

WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE BERICHTE

FZR-358

Oktober 2002

ISSN 1437-322X

Archiv-Ex.:



Johannes Raff

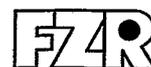
**Wechselwirkungen der Hüllproteine von
Bakterien aus Uranabfallhalden mit
Schwermetallen**

Herausgeber:
Forschungszentrum Rossendorf e.V.
Postfach 51 01 19
D-01314 Dresden
Telefon +49 351 26 00
Telefax +49 351 2 69 04 61
<http://www.fz-rossendorf.de/>

Als Manuskript gedruckt
Alle Rechte beim Herausgeber

FORSCHUNGSZENTRUM ROSSENDORF

WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE BERICHTE



FZR-358

Oktober 2002

Johannes Raff

**Wechselwirkungen der Hüllproteine von
Bakterien aus Uranabfallhalden mit
Schwermetallen**

Dissertation

**Wechselwirkungen
der Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden
mit Schwermetallen**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt

von Dipl. Biol. Johannes Raff

geboren am 23. Juli 1969 in Aalen

Dekan: Prof. Dr. Martin Schlegel

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Prof. Dr. Hubert Bahl

Dr. Sonja Selenska-Pobell

Tag der Verteidigung : 06. September 2002

Für meine Eltern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. U. Hahn für die Betreuung meiner Promotion sowie sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch der Leiterin unserer Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie, Frau Dr. S. Selenska-Pobell, für ihr persönliches Engagement, die Gewährung eines großen persönlichen Freiraums, die vielen fruchtbaren Diskussionen und die gute wissenschaftliche Betreuung.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie, Frau K. Flemming, Frau M. Schnorpfeil und Herrn Dr. M. Merroun und unseren Gästen Frau S. Matys sowie Herrn U. Soltmann möchte ich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre sowie die allseits gewährte Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. G. Kampf, Frau S. Kutschke, Frau Dr. J. Wober und Herrn R. Wahl für viele wertvolle Gespräche und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Bernhard, Herrn Dr. C. Hennig und Frau R. Nicolai und sowie allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Radiochemie und des Instituts für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden für die zahlreichen Diskussionen und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft danken.

Außerdem möchte ich meinen Freunden Frau K. Fleischer und Herrn M. Schmidt für die moralische Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen beiden Brüdern und meiner Freundin T. Birk, deren Unterstützung, liebevolle Geduld und Verständnis zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden durch das SMWK-Fördervorhaben 4-7531.50-03-0370/708 des Sächsischen Staatsministeriums für Wissenschaft und Kunst unterstützt.

Bibliographische Beschreibung:

Raff, Johannes

Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden mit Schwermetallen

155 Seiten, 206 Literaturangaben, 71 Abbildungen, 8 Tabellen.

Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Dissertation

Inhaltsverzeichnis	i
Zusammenfassung	vii
Verwendete Abkürzungen und Symbole	viii
1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle Hüllproteine (S-Layer)	1
1.1.1 Biochemie und molekulare Biologie bakterieller Hüllproteine	1
1.1.2 Anwendung bakterieller Hüllproteine	12
1.2 Perspektiven zur Bioremediation radionuklid- und schwermetallbe- lasteter Abwässer mittels Bakterienisolaten von Uranabfallhalden	14
2 Zielsetzung der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Auswahl der Versuchsobjekte	18
3.2 Organismen und Zellanzucht	18
3.2.1 Anzucht der <i>Bacillus</i> - und <i>Sporosarcina</i> -Stämme	19
3.2.2 Ernte und Aufbewahrung der Zellen	19
3.2.3 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	19
3.3 Isolierung von Sporen	20
3.4 Isolierung von Hüllproteinen und Hüllproteinschichten	20
3.4.1 Allgemeine Isolierungsbedingungen	20
3.4.2 Herstellung von Zellextrakten	21
3.4.2.1 Mechanischer Zellaufschluß	21
3.4.2.2 Zellaufschluß mit Guanidiniumhydrochlorid	21
3.4.3 Präparation der Hüllproteinschichten und Lagerung	21
3.5 Rekrystallisation von Hüllproteingittern	22
3.5.1 Solubilisierung der Hüllproteine	22
3.5.2 Dialyse der Proteinproben und Rekrystallisation	23
3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	23
3.7 Bestimmung von Trockengewichten	24

