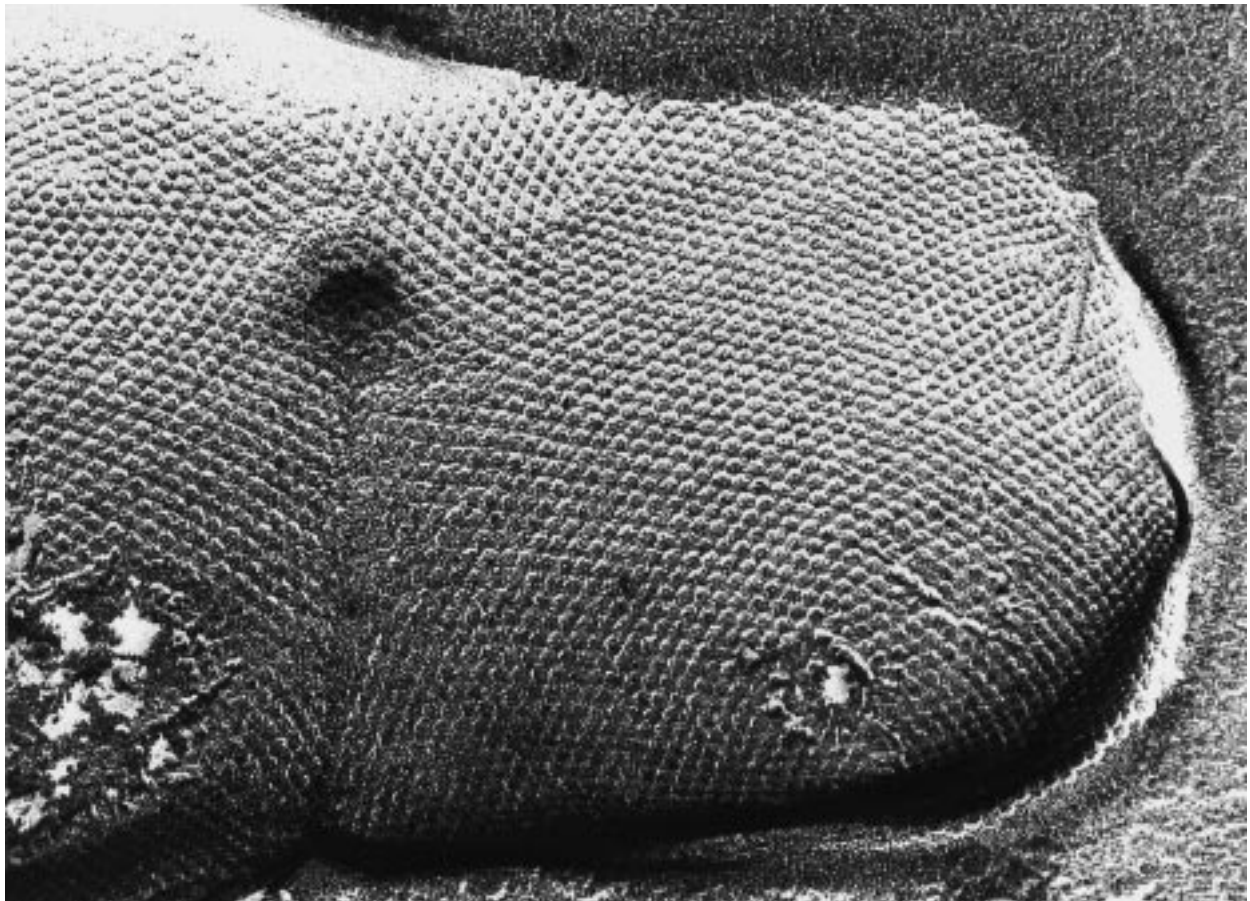


Elektronenmikroskopische Darstellung zweier S-Schicht-Gitter auf der Oberfläche von Bakterienzellen. Oben: *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 (Vergrößerung 241000fach), unten: *Methanocorpusculum sinense* DSM 4274 (Vergrößerung 343000fach)



# Kristalline Zelloberflächen-Schichten prokaryotischer Organismen (S-Schichten): von der supramolekularen Zellstruktur zur Biomimetik und Nanotechnologie

Uwe B. Sleytr,\* Paul Messner, Dietmar Pum und Margit Sára

Kristalline Zelloberflächenschichten (sogenannte S-Schichten; „S“ für surface) zählen zu den häufigsten Oberflächenstrukturen prokaryotischer Organismen (Archaea und Bakterien). S-Schichten sind aus einer einzigen Protein- oder Glycoproteinspezies aufgebaut und können als die einfachsten biologischen Membranen angesehen werden, die sich im Zuge der Evolution entwickelt haben. Auf Grund ihrer hohen Regelmäßigkeit stellen S-Schichten einzigartige Systeme dar, um Struktur, Synthese, Genetik, den

dynamischen Prozeß der Selbstorganisation sowie die Funktion einer supramolekularen Struktur zu erforschen. Isolierte S-Schicht-Untereinheiten von zahlreichen Organismen haben die Fähigkeit zur Selbstorganisation zu monomolekularen kristallinen Gittern in Suspension, auf festen Trägern (z. B. Silicium-Wafern), an der Wasser/Luft-Grenzfläche sowie auf gespreiteten Lipidfilmen und an Liposomen. Die Poren der S-Schichten sind von regelmäßiger Größe und Morphologie, und die funktionellen Gruppen im Protein-

gitter befinden sich an genau definierten Positionen und in definierter Orientierung. Diese einzigartigen Eigenschaften von S-Schichten haben zu einem breiten Anwendungsspektrum in der Biotechnologie, Biomimetik, molekularen Nanotechnologie, Diagnostik, Vakzine-Entwicklung und bei der kontrollierten Biomineralisation geführt.

**Stichwörter:** Biomimetik • Immobilisierung • Membranen • Nanotechnologie • S-Schichten

## 1. Einleitung

Die Einteilung der Lebensformen auf unserem Planeten in die Domänen Bakterien, Archaea und Eukaryonten wird allgemein anerkannt.<sup>[1, 2]</sup> Sowohl Bakterien (früher: Eubakterien) als auch Archaea (früher: Archaeobakterien) zählen zu den Prokaryonten und somit zu den kleinsten einzelligen Lebensformen. Mit Ausnahme der Prokaryonten, die als nackte Protoplasten in hochspezialisierten ökologischen Nischen existieren, haben die meisten Bakterien und Archaea eine supramolekulare Zellwandstruktur außerhalb der Cytoplasmamembran. Die prokaryotische Zellhülle, bestehend aus Cytoplasmamembran und assoziierter Zellwand, reguliert den Austausch von Molekülen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. In den meisten Organismen muß die Zellwand stabil genug sein, um dem Innendruck des Protoplasten

standzuhalten. Sie ist zudem wesentlich an der Bildung einer definierten Zellform beteiligt. Die meisten prokaryotischen Zellen müssen in hochkompetitiven Umgebungen überleben; somit reflektiert die molekulare Architektur der Zellwand, insbesondere der äußersten Grenzschichten, in ihrer Vielfalt zum Teil sehr spezifische Anpassungen an die Umwelt und ökologische Gegebenheiten.<sup>[3]</sup>

Monomolekulare kristalline Schichten aus Proteinen (sogenannte S-Schichten, „S“ für surface) zählen zu den häufigsten Oberflächenstrukturen bei Archaea und Bakterien.<sup>[4, 5]</sup> Morphologische, chemische, genetische und morphogenetische Untersuchungen ergaben, daß S-Schichten die einfachsten biologischen Membranen darstellen, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben.<sup>[6–8]</sup> S-Schichten sind jeweils aus einer einzigen Protein- oder Glycoproteinspezies aufgebaut. Diese S-Schicht-Untereinheiten können an der Zelloberfläche während des Zellwachstums und der Zellteilung durch Selbstorganisation ein geschlossenes, hochporöses Gitter bilden.

Die umfangreichen Informationen über die allgemeinen Prinzipien von S-Schichten führten zu einem breiten Anwendungsspektrum.<sup>[9–11]</sup> Die wichtigsten Eigenschaften, die in der angewandten S-Schicht-Forschung genutzt werden, sind:

[\*] Prof. Dr. U. B. Sleytr, Prof. Dr. P. Messner, Prof. Dr. D. Pum, Prof. Dr. M. Sára  
Zentrum für Ultrastrukturforschung und  
Ludwig-Boltzmann-Institut für Molekulare Nanotechnologie  
Universität für Bodenkultur  
Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien (Österreich)  
Fax: (+ 43) 1-47-89112  
E-mail: sleytr@edv1.boku.ac.at

- 1) Isolierte S-Schicht-Untereinheiten vieler Organismen kristallisieren als geschlossene Monoschichten auf festen Trägern, an der Luft/Wasser-Grenzfläche, auf Langmuir-Lipidfilmen und an Liposomen.
- 2) Die Poren der S-Schichten haben einheitliche Größe und Morphologie und entsprechen in ihrer Größe den Poren von Ultrafiltrationsmembranen.
- 3) Die funktionellen Gruppen an der Oberfläche und in den Poren sind hinsichtlich ihrer Verteilung und Orientierung genau definiert und daher zur präzisen Bindung funktioneller Moleküle geeignet.

Auf Grund ihrer repetitiven physikochemischen Eigenschaften eignen sich S-Schichten somit zur Funktionalisierung von Oberflächen und Grenzflächen bis in den Subnanometer-Bereich. Derzeit werden die supramolekularen Bauprinzipien von S-Schichten vor allem in der Biotechnologie, Biomimetik, Biomedizin und molekularen Nanotechnologie genutzt.

## 2. Vorkommen und Ultrastruktur

Ungeachtet der bemerkenswerten Vielfalt und Komplexität im supramolekularen Aufbau prokaryotischer Zellhüllen lassen sich die meisten Zellwandprofile in drei Hauptgruppen einteilen, die auch die phylogenetische Herkunft des betreffenden Organismus widerspiegeln (Abbildung 1). S-Schichten wurden bisher beinahe in allen taxonomischen Gruppen Zellwand-tragender Bakterien nachgewiesen und scheinen ein nahezu allgemeines Merkmal von Archaea zu sein. Im Unterschied zu den meisten anderen prokaryotischen Zelloberflächenstrukturen können S-Schichten nur mit elektronenmikroskopischen Verfahren, insbesondere durch die Gefrierätztechnik (Gefrierbruchtechnik), eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 2). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß sowohl bei Bakterien als auch bei Archaea die Zelloberfläche während des Zellwachstums

*Uwe B. Sleytr, geboren 1942 in Wien, studierte Lebensmittel- und Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur in Wien, wo er 1968 seinen Dokortitel erhielt. Nach Forschungsaufenthalten am Strangeways Research Laboratory und MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Großbritannien, von 1974 bis 1975 und an der Temple University, Philadelphia, USA, von 1977 bis 1978 wurde er 1982 Professor und Leiter des Zentrums für Ultrastrukturforschung sowie 1986 auch Leiter des Ludwig-Boltzmann-Institutes für Molekulare Nanotechnologie in Wien. Seine Hauptforschungsthemen sind die molekulare Nanotechnologie auf der Grundlage von Selbstorganisationssystemen sowie grundlagen- und anwendungsorientierte Forschung an S-Schichten.*



P. Messner

U. B. Sleytr

M. Sára

D. Pum

*Paul Messner, geboren 1949 in Amstetten, Niederösterreich, studierte an der Technischen Universität Wien und an der Universität für Bodenkultur Wien (Chemie, Lebensmittel- und Biotechnologie). Seine Doktorarbeit (1980) fertigte er im Sandoz-Forschungszentrum in Wien an. 1980 wurde er Assistenzprofessor am Zentrum für Ultrastrukturforschung der Universität für Bodenkultur Wien, 1987 außerordentlicher Professor. 1988–1989 war Messner bei Chembiomed Ltd., Edmonton, Kanada, tätig und 1997 an der University of Guelph, Kanada. Seine Hauptforschungsthemen sind Grundlagenforschung an S-Schichten, prokaryotische Glycoproteine und die Anwendung der S-Schichten für Vakzine.*

*Dietmar Pum, geboren 1957 in Blindenmarkt, Österreich, studierte Physik an der Technischen Universität Wien und erhielt dort 1984 seinen Dokortitel. Nach mehreren Aufenthalten an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, in den Jahren 1982–84 wurde er 1992 Assistenzprofessor am Zentrum für Ultrastrukturforschung der Universität für Bodenkultur in Wien. 1997 wurde er außerordentlicher Professor. Seine Hauptinteressen sind zweidimensionale Proteinkristalle, Transmissionselektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie sowie digitale Bildverarbeitung.*

*Margit Sára, geboren 1957 in Wien, studierte Lebensmittel- und Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien. Nach der Erlangung des Dokortitels 1985 forschte sie auf Gebieten der Mikrobiologie, Biochemie und Biotechnologie, wobei sie sich auf die biotechnologischen Anwendungen der S-Schichten konzentrierte. 1989 wurde sie zur außerordentlichen Professorin für allgemeine Mikrobiologie ernannt. Seitdem ist sie Leiterin der Forschungsgruppe „Molekulare Biotechnologie und Biomimetische Membranen“ am Zentrum für Ultrastrukturforschung.*

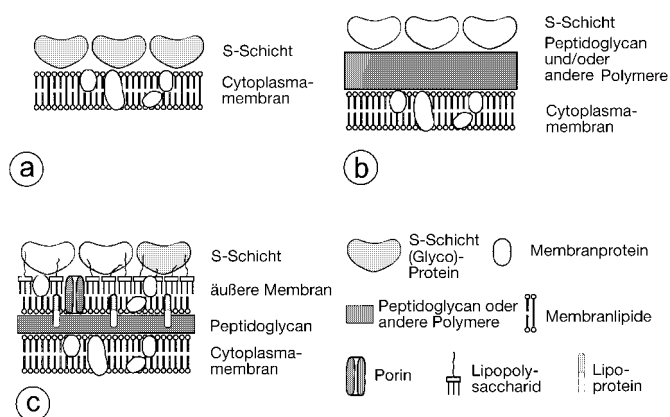


Abbildung 1. Schematische Darstellung der supramolekularen Architektur der drei Hauptgruppen von prokaryotischen Zellhüllen mit kristallinen bakteriellen Zelloberflächenschichten (S-Schichten): a) Zellwandprofil von Gram-negativen Archaea mit der S-Schicht als einziger Zellwandkomponente außerhalb der Cytoplasmamembran. b) Zellhülle von Gram-positiven Archaea und Bakterien. Bei Bakterien besteht die rigide Zellwand hauptsächlich aus Peptidoglycan. In Archaea treten auch andere Zellwandpolymere auf (z.B. Pseudomurein oder Methanochondroitin). c) Zellwandprofil von Gram-negativen Bakterien, bestehend aus einer dünnen Peptidoglycanschicht und der äußeren Membran. Sofern eine S-Schicht vorhanden ist, liegt sie eng assoziiert mit dem Lipopolysaccharid der äußeren Membran vor (modifiziert nach Lit. [13]).

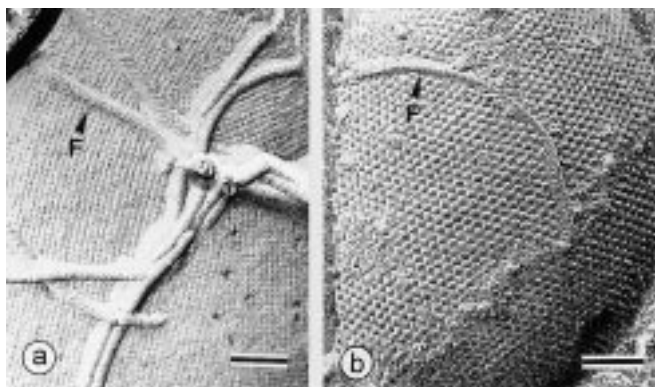


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gefrierätz-Präparation von a) *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10155 mit quadratischem (p4) S-Schicht-Gitter und von b) *Methanomicrobium mobile* DSM 1539, einem Archaeobakterium mit hexagonalem (p6) Gitter. F: Flagellen. Die Länge des Balkens entspricht 100 nm.

und der Zellteilung vollständig mit einem kristallinen S-Schicht-Gitter bedeckt bleibt.<sup>[4, 12–15]</sup>

Die dreidimensionale Struktur der S-Schichten wurde durch Elektronenbeugung und, in letzter Zeit, durch Rasterkraftmikroskopie aufgeklärt. Computer-unterstützte Bildverarbeitungsmethoden ermöglichten es, über die Masseverteilung in S-Schicht-Gittern Informationen bis in Bereiche von 0.5 bis 1.5 nm zu erhalten.<sup>[14, 16–19]</sup> S-Schichten sind monomolekulare Anordnungen aus identischen Protein- oder Glycoproteinspezies. Sie können schräge (p1, p2), quadratische (p4) oder hexagonale Symmetrien (p3, p6) aufweisen, mit Zentrum-zu-Zentrum-Abständen zwischen den morphologischen Einheiten von ca. 2.5–35 nm (Abbildung 3). Bei S-Schichten von Archaea tritt vorwiegend eine hexagonale Gittersymme-

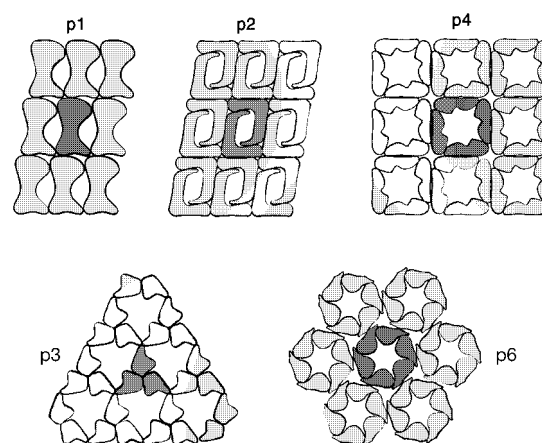


Abbildung 3. Schematische Darstellung der verschiedenen S-Schicht-Typen. Die regelmäßigen Gitter weisen entweder schräge (p1, p2), quadratische (p4) oder hexagonale Symmetrie (p3, p6) auf. Die morphologischen Einheiten werden aus ein, zwei, drei, vier oder sechs identischen Untereinheiten gebildet.

trie auf.<sup>[20]</sup> S-Schichten von Bakterien sind generell 5 bis 20 nm dick, wobei die innere Oberfläche stärker strukturiert ist als die Außenseite. Bei S-Schichten von Archaea wurden an der inneren Oberfläche säulenartige Fortsätze beobachtet, die mit der Plasmamembran verbunden sind oder in diese eindringen können.<sup>[17, 21–23]</sup> Auf diese Weise kann die Hauptmasse der S-Schicht-Gitter bis zu 70 nm von der Oberfläche der Cytoplasmamembran entfernt sein.

Hochauflösende elektronenmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß S-Schichten hochporöse Membranen sind, wobei die Porosität bis zu 70 % der Fläche ausmachen kann (Abbildung 4). Da S-Schichten durch Selbstorganisation identischer Untereinheiten entstehen, weisen sie auch Poren von einheitlicher Größe und Morphologie auf. In vielen S-Schicht-Gittern wurden zwei oder mehrere Porenklassen in der Größenordnung von ungefähr 2–8 nm nachgewiesen.<sup>[13–15, 18, 22]</sup>

### 3. Selbstorganisation und Morphogenese

S-Schichten sind faszinierende Modellsysteme zur Untersuchung des dynamischen Selbstorganisationsprozesses einer supramolekularen Struktur während des Zellwachstums und der Zellteilung. Eine geschlossene S-Schicht auf der Oberfläche einer stäbchenförmigen prokaryotischen Zelle (durchschnittliche Größe  $1 \times 3 \mu\text{m}$ ) besteht aus ungefähr  $5 \times 10^5$  Untereinheiten. Folglich müssen zur Erhaltung einer intakten S-Schicht auf einer Zelle, die sich mit einer Generationsdauer von 20 bis 30 min vermehrt, ca. 500 Kopien einer einzigen Polypeptidspezies pro Sekunde synthetisiert, an die Zelloberfläche transportiert und in das vorhandene Gitter eingebaut werden. Zur Aufklärung des dynamischen Selbstorganisationsprozesses von S-Schichten im Zuge des Zellwachstums wurden elektronenmikroskopische In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen durchgeführt.

