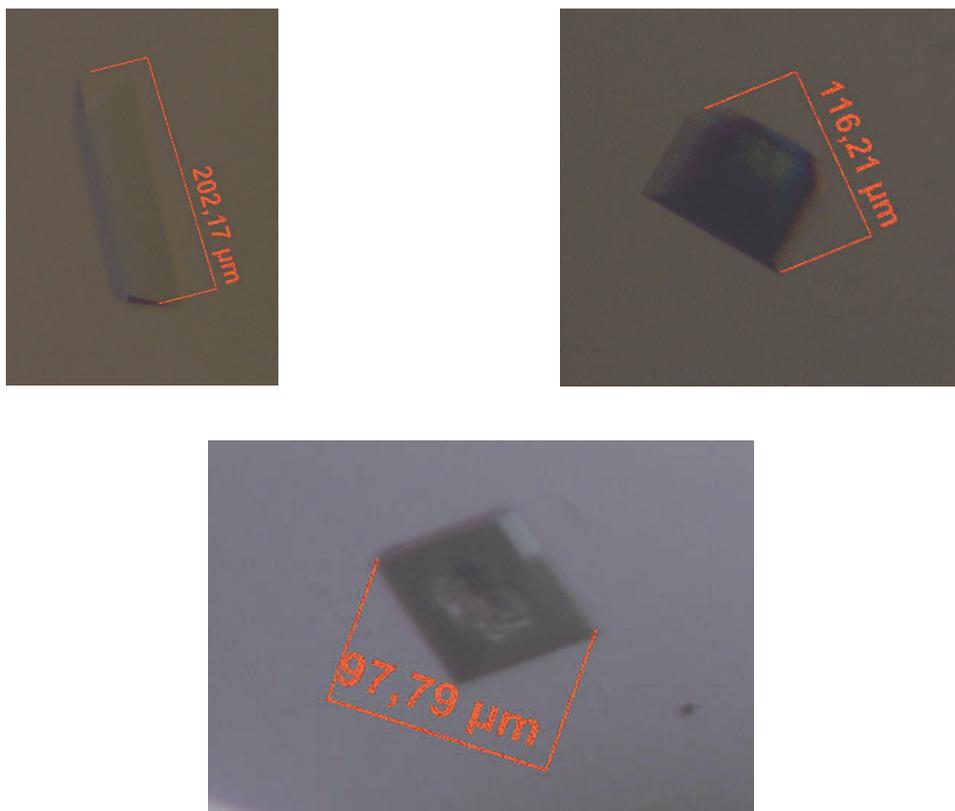


Bild 11 : Bilder von Kristallen des S-Layers von *Sulfolobus acidocaldarius* gezüchtet im Labor

Literatur

1. Akça E., Claus H., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H (2002) Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic and extremely methanococci. *Extremophiles* 6: 351-358
2. Claus H., Akça E., Schultz N., Karbach G., Schlott B., Debaerdemaeker T., Declercq J.-P., König H (2001) Surface (glyco-)proteins: primary structure and crystallization under microgravity conditions. In: Proc First European Workshop on Exo-/Astro Biology, Frascati, 21-23 May 2001, ESA SP-496, August 2001; ISBN No 92-9092-806-9
3. Claus H, Akça E, Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, König H (2002) Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. *System Appl Microbiol* 2: 3-12
4. Claus H., Akça E., Debaerdemaeker T., Evrard C., Declercq JP, Harris R., Schlott B., König H., (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.*(2005) 51:731-743
5. Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, Claus H, Akça E, König H (2002) The first crystallization of the outer surface (S-Layer)glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. Proc. 2nd European Workshop on Exo/Astrobiology, Graz (ESA SP-518, November 2002)
6. Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, Claus H, Akça E, König H (2002) Crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the Hyperthermophilic Archaeon *Methanothermus fervidus*. Abstract Astrobiology Science Conference, NASA Ames Research Centre, Moffett Field, CA
11. Evrard C, Declercq, Debaerdemaeker T, König H (2001) Crystallization under micro gravity conditions of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the hyperthermophilic *Methanothermus fervidus* and preliminary crystallographic information. Abstract 13th Int. Conference on Crystal Growth, Kyoto, Japan
12. Evrard C, Declercq, Debaerdemaeker T, König H (1999) The first successful crystallization of a prokaryotic extremely thermophilic outer surface layer glycoprotein. *Z. Kristallogr* 214: 427-429