3.8	Analyse von Proteinlösungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.8.1	Herstellung der Gele	25
3.8.2	Probenbehandlung und Durchführung der Elektrophorese	26
3.8.3	Unspezifische Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue R 250	27
3.8.4	Unspezifische Silberfärbung	27
3.8.5	Spezifische Färbung von Glykoproteinen	29
3.8.6	Videodensitometrischer Scan und computergestützte Auswertung der Proteinprofile im Polyacrylamidgele	30
3.9	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	30
3.9.1	Präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.9.2	Western-Blot	31
3.9.3	Färben und Entfärben der PVDF-Membran	32
3.9.4	Sequenzanalyse der N-terminalen Aminosäuren	32
3.10	Limitierte Proteolyse von Hüllproteinen	33
3.10.1	Vorbehandlung der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin	33
3.10.2	Verdau der Hüllproteine	33
3.11	Stabilisierung nativer Hüllproteingitter von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	34
3.11.1	Vernetzung mit Glutardialdehyd.....	34
3.11.2	Vernetzung mit 1-Ethyl-3-(N,N'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid	36
3.11.3	Untersuchungen zur pH-Stabilität der Hüllproteingitter	37
3.12	DNA-Isolierung	37
3.13	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.13.1	Herstellung konventioneller Agarose-Gele	37
3.13.2	Herstellung von Gelen zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten	38
3.14	Sequenzanalysen der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	39
3.14.1	Primerdesign auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenzen	39
3.14.2	Amplifikation von DNA mittels PCR	40
3.14.3	Reinigung der Amplifikate	41

3.14.4	Sequenzierung	41
3.15	Identifikation und Differenzierung von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 mittels PCR und RFLP	43
3.16	Mikroskopische Untersuchungen	43
3.16.1	REM-Abbildung intakter Bakterien	43
3.16.2	AFM-Abbildung intakter Bakterien und isolierter Hüllproteinschichten	44
3.16.3	TEM-Abbildung isolierter Hüllproteinschichten	44
3.17	Untersuchungen zu den Wechselwirkungen intakter Hüllprotein- schichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 mit Metallen	45
3.17.1	Metallisierung der Hüllproteinschichten mit Platin oder Palladium	45
3.17.2	Inkubation der Hüllproteinschichten mit Uran	45
3.18	Spektroskopische Untersuchungen der nativen und quervernetzten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 und ihrer Metall-Protein-Komplexe	47
3.18.1	UV/VIS-Spektroskopie	47
3.18.2	IR-Spektroskopie	47
3.18.3	Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) der Protein-Metall- Komplexe	48
3.19	Bestimmung der Phosphorgehalte ganzer Zellen, Sporen, Zellwände und nativer Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 mittels Massenspektroskopie (ICP-MS)	49
3.20	Immobilisierung von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602-Zellen, Sporen und ihrer Hüllproteinschichten in SiO ₂ - Xerogelen	49
3.20.1	Herstellung von Sol-Gel-Keramiken	49
3.20.2	Herstellung von Bioceren mit intakten Zellen, Sporen oder stabili- sierten Hüllproteinschichten	50
3.20.3	Mikroskopische Charakterisierung der Biocere	51
3.20.4	Bestimmung der metallbindenden Kapazitäten von Xerogelen und Bioceren	51
3.21	Chemikalien	52

4	Experimente und Ergebnisse	53
4.1	Charakterisierung verschiedener Bacillus-Haldenisolate und Referenzstämme	53
4.1.1	Wachstumskurve von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	53
4.1.2	Nachweis der Hüllproteine im Proteinprofil des zellfreien Rohextrakts	54
4.2	Entwicklung einer schnellen Methode zum Nachweis von Hüllproteinen an Zellen mittels AFM und TEM	56
4.3	Charakterisierung der gereinigten Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	59
4.3.1	Reinheitskontrolle und Abschätzung des Molekulargewichts der gereinigten Hüllproteine mittels SDS-PAGE	58
4.3.2	Ausbeute der Hüllproteinisolierung	60
4.3.3	Glykosylierung der Hüllproteine	61
4.4	Stabilität nativer und vernetzter Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 in Abhängigkeit vom pH-Wert	63
4.5	N-terminale Aminosäuresequenz der nativen Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	67
4.6	Proteolytische Analyse der Hüllproteine des Haldenisolats <i>B. sphaericus</i> JG-A12 im Vergleich zu den Hüllproteinen der Referenzstämme <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602, <i>B. sphaericus</i> WHO 2362 und <i>B. sphaericus</i> CCM 2177	68
4.6.1	Limitierte Proteolyse der Hüllproteine mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin	69
4.6.2	N-terminale Aminosäuresequenzen ausgewählter Fragmente des proteolytischen Verdaus	73
4.7	Primerdesign auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenzen der nativen Hüllproteine und proteolytischen Fragmente	76
4.8	Nukleinsäuresequenzen von Teilen der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	78
4.8.1	Nukleinsäuresequenzen des 5'-Endes des strukturellen Teils der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	78