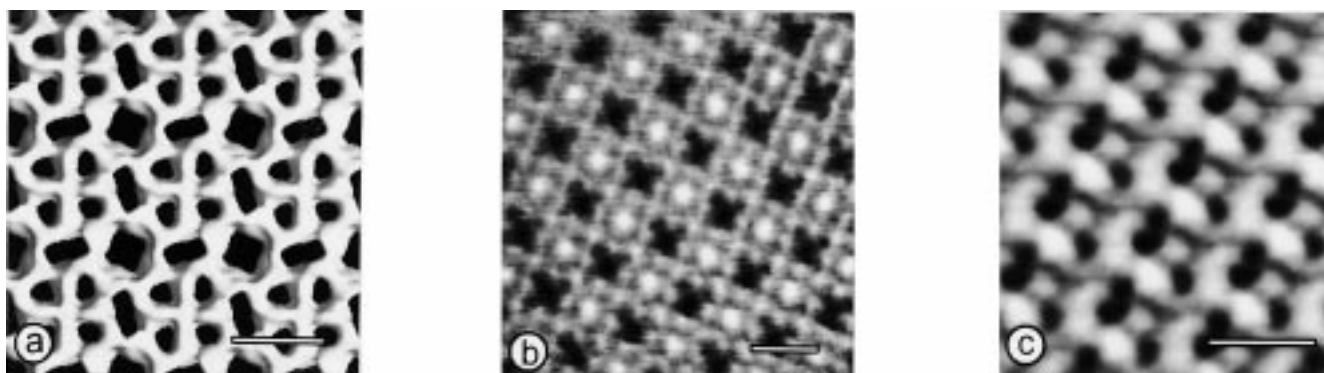


Abbildung 4. a) Dreidimensionales Modell der Proteinmasseverteilung der S-Schicht von *Bacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a/V2 (Außenseite). Die S-Schicht ist ungefähr 8 nm dick und weist einen Zentrum-zu-Zentrum-Abstand zwischen den morphologischen Einheiten von 13,5 nm auf. Das Proteinnetzwerk enthält pro morphologischer Einheit eine quadratische, zwei längliche und vier kleine Poren. Das Modell wurde auf der Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen negativ kontrastierter Präparate in verschiedenen Winkeln erstellt. Die Computer-Bildrekonstruktionen erfolgte durch Fourier-Transformation jeder einzelnen Ansicht und Kombination aller Ansichten zu einem drei-dimensionalen Datensatz. b, c) Computer-Bildrekonstruktion der rasterkraftmikroskopischen Bilder der Topographie der Innenseite des S-Schicht-Gitters von *B. sphaericus* CCM 2177 (b) und *Bacillus coagulans* E38-66/V1 (c). Die Aufnahmen wurden in einer Flüssigkeitszelle gemacht. Die Oberflächenrauheit beträgt, entsprechend einer Grauwertskala von Schwarz nach Weiß, 1,8 nm. Der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand der morphologischen Einheiten im quadratischen Gitter (b) beträgt 14,5 nm. Das S-Schicht-Gitter in (c) weist eine schräge Elementarzelle auf ( $a = 9,4$  nm,  $b = 7,5$  nm, Basiswinkel =  $80^\circ$ ). Die Länge der Balken entspricht 10 nm.

### 3.1. Selbstorganisation in vitro

Zur Isolierung von S-Schichten und ihrer Desintegration in protomere Untereinheiten wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Generell ist eine vollständige Desintegration von S-Schichten in konzentrierten Lösungen chaotroper Agentien (z. B. Guanidinhydrochlorid, Harnstoff) sowie durch Senkung oder Erhöhung des pH-Wertes erzielbar. Insbesondere S-Schichten von Gram-negativen Bakterien lassen sich auch mit Metallchelatlösungsmitteln (z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)) oder durch Kationensubstitution desintegrieren.<sup>[4, 12–14, 24–28]</sup> Diesen Untersuchungen zufolge sind die S-Schicht-Untereinheiten sowohl im Gitter als auch mit der darunter liegenden Zellwandkomponente über nichtkovalente Bindungen (hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen über zweiwertige Kationen oder auch direkte Wechselwirkungen polarer Gruppen) verbunden. S-Schicht-Extraktionsversuche haben zudem ergeben, daß die Bindungen, die die Untereinheiten im Gitter zusammenhalten, stärker sind als jene, die an der Bindung der S-Schichten an die darunter liegende Schicht verantwortlich sind.

Da sich die S-Schichten einiger Archaea als äußerst resistent gegenüber verschiedenen Extraktions- und Desintegrationsversuchen herausstellten, wurde angenommen, daß sogar kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Untereinheiten vorliegen können.<sup>[14, 29a]</sup> Die isolierten S-Schicht-Untereinheiten zahlreicher prokaryotischer Organismen rekristallisieren bei Entfernung des zu ihrer Isolierung verwendeten desintegrierenden Agens (z. B. durch Dialyse) in Form von regelmäßigen Gittern, die in ihrer Struktur den S-Schichten auf den intakten Zellen entsprechen.<sup>[29b]</sup> Im Zuge dieser Selbstorganisation der S-Schicht-Untereinheiten entstehen planare, zylindrische oder sphärische Strukturen (Abbildung 5).<sup>[12, 15, 27, 30]</sup> Ionenstärke, Temperatur, Proteinkonzen-

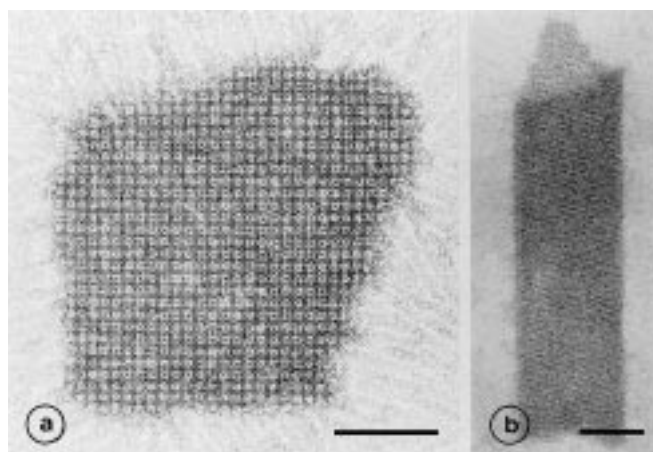


Abbildung 5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ kontrastierter Präparate von S-Schicht-Selbstorganisationsprodukten von a) *Desulfotomaculum nigrificans* NCIB 8706 mit quadratischem Gitter und b) Zylinderförmiges Rekristallisationsprodukt des S-Schicht-Proteins von *Bacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a mit schrägem Gitter. Die Länge der Balken entspricht 100 nm.

tration sowie mit der S-Schicht assoziiert vorliegende Polymere können sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Assoziation bestimmen. An S-Schichten von Bacillaceae wurde gezeigt, daß die Assoziation in mehreren Phasen verläuft, wobei in einer raschen Anfangsphase zunächst oligomere Vorstufen gebildet werden, die in der Folge in einem langsamen Assoziationsschritt großflächigere Gitter bilden.<sup>[31]</sup> Die Fähigkeit einiger S-Schicht-Proteine, auf festen Trägern, an der Luft/Wasser-Grenzfläche und an Langmuir-Lipidfilmen in Form von großflächigen, monomolekularen Anordnungen zu kristallisieren (Abbildung 6), hat bereits zu zahlreichen Anwendungen geführt (siehe Abschnitt 7).



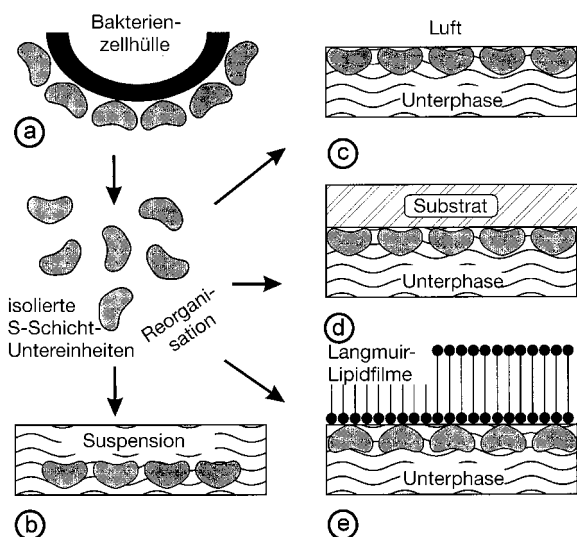


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Rekristallisation isolierter S-Schicht-Untereinheiten (a). Der Selbstorganisationsprozeß kann in Suspension (b), an der Luft/Wasser-Grenzfläche (c), auf festen Trägern (d) und an Langmuir-Lipidfilmen (e) stattfinden.

### 3.2. Selbstorganisation in vivo

Rekristallisationsversuche mit verschiedenen S-Schichten haben ergeben, daß die spezifischen Oberflächeneigenschaften der Untereinheiten (Ladungsverteilung, Hydrophobie, spezifische Wechselwirkungen mit Komponenten assoziierter Polymere der Zellhülle) dazu führen, daß während des Gitterwachstums der lokale Einbau von Untereinheiten in definierter Orientierung erfolgt. Mit In-vivo-Markierungsversuchen (z. B. mit kolloidal verteiltem Gold oder Fluoreszenzmarkern) konnten an intakten Zellen während des Gitterwachstums die Inkorporationsstellen der Untereinheiten nachgewiesen werden. Bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien konnte gezeigt werden, daß der Einbau von S-Schicht-Untereinheiten in bestehende Gitter an den Zonen erfolgt, an denen sich die Wachstumszonen der Trägerschicht befinden (Abbildung 1). Das S-Schicht-Gitterwachstum kann sowohl an definierten Domänen<sup>[32, 33]</sup> als auch an statistisch verteilten Stellen stattfinden.<sup>[34, 35]</sup>

Mit hochauflösenden Gefrierätz-Präparationen konnten in den S-Schichten intakter Zellen Dislokationen und Disklinationen dargestellt werden (Abbildung 7). Rein topologisch betrachtet, sind derartige Gitterfehler sowohl für die Bedekung der halbkugelförmigen Zellpole bei stäbchenförmigen Zellen als auch auf der gesamten Oberfläche kokkoider Zellen erforderlich. Wie von Harris und Mitarbeitern bereits theoretisch vorhergesagt,<sup>[36–38]</sup> sind Dislokationen und Disklinationen bevorzugte Stellen für den Einbau neuer Untereinheiten in bestehende Kristallgitter. Ferner müssen aus rein geometrischen Erfordernissen in sich geschlossene zweidimensionale Kristalle lokale Schraubenversetzungen enthalten, welche ihrerseits wieder Ausgangspunkte für Kantendisklinationen darstellen können.<sup>[38]</sup>

Die Analyse der Verteilung von Gitterfehlern in den hexagonalen S-Schichten von Archaea, deren Zellwand

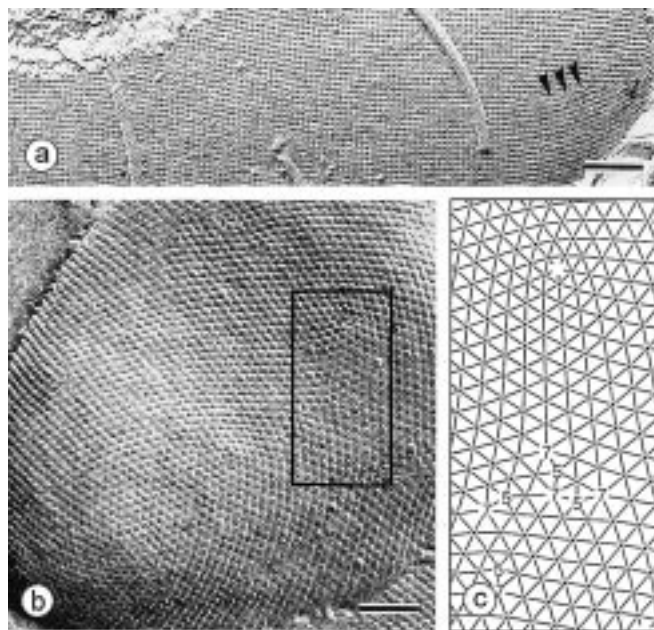


Abbildung 7. Gefrierätz-Präparation intakter Bakterienzellen mit charakteristischen Gitterfehlern von S-Schichten. a) Die Pfeile weisen auf Disklinationen im quadratischen Gitter an der abgerundeten Oberfläche des Zellpols von *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10155. b) Kantendisklinationen und Kantendislokationen sind als Punktdisklinationen im kristallinen Gitter von *Methanococcus sinense* DSM 4274 sichtbar. c) Darstellung der angrenzenden S-Schicht-Untereinheiten aus dem eingerahmten Bereich im Bildteil (b). Die zentralen Elementarzellen der +60°- und -60°-Winkeldisklinationen sind Fünfecke (bezeichnet als 5) bzw. Siebenecke (bezeichnet als 7). Darstellung modifiziert nach Lit. [39]. Die Länge der Balken entspricht 100 nm.

ausschließlich aus einer S-Schicht besteht (Abbildung 1 a), lieferte starke Argumente dafür, daß komplementäre Paare von Fünf- und Siebenecken eine wichtige Rolle beim Einbau von neuen S-Schicht-Untereinheiten bei der Entstehung und bei der Erhaltung einer vielfach beobachteten gelappten Zellstruktur sowie bei der Zellteilung spielen.<sup>[27, 39]</sup> Es ist zudem anzunehmen, daß sich der Fortschritt einer Zellteilung aus dem Verhältnis zwischen der Zunahme des Protoplastenvolumens und der Zunahme der S-Schicht-Oberfläche während des Zellwachstums ergibt. Bei stäbchenförmigen Archaea, bei denen die S-Schicht die einzige Zellwandkomponente ist, konnten an beiden halbkugelförmigen Polen entsprechend der theoretischen Mindestzahl sechs Kantendisklinationen nachgewiesen werden. Die Verlängerung des zylindrischen Teils der Zellen erfolgt demnach wahrscheinlich an den Zellpolen durch den Einbau von S-Schicht-Untereinheiten in Form gleitender Dislokationen.<sup>[40, 41]</sup>

S-Schichten können somit als „geschlossene, dynamische zweidimensionale Oberflächenkristalle“ angesehen werden. Sie können außerdem während des Zellwachstums kontinuierlich einen Zustand mit minimaler Gibbs-Energie einnehmen. Das morphogenetische Potential von S-Schicht-Gittern wird zudem ausschließlich durch die molekulare Struktur der Untereinheiten bestimmt.<sup>[4, 12, 14, 27, 42]</sup>

## 4. Chemischer Aufbau und Biosynthese

Unabhängig von der phylogenetischen Stellung der Organismen hat die chemische Charakterisierung reiner S-Schichten von Bakterien und von Archaea große Ähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung ergeben. Zu diesem Thema sind umfangreiche Übersichtsartikel erschienen.<sup>[26, 43–53]</sup> Darüber hinaus wurden S-Schichten nichtpathogener<sup>[45–48]</sup> sowie pathogener<sup>[49–51]</sup> Bakterien und Archaea<sup>[52, 53]</sup> biochemisch charakterisiert. Typische S-Schicht-Proteine bestehen zu 40 bis 60% aus hydrophoben Aminosäuren. Sie weisen hingegen, sofern überhaupt vorhanden, nur einen sehr geringen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren auf. Circular dichroismus-Messungen und Proteinsequenzierungen ermöglichten Aussagen über ihre Sekundärstrukturen (Tabelle 1). S-Schichten sind im allgemeinen schwach saure Proteine oder Glycoproteine mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich zwischen 4 und 6.<sup>[5, 7, 26, 43, 44, 54, 55]</sup> Ausnahmen sind die S-Schicht-Proteine von *Methanothermobacter fervidus* (pI-Wert = 8.4)<sup>[56]</sup> und verschiedener *Lactobacillen* (pI ≈ 9–10).<sup>[57]</sup>

Bei Bakterien sind mehrere allgemeine Mechanismen für die Sekretion von Proteinen bekannt. Für das Ausschleusen von S-Schicht-Proteinen wurde erstmals bei *Aeromonas salmonicida* ein spezifischer Sekretionsweg beschrieben.<sup>[58]</sup> Zusätzlich kommen posttranslationale Modifikationen von S-Schicht-Proteinen wie Phosphorylierung und Glycosylierung vor (Tabelle 1). Die chemische Modifikation im S-Schicht-Protein von *Aeromonas hydrophila* (als A-Schicht bezeichnet) wurde durch den Vergleich der in der SDS-PAGE ermittelten Molekülmasse und der DNA-Sequenz erkannt (SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Das modifizierte S-Schicht-Protomer wies eine um 7000 Da höhere Molekülmasse als das nicht modifizierte Protomer auf (45 000 Da). In einer Western-Blot-Analyse wurden mit einem monoklonalen Antikörper Phosphotyrosinreste festgestellt.<sup>[59]</sup>

Eine häufig beobachtete Modifikation von S-Schicht-Proteinen ist die Glycosylierung. Die S-Schicht-Proteine einer Vielzahl halophiler, methanogener, thermophil acidophiler und alkalophiler Archaea enthalten kovalent gebundene Glycanketten.<sup>[43, 60, 61]</sup> Erst in den letzten Jahren wurden der

extrem thermostabile S-Schicht-Glycoprotein-Komplex von *Staphylothermus marinus*<sup>[62]</sup> sowie das S-Schicht-Glycoprotein von *Haloarcula japonica*<sup>[63]</sup> näher charakterisiert. Anders als bei Archaea wurden bei Bakterien glycosylierte S-Schichten bisher nur in der Familie der Bacillaceae eindeutig nachgewiesen.<sup>[43, 64, 65]</sup>

Die Reinigung glycosylierter und nicht glycosylierter S-Schichten wird auf gleiche Weise durchgeführt und ist in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst worden.<sup>[26, 43, 66, 67]</sup> Zur Untersuchung der Kohlenhydratstrukturen von glycosylierten S-Schichten ist der vollständige Abbau des S-Schicht-Glycoproteins zu Glycopeptiden durch proteolytische Enzyme erforderlich. Anschließend erfolgt die Strukturermittlung der S-Schicht-Glycane durch die Kombination von chemischen Abbaureaktionen der Glycanketten, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.<sup>[43, 68]</sup> In Tabelle 2 sind die Glycanstrukturen ausgewählter Bakterien und Archaea zusammengefasst. An den bisher bekannten Strukturen läßt sich folgendes Bauprinzip erkennen: Der Großteil der S-Schicht-Glycanketten von Bakterien ist aus 20 bis 50 identischen Wiederholungseinheiten aufgebaut, bestehend aus neutralen Hexosen, seltener Pentosen, 6-Desoxyhexosen und Aminosackern. Bezüglich ihrer Struktur sind sie den Wiederholungseinheiten der O-Antigene von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien ähnlich (Abbildung 8).<sup>[66]</sup>

