

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 *Methanothermus fervidus*.
- 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" Kristallzuchtungshardware (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.

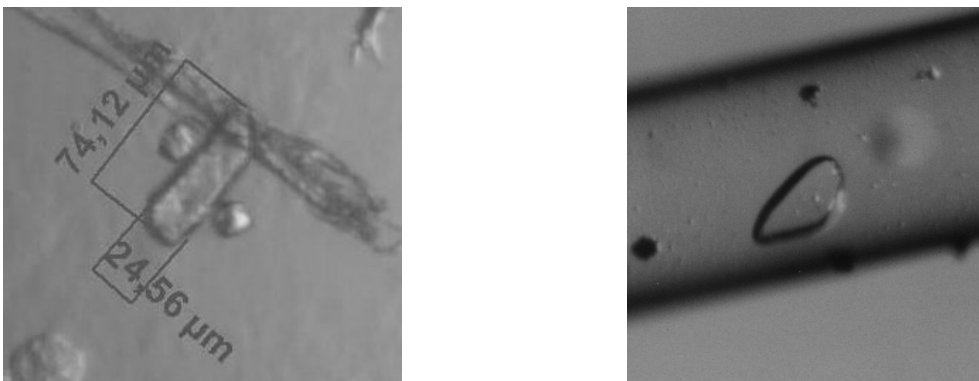


Bild 1: Links Kristall des S-Layer von *Methanothermobacter feravidus* gezüchtet im Labor, rechts im All (30 x 20 x 5 µm, STS-95)