4.8.2	Nukleinsäuresequenzen der zentralen Region des strukturellen Teils der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	81
4.8.3	Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der entschlüsselten Teile der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	82
4.9	Alignment der N-terminalen Teile der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine der <i>B. sphaericus</i> Stämme JG-A12 und NCTC 9602 mit bereits sequenzierten Hüllproteinen anderer <i>B. sphaericus</i> Stämme	83
4.10	Nachweis und spezifische Diskriminierung von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 mittels PCR-RFLP der Hüllproteingene	85
4.11	Wechselwirkungen von Metallionen mit Hüllproteinen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	86
4.11.1	IR-Analysen von Uran-Hüllprotein-, Palladium-Hüllprotein- und Platin-Hüllprotein-Komplexen	87
4.11.1.1	IR-Analysen von Uran-Hüllprotein-Komplexen	87
4.11.1.2	IR-Analysen von Palladium-Hüllprotein- und Platin-Hüllprotein-Komplexen	90
4.11.2	Röntgenabsorptionsspektroskopische Analyse (EXAFS) von Uran-Hüllprotein-Komplexen.....	92
4.12	Phosphorgehalte ganzer Zellen, Sporen, Zellwände und isolierter Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	94
4.13	Konstruktion biologisierter Sol-Gel-Keramiken durch die Immobilisierung intakter Zellen, Sporen oder Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 in einer SiO ₂ -Matrix	95
4.13.1	Verteilung der immobilisierten Bakterien, Sporen oder Hüllproteinschichten in der SiO ₂ -Matrix	96
4.13.2	Struktur unterschiedlich hergestellter Biocere	97
4.13.3	Metallbindung der Xerogele, der nativen Biokomponenten und der Biocere	99

4.13.3.1	Lokalisation der gebundenen Metallionen mittels EDX-Analysen	99
4.12.3.2	Metallbindung der Xerogele, der nativen Biokomponenten und der Biocere	100
4.13.3.3	Desorption der gebundenen Metalle von Xerogelen, den nativen Biokomponenten und den Bioceren.....	108
5	Diskussion	112
5.1	Die Hüllproteine der <i>B. sphaericus</i> Stämme JG-A12 und NCTC 9602	112
5.2	Metallbindung an Hüllproteinen und intakten bakteriellen Zellen	123
5.3	Nutzung der Hüllproteine, Sporen oder intakten Zellen für Bio- remediationsprozesse	125
5.4	Ausblick	134
6	Schlussfolgerungen	136
7	Anhang	138
7.1	Abbildungsverzeichnis	138
7.2	Tabellenverzeichnis.....	144
8	Literaturverzeichnis	145

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden isoliert und strukturell sowie molekularbiologisch analysiert werden. Dazu wurden mehrere Haldenisolat der Gattung *Bacillus* hinsichtlich der Existenz von Hüllproteinen hin untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe einer neu entwickelten Methode zum schnellen Nachweis von Hüllproteinen auf Gram-positiven Bakterien. Dabei wird das Peptidoglycan der Zellwand mit Lysozym verdaut und auf diese Weise die Proteinschicht von der Zellwand gelöst. Die freien Schichten können somit im Transmissionselektronenmikroskop oder Atomkraftmikroskop direkt nachgewiesen werden. Es wurde gefunden, dass nur das Isolat *Bacillus sphaericus* JG-A12 eine Hüllproteinschicht mit tetragonaler Symmetrie und einer Gitterkonstante von 12,5 nm besitzt. Die (135±5) kDa schweren Hüllproteinmonomere sind nicht glykosyliert, weisen aber zwei verschieden stabil gebundene Phosphorspezies auf. Mittels molekularbiologischer Analysen konnten Teile der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 (Base 1 bis 1497 des strukturiertcodierenden Teils des Gens) und des nächst verwandten Referenzstamms *B. sphaericus* NCTC 9602 (Base 1 bis 579 des strukturellen Teils des Gens) entschlüsselt werden. Beide Hüllproteine besitzen N-terminal drei S-Layer homologe Domänen und weisen in den Aminosäuren 1-182 nur sehr geringe Identitäten zu bereits entschlüsselten Hüllproteinen anderer *B. sphaericus* Stämme auf. Dem gegenüber ergeben sich hohe Identitäten für die Aminosäuren 183-320 für Hüllproteine mit tetragonaler Symmetrie (Hüllproteine der *B. sphaericus* Stämme P-1 und CCM 2177) und sehr niedrige für das Hüllprotein mit schräger Symmetrie (Hüllprotein von *B. sphaericus* WHO 2362).