Zwischen der O-Antigen-ähnlichen Glycankette und dem S-Schicht-Polypeptid befindet sich in der Regel ein aus zwei bis vier Zuckern bestehendes Core-Oligosaccharid, das die beiden Teile des Makromoleküls miteinander verbindet. Pro S-Schicht-Protein-Monomer wurden zwischen zwei und sechs Glycosylierungsstellen ermittelt,<sup>[68, 73a, 77]</sup> wobei die S-Schicht-Glycane vorwiegend O-glycosidisch über Bindungen wie  $\beta$ -D-Galactose  $\rightarrow$  Tyrosin<sup>[68]</sup> und  $\beta$ -D-Glucose  $\rightarrow$  Tyrosin<sup>[73a, 77]</sup> gebunden sind. Anders als bei eukaryotischen Glycoproteinen liegt in den N-Acetyl-D-Galactosamin  $\rightarrow$  Threonin/Serin-Bindungen der GalNAc-Rest als bisher nicht bekanntes  $\beta$ -Anomer vor. Die Überprüfung einer S-Schicht-Glycoprotein-Präparation von *Bacillus staerothermophilus* NRS 2004/3a<sup>[88a]</sup> hat ergeben, daß in der S-Schicht nur ein einziger Glycantyp mit variabler Kettenlänge auftritt. Ein weiteres Oligosaccharid, das aus der S-Schicht-Glycoprotein-Präpara-

Tabelle 1. Eigenschaften von S-Schichten.<sup>[5, 7, 14, 26, 43, 44, 54, 55]</sup>

S-Schicht-Gitter weisen schräge (p1, p2), quadratische (p4) oder hexagonale Symmetrie (p3, p6) auf
Die Zentrum-zu-Zentrum Abstände der morphologischen Einheiten betragen zwischen 3 und 35 nm
Die Gitter sind generell 5 bis 20 nm dick (in Archaea bis ca. 70 nm)
Die äußere Oberfläche ist vielfach weniger rau als die innere Oberfläche
S-Schicht-Gitter weisen Poren von identischer Größe und Morphologie auf
In vielen S-Schichten gibt es zwei oder auch mehrere Klassen von Poren
Die Porengrößen variieren zwischen 2 und 8 nm
Die Poren können 30 bis 70% der Oberfläche ausmachen
Die relative Molekülmasse der Untereinheiten beträgt zwischen 40 000 und 200 000
Es handelt sich um schwach saure Proteine (pI ≈ 4–6), außer bei <i>Methanothermobacter fervidus</i> (pI = 8.4) und <i>Lactobacilli</i> (pI > 9.5)
Hoher Gehalt an Glutamin- und Asparaginsäure (ca. 15 Mol-%)
Hoher Gehalt an Lysin (ca. 10 Mol-%)
Hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren (ca. 40–60 Mol-%)
Hydrophile und hydrophobe Aminosäuren bilden keine ausgedehnten Cluster
In den meisten S-Schicht-Proteinen sind etwa 20% der Aminosäuren als $\alpha$ -Helix organisiert, etwa 40% treten in $\beta$ -Faltblattstruktur auf
Aperiodische Faltungen und der Gehalt an $\beta$ -Turns variieren zwischen 5 und 45%
Zu posttranslationalen Modifikationen von S-Schicht-Proteinen zählen die Abspaltung von N- und C-terminalen Fragmenten, die Glycosylierung und die Phosphorylierung von Aminosäuren

tion isoliert werden konnte, ist nichtkovalent mit dem S-Schicht-Polypeptid verknüpft<sup>[87]</sup> und repräsentiert demnach ein assoziiertes sekundäres Zellwandpolymer, wie es auch in anderen *Bacillus*-Stämmen gefunden wurde.<sup>[88b]</sup>

Die archaebakteriellen S-Schicht-Glycoproteine, deren Glycanstrukturen und Bindungsregionen untersucht wurden (Tabelle 2), bestehen fast ausschließlich aus kurzen Heterosacchariden mit bis zu zehn Zuckerresten und sind nicht aus Wiederholungseinheiten aufgebaut.<sup>[43, 61, 85]</sup> Bei Halobakterien können bis zu drei verschiedene Glycanspezies mit bis

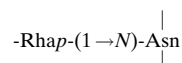
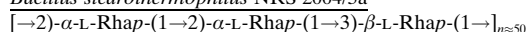
zu 25 Glycosylierungsstellen pro S-Schicht-Monomer vorkommen.<sup>[61, 84]</sup> Dabei überwiegen N-glycosidische Bindungstypen wie Glucose → Asparagin<sup>[61]</sup> oder *N*-Acetyl-Galactosamin → Asparagin,<sup>[61, 85]</sup> andererseits treten auch kurze O-Glycane in Clustern auf.

Die bemerkenswerte Vielfalt an Glycanstrukturen bei Bakterien und Archaea hat interessante Fragen bezüglich der Biosynthese prokaryotischer Glycoproteine aufgeworfen. Ein von Sumper und Wieland vorgestelltes Modell für die Synthese der verschiedenen N-Glycane von *Halobacterium*

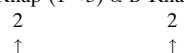
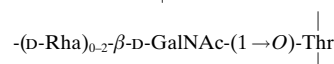
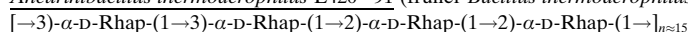
Tabelle 2. Glycanstrukturen ausgewählter bakterieller und archaebakterieller S-Schicht-Glycoproteine.<sup>[a][43, 61]</sup>

#### Bakterien

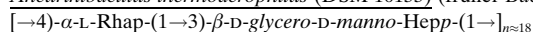
*Bacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a<sup>[69, 70]</sup>



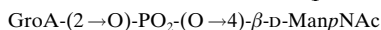
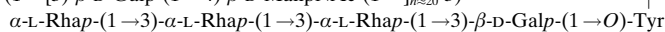
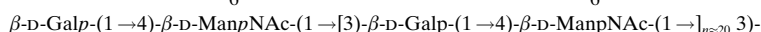
*Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91 (früher *Bacillus thermoaerophilus*)<sup>[71]</sup>



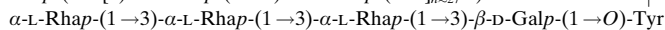
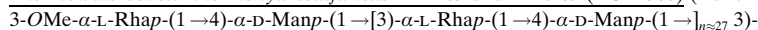
*Aneurinibacillus thermoaerophilus* (DSM 10155) (früher *Bacillus thermoaerophilus*)<sup>[72, 73]</sup>



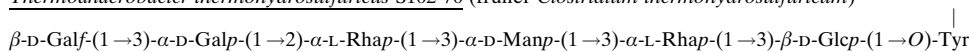
*Paenibacillus alvei* (CCM 2051)<sup>[74, 75]</sup>



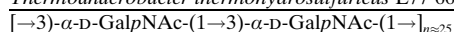
*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 und L110-69 (DSM 568) (früher *Clostridium thermohydrosulfuricus*)<sup>[68, 76]</sup>



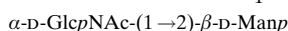
*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* S102-70 (früher *Clostridium thermohydrosulfuricus*)<sup>[77, 78]</sup>



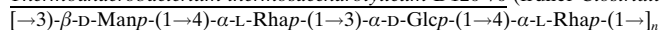
*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L77-66 (DSM 569) und L92-71 (früher *Clostridium thermohydrosulfuricus*)<sup>[79]</sup>



O-glycosidische Bindung über Tyr?



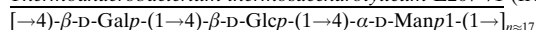
*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* D120-70 (früher *Clostridium thermosaccharolyticum*)<sup>[80]</sup>



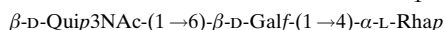
O-glycosidische Bindung über Tyr



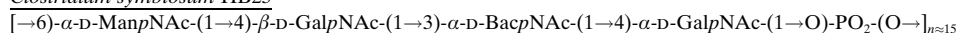
*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* E207-71 (früher *Clostridium thermosaccharolyticum*)<sup>[81]</sup>



O-glycosidische Bindung über Tyr



*Clostridium symbiosum* HB25<sup>[82]</sup>



*Lactobacillus buchneri* 41021/251<sup>[83]</sup>

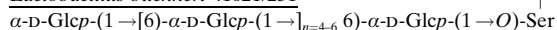
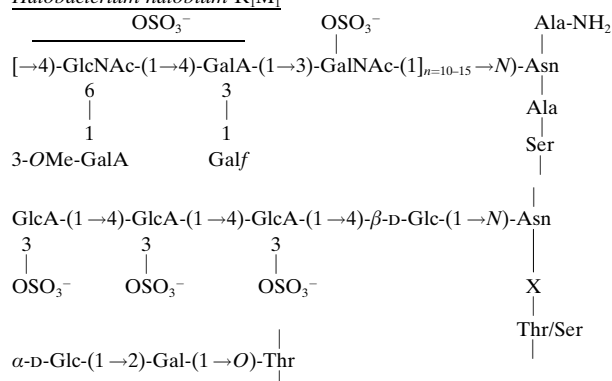




Tabelle 2. (Fortsetzung)

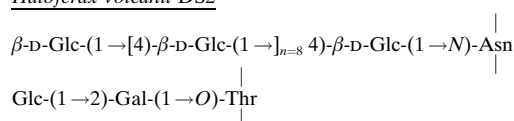
Archaea

*Halobacterium halobium* R<sub>1</sub>M<sub>1</sub><sup>[61]</sup>

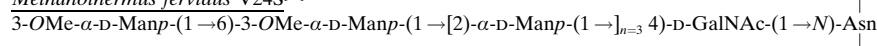


1/3 von GlcA kann durch IdA ersetzt werden

*Haloferax volcanii* DS2<sup>[61, 84]</sup>



*Methanothermus fervidus* V24S<sup>[85]</sup>



[a] Die Formeln entsprechen entweder der Struktur einer Wiederholungseinheit oder der Gesamtstruktur der S-Schicht-Glycoproteinglycane. Zusätzlich wird, soweit bisher bestimmt, die Struktur der Kohlenhydrat-Protein-Bindungsregion angegeben. –Abkürzungen: Glcp: Glucose (Pyranoseform), Galf: Galactose (Furanoseform), Man: Mannose, Rha: Rhamnose, GlcNAc: N-Acetylglucosamin, GalNAc: N-Acetylgalactosamin, ManNAc: N-Acetylmannosamin, GlcA: Glucuronsäure, GalA: Galacturonsäure, ManA: Mannuronsäure, IdA: Iduronsäure, 3-O-Me-GalA: 3-O-Methylgalacturonsäure, BacNAc: N-Acetylbaucillosamin (2-N-Acetyl-4-amino-2,4,6-tridesoxyglucose), Fuc3NAc: 3-N-Acetyl-fucosamin, Qui3NAc: 3-N-Acetylquinovosamin (3-Acetamido-3,6-didesoxyglucose), BacNAc: N-Acetylbaucillosamin (2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxyglucose), GroA: Phosphoglycerinsäure, Asn: Asparagin, Tyr: Tyrosin, Thr: Threonin, Ser: Serin, Ala: Alanin, X: austauschbare Aminosäure.

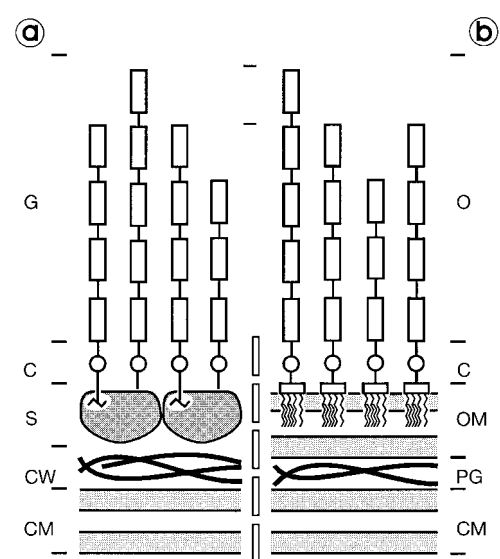


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Zellwandprofile von Gram-positiven (a) und Gram-negativen (b) Bakterien zur Verdeutlichung von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen S-Schicht-Glycoproteinen und Lipopolysacchariden. Abkürzungen: C: Core-Region, CM: Cytoplasmamembran, OM: äußere Membran, PG: Peptidoglycan (übernommen aus Lit. [43] mit freundlicher Genehmigung von Landes/Academic Press).

*halobium* beinhaltet den Transfer von Dolichol-gebundenen Sacchariden an entsprechende N-Glycosylierungssequenzen am S-Schicht-Polypeptid.<sup>[61]</sup> Bei der S-Schicht-Glycosylierung

von *Haloferax volcanii*<sup>[89]</sup> und *Methanothermus fervidus*<sup>[90]</sup> wurde das Auftreten ähnlicher, lipidaktivierter Oligosaccharide beobachtet, deren Lipidteile überwiegend aus kurzkettigen (C<sub>55</sub>–C<sub>60</sub>) Dolicholspezies mit elf bis zwölf Isopreneinheiten bestehen. Im Vergleich zur Biosynthese von S-Schicht-Glycoproteinen bei Archaea ist über die Biosynthese glycosylierter S-Schichten bei Bakterien weniger bekannt. Während an der Glycanbiosynthese von *Paenibacillus* (früher *Bacillus*) *alvei* ähnliche Dolichol(C<sub>55</sub>)-Lipidcarrier wie bei den Archaea beteiligt sind,<sup>[91]</sup> wurden bei *Thermoanaerobacterium* (früher *Clostridium*) *thermosaccharolyticum* bisher nur nucleotidaktivierte Zucker beschrieben.<sup>[92]</sup> Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß in allen untersuchten Systemen neben nucleotidaktivierten Monosacchariden auch nucleotidaktivierte Oligosaccharide eine wichtige Rolle bei der Synthese von Glycanstrukturen spielen.<sup>[90–92]</sup> Derartige aktivierte Stoffwechselzwischenprodukte sind bei eukaryotischen Glycoproteinen nicht bekannt. Die biologische Relevanz dieses charakteristischen Unterschiedes wird gegenwärtig untersucht.

Die Aufklärung der Biosynthesewege prokaryotischer Glycoproteinglycane ist nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die anwendungsorientierte S-Schicht-Forschung von Interesse. So sollte die Produktion von maßgeschneiderten S-Schicht-Glycoproteinen, wie sie für verschiedene biotechnologische Anwendungen erforderlich sind (z. B. für S-Schicht-Vakzine; siehe Abschnitt 7.1.3.), in absehbarer Zeit möglich sein.

## 5. Molekularbiologie und Genetik

Obwohl man davon ausgehen kann, daß in S-Schicht-Proteinen gemeinsame Funktionsprinzipien und damit homologe Domänen vorliegen müssen (z.B. die Fähigkeit zur Selbstorganisation in Form zweidimensionaler Gitter, die Bildung von Porendomänen mit geringer unspezifischer Adsorption oder die Wechselwirkung mit assoziierten Zellwandstrukturen), hat die Sequenzierung der S-Schicht-Gene von Organismen unterschiedlicher phylogenetischer Verzweigungen kaum Sequenzähnlichkeiten hervorgebracht.<sup>[93]</sup> Die Sequenzierung von S-Schicht-Genen nahe verwandter Organismen (Tabelle 3)<sup>[94–127]</sup> hat jedoch ergeben, daß Sequenzidentitäten vom evolutionären Verwandtschaftsgrad ab-

hängen und daß unter diesen Voraussetzungen hohe Sequenzidentitäten für funktionell homologe Domänen durchaus zu finden sind. Die Nucleotidsequenz des S-Schicht-Gens *slpA* von *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356<sup>[115]</sup> war beispielsweise zu 80 Prozent mit der des S-Schicht-Gens des nahe verwandten *L. helveticus* identisch,<sup>[118]</sup> wies aber nur geringe Ähnlichkeit zu der von *L. brevis* auf.<sup>[116]</sup>

Bei manchen Spezies hingegen stellt der N-Terminus des S-Schicht-Proteins, der für die Verankerung der S-Schicht-Untereinheiten an die darunterliegende Zellgrenzfläche verantwortlich ist, ein konserviertes Strukturelement dar. Beispielsweise zeigten die S-Schicht-Proteine SbsA<sup>[103]</sup> und SbsC<sup>[105]</sup> von zwei *B.-stearothermophilus*-Wildtypstämmen (PV72/p2 und ATCC 12980) eine hohe Sequenzidentität

Tabelle 3. Übersicht über S-Schicht-Proteine mit bekannten Aminosäuresequenzen.

Spezies	Stamm	Gen	Zahl der Aminosäuren, einschließlich N-terminaler Leadersequenz/ N-terminale Leadersequenz	Gitter- <sup>[a]</sup> typ	Genbank-zugriffs-nummer	Lit.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TF7	<i>ahs</i>	467/19	S	L37348	[59]
<i>Aeromonas salmonicida</i>	A 450	<i>vapA</i>	502/21	S	M64655	[94]
<i>Bacillus anthracis</i>	Sterne substrain 9131	<i>sap</i>	814/29	O	Z36946	[95]
<i>Bacillus anthracis</i>	Sterne substrain 9131	<i>eag</i>	862/29	O	X99724	[96]
<i>Bacillus brevis</i>	47	<i>owp</i>	1004/24	–	M14238	[97]
<i>Bacillus brevis</i>	47	<i>mwp</i>	1053/23	H	M19115	[98]
<i>Bacillus brevis</i>	HPD 31	<i>HWP</i>	1087/23 oder 53	H	D90050	[99]
<i>Bacillus licheniformis</i>	HM 105		874/29	–	U38842	[100]
<i>Bacillus sphaericus</i>	P1	Sequenz 8	1252/30	S	A45814	[101]
<i>Bacillus sphaericus</i>	2362	Gen 125	1176/30	S	M28361	[102]
<i>Bacillus sphaericus</i>	2362	Gen 80	745 (stumm)	–	–	[102]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PV72/p6	<i>sbsA</i>	1228/30	H	X71092	[103]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PV72/p2	<i>sbsB</i>	920/31	O	X98095	[104]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980	<i>sbsC</i>	1099/30	O	AF055578	[105]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ssp. <i>israelensis</i> 4Q2	<i>slp</i>	393/mutmaßlich	–	X62090	–
<i>Campylobacter fetus</i> , ssp. <i>fetus</i>	–	<i>sapA</i>	933/No	H, S <sup>[b]</sup>	J05577	[106]
<i>Campylobacter fetus</i> , ssp. <i>fetus</i>	23B	<i>sapA1</i>	920/No	H, S <sup>[b]</sup>	L15800	[107]
<i>Campylobacter fetus</i> , ssp. <i>fetus</i>	82-40LP3	<i>sapA2</i>	1109/No	H, S <sup>[b]</sup>	S76860	[108]
<i>Campylobacter fetus</i> , ssp. <i>fetus</i>	84-91	<i>sapB</i>	936/No	–	U25133	[108]
<i>Campylobacter fetus</i> , ssp. <i>fetus</i>	CIP 5396T	<i>sapB2</i>	1112/No	–	AF048699	–
<i>Campylobacter rectus</i>	314	<i>crs</i>	1361/No	–	AF010143	[109]
<i>Caulobacter crescentus</i>	CB 15	<i>rsaA</i>	1026/No	H	M84760	[110]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 17965	<i>csp2</i>	510/30	H	X69103	[111]
<i>Deinococcus radiodurans</i>	–	<i>HPI</i>	1036/31	H	M17895	[112]
<i>Halobacterium halobium</i>	–	<i>csg</i>	852/34	H	J02767	[113]
<i>Haloferax volcanii</i>	–	–	828/34	H	M62816	[114]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	<i>slpA</i>	444/24	O	X89375	[115]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	<i>slpB</i>	456 (stumm)	–	X89376	[115]
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 8287		465/30	O	Z14250	[116]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	JCM 5810	<i>cbsA</i>	440/30	O	AF001313	–
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BR 11	<i>bspA</i>	265/mutmaßlich	O	U97348	[117]
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ 892	<i>slpH1</i>	440/30	O	X91199	[118]
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ 1269	<i>slpH2</i>	440/30	O	X92752	[119]
<i>Methanococcus voltae</i>	–	<i>sla</i>	565/12	H	M59200	[120]
<i>Methanosarcina mazei</i>	S-6	<i>slgB</i>	652/31	H	X77929	[121]
<i>Methanothermobacter fervidus</i>	DSM 2088	<i>slgA</i>	593/22	H	X58297	[56]
<i>Methanothermobacter sociabilis</i>	DSM 3496	<i>slgA</i>	593/22	H	X58296	[56]
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Brein 1	<i>spaP</i>	1612/32	–	M37647	[122]
<i>Rickettsia rickettsii</i>	R	<i>p120</i>	1645/32	–	X16353	[123]
<i>Rickettsia typhi</i>	Wilmington	<i>slpT</i>	1645/32	–	L04661	[124]
<i>Serratia marcescens</i>	Isolat 8000	<i>slaA</i>	1004	–	AB007125	–
<i>Staphylothermus marinus</i>	F1	–	1524/mutmaßlich	–	U57967	[125]
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	DSM 2030	<i>slp</i>	762/26	H	M31069	[126]
<i>Thermus thermophilus</i>	HB-8	<i>slpA</i>	917/27	H, S	X57333	[127]

[a] H: hexagonal, S: quadratisch, O: schräg. [b] In *Campylobacter fetus*, ssp. *fetus*, hängt der Gittertyp von der Molekülmasse der S-Schicht-Untereinheiten ab (H: 97 000; S: 127 000 und 149 000).