13. Garcia-Ruiz JM, Gonzalez-Ramirez LA, Gavira JA, Otalora F (2002) Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques. *Acta Cryst. D* 58, 1638-1642
14. Henisch HK (1988) *Crystals in Gels and Lieselang Rings*, Cambridge University Press
15. Horneck G (2002) Auf den Spuren des Lebens. *Spektrum der Wissenschaft* 3: 6-9
16. Jing H, Takagi J, Liu J, Lindgren S, Zang R, Joachimiak A, Wang J, Springer TA (2002) Archaeal surface layer proteins contain β propeller, PKD and β helix domains and are related to metazoan cell surface protein. *Structure* 10: 1453-1464
17. König H (1986) *Biologie der Archaeobakterien*. *BIUZ* 16: 71-82
18. König H (1988) Archaeobacteria. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology Crystal line Bacterial Cell Surface Layers*. Pp 7-10, Springer Verlag, Berlin
19. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001) *Brock - Mikrobiologie*, Spektrum Verlag, Berlin
20. Pavkov T, Oberer M, Egelseer EM; Sara N, Sleytr UB, Keller W (2003) Crystallization and preliminary structure determination of the C-terminal truncated domain of the S-layer protein SbsC. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 59: 1466-1468.
21. Provost K, Robert MC (1991), Application of gel growth to hanging drop technique, *J. Crystal Growth*, 110, 258
22. Robert MC, Lefauchaux F (1988), Crystal growth in gels: Principles and Applications, *J. Crystal Growth*, 90, 358
23. Stetter KO, König H (1983) *Leben am Siedepunkt*. *Spektrum der Wissenschaften* 10: 26-40
24. Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer RA (2000) Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol* 7: 772-776

2.2. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens

S-Layer Proteine eignen sich für viele Anwendungen u.A. als Ultrafiltrationsmembranen, zur Immobilisierung von Enzymen und Antikörpern, als biometrische Templates, als Vakzine und medizinische Teststäbchen.

Die zahlreiche Kristalle von verschiedenen S-Layern, die wir erfolgreich gezüchtet haben, zeigen, daß der richtige Weg um zu einer vollständigen Kristallstrukturanalyse zu gelangen, in nächste Nähe gerückt ist.

Die Kristallisation und Stabilisierung der Oberflächenproteine von thermophilen, halophilen und acidophilen Archaea könnten zu Anwendungen dieser Proteine unter extremen Bedingungen führen.

Die untersuchten Mikroorganismen sind außerdem gute Beispiele für die Erforschung von außerirdischen Lebensformen und genießen dementsprechend ein sehr großes Interesse, was den Ursprung unserer Welt angeht.

2.3. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Vor einigen Jahren erschien die Veröffentlichung einer Kristallstruktur mit einem Fragment von 52 Aminosäuren eines S-Layers von *Staphylothermus marinus* (Stetefeld et al. 2000), später folgten die Daten von Fragmenten des S-Layers von *Methanosarcina mazei* (Jing et al. 2002) und *Geobacillus stearothermophilus* (Pavkov et al. 2003).

Diese Arbeiten zeigen, daß es anderen Forschungsgruppen auch noch nicht gelungen ist, die Strukturbestimmung eines ganzen Proteins zu bewältigen und zeigt, daß wir auf dem richtigen Weg sind, wie die bereits erhaltenen Kristalle vom S-Layer des *Methanothermus fervidus* und des *Bacillus fervidus* beweisen.

Die große Zahl von Anwendungsmöglichkeiten für S-Layer führt dazu, daß sich die Industrie mit Sicherheit für unsere Ergebnisse interessieren wird, denken wir z.B. nur an Anwendungen auf dem Gebiet der Nanotechnologie, Ultrafiltration, Sensortechnik, Medizin.

2.4. Veröffentlichungen der Ergebnisse

EVARD C, DECLERCQ JP, DEBAERDEMAEKER T, KÖNIG H (1999) *The first successful crystallization of a prokaryotic extremely thermophilic outer surface layer glycoprotein.* Z. Kristallogr. 214: 427-429.

CLAUS H, AKCA E, SCHULTZ N, KARBACH G, SCHLOTT B, DEBAERDEMAEKER T, DECLERCQ JP, KÖNIG H (2001) *Surface (glyco-)proteins: primary structure and crystallization under microgravity conditions.* In: Exo-/Astro-Biology: Proceedings Of The First European Workshop. Ehrenfreund, P., Angerer, O., Battrick, B. (Eds.), Frascati, 21-23 May 2001, p. 313-320, ESA SP-496, August 2001; ISBN No 92-9092-806-9.