Im Hinblick auf katalytische Anwendungen oder der Entwicklung von Bioremediationsverfahren auf der Basis immobilisierter Biokomponenten wurden die Wechselwirkungen von Hüllproteinen mit verschiedenen Metallen untersucht. Es konnten direkte Wechselwirkungen von Palladium, Platin und Uran mit den Hüllproteinen von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen für beide Proteine eine Komplexierung von Platin über CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen und über COOH- und OH-Gruppen. Das Hüllprotein von *B. sphaericus* JG-A12 komplexiert Palladium über NH-Gruppen der Peptidbindung und COOH-Gruppen, während das von *B. sphaericus* NCTC 9602 Palladium sowohl über CO-Gruppen der Peptidbindungen als auch über COOH- und OH-Gruppen bindet. Die Komplexierung von Uran erfolgt vorrangig über NH-Gruppen der Peptidbindungen aber auch über OH- sowie zwei verschiedene PO₄-Gruppen. Um eine Anwendung der metallbindenden Eigenschaften von Hüllproteinen im Rahmen von Bioremediationsprozessen zu ermöglichen, wurden diese mittels Sol-Gel-Technik in einer SiO₂-Matrix immobilisiert und die Sorption und Desorption von Uran und Kupfer untersucht. Zum Vergleich wurden intakte Zellen und Sporen immobilisiert und in die Untersuchungen mit einbezogen. Die biologisierten Keramiken (Biocere) binden 2,7-42fach mehr Uran und Kupfer als andere zur Sanierung verwendete Materialien, wobei die eingebetteten Biokomponenten gegenüber der SiO₂-Matrix deutlich höhere Bindungskapazitäten (intakte Zellen > Hüllprotein = Sporen > SiO₂-Matrix) aufweisen. Weitere Eigenschaften der Biocere sind die vollständige Regenerierbarkeit und die Möglichkeit, die Porosität der Biocere durch Gefriertrocknung oder durch Zusatz von Penetrationsmitteln wie Sorbit variieren zu können. Dies führt zu einer schnelleren Sorption und Desorption des Urans und des Kupfers.

Verwendete Abkürzungen und Symbole

A	Absorption
AFM	Atomic Force Microscope (Atomkraftmikroskop)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
$\chi(k)$	EXAFS-Funktion
$\chi(k) \cdot k^3$	k^3 gewichtete EXAFS-Funktion
ΔE	Energievarianz
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDX	Energy Dispersive X-Ray (Energiedispersive Analyse der Röntgenstrahlung)
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure (Erweiterte Röntgenabsorption-Feinstruktur)
FT	Fourier-Transformation
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
GHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
ICP-MS	Inductive Coupled Plasma Mass Spectroscopy (Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Hochfrequenzplasma)
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IR	Infrarot
k	Betrag des Wellenvektors des Photoelektrons
Da	Dalton
M_r	relatives Molekulargewicht
N	Koordinationszahl
NB	Nutrient Broth (Nährbouillon)
NCTC	National Collection of Type Cultures (Nationale Sammlung von Typus Kulturen)
NIR	nahes Infrarot
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pd	Palladium
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pt	Platin
R	Bindungslänge
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
RT	Raumtemperatur
σ^2	Debye-Waller-Faktor
S-Layer	Surface-Layer (Hüllproteine)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)

5(6)-TAMRA	Gemisch aus 5- und 6-Carboxytetramethylrhodaminsuccinimidylester
TCA	Trichloroacetic Acid (Trichloressigsäure)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N,N,'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uran
UV	Ultraviolett (ultravioletter Spektralbereich)
VIS	Visible (sichtbarer Spektralbereich)
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
v/v	Volume per Volume (Volumen pro Volumen)
w/v	Weight per Volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wild Type (Wildtyp)