(85 %) für die 270 N-terminalen Aminosäuren, jedoch nur geringe Identität (< 25 %) für den restlichen Teil der Sequenz, der etwa zwei Drittel der gesamten Proteine ausmacht. Der N-Terminus von SbsA und SbsC ist für die Bindung der S-Schicht-Untereinheiten an die rigide Zellwandschicht verantwortlich, wobei ein sekundäres Zellwandpolymer von identischer chemischer Zusammensetzung als bindende Komponente fungiert.<sup>[128]</sup> Der unterschiedliche C-Terminus dürfte, selbst bei nahe verwandten Stämmen derselben Spezies, zu unterschiedlichen Zelloberflächeneigenschaften führen.

Im Widerspruch zur Hypothese, daß ausschließlich die evolutionäre Verwandtschaft mit der Sequenzidentität homologer Domänen korreliert, steht jedoch die Beobachtung, daß das S-Schicht-Protein SbsB nur eine niedrige Gesamtidentität (< 25 %) zu SbsA aufweist und daß die beiden S-Schicht-Proteine selbst unterschiedliche N-Termini haben.<sup>[104]</sup> Das S-Schicht-Protein SbsB wird von *B. stearotherophilus* PV72/p2 produziert, einer durch Sauerstoffstreß induzierten Variante von *B. stearotherophilus* PV72/p6. Interessanterweise synthetisiert die durch Sauerstoffstreß induzierte Variante ein anderes sekundäres Zellwandpolymer, das von SbsB als Bindungsstelle erkannt wird. Dies deutet darauf hin, daß während der Variantenbildung eine hochkoordinierte Umstellung der Synthese von sämtlichen Zellwandkomponenten stattfindet. Die Sequenzierung von 450 Basen aus der variablen Region der 16S-rDNA bestätigte eine hundertprozentige Identität von Wildtypstamm und Variante. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß, ungeachtet der evolutionären Verwandtschaft, andere Faktoren (z.B. Wachstumsbedingungen oder Umweltstreß) eine entscheidende Rolle für die Ausprägung von Sequenzidentitäten funktionell homologer Domänen gespielt haben.

Da bei einer mittleren Generationsdauer von 20 Minuten für die Erhaltung einer kontinuierlichen S-Schicht-Bedeckung eine Syntheseleistung von ungefähr 500 Untereinheiten pro Sekunde erforderlich ist,<sup>[26]</sup> müssen die den S-Schicht-Genen vorgeschalteten Promotoren entsprechend leistungsfähig sein.<sup>[93]</sup> Tatsächlich ist der Promotor des S-Schicht-Gens von *L. acidophilus* doppelt so effizient wie derjenige, der die Transkription des die Lactat-Dehydrogenase codierenden Gens steuert. Dieser Promotor ist einer der stärksten, der bei Bakterien bekannt ist.<sup>[129]</sup> In *L. brevis* wurden zwei Promotoren (P1 und P2) für die Expression des S-Schicht-Gens nachgewiesen. Der P2-Promotor liegt näher beim Startcodon und ist während der exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase am effektivsten.<sup>[130]</sup> Für die Expression des *cwp*-Operons von *B. brevis* wurden drei Promotoren beschrieben.<sup>[99, 131]</sup> Mit Ausnahme der S-Schicht-Proteine von *Campylobacter* und *Caulobacter* werden alle anderen mit Signalpeptiden hergestellt, was auf klassische Sekretionswege schließen läßt.<sup>[57]</sup>

Wesentlich für das Verständnis der Regulation von S-Schicht-Genen war die Beobachtung, daß einzelne Bakterienstämme verschiedene „stumme Gene“ (silent genes) exprimieren können. Die detailliertesten Untersuchungen hinsichtlich S-Schicht-Variation wurden bisher an *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, einem für Huftiere pathogenen Organismus, durchgeführt.<sup>[132]</sup> Bei pathogenen Organismen führt die S-Schicht-Variation zu einer antigenen Variation der

Zelloberflächeneigenschaften und somit zu einem Selektionsvorteil gegenüber der lytischen Aktivität des Immunsystems. Bei *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* sind zwei Serotypen bekannt (Typ A und Typ B), die von der Art der Lipopolysaccharide in der äußeren Membran bestimmt werden.<sup>[133]</sup> Bei beiden Serotypen erkennt der N-terminale Teil des S-Schicht-Proteins einen bestimmten Lipopolysaccharidtyp. S-Schicht-Proteine von Serotyp-A-Zellen werden durch die *sapA*- und *sapA*<sub>1-n</sub>-Gene codiert; die S-Schicht-Proteine von Serotyp-B-Zellen stellen eine parallele Familie dar. Der Vergleich von *sapA* und *sapA*<sub>1</sub> ergab, daß zwei identische Regionen vorhanden sind: Die erste (5'-konservierte Region) beginnt 74 bp in der „Upstream“-Region des offenen Leserasters (open reading frame, ORF), reicht 552 bp in das ORF hinein und codiert für 184 N-terminale Aminosäuren. Die zweite (3'-konservierte Region) beginnt in der „Downstream“-Region des ORF.<sup>[107, 134]</sup>

In Wildtypstämmen von *C. fetus* gibt es acht bis neun S-Schicht-Genkassetten,<sup>[135, 136]</sup> die als Cluster in einem Bereich von weniger als 93 kb vorliegen und < 8 % des Genoms ausmachen.<sup>[134]</sup> Diese Untersuchungen haben auch bestätigt, daß nur ein einziger Promotor vorhanden ist<sup>[137]</sup> und daß die S-Schicht-Variation auf Rekombinationsereignisse zurückzuführen ist. Zusätzlich zur Promotorinversion zwischen zwei entgegengesetzt orientierten S-Schicht-Genkassetten wird auch eine der beiden benachbarten und das invertierbare Element einschließenden Genkassetten gegen eine nicht benachbarte, vormals stumme Genkassette ausgetauscht.<sup>[132, 138]</sup> Demnach verschiebt *C. fetus* einen einzigen Promotor durch ein einziges DNA-Inversionsereignis, wobei die Häufigkeit nicht von der Größe des DNA-Fragments (6 bis 16 kb) abhängt. Dadurch wird die Expression von verschiedenen S-Schicht-Genkassetten ermöglicht.

*L. acidophilus* ATCC 4356, ein Organismus, der aus dem menschlichen Rachen isoliert wurde, hat zwei S-Schicht-Gene, die als *slpA* und *slpB* bezeichnet werden.<sup>[115]</sup> Das *slpA*-Gen wird aktiv transkribiert, während *slpB* ein stummes Gen ist. Interessanterweise sind die 5'- und 3'-Enden beider S-Schicht-Gene sehr ähnlich, während in der mittleren Region deutliche Unterschiede auftreten.<sup>[115]</sup> Die beiden S-Schicht-Gene befinden sich in einem Abstand von 3 kb in entgegengesetzter Orientierung auf dem Chromosom.<sup>[57]</sup>

Umweltfaktoren, die eine Veränderung der S-Schicht-Genexpression in nicht pathogenen Organismen induzieren, wurden an *B. stearotherophilus*-Stämmen untersucht. Das S-Schicht-Gen *sbsA* wurde von *B. stearotherophilus* PV72/p6 in kontinuierlicher Kultur unter sauerstofflimitierten Bedingungen stabil exprimiert.<sup>[139–141]</sup> Nach Aufhebung der Sauerstofflimitierung kam es jedoch zur Bildung einer Stammvariante und zur Expression des zweiten S-Schicht-Gens, *sbsB*. Die Abnahme von SbsA zeigte, daß die Änderung der Expression der S-Schicht-Gene in der gesamten Kultur als synchroner Prozeß abläuft. Wenngleich der Mechanismus, der der S-Schicht-Variation zugrundeliegt, noch unklar ist, deuten PCR-Analysen und Hybridisierungsversuche darauf hin, daß *sbsB* aus teilweise codierenden Sequenzen gebildet und *sbsA* während der Variation in Fragmente zerschlagen wird.<sup>[142]</sup>

## 6. Funktionelle Aspekte

Da während des Zellwachstums für die vollständige Bedekung der Zelloberfläche mit S-Schicht-Proteinen eine beträchtliche Syntheseleistung erforderlich ist, stellt sich die Frage, welchen Selektionsvorteil S-Schicht-tragende Organismen in ihrem natürlichen Habitat gegenüber S-Schicht-defizienten Stämmen haben. Obwohl viele der Funktionen, die den S-Schichten zugeschrieben werden, noch hypothetisch sind, kann eindeutig festgehalten werden, daß sie 1) bei den Archaea, deren Zellwand nur aus S-Schicht besteht (siehe Abschnitt 3.2.), die Zellform bestimmen und den Zellteilungsprozeß unterstützen, 2) Strukturen darstellen, die an der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung beteiligt sind, und 3) als Schutzschicht, Molekularsiebe sowie Molekül- und Ionenfallen wirken dürften.<sup>[7, 11, 14, 20]</sup>

Da S-Schichten Poren von identischer Größe und Morphologie im Bereich von 2 bis 8 nm aufweisen, dienen sie der Zelle als Molekularsiebe mit scharfen Ausschlußgrenzen für den Stoff-Aus- und Eintritt. Die kleinsten Porengrößen (2 nm) wurden bisher für die S-Schicht-ähnlichen Scheiden von *Methanospirillum hungatei* beschrieben.<sup>[143, 144]</sup> Als typischer chemolithoautotropher Mikroorganismus benötigt er für sein Wachstum ausschließlich anorganische Moleküle wie Gase und Salze. Dagegen haben S-Schichten Gram-positiver Bakterien aus der Familie der Bacillaceae Poren mit einer Größe von 4 bis 5 nm.<sup>[145]</sup> Diese Organismen sind auch als typische Produzenten von Exoenzymen wie Proteasen oder Amylasen bekannt. Da die molekularen Trenngrenzen der S-Schichten von Bacillaceae im Bereich von 30 000 bis 40 000 liegen, wird angenommen, daß sie die Geschwindigkeit der Abgabe von Exoenzymen kontrollieren und auf diese Weise eine Art von periplasmatischen Raum begrenzen.<sup>[146–148]</sup> Die größten Poren im Bereich von 5 bis 8 nm wurden bei S-Schichten von Archaea gefunden, die keine rigide Zellwand aufweisen. Den S-Schichten dieser Organismen wird eine wesentliche Funktion bei der Bildung der Zellform und bei der Zellteilung zugeschrieben.<sup>[16–18, 21–23, 39–41]</sup> Die S-Schicht-Untereinheiten Gram-negativer Archaea haben üblicherweise hydrophobe Domänen, die in die Cytoplasmamembran intercalieren. Dabei wird eine Art periplasmatischer Raum zwischen S-Schicht und Plasmamembran gebildet. In diesem können Makromoleküle zurückgehalten werden, die am Abbau und Transport von Nährstoffen sowie an der Faltung und am Export von Proteinen beteiligt sind.<sup>[113, 149–151]</sup>

Was die Schutzfunktion betrifft, so verhindern S-Schichten Gram-negativer Bakterien wie *A. salmonicida*, *C. fetus*, *A. serpens* und *C. crescentus* den Angriff von bakteriellen Parasiten wie *Bdellovibrio bacteriovorus*, doch können sie die Zellen nicht vor anderen Organismen wie Protozoen schützen.<sup>[152, 153]</sup> Bei *L. crispatus* und *L. acidophilus* wurde beobachtet, daß S-Schichten die Adhäsion dieser Bakterien an die Epithelzellen des Darms vermitteln,<sup>[154, 155]</sup> wobei die S-Schicht-tragenden Stämme eine hydrophobere Oberfläche als die S-Schicht-defizienten Varianten aufweisen.<sup>[156, 157]</sup>

S-Schichten von Bacillaceae können auch als Adhäsionszone für zellassoziierte Exoenzyme dienen. Am Beispiel von zwei *B.-stearothermophilus*-Wildtypstämmen, die hochmolekulare Exoamylasen bilden, konnte gezeigt werden, daß die

Enzyme an der S-Schicht-Oberfläche in einer Dichte gebunden sind, die die Diffusion von Nährstoffen oder Metaboliten nicht behindert.<sup>[158, 159]</sup> S-Schicht-assoziierte Exoenzyme wurden auch für *Thermoanaerobacterium thermohydrosulfurigenes*<sup>[160, 161]</sup> und für *Clostridium thermocellum*<sup>[162]</sup> beschrieben. Eine ganz andere Funktion wird dem S-Schicht-Gitter von *Synechococcus* GL-24,<sup>[29a, 163]</sup> einem Cyanobakterium, das in Seen mit sehr hohen Calcium- und Sulfatkonzentrationen wächst, zugeschrieben: Im hexagonalen S-Schicht-Gitter dieses Organismus findet eine umfangreiche Biomineralisation statt. Nach Einlagerung von Gips und dem Blockieren der S-Schicht-Poren kommt es zu einer kontinuierlichen Ablösung des Proteingitters und somit zu einer Freilegung der Zelloberfläche.

S-Schichten haben auch eine wesentliche Bedeutung für die Virulenz pathogener Organismen. Detaillierte Untersuchungen wurden an dem fischpathogenen Organismus *Aeromonas salmonicida* durchgeführt. Die S-Schicht (hier als A-Schicht bezeichnet) verleiht diesem Organismus eine hohe Resistenz gegenüber den bakteriziden Aktivitäten des Komplementsystems, sowohl im Immun- als auch im Nichtimmunserum. Ferner spielt die A-Schicht eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Porphyrinen und weist außerdem spezifische Bindungsstellen für Immunglobuline und extrazelluläre Matrixproteine auf.<sup>[164–166]</sup> Ähnliche Eigenschaften hat die S-Schicht von *B. cereus*, einem an peridontalen Infektionen beteiligten Organismus.<sup>[156]</sup> S-Schicht-tragende Zellen dieses Organismus können an verschiedenen Matrixproteinen haften und sind in Abwesenheit von opsonisierenden Antikörpern resistent gegen Leukocyten. Andererseits wird die Serumresistenz von *C. fetus* darauf zurückgeführt, daß die Komplementkomponente C3b nicht an die S-Schicht-Oberfläche binden kann. Eine effektive Opsonisierung wird somit erst durch die Zugabe spezifischer Antikörper möglich.<sup>[132]</sup> Bei *Rickettsia prowazekii* und *R. typhi*, den Erregern von epidemischem oder endemischem Typhus, ist das S-Schicht-Protein für die humorale und zelluläre Immunität verantwortlich.<sup>[167]</sup> *Bacillus anthracis*, der Erreger von Milzbrand, hat zwei S-Schicht-Proteine: Sap und EA1.<sup>[95, 96]</sup> Die Analyse von EA1 in Mutanten mit defektem *sap* ergab, daß EA1 das Hauptantigen der Zelloberfläche ist und ausschließlich zellassoziiert vorkommt, während Sap auch in das Kulturmedium abgegeben wird.

## 7. Das Anwendungspotential von S-Schichten

### 7.1. Biotechnologische und biomimetische Anwendungen

Die sehr spezifischen morphologischen und biophysikalischen Eigenschaften von S-Schicht-Proteinen, besonders ihre Fähigkeit, sich zu monomolekularen kristallinen Gittern zu organisieren, die an ihrer Oberfläche eine räumlich definierte Anordnung funktioneller Gruppen sowie von Poren gleicher Größe und Morphologie aufweisen, haben zu einem breiten Spektrum an Anwendungen in der Biotechnologie, Nanotechnologie und Biomimetik geführt.<sup>[10, 11, 67]</sup>

Um S-Schicht-Proteine mit definierten Eigenschaften für bio- und nanotechnologische Anwendungen zu erhalten,

werden S-Schicht-tragende Organismen in kontinuierlicher Kultur bei konstanten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten gezüchtet.<sup>[140, 168]</sup> Die zukünftige Entwicklung ist allerdings auf die Produktion von rekombinanten S-Schicht-Proteinen<sup>[11, 169]</sup> mit integrierten funktionellen Domänen ausgerichtet. Die gezielte Herstellung von verkürzten Formen von S-Schicht-Proteinen mit ausgetauschten Aminosäuren sowie die Verwendung rekombinanter S-Schicht-Proteine werden eine Charakterisierung der Domänen ermöglichen, die für die Bindung zwischen den S-Schicht-Untereinheiten sowie zwischen dem S-Schicht-Gitter und natürlichen oder künstlichen Trägern verantwortlich sind. Weiterhin sollen rekombinante S-Schicht-Fusionsproteine mit integrierten strukturellen Domänen und der Fähigkeit zur Selbstorganisation hergestellt werden.

### 7.1.1. S-Schichten als

#### Ultrafiltrationsmembranen mit einheitlicher Porengröße

Da S-Schichten eine Porosität von 30–70% sowie Poren von identischer Größe und Morphologie im Bereich von 2 bis 8 nm aufweisen, können sie als hochporöse „isopore“ Ultrafiltrationsmembranen angesehen werden.<sup>[10, 11]</sup> An S-Schichten von *B.-stearothermophilus*-Stämmen wurden Permeabilitätsuntersuchungen mit Proteinen definierter molekularer Größe nach der „space technique“ durchgeführt.<sup>[145]</sup> Die nach dieser Methode ermittelten Trenngrenzen nach nomineller Molekülmasse stimmten mit den Porengrößen überein, die an negativ kontrastierten S-Schichten elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden.<sup>[148, 170]</sup> Dank der scharfen Molekülmassentrenngrenze können S-Schichten verschiedener Bacillaceae zur Produktion von Ultrafiltrationsmembranen (SUMs) verwendet werden.<sup>[171, 172]</sup> SUMs werden durch Aufbringen von S-Schicht-Selbstorganisationsprodukten oder S-Schicht-tragenden Zellwandfragmenten auf Mikrofiltrationsmembranen, Quervernetzung des S-Schicht-Proteins mit Glutaraldehyd und Reduktion der Schiff-Basen mit Natriumborhydrid hergestellt (Abbildung 9a).