AKCA E, CLAUS H, SCHULTZ N, KARBACH G, SCHLOTT B, DEBAERDEMAEKER T, DECLERCQ JP, KÖNIG H (2002) *Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic and extremely thermophilic methanococci.* Extremophiles 6:351-358.

CLAUS H, AKCA E, DEBAERDEMAEKER T, EVARD C, DECLERCQ JP, KÖNIG H (2002) *Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins.* System Appl Microbiol 25: 3-12.

DEBAERDEMAEKER T, EVARD C, DECLERCQ JP, CLAUS H, AKCA E, KÖNIG H (2002) *The first crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium Bacillus sphaericus and the hyperthermophilic archaeon Methanothermus fervidus.* In: Proc. Second European Workshop on Exo/Astro-Biology, Graz, Austria, 16-19 Sept. 2002, p. 441-442, ESA SP-518, November 2002; ISBN No 92-9092-828-X.

CLAUS H, AKCA E, DEBAERDEMAEKER T, EVARD C, DECLERCQ JP, HARRIS R, SCHLOTT B, KÖNIG H (2005) *Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins.* Can J Microbiol 51:731-743.

Auf folgenden Tagungen wurden Forschungsbeiträge aus diesem Projekt präsentiert:

RAMC-99, Recent Advances in Macromolecular Crystallization, 1999, San Diego, USA

Christine Evard, Jean-Paul Declercq, Tony Debaerdemaeker and Helmut König. Crystallization under microgravity conditions of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the hyperthermophile *Methanothermus fervidus* and preliminary crystallographic information

5th European Workshop on Crystallography, 1999, Como, Italy

T. Debaerdemaeker, C. Evard, J.-P. Declercq, T., H. König, Crystallisation under microgravity conditions of the outer surface (S-Layer) glycoprotein of the hyperthermophile *Methanothermus fervidus* and preliminary information.

8th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, 2000, Sandestin, Florida, USA

T. Debaerdemaeker, C. Evard, J.-P. Declercq, T., H. König, Crystallisation under microgravity conditions of the outer surface (S-Layer) glycoprotein of the hyperthermophile *Methanothermus fervidus*.

First European Workshop on Exo/Astrobiology. 2001. Frascati. Italy.

H. Claus, E. Akca, N.Schultz, G. Karbach, B. Schlott, T. Debaerdemaeker, J.-P. Declercq, H. König . Surface (glyco-)proteins: primary structure and crystallization under microgravity conditions.

ICCG-13/ The Thirteenth International Conference on Crystal Growth. 2001. Kyoto, Japan.

C. Evrard, J.-P. Declercq, T. Debaerdemaeker, H. König. Crystallization under microgravity conditions of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the hyperthermophile *Methanothermus fervidus* and preliminary crystallographic information.

Microgravity Transport Processes in Fluid, Thermal, Biological and Material Sciences Conference II. 2001. Banff. Canada.

H. König, H. Claus, E. Akca, C. Evrard, J.-P. Declercq, T. Debaerdemaeker. Primary structure and crystallization of prokaryotic extremely thermophilic outer surface layer glycoproteins.

2nd European Workshop on Exo/Astrobiology. 2002. Graz, Austria

T. Debaerdemaeker, C. Evrard, J.-P. Declercq, H. Claus, E. Akca, H. König. The first crystallization of outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*.

Astrobiology Science Conference. 2002. Ames, U.S.A.

- 1) T. Debaerdemaeker, C. Evrard, J.P. Declercq, H. Claus, E. Akça, H. König. Crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*.
- 2) H. Claus, E. Akça, T. Debaerdemaeker, C. Evrard, J.P. Declercq, H. König. Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins.

FEMS Congress of European Microbiologists. 2003. Ljubljana, Slowenien.

H. König, E. Akca, H. Claus, B. Schlott, T. Debaerdemaeker, J.P. Declercq. Primary structure of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic methanococci.

International Symposium on Physical Science in Space/Spacebound, 2004, Toronto, Kanada

Tony Debaerdemaeker, Christine Evrard, Jean-Paul Declercq, Harald Claus, Erol Akça and Helmut König. Comparison of the crystallization of the outer surface (S-layer) glycoprotein of the mesophilic bacterium *Bacillus sphaericus* and the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus* on earth and in space