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

Symbole für Nucleotide:

A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Hüllproteine (S-Layer)

1.1.1 Biochemie und molekulare Biologie bakterieller Hüllproteine

Allgemeine Eigenschaften

Als bakterielle Hüllproteine oder auch „surface layer“ (S-Layer) bezeichnet man die äußerste Schicht der Zellwand vieler Eubakterien (> 150 Arten) und Archaea (> 40 Arten) (Engelhardt 1988). Es handelt sich dabei nicht um ein katalytisch aktives Protein, sondern um ein Strukturprotein, dessen zweidimensionale parakristalline Gitterstruktur als einfachste und zugleich älteste Form einer biologischen Membran angesehen werden kann. Diese Proteinschicht wurde erstmals durch Houwink (1953) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Spirillum serpens* als hexagonales Gitter beschrieben, setzt sich meist aus einer oder mehreren Spezies von Protein- oder Glykoproteinmolekülen zusammen und überzieht das Bakterium mit einem hoch geordneten Gitter. Unabhängig von der Existenz von Kapseln und Schleimen sitzt die Hüllproteinschicht entweder direkt der Plasmamembran (Archaea), der Außenmembran (Gram-negative Bakterien) oder dem Peptidoglycan (Gram-positive Bakterien) auf (Sleytr et al. 1993). Dazu siehe auch Abb. 1.1.1a

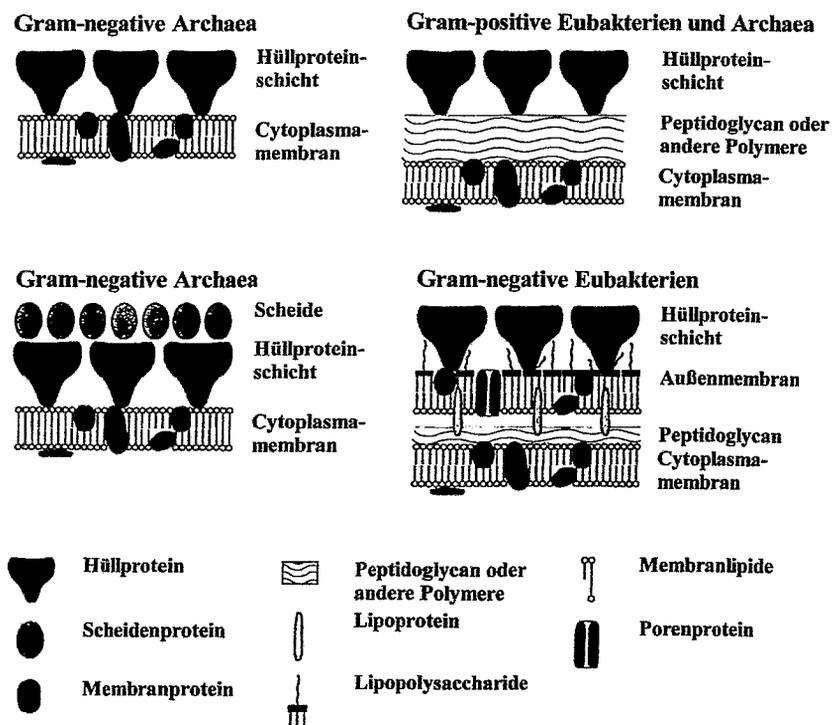


Abb. 1.1.1a: Lokalisation von Hüllproteinen auf Zellwänden von Archaea und Eubakterien (Sleytr et al. 1993).

Das Gitter kann dabei theoretisch verschiedene Symmetrien annehmen: triklin (p1), monoklin (p2), trigonal (p3), tetragonal (p4) und hexagonal (p6) (Abb. 1.1.1b). Häufig besitzen die Hüllproteinschichten eine tetragonale oder hexagonale, seltener eine monokline Symmetrie. Hüllproteingitter mit einer p1 Symmetrie wurden bislang nicht beobachtet, und die Existenz einer trigonalen Symmetrie ist umstritten (Baumeister et al. 1989, Messner und Sleytr 1992).