Die chemische Modifikation der Carboxygruppen an der S-Schicht-SUM-Oberfläche und im Bereich der Poren ermöglicht die Herstellung von neutralen, positiv oder negativ geladenen SUMs mit unterschiedlicher Oberflächenhydrophobie.<sup>[173, 174]</sup> Auf Grund der isoporen Struktur und der definierten Oberflächeneigenschaften von (chemisch modifizierten) SUMs konnten detaillierte Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Adsorption von

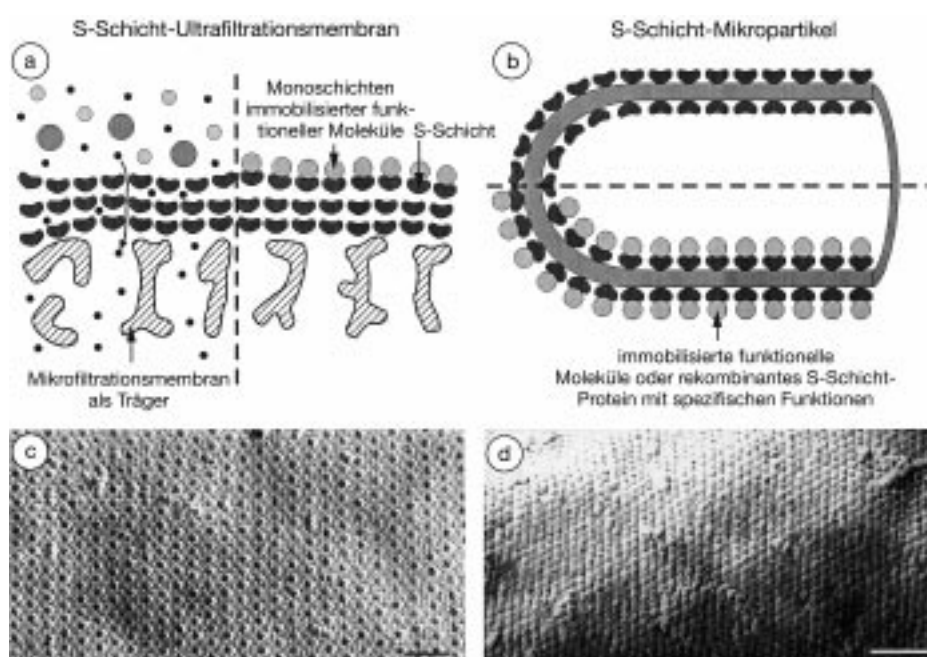


Abbildung 9. a) Schematische Darstellung einer S-Schicht-Ultrafiltrationsmembran (SUM) und b) von S-Schicht-Mikropartikeln (SMPs), die als Matrix zur Immobilisierung funktioneller Makromoleküle genutzt werden. c, d) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von gefriergetrockneten ganzen Zellen mit hexagonaler Gittersymmetrie. In (c) wurde polykationisches Ferritin (PCF) zur Markierung der negativ geladenen Domänen an der S-Schicht-Oberfläche des Archaeobakteriums *Thermoproteus tenax* verwendet. In (d) wurde Ferritin kovalent an die Carbodiimid-aktivierten Carboxygruppen des S-Schicht-Proteingitters von *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* gebunden. Die Länge der Balken entspricht 100 nm.

Mono- und Multischichten und den Flußverlusten der Ultrafiltrationsmembranen während der Filtrationsvorgänge durchgeführt werden.<sup>[173, 174]</sup>

### 7.1.2. S-Schichten als Matrix zur Immobilisierung von funktionellen Molekülen

Die hohe Dichte und die definierte Anordnung von Carboxygruppen an der Oberfläche der S-Schicht-Gitter wurde zur Immobilisierung (kovalenten Bindung) eines breiten Spektrums funktioneller (Makro)moleküle genutzt (Abbildung 9). Bezüglich der Belegungsdichte und der Reproduzierbarkeit erwies sich unter den verschiedenen Immobilisierungsverfahren eine Aktivierung der Carboxygruppen mit der Carbodiimidmethode als optimal.<sup>[175–178]</sup> Zur Quantifizierung der Zahl an Fremdmolekülen, die kovalent an S-Schicht-Gitter gebunden werden können, wurden S-Schicht-Mikropartikel (SMP; mit Glutaraldehyd vernetzte, S-Schicht-tragende Zellwandfragmente mit kompletter innerer und äußerer S-Schicht) verwendet (Abbildung 9b).<sup>[175, 177]</sup> Die meisten Enzyme, (z.B.  $\beta$ -Glucosidase, Glucoseoxidase, Invertase oder Naringinase) konnten in Form von dicht gepackten Monoschichten an S-Schicht-Gitter gebunden werden.<sup>[176, 178]</sup> Bei der Immobilisierung von Enzymen hatte die Verwendung von Spacern keinen Einfluß auf die Bindungskapazität von S-Schichten, es konnten aber dadurch höhere Enzymaktivitäten pro Flächeneinheit erhalten werden.<sup>[176]</sup> Durch die kovalente Bindung von Protein A, einem Liganden, der spezifisch den Fc-Teil der meisten Antikörper

von Säugetieren erkennt, konnten SMPs als Affinitätspartikel für die Isolierung und Reinigung von (monoklonalen) Antikörpern aus Serum oder Zellkulturüberständen hergestellt werden.<sup>[179, 180]</sup> Auf Grund ihrer hohen Beständigkeit gegenüber Druck und Scherkräften eignen sich SMPs mit immobilisiertem Protein A auch als „escort particles“ in der Affinitäts-Cross-Flow-Filtration.<sup>[180]</sup>

SUMs mit immobilisiertem IgG wurden auch als Reaktionszone für Teststreifen eingesetzt, die nach dem Prinzip von Festphasen-Immunoassays arbeiten.<sup>[175, 181]</sup> Teststreifen auf der Basis von SUMs sind leicht handhabbar und ermöglichen die rasche Bestimmung verschiedenster Analyte. Zur Herstellung der Reaktionszone werden üblicherweise monoklonale Antikörper an die Carbodiimid-aktivierten Carboxygruppen des S-Schicht-Proteins gebunden. So beträgt die Bindungskapazität des quadratischen S-Schicht-Gitters von *B. sphæricus* für IgG 375 ng cm<sup>-2</sup>. Gemessen an der Sättigungskapazität einer planaren Oberfläche für IgG entspricht diese Menge einer Monoschicht von statistisch orientierten Antikörpermolekülen.<sup>[175]</sup> Auf der Basis der SUM-Technik wurden bereits verschiedene Arten von Teststreifensystemen entwickelt. Klinisch erprobt wurden Teststreifen zur Bestimmung des Gewebeplasminogen-Aktivators (t-PA) in Vollblut oder Plasma, von IgE als Marker für Allergien vom Typ I im Serum und von Interleukinen zur Differenzierung zwischen septischem und traumatischem Schock. Die Vorteile von SUMs gegenüber den bisher bei Teststreifensystemen als Reaktionszonen verwendeten amorphen Polymeren können wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) S-Schichten haben definiert repetitive Oberflächeneigenschaften.
- 2) Da die Immobilisierung des Bindungsantikörpers an der äußersten Oberfläche einer kristallinen Matrix und nicht in einer porösen Struktur erfolgt, finden keine diffusionskontrollierten Reaktionen statt.
- 3) Auf Grund der kovalenten Bindung der Liganden (z. B. Antikörper) an das S-Schicht-Protein findet während der Testdurchführung kein Verlust statt.
- 4) SUMs adsorbieren weder Erythrocyten noch andere Serum- oder Blutbestandteile.
- 5) An der Oberfläche der SUM werden durch Peroxidase oder alkalische Phosphatase stabile, konzentrationsabhängige Präzipitate gebildet, deren Intensität reflektometrisch gemessen werden kann.<sup>[181]</sup>

### 7.1.3. S-Schichten bei der Entwicklung von Vakzinen

S-Schichten wurden bisher auf verschiedene Weise für die Entwicklung von Vakzinen eingesetzt. Bei der Lachszucht im Süßwasser und im Meer können Erkrankungen mit *Aeromonas salmonicida* und *A. hydrophila* zu drastischen Produktionsverlusten führen. Nachdem die S-Schicht dieser Organismen als wesentlicher Virulenzfaktor erkannt worden war, wurden intakte oder mit Ultraschall desintegrierte Zellen, oder gereinigte Zellprodukte, als abgeschwächte Vakzine eingesetzt.<sup>[44, 182]</sup>

Ein anderer Weg wurde bei der Verwendung von S-Schichten als Matrix für die Immobilisierung von Antigenen und Haptenen eingeschlagen. Native oder chemisch vernetzte

S-Schichten können als kombiniertes Carrier/Adjuvans-System für die Impfung gegen Infektionen mit pathogenen Organismen, in der Krebs-Immuntherapie sowie in der anti-allergischen Immuntherapie verwendet werden.<sup>[183, 184]</sup> Auf Grund der kristallinen Struktur von S-Schichten sind die für die Bindung von Antigenen/Haptenen erforderlichen funktionellen Gruppen auf jedem Promotor in identischer Position und Orientierung verfügbar.<sup>[185, 186]</sup> Diese charakteristischen Eigenschaften ermöglichen eine präzise Immobilisierung von Liganden auf definierten Epitopen der S-Schicht-Proteingitter (Abbildungen 5 und 9).

Die Verwendung von S-Schichten als Carrier/Adjuvans-Kombination für die Herstellung von therapeutischen Krebs-Vakzinen wurde erstmals von Smith et al. vorgeschlagen.<sup>[187]</sup> Tumor-assoziierte Glycane wie das T- oder Lewis-Y-Antigen lösten, gekuppelt an mit Glutaraldehyd quervernetzte S-Schichten verschiedener Gram-positiver Bakterien, ohne Verwendung eines externen Adjuvans eine starke, Hapten-spezifische Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ aus (delayed-type hypersensitivity; DTH). Dagegen waren mit diesen S-Schicht-Konjugaten nur niedrige Antikörpertiter erzielbar. „Adoptive-transfer“-Experimente deuteten darauf hin, daß diese DTH-Antwort durch T-Helferzellen vermittelt wurde. Die orale oder nasale Verabreichung von Hapten-S-Schicht-Konjugaten erbrachte für Tumor-assoziierte Glycane ähnlich spezifische DTH-Antworten.<sup>[187]</sup>

Weitere S-Schicht-Antigen-Konjugate wurden durch Kupplung von Oligosacchariden aus Kapseln verschiedener *Streptococcus pneumoniae*-Serotypen an native, nicht fixierte S-Schichten hergestellt. Die Seren von Mäusen, die mit diesen Konjugaten immunisiert worden waren, zeigten immunprotektive Eigenschaften und verringerten die Kolonienzahl von *S. pneumoniae* auf Blutagarplatten um 99%. Konjugate aus S-Schichten und intaktem Polysaccharid desselben Serotyps führten hingegen nicht zur Bildung protektiver Antikörper. Die Oligosaccharid-Konjugate lösten außerdem bei einer folgenden Verabreichung von thermisch abgetöteten *S. pneumoniae*-Zellen eine zelluläre (DTH) Immunantwort aus. Daraus wurde abgeleitet, daß die Thymus-unabhängige Immunantwort auf das bakterielle Polysaccharid durch die S-Schicht-Konjugate in eine immunprotektive, Thymus-abhängige Reaktion umgewandelt werden konnte.<sup>[188]</sup>

Bei Allergien vom Typ I wird die Bildung von IgE-Antikörpern durch Th2-Helfer-Lymphocyten vermittelt. Nicht-Allergiker produzieren hingegen kein IgE und nur wenige spezifische IgG-Antikörper gegen Allergene. Diese charakteristische Immunantwort wird durch Th0/Th1-Zellen vermittelt.<sup>[189]</sup> Dies stellt einen Ansatzpunkt für die Immuntherapie und möglicherweise auch für die Prophylaxe von Allergien vom Typ I dar. Eine S-Schicht-Vakzine zur Behandlung von Allergien wurde durch Kupplung des rekombinanten Birkenpollen-Allergens Bet v 1 (rBet v 1) an chemisch vernetzte S-Schichten hergestellt. Dazu wurden zunächst T-Zelllinien (TCL) und T-Zellklone (TCC) aus dem peripheren Blut von Birkenpollen-Allergikern isoliert und anschließend den Zellkulturen entweder reines rBet v 1 oder an S-Schichten immobilisiertes rBet v 1 als primärer Antigenstimulus zugegeben. Die Zuordnung der entsprechenden Immunreaktion erfolgte durch die Untersuchung des Cyto-



kinmusters in den T-Zellklonen (Abbildung 10).<sup>[190]</sup> Dabei zeigte sich, daß S-Schichten und rBet v 1-S-Schicht-Konjugate die Produktion großer Mengen an Interleukin 12 (IL-12) stimulierten. Hingegen führte die Stimulation von rBet v 1-induzierten TCC mit rBet v 1-S-Schicht-Konjugaten zu einer erhöhten Produktion von Interferon  $\gamma$ , wobei diese durch neutralisierende monoklonale Anti-IL-12-Antikörper wieder rückgängig gemacht werden konnte. Diese Resultate deuten darauf hin, daß S-Schichten primär einen durch IL-12 vermittelten Adjuvanseffekt auslösen.<sup>[190]</sup>

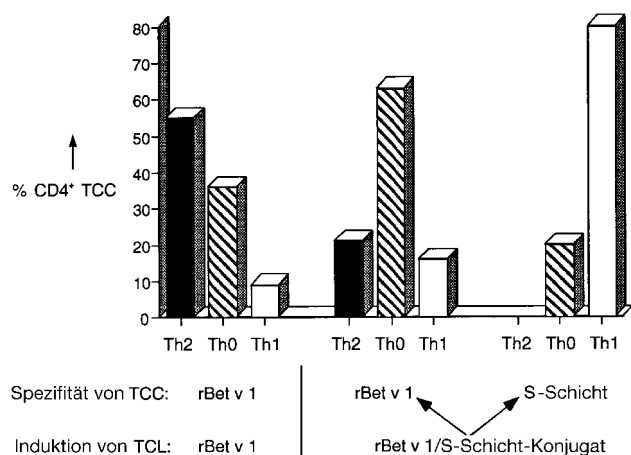


Abbildung 10. Subklassenverteilung von T-Helferzellen (Th) bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen (TCC), wie sie durch das rekombinante Hauptbirkenpollenallergen rBet v 1 oder durch rBet v 1-S-Schicht-Konjugate und Stimulation mit rBet v 1 induziert wurden. Th-Subklassen wurden nach dem Verhältnis von Interferon  $\gamma$  zu Interleukin 4 klassifiziert (entnommen aus Lit. [190] mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press).

Die bisherigen Versuche lassen erkennen, daß die S-Schicht-Vakzinetechnologie für ein breites Spektrum von Anwendungen geeignet ist. Als Träger/Adjuvans-Basisstrukturen kann bereits auf eine Vielzahl von immunologisch nicht-kreuzreaktiven S-Schichten, die zudem keine meßbare Toxizität aufweisen, zurückgegriffen werden. Eine weitere Strategie für die Entwicklung neuer Modellvakzine beruht auf S-Schicht-stabilisierten Liposomen, wobei sich ein breites Spektrum an Kombinationsmöglichkeiten aus geeigneten Protein-, Lipid-, oder Glycolipid-Immunmodulatoren anbietet. Die bisherigen Befunde mit S-Schicht-Konjugaten zeigen deutlich, daß die immunologischen Antworten auf die Impfung durch S-Schichten in die durch Th1- und Th2-Lymphocyten kontrollierte Richtung gelenkt werden, wodurch die Voraussetzung für Therapie und Prophylaxe erfüllt wird.

#### 7.1.4. S-Schichten als Trägerstrukturen für funktionelle Lipidmembranen

Da ein wesentlicher Teil der biologischen Prozesse über Membranen abläuft, besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Verfahren und Methoden für ihre meso- und makroskopische Nutzung. Insbesondere funktionelle Transmembranproteine haben ein sehr breites Anwendungspotential in der Bioanalytik, Biotechnologie und Biomimetik. Da künstlich hergestellte, planare Lipid-Doppelschichten und

Liposomen nur eine geringe mechanische Stabilität aufweisen, war eine praktische Nutzung in vielen Anwendungsbereichen bisher nicht möglich.<sup>[191, 192]</sup> Daher besteht ein großer Bedarf an Systemen, die solche Strukturen verstärken, ohne ihre Funktion zu behindern.

Die Stabilität von Lipidmembranen kann durch die Rekristallisation eines geschlossenen monomolekularen S-Schicht-Gitters signifikant erhöht werden.<sup>[193, 194]</sup> Komposit-S-Schicht-Lipidfilme (Abbildung 11) sind biomimetische Strukturen,

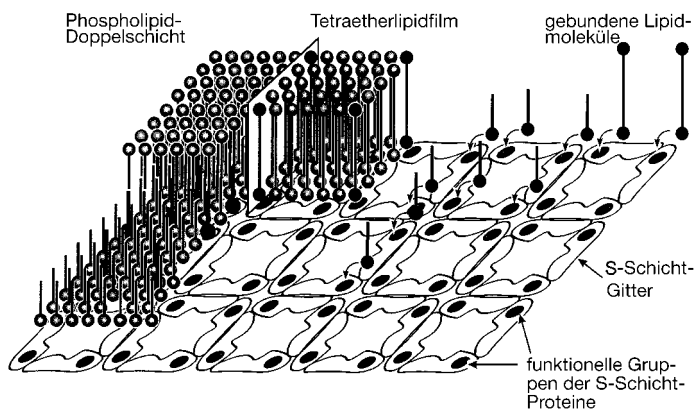


Abbildung 11. Schematische Darstellung einer semifluiden Membran, bei der eine Phospholipid-Doppelschicht oder eine Tetraetherlipid-Monoschicht mit einer S-Schicht stabilisiert wurde. Der Anteil der Lipidmoleküle, die entweder kovalent oder über nichtkovalente Kräfte an definierte Domänen des porösen S-Schicht-Proteingitters gebunden sind, beeinflusst die laterale Diffusion der freien Lipidmoleküle und folglich die Fluidität der gesamten Membran (modifiziert nach Lit. [200]).

die in ihrem supramolekularen Aufbau den Zellhüllen der Archaea entsprechen, die ausschließlich aus einer Plasmamembran und einer mit dieser assoziierten S-Schicht bestehen (Abbildung 1a). Der stabilisierende Effekt von S-Schichten auf Lipidmembranen konnte bereits an Phospholipid-Doppel- und Tetraetherlipid-Monoschichten demonstriert werden. S-Schicht-unterstützte Lipidfilme können auf porösen Trägern mit Porendurchmessern von einigen 10  $\mu$ m aufgezogen werden.<sup>[194]</sup> Die Möglichkeit, derartige Schichten durch Langmuir-Blodgett (LB)-Techniken herzustellen, öffnet ein weites Anwendungsspektrum in der grundlagen- und anwendungsorientierten Membranforschung, einschließlich der Physiologie, Diagnostik und Biosensor-Entwicklung. Komposit-S-Schicht-Lipidfilme sind besonders interessante supramolekulare Strukturen, da zu ihrer Bildung keine spezifischen Schlüssel-Schloß-Mechanismen zwischen Proteinen und (modifizierten) Lipiden erforderlich sind, wie es bei der Wechselwirkung von Antigenen mit Antikörpern, Enzymen mit Substraten oder auch Biotin mit Avidin der Fall ist.<sup>[195–198]</sup>

Die Rekristallisation von S-Schicht-Proteinen zu geschlossenen Monoschichten an Phospholipidfilmen ist 1) von der Lipidkopfgruppe, 2) vom Phasenzustand des Lipidfilms und 3) vom Ionengehalt und vom pH-Wert der Subphase abhängig.<sup>[198–201]</sup>

Um die Wechselwirkung zwischen den S-Schicht-Proteingittern und Lipidmembranen sowie den Einfluß der S-Schicht auf die Fluidität in den Lipidschichten aufzuklären, wurden verschiedene biophysikalische Methoden angewendet wie Röntgenbeugung,<sup>[202]</sup> Fluoreszenzmessung nach „Photoblei-

chen“,[203] Rasterkraftmikroskopie,[199] Schallgeschwindigkeitsmessung zur Dichtebestimmung[204] sowie mikrokalorimetrische Untersuchungen.[205] Da sich in Komposit-S-Schicht-Lipidmembranen (Abbildung 11) die Stellen der spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Lipidkopfgruppen und dem assoziierten S-Schicht-Protein entsprechend den Gitterkonstanten wiederholen, wird erwartet, daß sich auch die Fluidität und lokale Ordnung des Lipidfilmes dieser Periodizität anpaßt. Es wurde deshalb zur Beschreibung von S-Schicht-stabilisierten Lipidmembranen der Begriff „semifluide Membranen“ eingeführt.[194, 200]

Voltage-Clamp-Messungen an Langmuir-Lipidfilmen[206] und an Black-Lipidmembranen[207] haben bestätigt, daß die assoziierte S-Schicht weder die Funktion der Lipidmembranen noch der in sie integrierten Moleküle stört. Besonders stabile Kompositstrukturen wurden nach intra- und intermolekularen Quervernetzungen sowohl der S-Schicht-Proteine als auch des S-Schicht-Gitters mit den Lipidmolekülen erhalten.

Das Konzept der „semifluiden Membran“ lag auch der Entwicklung und Herstellung von Lipid-Doppelschichten und Tetraetherlipid-Monoschichten auf festen Trägern zugrunde (Abbildung 12).[199, 203] Beide Systeme werden für (hochselektive) Rezeptor-Oberflächen in elektrochemischen und optischen Biosensoren sowie für funktionalisierte anorganische Oberflächen benötigt.[208, 209]

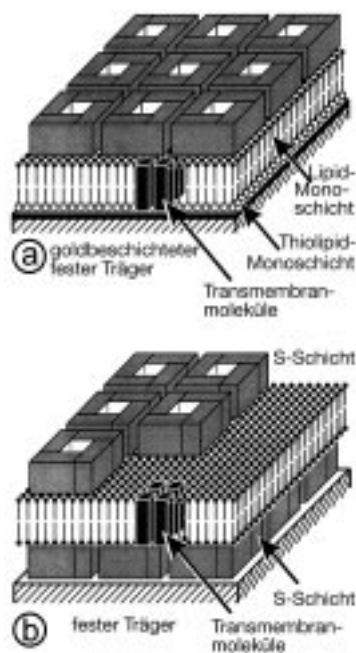


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Aufbaus von S-Schicht-stabilisierten Lipidmembranen auf festen Trägern. In (a) wird bei der Bildung der Lipid-Doppelschicht die starke Chemisorption von Thiolgruppen an Gold genutzt. Auf den Thiolipid-beschichteten festen Träger wurde eine zweite Membranhälfte mit einer S-Schicht, die zuvor in einem Langmuir-Trog am Lipidfilm rekristallisiert wurde, nach der Langmuir-Schaefer-Methode übertragen. Integrierte funktionelle Moleküle ermöglichen die Untersuchungen von Transmembranfunktionen. b) Als Alternative zu einer Polymerschicht befindet sich eine S-Schicht zwischen dem festen Träger und der Lipidmembran. Wahlweise kann auch die äußere Hälfte der Lipid-Doppelschicht durch das Binden einer S-Schicht stabilisiert werden (modifiziert nach Lit. [212]).

Die S-Schicht-Proteine können auch auf Liposomen,[205, 210, 211] die aus Phospholipiden oder Tetraetherlipiden bestehen, rekristallisiert werden (Abbildung 13). Das supramolekulare Bauprinzip von S-Schicht-umhüllten Liposomen hat große Ähnlichkeit mit den Zellhüllen Gram-negativer

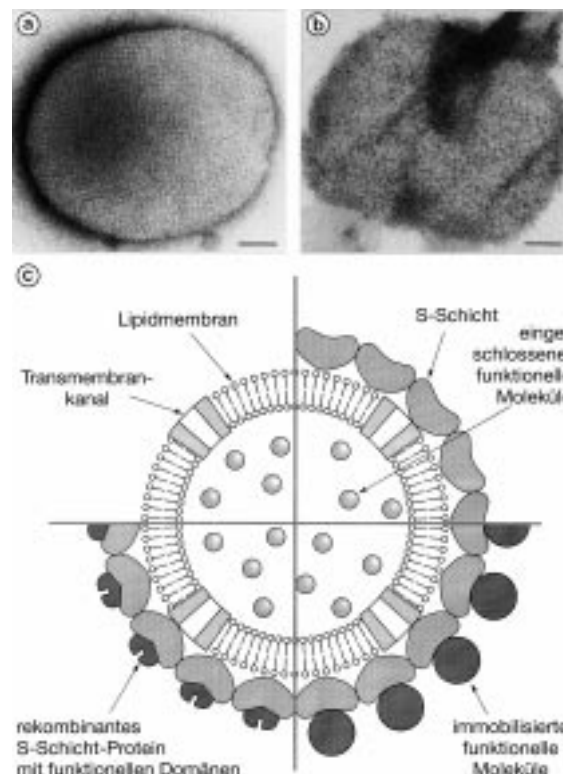


Abbildung 13. Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten Liposomen, an deren Oberfläche eine S-Schicht mit schräger Gittersymmetrie rekristallisiert wurde, a) vor und b) nach der kovalenten Bindung von stark elektronenstreuenden Ferritinmolekülen. c) Schematische Darstellung eines mit einem S-Schicht-Gitter umhüllten Liposoms, das als Matrix zur Immobilisierung funktioneller Moleküle verwendet werden kann. Alternativ können auch rekombinante S-Schicht-Proteine mit integrierten funktionellen Domänen verwendet werden. Die Länge der Balken entspricht 80 nm.

Archaea (Abbildung 1a) oder den Virushüllen. Nach ihrer Rekristallisation auf den Liposomen können die S-Schicht-Proteine quervernetzt und als Matrix zur kovalenten Bindung von monomolekularen Schichten weiterer Moleküle verwendet werden. Die hohe mechanische und thermische Stabilität der S-Schicht-umhüllten Liposomen sowie die Möglichkeit zur Bindung von biologisch aktiven Molekülen hat ein breites Anwendungspotential erschlossen. Insbesondere ergeben sich über diese biomimetischen Strukturen neue strategische Ansätze für die Entwicklung von Carrier/Adjuvans-, Arzneimittelverabreichungs- und -Targeting-Systemen einschließlich der Herstellung künstlicher Viren, wie sie in der Gentherapie zum Einsatz kommen sollen.

## 7.2. Nanotechnologische Anwendungen

### 7.2.1. Rekristallisation von S-Schichten auf festen Trägern

Die besondere Eigenschaft von isolierten S-Schicht-Proteinen, auf festen Trägern großflächig zu rekristallisieren, ist eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Funktionalisierung von Oberflächen.<sup>[200, 212]</sup> Viele bio- und nanotechnologische Anwendungen von S-Schichten setzen eine definierte Orientierung des Proteingitters zum Substrat voraus.<sup>[213]</sup> Eine Gemeinsamkeit der meisten technologisch relevanten S-Schichten ist ihre Asymmetrie zwischen Außen- und Innenseite bezüglich Topographie, Oberflächenladung und Hydrophobie. Aus hochauflösenden elektronen- und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ist bekannt, daß die Oberflächenrauheit an der Außenseite nur mäßig, an der Innenseite hingegen stärker ausgeprägt ist. Chemische Modifikationen der S-Schicht-Oberflächen sowie Adsorptions- und Markierungsexperimente mit unterschiedlich geladenen Markermolekülen ergaben für die S-Schichten vieler Bacillaceae eine ladungsneutrale, eher hydrophobe Außen- und eine nettonegativ geladene, weniger hydrophobe Innenseite.

Hochauflösende elektronenmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die rekristallisierten Protein-Monoschichten nicht über die gesamte Oberfläche monokristallin vorliegen, sondern aus einem geschlossenen Mosaik aus zufällig ausgerichteten kristallinen Domänen bestehen.<sup>[29b, 193, 213]</sup> Aus der zeitlich aufeinanderfolgenden Abbildung des Kristallisationsvorganges ging hervor, daß das Kristallwachstum von S-Schichten an Phasengrenzflächen zunächst von zufällig verteilten Nucleationspunkten, bestehend aus einzelnen Proteinen, oligomeren Vorstufen oder kleinen Kristalliten, ausgeht. In der Folge verläuft, von den Nucleationspunkten ausgehend, in alle Richtungen ein laterales Wachstum, bis benachbarte kristalline Regionen aufeinandertreffen und eine vollständig geschlossene Monoschicht gebildet ist.

Obwohl das S-Schicht-Gitter einen polykristallinen Charakter aufweist, haben die einzelnen kristallinen Domänen dieselbe Orientierung zur Grenzfläche. Diese charakteristische Orientierung wird sowohl durch die anisotropen Oberflächeneigenschaften der S-Schicht-Gitter als auch durch die physikochemischen Eigenschaften der Träger (z.B. Hydrophobie, Oberflächenladung) bestimmt. Die Größe der einzelnen monokristallinen Bereiche hängt sowohl von der Dichte als auch von der lateralen Beweglichkeit der Protein-Untereinheiten oder Kristallisationskeime ab, die in einem sehr frühen Stadium der S-Schicht-Rekristallisation an der Trägerfläche adsorbiert wurden. Neben den Oberflächeneigenschaften des Substrates ist die Bildung geschlossener kristalliner Anordnungen außerdem stark von der jeweils verwendeten S-Schicht sowie von den Eigenschaften der Subphase (z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenzusammensetzung und Ionenstärke) abhängig. Der mittlere Durchmesser der kristallinen Bereiche kann im Bereich von 1 bis 20 µm liegen. Das Ausmaß der Gesamtbedeckung ist dabei nur durch die Größe des Substrats begrenzt. In Tabelle 4 sind alle technologisch bedeutenden Substrate zusammengefaßt, für die die Bildung von S-Schicht-Gittern bereits optimiert wurde.

Tabelle 4. Technologisch wichtige Substrate, an denen S-Schichten rekristallisieren.<sup>[200]</sup>

Silicium- und Galliumarsenid-Wafer für neue Anwendungen in der Mikroelektronik und bei miniaturisierten integrierten Biosensoren
Glas zur Entwicklung von optischen und elektrooptischen Sensorsystemen
Edelmetalle (z. B. Gold oder Platin) zur Entwicklung ultradünner Arbeitselektroden für amperometrische Biosensoren

### 7.2.2. Strukturierung von rekristallisierten S-Schichten

Zahlreiche technologische Anwendungen von S-Schicht-funktionalisierten Oberflächen erfordern eine Strukturierung des Proteingitters im (Sub)mikrometer-Bereich. Beispielsweise können auf Silicium-Wafern rekristallisierte S-Schichten mit UV-Strahlung durch eine in der Mikrolithographie übliche Maske, die Strukturen in der Größe von 1 µm bis 200 nm aufweist (quadratische und linienförmige Muster), belichtet werden (Abbildung 14).<sup>[214]</sup> Zur Vermeidung von Interferenzmustern in der strukturierten S-Schicht erwies es sich als notwendig, noch vor der Belichtung den der Proteinmatrix anhaftenden dünnen Wasserfilm durch schonende Trocknung zu entfernen. Mit zwei Pulsen eines ArF-Excimerlasers ( $\lambda = 193$  nm, Dosis: circa  $100 \text{ mJ cm}^{-2}$  pro Puls) konnte die S-Schicht in den belichteten Bereichen vollständig abgetragen werden, wobei in den nicht belichteten Bereichen die Struktur und biochemische Funktion des Proteingitters völlig erhalten blieb. Die Höhendifferenz zwischen den belichteten und nicht belichteten Bereichen konnte rasterkraftmikroskopisch bestimmt werden. Die Abmessung entsprach genau den an Randzonen einzelner kristalliner S-Schichten bestimmten Werten.

Derzeit werden S-Schichten, die auf Silicium-Wafern rekristallisiert wurden, auf ihre Eignung als neuartige, ultradünne Resistmaterialien getestet. Bei dieser Anwendung werden die strukturierten S-Schichten verstärkt durch eine dünne, widerstandsfähige Schicht (z. B. Zr, aufgebracht durch die Reaktion mit  $\text{ZrOCl}_2$ ), durch Silylierung<sup>[215]</sup> oder stromlose Metallabscheidung,<sup>[216]</sup> um auf diese Weise bei einem nachfolgenden Trockenätzverfahren unterschiedliche Ätzungsanteile zwischen belichteten und unbelichteten Bereichen zu erzielen. Auf Grund der geringen Dicke von S-Schichten (circa 10 nm) sind gegenüber konventionellen polymeren Resistmaterialien für bestimmte Strukturierungsverfahren Vorteile zu erwarten.

Im Gegensatz zur Bestrahlung mit einem ArF-Excimerlaser war die Abtragung der S-Schicht mit einem KrF-Laser ( $\lambda = 248$  nm) nicht möglich.<sup>[214]</sup> Untersuchungen von solchen bestrahlten S-Schicht-Gittern haben ergeben, daß selbst eine Dosis von ca.  $3500 \text{ mJ cm}^{-2}$  (10 Pulse zu je ca.  $350 \text{ mJ cm}^{-2}$ ) nur zu einer starken Denaturierung, aber nicht zur Entfernung des Proteingitters führt.<sup>[214]</sup> Wie rasterkraftmikroskopisch nachgewiesen wurde, entsprach die Stufenhöhe zwischen den belichteten und nicht belichteten Bereichen auch nicht mehr der vollen Dicke einer intakten S-Schicht. Da durch die Bestrahlung die Struktur des S-Schicht-Gitters auch in den nicht belichteten Regionen verloren ging, wurde daraus geschlossen, daß während des Belichtungsvorganges auch in diesen Bereichen eine thermische Schädigung auftrat.

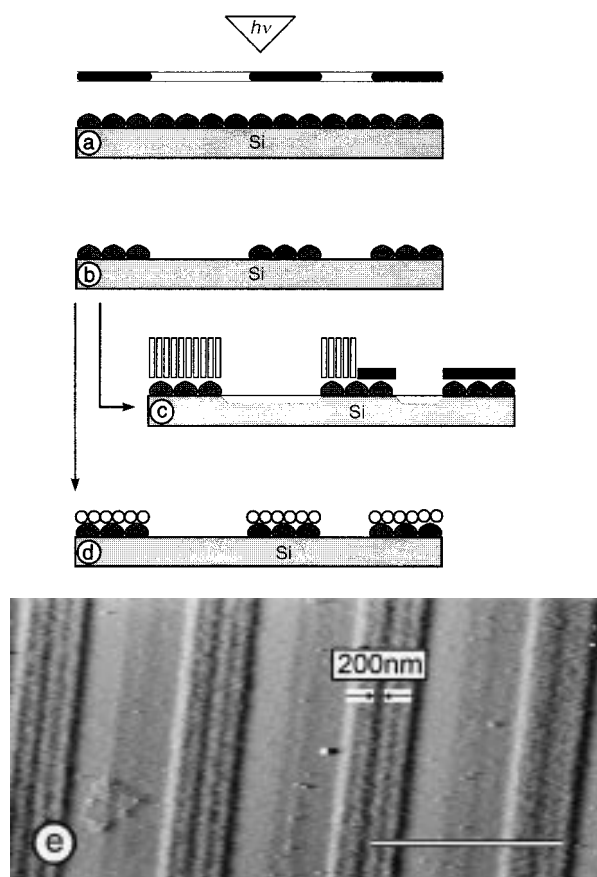


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Strukturierung von S-Schichten, die auf festen Trägern rekristallisiert wurden, durch Bestrahlung mit UV-Licht. a) Durch die Bestrahlung mit einem ArF-Excimerlaser ( $\lambda = 193$  nm) durch eine mikrolithographische Maske wird auf die S-Schicht ein Muster übertragen. b) Die S-Schicht wird spezifisch an den belichteten Stellen von der Silicium-Oberfläche abgetragen, behält aber an den unbelichteten Stellen ihre kristalline und funktionelle Integrität. c) Unbelichtete Bereiche der S-Schicht können zur Bindung von Verstärkerliganden (links) oder zur stromlosen Metallabscheidung (rechts) verwendet werden. In beiden Fällen wird eine Schicht gebildet, die eine Strukturierung durch Trockenätzen ermöglicht. d) Alternativ können unbelichtete Bereiche der S-Schicht auch für das selektive Binden biologisch aktiver Moleküle, die zur Herstellung miniaturisierter Biosensoren oder biokompatibler Oberflächen notwendig sind, verwendet werden. e) Rasterkraftmikroskopisches Bild einer auf einem Silicium-Wafer strukturierten S-Schicht. Die Länge des Balkens entspricht 3  $\mu\text{m}$ . Die mögliche Auflösung wird durch die Wellenlänge der Excimerlaserstrahlung bestimmt (modifiziert nach Lit. [212]).

Dieser bemerkenswerte Empfindlichkeitsunterschied von S-Schichten gegenüber ArF-Laser- und KrF-Laserstrahlung konnte bereits zur Übertragung eines Submikrometer-Musters auf ein konventionelles polymeres Resistmaterial auf einem Silicium-Wafer genutzt werden.<sup>[217]</sup> Dazu wurde zunächst eine S-Schicht auf einem durch Spin-Coating erhaltenen polymeren Resist (ungefähr 500 nm Schichtdicke), der nur gegenüber KrF-, aber nicht gegenüber ArF-Laserstrahlung empfindlich war, rekristallisiert und durch ArF-Laserstrahlung durch eine lithographische Maske strukturiert. Die strukturierte S-Schicht diente in der Folge als Maske für die Bestrahlung des Resists mit KrF. Mit diesem Verfahren

konnten sehr steile Flanken im danach entwickelten polymeren Resistmaterial erhalten werden.

Gegenwärtig wird versucht, die Auflösungsgrenze von etwa 100 nm, die sich aus der Wellenlänge der verwendeten UV-Strahlung ergibt, für lithographische Verfahren mit S-Schichten zu verbessern. Erste Versuche mit Elektronen- und Ionenstrahlen haben bereits ergeben, daß es grundsätzlich möglich ist, feinere Strukturen in S-Schicht-Gitter zu übertragen (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe).