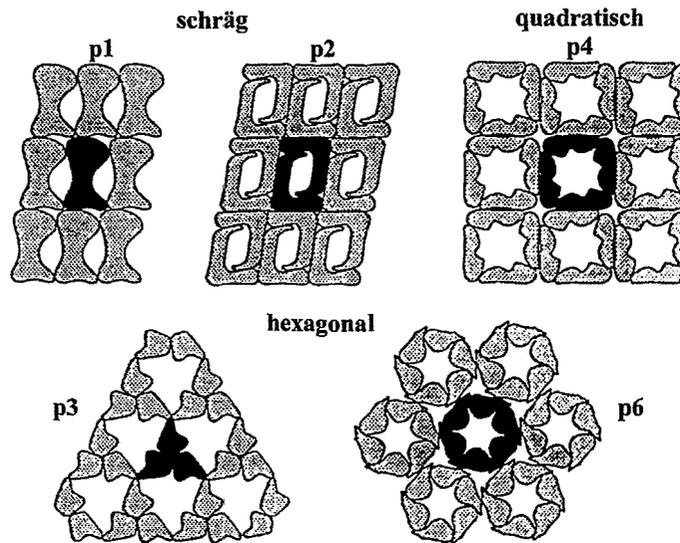


Abb.1.1.1b: Mögliche Symmetrien bakterieller Hüllproteine (Sleytr et al. 1993)

Eine besondere Eigenschaft der Proteinuntereinheiten ist die Fähigkeit, sich unter geeigneten Bedingungen spontan zu einem zweidimensionalen Kristallgitter zusammenzulagern (Pum et al. 1993, Pum und Sleytr 1994, Sleytr und Sára 1997a) und somit charakteristisch geformte Polymere ausbilden zu können (schollen- oder röhrenförmig). In typischen Fällen sind die Hüllproteinschichten 3-40 nm dick und besitzen Gitterkonstanten von 10-40 nm. Kennzeichnend ist außerdem die Existenz 2-8 nm großer Poren, die einen Flächenanteil von 30-70 % ausmachen (Engelhardt 1988, Sleytr 1997b, Sára und Sleytr 2000). Die ungeladene Außenseite der Proteinschicht ist meist glatt, sehr variabel in Struktur und Aminosäurezusammensetzung und wird von der leichten Domäne der Proteinuntereinheit gebildet. Die Innenseite ist negativ geladen, deutlich strukturiert und wird von konservierten Aminosäuren der schweren Domäne der Untereinheit gebildet (Engelhardt 1988). Bei der Bindung der Hüllproteinschicht an der Zellwand handelt es sich um nicht kovalente Wechselwirkungen geringerer Stabilität, während die Bindung der Monomere untereinander durch eine sehr stabile nicht kovalente Wechselwirkung bewerkstelligt wird (Messner und Sleytr 1992). Nur bei den Archaea wird die kovalente Bindung der Monomere untereinander vermutet (König 1988, Beveridge 1994).

Das Hüllprotein macht insgesamt einen Anteil von 10-15 % am Gesamtprotein des Bakteriums aus. Die Untereinheiten können Molekulargewichte von 40-500 kDa besitzen und haben ihren isoelektrischen Punkt bei pH 3-6. Häufige Aminosäuren sind Lysin (10 mol%), Threonin (8-12 mol%), Glutaminsäure und Asparaginsäure (15 mol%) sowie hydrophobe Aminosäuren (40-60%) (Engelhardt 1988, Messner und Sleytr 1992, Sleytr 1997b, Sára und Sleytr 2000). Bei Eubakterien sind schwefelhaltige Aminosäuren selten, bei Archaea hingegen häufig. Außerdem sind N-terminal häufig sogenannte S-Layer-homologe (SLH) Domänen vorhanden, die für die Wechselwirkung der Hüllproteine mit der Zellwand oder sekundären Zellwandpolymeren relevant sind (Engelhardt 1998, Mesnage et al. 2000, 2001). Die SLH-Motive sind auch typisch für extrazelluläre Proteine oder Membranproteine, sind jedoch in diesem Fall C-terminal lokalisiert. Die Sekundärstruktur besteht typischerweise aus ca. 20 % α -Helices, 40 % β -Faltblättern sowie 5-45 % β -Turns und nicht periodischen Strukturen (Engelhardt 1988, Sleytr 1997b, Sára und Sleytr 2000).