### 7.2.3. S-Schichten als Matrizen zur Herstellung regelmäßig angeordneter Nanopartikel

Der Entwicklung von Verfahren zur Herstellung regelmäßig angeordneter Metallcluster mit neuen, interessanten physikalischen Eigenschaften wird in der molekularen Elektronik und nichtlinearen Optik eine große Bedeutung beigemessen. Die gegenwärtigen Ansätze nutzen zumeist kolloidchemische Methoden in Verbindung mit der Langmuir-Blodgett-Technik.<sup>[218–221]</sup> Obwohl diese Methoden in den letzten Jahren wesentlich weiterentwickelt wurden, ist es mit ihnen noch nicht möglich, definiert angeordnete Punktgitter im Mikrometer-Maßstab herzustellen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß sich S-Schichten als Matrizen zur Herstellung von regelmäßigen metallischen oder halbleitenden nanometergroßen Punktgittern eignen. Sowohl an S-Schichten, die auf Substraten rekristallisiert wurden, als auch an planaren und zylindrischen Selbstorganisationsprodukten in Suspension konnten geometrisch streng geordnete Präzipitate von monodispersen Cadmiumsulfid<sup>[222]</sup> und von Gold (Abbildung 15) hergestellt werden.<sup>[223]</sup> Dieses Ergebnis ist grundsätzlich nicht überraschend, zumal Untersuchungen an der S-Schicht eines Cyanobakteriums ergaben, daß die kristalline Proteinmatrix eine definierte Biomineralisation von  $\text{CaSO}_4$  und  $\text{CaCO}_3$  induzieren kann.<sup>[163]</sup>

Für die Herstellung von regelmäßig angeordneten Gold-Nanopartikeln wurden zunächst durch eine chemische Modifikation Thiolgruppen in die S-Schicht eingeführt. Danach wurde die Protein-Matrix mit Tetrachlorogold(III)-säure-Lösung inkubiert. Die Bildung von diskreten Goldpartikeln erforderte eine Elektronenbestrahlung der mit einer dünnen Goldschicht überzogenen S-Schicht im Transmissionselektronenmikroskop. Hochauflösende elektronenmikroskopische Abbildungen lassen erkennen, daß sich die Gold-Nanopartikel im Porenbereich des S-Schicht-Gitters gebildet hatten und in ihrer Morphologie und räumlichen Verteilung der Struktur der Poren sowie den Gitterkonstanten der S-Schicht-Matrix entsprachen (Abbildung 15). Elektronenbeugungsbilder und energiedispersive Röntgenmikroanalyse bestätigten, daß die Gold-Partikel zwar aus kristallinem (reinem) Gold bestanden, diese aber gegenseitig nicht kristallographisch ausgerichtet waren. Digitale Bildverarbeitungsmethoden zeigten zudem, daß die Standardabweichung einzelner Partikel von ihrer idealen Position im zweidimensionalen Gitter weniger als  $\pm 0.5$  nm betrug.

Seit kurzem schließt das Spektrum an verfügbaren Materialien auch die Präzipitate von Platin und Palladium sowie von magnetischen Materialien wie Eisen oder Nickel ein (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Zur

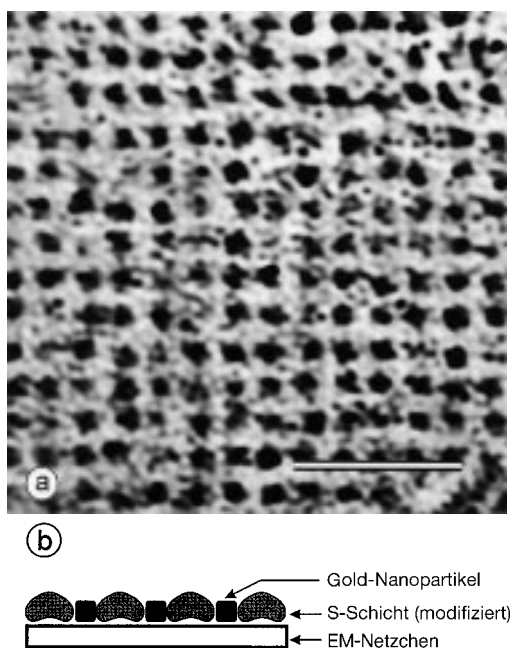


Abbildung 15. a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gold-„Supergitters“ aus monodispersen Gold-Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 4 bis 5 nm. b) Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen S-Schicht-überzogenen Träger mit Gold-Nanopartikeln im Bereich der S-Schicht-Poren. Die Länge des Balkens entspricht 50 nm.

Zeit untersuchen wir die elektrischen, magnetischen sowie optischen Eigenschaften dieser regelmäßig angeordneten Nanopartikel.

S-Schichten konnten auch bereits als Ätzmasken im Nanometerbereich zur Herstellung regelmäßig angeordneter Titan-Nanopartikel eingesetzt werden.<sup>[224–226]</sup> Bei dieser Anwendung wurde zunächst die Struktur eines hexagonalen S-Schicht-Gitters durch (niederenergetisches) Elektronenstrahlätzen auf eine Silicium-Oberfläche übertragen. Danach wurde die S-Schicht-Maske entfernt und die strukturierte Oberfläche im Sauerstoffplasma oxidiert. Nach Aufbringung einer dünnen Schicht (ca. 1.2 nm) von Titan auf die oxidierte Oberfläche entstanden in den geätzten Vertiefungen regelmäßig angeordnete Titan-Cluster.

Im Unterschied zu anderen Verfahren scheint es derzeit nur mit Hilfe von S-Schichten möglich zu sein, großflächige anorganische Gitter von Nanokristallen mit einer hohen Flexibilität hinsichtlich der Partikelgröße (3 bis 15 nm im Durchmesser), des Abstandes zwischen den Partikeln (bis zu 30 nm) und der Gittersymmetrien (schräg, quadratisch oder hexagonal) herzustellen.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, daß S-Schichten bei prokaryotischen Organismen zu den am weitesten verbreiteten Zelloberflächenstrukturen gerechnet werden müssen. Als hochporöse kristalline Proteingitter, die die Zelloberfläche vollständig bedecken, reflektieren sie

spezifische Anpassungen der Organismen an ein breites Spektrum von ökologischen Bedingungen und Selektionskriterien. S-Schichten werden aus einer einzigen (Glyco)proteinspezies aufgebaut und stellen somit die einfachsten selbstorganisierten Membranen dar, die sich im Laufe der biologischen Evolution entwickelt haben. Durch eine spontane Assoziation identischer Untereinheiten unter Gleichgewichtsbedingungen entstehen stabile, strukturell genau definierte monomolekulare kristalline Aggregate, die durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden. Während des Wachstums und der Teilung von Bakterienzellen verhalten sich S-Schichten als „dynamische, geschlossene Kristalle“, die die intrinsische Fähigkeit haben, ständig eine Struktur mit niedriger Gibbs-Energie einzunehmen.

Untersuchungen zur Aufklärung der Selbstorganisation von Strukturen aus molekularen Bausteinen präsentieren ein neues, sich rasch entwickelndes, interdisziplinäres wissenschaftliches Gebiet.<sup>[296, 212, 227, 228]</sup> Molekulare Selbstorganisationsprozesse sind ubiquitär in biologischen Systemen und als solche auch die Grundlage für die Morphogenese komplexer biologischer Strukturen. Für die Materialwissenschaften liegt die Attraktivität von Selbstorganisationssystemen vor allem in der Möglichkeit, über einfache Verfahren ultrakleine, einheitliche funktionelle Strukturen in mikro-, meso- oder makroskopischen Dimensionen zu nutzen. Diese „Bottom-up“-Prozesse der Selbstorganisation beruhen auf streng definierten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bausteinen, die letztlich auch die Möglichkeit des supramolekularen Endprodukts bestimmen.

Es ist das Ziel der molekularen Nanotechnologie und Biomimetik, von der Natur zu lernen, mit welchen molekularen Bausteinen und nach welchen Prinzipien der Selbstorganisation funktionelle supramolekulare Systeme entstehen. In diesem Sinne ist es auch das erklärte Ziel der anwendungsorientierten S-Schicht-Forschung, das erstaunlich vielfältige Selbstorganisationspotential dieser einfachsten biologischen Membranen, insbesondere aber auch die sich davon ableitenden repetitiven Struktureigenschaften zu nutzen. Besonders die vielfältigen Möglichkeiten, auf S-Schichten andere molekulare Funktionseinheiten und Materialien räumlich genau definiert zu immobilisieren oder wachsen zu lassen, eröffnet völlig neue strategische Ansätze im Bereich des supramolekularen Engineerings und der Nanofabrikation.

Wesentliche Fortschritte bei der meso- und makroskopischen Nutzung von funktionellen Lipidmembranen sollten sich durch den stabilisierenden Effekt rekristallisierter S-Schichten ergeben. Das breite Anwendungspotential des supramolekularen Bauprinzips dieser „semifluiden Membranen“ ist erst in einigen strategischen Ansätzen erkennbar. Es wird erwartet, daß insbesondere die Verwendung der S-Schichten und Lipide der Archaea, die unter extremsten Umweltbedingungen (z. B. bei pH-Werten < 1, bei Temperaturen bis 110°C oder in konzentrierten Salzlösungen) vorkommen, zur Entwicklung technologisch relevanter Membransysteme führen.

Analog zu S-Schicht-stabilisierten Lipidmembranen gleichen auch die mit S-Schicht bedeckten Liposomen den Hüllen

vieler Archaea und Viren. Für dieses neue biomimetische System sollten sich vor allem bei Arzneimittelverabreichung und -Targeting, aber auch in der Gentherapie und der Vakzine-Entwicklung interessante Einsatzmöglichkeiten ergeben.

In Zukunft wird besonders der genetischen Manipulation von S-Schicht-Proteinen eine große Bedeutung zukommen. Die Möglichkeit, unter Erhaltung der natürlichen Selbstorganisations-Eigenschaften S-Schicht-Proteine durch gerichtete Mutagenese zu verändern, eröffnet völlig neue Möglichkeiten struktureller und funktioneller Modifikationen. Der Einbau von Peptidsequenzen, die spezifischen funktionellen Domänen anderer Proteine entsprechen, sollte es ermöglichen, völlig neue Affinitätsstrukturen und Enzymmembranen, Matrices für das selektive Binden von Ionen, Mikrocarrier, Biosensoren, Diagnostika, Vakzine, biokompatible Oberflächen und bioadsorbierende Systeme für die Regeneration von Gewebe zu entwickeln.<sup>[11]</sup> Schließlich ermöglicht die Verwendung von S-Schichten auch alternative Strategien zur Nanostrukturierung von Oberflächen, zum Kopieren von biologischen Mustern und zur Bildung von regelmäßigen Anordnungen von Metallclustern, wie sie in der nichtlinearen Optik und Nanoelektronik benötigt werden.<sup>[212]</sup>

*In diesem Aufsatz zitierte Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich (Projekt S72) sowie das Österreichische Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr und das Bundesministerium für wirtschaftliche Angelegenheiten unterstützt.*

Eingegangen am 24. Juni 1998 [A288]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1034–1054

Übersetzt von Dr. Christina Schäffer, Wien

- [1] C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4576–4579.
- [2] O. Kandler in *Thermophiles. The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life?* (Hrsg.: J. Wiegand, M. W. W. Adams), Taylor & Francis, London, **1998**, S. 19–31.
- [3] T. J. Beveridge, L. L. Graham, *Microbiol. Rev.* **1991**, 55, 684–705.
- [4] U. B. Sleytr, *Int. Rev. Cytol.* **1978**, 53, 1–64.
- [5] *Crystalline Bacterial Cell Surface Layers* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Springer, Berlin, **1988**, S. 193.
- [6] U. B. Sleytr, R. Ploberger in *Electron Microscopy at Molecular Dimensions* (Hrsg.: W. Baumeister, W. Vogell), Springer, Berlin, **1980**, S. 36–47.
- [7] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára, *Mol. Microbiol.* **1993**, 10, 911–916.
- [8] R. G. E. Murray in *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**, S. 3–9.
- [9] U. B. Sleytr, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 20, 5–12.
- [10] M. Sára, U. B. Sleytr, *Micron* **1996**, 27, 141–156.
- [11] U. B. Sleytr, M. Sára, *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 20–26.
- [12] U. B. Sleytr in *Cytomorphogenesis in Plants, Cell Biology Monographs, Vol. 8* (Hrsg.: O. Kiermayer), Springer, Wien, **1981**, S. 1–26.
- [13] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára in *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Landes/Academic Press, Austin, TX, **1996**, S. 1–33.
- [14] T. J. Beveridge, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 204–212.
- [15] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, *Methods Microbiol.* **1988**, 20, 29–60.
- [16] W. Baumeister, G. Lembecke, R. Dürr, B. Phipps in *Electron Crystallography of Organic Molecules* (Hrsg.: J. R. Fryer, D. L. Dorset), Kluwer, Dordrecht, **1991**, S. 283–296.
- [17] W. Baumeister, G. Lembecke, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, 24, 567–575.
- [18] S. Hövmöller, A. Sjögren, D. N. Wang, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1988**, 51, 131–163.
- [19] „Advances in Paracrystalline Bacterial Surface Layers“: S. Hövmöller, *NATO ASI Ser. Ser. A* **1993**, 252, 13–21.
- [20] *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Landes/Academic Press, Austin, TX, **1996**, Appendix, S. 211–225.
- [21] J. Peters, M. Nitsch, B. Kühlmorgen, R. Golbik, A. Lupas, J. Kellermann, H. Engelhardt, J. P. Pfander, S. Müller, K. Goldie, A. Engel, K. O. Stetter, W. Baumeister, *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 385–401.
- [22] W. Baumeister, I. Wildhaber, B. M. Phipps, *Can. J. Microbiol.* **1989**, 35, 215–227.
- [23] D. Pum, P. Messner, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6865–6873.
- [24] S. F. Koval, R. G. E. Murray, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1984**, 62, 1181–1189.
- [25] S. F. Koval, *Can. J. Microbiol.* **1988**, 34, 407–414.
- [26] P. Messner, U. B. Sleytr, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1992**, 33, 213–275.
- [27] U. B. Sleytr, P. Messner in *Electron Microscopy of Subcellular Dynamics* (Hrsg.: H. Plattner), CRC Press, Boca Raton, FL, **1989**, S. 13–31.
- [28] T. J. Beveridge, R. G. E. Murray, *J. Ultrastruct. Res.* **1976**, 55, 105–118.
- [29] a) S. Schultze-Lam, T. J. Beveridge, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 447–453; b) U. B. Sleytr, M. Sára, D. Pum in *Supramolecular Polymerization* (Hrsg.: A. Ciferri), Dekker, New York, im Druck.
- [30] T. J. Beveridge, *Int. Rev. Cytol.* **1981**, 72, 229–317.
- [31] R. Jaenicke, R. Welsch, M. Sára, U. B. Sleytr, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1985**, 366, 663–670.
- [32] K. Gruber, U. B. Sleytr, *Arch. Microbiol.* **1988**, 149, 485–491.
- [33] L. V. Howard, D. D. Dalton, W. K. McCoubrey, Jr., *J. Bacteriol.* **1982**, 149, 748–757.
- [34] J. Smit, N. Agabian, *J. Cell Biol.* **1982**, 95, 41–49.
- [35] J. Smit, W. J. Todd in *Ultrastructure Techniques for Microorganisms* (Hrsg.: H. C. Aldrich, W. J. Todd), Plenum, New York, **1986**, S. 469–516.
- [36] W. F. Harris, L. E. Scriven, *Nature* **1970**, 228, 827–829.
- [37] F. R. N. Nabarro, W. F. Harris, *Nature* **1971**, 232, 423.
- [38] W. F. Harris, *Sci. Am.* **1977**, 237(6), 130–145.
- [39] D. Pum, P. Messner, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 6865–6873.
- [40] P. Messner, D. Pum, M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1986**, 166, 1046–1054.
- [41] I. Wildhaber, W. Baumeister, *EMBO J.* **1987**, 6, 1475–1480.
- [42] U. B. Sleytr, *Nature* **1975**, 257, 400–402.
- [43] P. Messner in *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Landes/Academic Press, Austin, TX, **1996**, S. 35–76.
- [44] B. Noonan, T. J. Trust, *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, 154, 1–7.
- [45] T. Yasui, K. Yoda, T. Kamiya, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 133, 181–186.
- [46] M. Chami, N. Bayan, J.-C. Dedieu, G. Leblon, E. Shechter, T. Gulik-Krzywicki, *Biol. Cell* **1995**, 83, 219–229.
- [47] L. O. Severina, A. A. Senyushkin, G. I. Karavaiko, *Microbiology* **1995**, 64, 280–283.
- [48] S. N. Wai, A. Takade, S. Fujimoto, K. Amako, *Microbiol. Immunol.* **1995**, 39, 943–949.
- [49] M. Cerquetti, A. Sebastianelli, A. Molinari, A. Gelosia, G. Donelli, P. Mastrantonio, *Microecol. Ther.* **1995**, 25, 164–167.
- [50] W.-M. Ching, H. Wang, B. Jan, G. A. Dasch, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 1413–1419.
- [51] H. Nitta, S. C. Holt, J. L. Ebersole, *Infect. Immun.* **1997**, 65, 478–483.
- [52] S. Nakamura, S. Mizutani, H. Wakai, H. Kawasaki, R. Aono, K. Horikoshi, *Biotechnol. Lett.* **1995**, 17, 705–706.
- [53] D. W. Grogan, *Can. J. Microbiol.* **1996**, 42, 1163–1171.
- [54] *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**.
- [55] U. B. Sleytr, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 20, 5–12.



- [56] G. Bröckl, M. Behr, S. Fabry, R. Hensel, H. Kaudewitz, E. Biendl, H. König, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199, 147–152.
- [57] H. J. Boot, P. H. Pouwels, *Mol. Microbiol.* **1996**, 21, 1117–1123.
- [58] B. Noonan, T. J. Trust, *J. Mol. Biol.* **1995**, 248, 316–327.
- [59] S. R. Thomas, T. J. Trust, *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 568–581.
- [60] P. Messner, U. B. Sleytr, *Glycobiology* **1991**, 1, 545–551.
- [61] M. Sumper, F. T. Wieland in *Glycoproteins* (Hrsg.: J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam, **1995**, S. 455–473.
- [62] J. Peters, W. Baumeister, A. Lupas, *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 1031–1041.
- [63] H. Wakai, S. Nakamura, H. Kawasaki, K. Takada, S. Mizutani, R. Aono, K. Horikoshi, *Extremophiles* **1997**, 1, 29–35.
- [64] P. Messner, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 3–11.
- [65] S. Moens, J. Vanderleyden, *Arch. Microbiol.* **1997**, 168, 169–175.
- [66] P. Messner, U. B. Sleytr in *Bacterial Cell Surface Techniques* (Hrsg.: I. C. Hancock, I. R. Poxton), Wiley, Chichester, **1988**, S. 97–104.
- [67] M. Sára, U. B. Sleytr, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, 65, 83–111.
- [68] K. Bock, J. Schuster-Kolbe, E. Altman, G. Allmaier, B. Stahl, R. Christian, U. B. Sleytr, P. Messner, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 7137–7144.
- [69] R. Christian, G. Schulz, F. M. Unger, P. Messner, Z. Küpcü, U. B. Sleytr, *Carbohydr. Res.* **1986**, 150, 265–272.
- [70] P. Messner, U. B. Sleytr, *FEBS Lett.* **1988**, 228, 317–320.
- [71] a) P. Kosma, C. Neuninger, R. Christian, G. Schulz, P. Messner, *Glycoconjugate J.* **1995**, 12, 99–107; b) C. Schäffer, N. Müller, R. Christian, M. Graninger, T. Wugeditsch, A. Scheberl, P. Messner, *Glycobiology*, im Druck.
- [72] P. Kosma, T. Wugeditsch, R. Christian, S. Zayni, P. Messner, *Glycobiology* **1995**, 5, 791–796.
- [73] a) T. Wugeditsch, Dissertation, Universität für Bodenkultur, Wien, **1998**; b) T. Wugeditsch, N. E. Zachara, M. Puchberger, P. Kosma, A. A. Gooley, P. Messner, *Glycobiology*, im Druck.
- [74] E. Altman, J.-R. Brisson, P. Messner, U. B. Sleytr, *Biochem. Cell Biol.* **1991**, 69, 72–78.
- [75] P. Messner, R. Christian, C. Neuninger, G. Schulz, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 2188–2193.
- [76] R. Christian, P. Messner, C. Weiner, U. B. Sleytr, G. Schulz, *Carbohydr. Res.* **1988**, 176, 160–163.
- [77] P. Messner, R. Christian, J. Kolbe, G. Schulz, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 2236–2240.
- [78] R. Christian, G. Schulz, J. Schuster-Kolbe, G. Allmaier, E. R. Schmid, U. B. Sleytr, P. Messner, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 1250–1256.
- [79] E. Altman, J.-R. Brisson, S. M. Gagné, J. Kolbe, P. Messner, U. B. Sleytr, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1117, 71–77.
- [80] E. Altman, J.-R. Brisson, P. Messner, U. B. Sleytr, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 188, 73–82.
- [81] E. Altman, C. Schäffer, J.-R. Brisson, P. Messner, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, 308–315.
- [82] P. Messner, K. Bock, R. Christian, G. Schulz, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 2576–2583.
- [83] A. Möschl, C. Schäffer, U. B. Sleytr, P. Messner, R. Christian, G. Schulz in *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**, S. 281–284.
- [84] M. Sumper in *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**, S. 303–305.
- [85] U. Kärcher, H. Schröder, E. Haslinger, G. Allmaier, R. Schreiner, F. Wieland, A. Haselbeck, H. König, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 26821–26826.
- [86] C. R. H. Raetz, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 129–170.
- [87] C. Schäffer, H. Kählig, R. Christian, G. Schulz, S. Zayni, P. Messner, *Microbiology*, im Druck.
- [88] a) P. Messner, U. B. Sleytr, R. Christian, G. Schulz, F. M. Unger, *Carbohydr. Res.* **1987**, 168, 211–218; b) M. Sára, C. Dekitsch, H. F. Mayer, E. M. Egelseer, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 4146–4153.
- [89] C. Kuntz, J. Sonnenbichler, I. Sonnenbichler, M. Sumper, R. Zeitler, *Glycobiology* **1997**, 7, 897–904.
- [90] E. Hartmann, H. König, *Arch. Microbiol.* **1989**, 151, 274–281.
- [91] E. Hartmann, P. Messner, G. Allmaier, H. König, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 4515–4519.
- [92] C. Schäffer, T. Wugeditsch, C. Neuninger, P. Messner, *Microb. Drug Resist.* **1996**, 2, 17–23.
- [93] B. Kuen, W. Lubitz in *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Landes/Academic Press, Austin, TX, **1996**, S. 77–102.
- [94] S. Chu, S. Chavaignac, J. Feutrier, B. Phipps, M. Kostrzynska, W. W. Kay, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 15258–15265.
- [95] I. Etienne-Toumelin, J.-C. Sirard, E. Duflo, M. Mock, A. Fouet, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 614–620.
- [96] S. Mesnage, E. Tosi-Couture, M. Mock, P. Gounon, A. Fouet, *Mol. Microbiol.* **1997**, 23, 1147–1155.
- [97] A. Tsuboi, R. Uchichi, R. Tabata, Y. Takahashi, H. Hashiba, Y. Sasaki, H. Yamagata, N. Tsukagoshi, S. Uda, *J. Bacteriol.* **1986**, 168, 365–373.
- [98] A. Tsuboi, N. Tsukagoshi, S. Uda, *J. Bacteriol.* **1988**, 177, 614–620.
- [99] S. Ebisu, A. Tsuboi, H. Takagi, Y. Naruse, H. Yamagata, N. Tsukagoshi, S. Uda, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 1312–1320.
- [100] X. Zhu, R. R. McVeigh, P. Malath, B. K. Ghosh, *Gene* **1996**, 173, 189–194.
- [101] R. Deblaere (Solvay), EP-B 9500147, **1995**.
- [102] R. D. Bowditch, P. Baumann, A. A. Yousten, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 4178–4188.
- [103] B. Kuen, U. B. Sleytr, W. Lubitz, *Gene* **1994**, 145, 115–120.
- [104] B. Kuen, A. Koch, E. Asenbauer, M. Sára, W. Lubitz, *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 1664–1670.
- [105] M. Jarosch, E. M. Egelseer, D. Mattanovich, U. B. Sleytr, M. Sára, *Mol. Microbiol.* **1999**, eingereicht.
- [106] M. J. Blaser, E. C. Gottschlich, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 14529–14535.
- [107] M. Tummuru, M. J. Blaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7265–7269.
- [108] J. Dworkin, M. Tummuru, M. J. Blaser, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 15093–15101.
- [109] B. Wang, E. Kraig, D. Kolodrubetz, *Infect. Immun.* **1998**, 66, 1521–1526.
- [110] A. Gilchrist, J. A. Fisher, J. Smit, *Can. J. Microbiol.* **1992**, 38, 193–202.
- [111] J. L. Peyret, N. Bayran, G. Joliff, T. Gulik-Krzywieki, L. Mathieu, E. Schechter, G. Leblon, *Mol. Microbiol.* **1993**, 9, 97–109.
- [112] J. Peters, M. Peters, F. Lottspeich, W. Baumeister, *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 5216–5223.
- [113] J. Lechner, M. Sumper, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 9724–9729.
- [114] M. Sumper, E. Berg, R. Mengele, I. Strobel, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 7111–7118.
- [115] H. J. Boot, C. P. A. Kolen, P. H. Pouwels, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 7222–7230.
- [116] G. Vidgren, I. Palva, R. Pakkanen, K. Lounatmaa, A. Palva, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7419–7425.
- [117] M. S. Turner, P. Timmis, C. M. Hafner, P. M. Giffard, *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 3310–3316.
- [118] M. L. Callegari, B. Riboli, J. W. Sanders, P. S. Cocconelli, J. Kok, G. Veruma, L. Morelli, *Microbiol.* **1998**, 144, 719–726.
- [119] L. Morelli, M. L. Callegari, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 20, 118–121.
- [120] J. Konisky, D. Lynn, M. Hoppert, F. Mayer, P. Horney, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 1790–1792.
- [121] R. Yao, A. J. Macario, E. Conway de Macario, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1219, 697–700.
- [122] M. Carl, W.-M. Ching, M. E. Dobson, G. A. Dasch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8237–8241.
- [123] R. D. Gilmore, N. Joste, G. A. McDonald, *Mol. Microbiol.* **1989**, 3, 1579–1586.
- [124] M. J. Hahn, K. K. Kim, I. Kim, W. H. Chang, *Gene* **1993**, 133, 129–133.
- [125] J. Peters, W. Baumeister, A. Lupas, *J. Mol. Biol.* **257**, 1031–1041.
- [126] J. Peters, M. Peters, F. Lottspeich, W. Baumeister, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 6307–6315.
- [127] M. L. M. Faraldo, M. A. de Pedro, J. Berenguer, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7458–7462.

- [128] E. M. Egelseer, K. Leitner, M. Jarosch, C. Hotzy, S. Zayni, U. B. Sleytr, M. Sára, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1488–1495.
- [129] H. J. Boot, C. P. A. M. Kolen, P. H. Pouwels, *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 799–809.
- [130] M. Kahala, K. Savijoki, A. Palva, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 284–286.
- [131] T. Adachi, H. Yamagata, N. Tsukagoshi, S. Udaka, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1010–1016.
- [132] J. Dworkin, M. J. Blaser, *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 433–440.
- [133] J. D. Dubreuil, M. Kostrzynska, J. W. Austin, T. J. Trust, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 5035–5043.
- [134] J. Dworkin, M. Tummuru, M. J. Blaser, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 1734–1741.
- [135] M. Tummuru, M. J. Blaser, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5916–5922.
- [136] M. Fujita, T. Morooka, S. Fujimoto, T. Moriya, K. Amako, *Arch. Microbiol.* **1995**, *164*, 444–447.
- [137] M. J. Blaser, J. Dworkin, *Mol. Microbiol.* **1996**, *19*, 1241–1253.
- [138] J. Dworkin, M. J. Blaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 985–990.
- [139] M. Sára, B. Kuen, H. Mayer, F. Mandl, K. C. Schuster, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 2108–2117.
- [140] K. C. Schuster, H. F. Mayer, W. A. Hampel, M. Sára, *J. Biotechnol.* **1997**, *54*, 15–28.
- [141] W. Ries, C. Hotzy, I. Schocher, U. B. Sleytr, M. Sára, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3892–3898.
- [142] H. Scholz, B. Kuen, W. Lubitz, M. Sára, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 69–78.
- [143] M. Firtel, G. Southam, G. Harauz, T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7550–7555.
- [144] M. Firtel, G. Southam, G. Harauz, T. J. Beveridge, *J. Struct. Biol.* **1994**, *112*, 160–171.
- [145] M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 4092–4098.
- [146] A. Breitwieser, K. Gruber, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 8008–8015.
- [147] L. L. Graham, T. J. Beveridge, N. Nanninga, *TIBS* **1991**, *16*, 328–329.
- [148] M. Sára, D. Pum, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3487–3493.
- [149] J. Mayr, A. Lupas, J. Kellermann, C. Eckerskorn, W. Baumeister, J. Peters, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 739–749.
- [150] B. M. Phipps, R. Huber, W. Baumeister, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 253–265.
- [151] B. M. Phipps, H. Engelhardt, R. Huber, W. Baumeister, *J. Struct. Biol.* **1992**, *103*, 152–159.
- [152] S. F. Koval in *Advances in Paracrystalline Bacterial Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**, S. 85–92.
- [153] S. F. Koval, S. H. Hynes, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2244–2245.
- [154] C. Schneitz, L. Nuotio, K. Lounatmaa, *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *74*, 290–294.
- [155] T. Toba, R. Virkda, B. Westerlund, Y. Björkman, J. Sillanpää, T. Vartio, N. Kalkinen, T. K. Korkonen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2467–2471.
- [156] A. Kotiranta, K. Lounatmaa, E. Kerosuo, M. Haapasalo, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 110–114.
- [157] C. B. Munn, E. E. Ishiguro, W. W. Kay, T. J. Trust, *Infect. Immun.* **1982**, *36*, 1069–1075.
- [158] E. Egelseer, I. Schocher, M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1995**, *174*, 1444–1451.
- [159] E. Egelseer, I. Schocher, U. B. Sleytr, M. Sára, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5602–5609.
- [160] S.-Y. Liu, F. Gherardini, M. Matuschek, H. Bahl, J. Wiegand, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1539–1547.
- [161] M. Matuschek, G. Burchhardt, K. Sahm, H. Bahl, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3295–3302.
- [162] E. Leibovitz, H. Ohayon, P. Gounon, P. Beguin, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2519–2523.
- [163] S. Schultze-Lam, G. Harauz, T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7971–7981.
- [164] P. Doig, L. Emödy, T. J. Trust, *J. Biol. Chem.* **267**, 43–49.
- [165] R. A. Garduño, B. M. Phipps, W. W. Kay, *Can. J. Microbiol.* **1994**, *40*, 622–629.
- [166] T. J. Trust, M. Kostrzynska, L. Emödy, W. W. Kay, *Mol. Microbiol.* **1993**, *7*, 593–600.
- [167] M. Carl, G. A. Dasch, *Autoimmunity* **1989**, *2*, 81–91.
- [168] T. Pink, K. Langer, C. Hotzy, M. Sára, *J. Biotechnol.* **1996**, *50*, 189–200.
- [169] B. Kuen, M. Sára, W. Lubitz, *Mol. Microbiol.* **1996**, *19*, 495–503.
- [170] D. Pum, M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 5296–5303.
- [171] M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Membrane Sci.* **1987**, *33*, 27–49.
- [172] U. B. Sleytr, M. Sára, US-A 4 886 604, **1989**.
- [173] S. Weigert, M. Sára, *J. Membrane Sci.* **1995**, *106*, 147–159.
- [174] S. Weigert, M. Sára, *J. Membrane Sci.* **1996**, *121*, 185–196.
- [175] A. Breitwieser, S. Küpcü, S. Howorka, S. Weigert, C. Langer, K. Hoffmann-Sommergruber, O. Scheiner, U. B. Sleytr, M. Sára, *Bio/Techniques* **1996**, *21*, 918–925.
- [176] S. Küpcü, C. Mader, M. Sára, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1995**, *21*, 275–286.
- [177] S. Küpcü, M. Sára, U. B. Sleytr, *J. Immunol. Meth.* **1996**, *196*, 73–84.
- [178] M. Sára, U. B. Sleytr, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *30*, 184–189.
- [179] C. Weiner, M. Sára, U. B. Sleytr, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 321–330.
- [180] C. Weiner, M. Sára, G. Dasgupta, U. B. Sleytr, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44*, 55–65.
- [181] A. Breitwieser, C. Mader, I. Schocher, K. Hoffmann-Sommergruber, O. Scheiner, W. Aberer, U. B. Sleytr, M. Sára, *Allergy* **1998**, *53*, 786–793.
- [182] J. C. Thornton, R. A. Garduño, S. G. Newman, W. W. Kay, *Microb. Pathog.* **1991**, *11*, 85–99.
- [183] B. Jahn-Schmid, P. Messner, F. M. Unger, U. B. Sleytr, O. Scheiner, D. Kraft, *J. Biotechnol.* **1996**, *44*, 225–231.
- [184] U. B. Sleytr, H. Bayley, M. Sára, A. Breitwieser, S. Küpcü, C. Mader, S. Weigert, F. M. Unger, P. Messner, B. Jahn-Schmid, B. Schuster, D. Pum, K. Douglas, N. A. Clark, J. T. Moore, T. A. Winningham, S. Levy, I. Frithsen, J. Pankovc, P. Beagle, H. P. Gillis, D. A. Choutov, K. P. Martin, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 151–175.
- [185] U. B. Sleytr, W. Mundt, P. Messner, EP-B 0 306 473 Bl, **1993**.
- [186] U. B. Sleytr, W. Mundt, P. Messner, R. H. Smith, F. M. Unger, US-A 5,043,158, **1991**.
- [187] R. H. Smith, P. Messner, L. R. Lamontagne, U. B. Sleytr, F. M. Unger, *Vaccine* **1993**, *11*, 919–924.
- [188] A. J. Malcolm, M. W. Best, R. J. Szarka, Z. Mosleh, F. M. Unger, P. Messner, U. B. Sleytr in *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers* (Hrsg.: T. J. Beveridge, S. F. Koval), Plenum, New York, **1993**, S. 219–233.
- [189] C. Ebner, S. Schenk, N. Najafian, U. Siemann, R. Steiner, G. W. Fischer, K. Hoffmann, Z. Szépfalusi, O. Scheiner, D. Kraft, *J. Immunol.* **1995**, *154*, 1932–1940.
- [190] B. Jahn-Schmid, U. Siemann, A. Zenker, B. Bohle, P. Messner, F. M. Unger, U. B. Sleytr, O. Scheiner, D. Kraft, C. Ebner, *Int. Immunol.* **1997**, *9*, 1867–1874.
- [191] H. F. Knapp, W. Wiegand, M. Heim, R. Eschrich, R. Guckenberger, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 708–715.
- [192] X. Lu, A. Leimannova-Ottova, H. T. Tien, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *39*, 285–289.
- [193] D. Pum, M. Weinhandl, C. Hödl, U. B. Sleytr, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2762–2766.
- [194] D. Pum, U. B. Sleytr, *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 882–886.
- [195] E. E. Uzgir, R. D. Kornberg, *Nature* **1983**, *301*, 125–129.
- [196] H. O. Ribi, P. Reichard, R. D. Kornberg, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7974–7979.
- [197] S. A. Darst, M. Ahlers, P. H. Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf, R. D. Kornberg, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 387–396.
- [198] B. Wetzler, A. Pfandler, E. Györvary, D. Pum, M. Lösche, U. B. Sleytr, *Langmuir* **1998**, *14*, 6899–6909.
- [199] B. Wetzler, D. Pum, U. B. Sleytr, *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 123–128.
- [200] D. Pum, U. B. Sleytr in *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins* (Hrsg.: U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára), Landes/Academic Press, Austin, TX, **1996**, S. 175–209.
- [201] A. Diederich, C. Sponer, D. Pum, U. B. Sleytr, M. Lösche, *Colloids Surf. B* **1996**, *6*, 335–346.
- [202] M. Weygand, B. Wetzler, D. Pum, U. B. Sleytr, N. Cuvillier, K. Kjaer, P. B. Howes, M. Lösche, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 458–468.
- [203] E. Györvary, B. Wetzler, U. B. Sleytr, A. Sinner, A. Offenhäusser, W. Knoll, *Langmuir* **1999**, im Druck.

- [204] T. Hianik, S. Küpcü, U. B. Sleytr, P. Rybár, R. Krivánek, U. Kaatz, *Colloid Surf. A* **1998**, im Druck.
- [205] S. Küpcü, K. Lohner, C. Mader, U. B. Sleytr, *Mol. Membrane Biol.* **1998**, *15*, 69–74.
- [206] B. Schuster, D. Pum, U. B. Sleytr, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1369*, 51–60.
- [207] B. Schuster, D. Pum, O. Braha, H. Bayley, U. B. Sleytr, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1370*, 280–288.
- [208] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43–48.
- [209] W. Göpel, P. Heiduschka, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 853–883.
- [210] S. Küpcü, M. Sára, U. B. Sleytr, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 263–269.
- [211] a) F. J. Nomellini, S. Küpcü, U. B. Sleytr, J. Smit, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6349–6354; b) C. Mader, S. Küpcü, M. Sára, U. B. Sleytr, *Biochim. Biophys. Acta*, im Druck.
- [212] D. Pum, U. B. Sleytr, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 8–12.
- [213] D. Pum, U. B. Sleytr, *Supramol. Sci.* **1995**, *2*, 193–197.
- [214] D. Pum, G. Stangl, C. Sponer, W. Fallmann, U. B. Sleytr, *Colloids Surf. B* **1996**, *8*, 157–162.
- [215] G. N. Taylor, R. S. Hutton, S. M. Stein, H. E. Katz, M. L. Schilling, T. M. Putvinski, *Microelectron. Eng.* **1994**, *23*, 259–262.
- [216] J. M. Calvert, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1993**, *11*, 2155–2163.
- [217] D. Pum, G. Stangl, C. Sponer, K. Riedling, P. Hudek, W. Fallmann, U. B. Sleytr, *Microelectron. Eng.* **1997**, *35*, 297–300.
- [218] K. Nagayama, *Nanobiology* **1992**, *1*, 25–37.
- [219] J. P. Spatz, A. Roescher, R. Möller, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 334–337.
- [220] R. P. Andres, J. D. Bielefeld, J. I. Henderson, D. B. Janes, V. R. Kolagunta, C. P. Kubiak, W. J. Mahoney, R. G. Osifchin, *Science* **1996**, *273*, 1690–1693.
- [221] R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, R. Wahl, G. Sadowski, K. J. Böhm, E. Unger, *Thin Solid Films* **1997**, *305*, 248–253.
- [222] W. Shenton, D. Pum, U. B. Sleytr, S. Mann, *Nature* **1997**, *389*, 585–587.
- [223] S. Dieluweit, D. Pum, U. B. Sleytr, *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 15–19.
- [224] K. Douglas, N. A. Clark, *Appl. Phys. Lett.* **1986**, *48*, 676–678.
- [225] K. Douglas, G. Devaud, N. A. Clark, *Science* **1992**, *257*, 642–644.
- [226] T. A. Winningham, H. P. Gillis, D. A. Choutov, K. P. Marzin, J. T. Moore, K. Douglas, *Surf. Sci.* **1998**, *406*, 221–228.
- [227] S. I. Stupp, V. LeBonheur, K. Walker, L. S. Li, K. E. Huggins, M. Keser, A. Amstutz, *Science* **1997**, *276*, 384–389.
- [228] W. Knoll, L. Angermaier, G. Batz, T. Fritz, S. Fujisawa, T. Furuno, H.-J. Guder, M. Hara, M. Liley, K. Niki, J. Spinke, *Synth. Met.* **1993**, *61*, 5–11.