Funktion

Insbesondere dienen die Hüllproteinschichten der Formerhaltung und Formgebung, was bei den Archaea von besonderer Bedeutung ist (Wildhaber und Baumeister 1987), da diese außer der Hüllproteinschicht nur die Cytoplasmamembran als Zellwandkomponente besitzen, welche gegenüber einem erhöhten osmotischen Druck oder mechanischer Belastung sehr empfindlich ist. So weit dies untersucht wurde, stellen die Hüllproteine ein universelles Merkmal bei den Archaea dar (Sleytr und Messner 1983, 1988). Außerdem wurde die Bedeutung der Hüllproteine bei pathogenen Keimen nachgewiesen. So stellen die Hüllproteine zum Beispiel bei *Aeromonas salmonicida* ebenso wie die Kapseln und Schleime anderer Bakterien einen Virulenzfaktor dar und bieten einen Schutz gegen die Abwehrmechanismen des betroffenen Organismus (Kay et al. 1981, Noonan und Trust 1997). Die Hüllproteinschichten fungieren außerdem als Schutzhülle gegen parasitäre Bakterien wie zum Beispiel *Bdellovibrio bacteriovorus* (Koval und Murray 1986) oder als Molekularsieb zum Schutz vor lytischem Verdau der Zellwand durch Lysozym. Auf Grund der besonderen Stellung der Hüllproteinschicht als Grenzfläche zwischen Zellinnerem und umgebendem Medium liegt es nahe, dass dieser Schicht auch eine Bedeutung im Hinblick auf die Anheftung der Zelle an Oberflächen zukommt (Baummeister und Hegerl 1986, Baummeister und Engelhardt 1987). Neben der unspezifischen Anheftung der Bakterien an tote Materie, wie Substrat, ist hier die spezifische Anheftung an Gewebe zu nennen, wie es für Krankheitserreger, Symbionten oder Kommensalen von Bedeutung ist.

Die metallbindenden Eigenschaften des Gitters liefern außerdem Hinweise auf eine Funktion als Molekül- und Ionenfalle (Beveridge 1979, Sára und Sleytr 1987a, Sára et al. 1992) zur Bindung relevanter Spurenelemente oder zur Entgiftung von toxischen Metallen durch Bindung dieser Ionen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Stämme der Art *Bacillus cereus* mit Hüllproteinen eine 2,6fach niedrigere Empfindlichkeit gegenüber Gammastrahlung aufweisen, verglichen mit Stämmen ohne Hüllproteinschicht (Kotiranta et al. 1999). Es wird vermutet, dass die Hüllproteinschicht Radikale, die durch die ionisierende Wirkung der Gammastrahlung entstehen, bindet und somit deren negative Wirkung auf die Zelle reduziert. Nicht zuletzt lässt die exponierte Lage und die Regelmäßigkeit der Struktur die Funktion als Trägermatrix für Exoenzyme plausibel erscheinen. Im Falle einer Amylase von *Geobacillus stearothermophilus* DSM 2358 konnte dies bereits belegt werden (Egelseer et al. 1995). Die Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung sind weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass die Glykosylierung als Schutz vor proteolytischem Verdau relevant ist. Anders sieht dies für die posttranslationale Abspaltung von C- oder N-terminalen Fragmenten (Signalpeptiden) aus, die die Information für die Translokation des Hüllprotein-Vorläufers durch die Cytoplasmamembran tragen und während des Transports abgespalten werden. Hinsichtlich der möglichen Funktionen der Hüllproteinschichten gilt nur als gesichert, dass die Hüllproteine multifunktionell sind. Während vieler Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass die Bakterien oftmals bei langer Kultivierung im Labor die Hüllproteine irreversibel verlieren. Der Grund hierfür ist ebenfalls nicht bekannt. Die Zweifel über die Funktion der Hüllproteine sind hauptsächlich darin begründet, dass die Hüllproteine zwar lange bekannt sind, aber genaue Untersuchungen erst an wenigen Gattungen durchgeführt wurden. Neben biochemischen Aspekten wurde vor allem die genetische Organisation und Regulation der bakteriellen Hüllproteine einiger Bakterienstämme näher untersucht. Allerdings muss zu Beginn bemerkt werden, dass der Focus der verschiedenen Arbeiten nicht einheitlich ist und deshalb beim jetzigen Stand des Wissens nur bedingt Vergleiche möglich sind.

Molekulare Biologie der Hüllproteine

Wie bereits erwähnt, ist von über 150 Eubakterien und über 40 Archaea bekannt, dass sie Hüllproteine besitzen. Vollständige Sequenzen oder Teile von Sequenzen sind derzeit von 79 Hüllproteinen von 70 Stämmen verfügbar (siehe Tab.1.1.1).

Tab. 1.1.1: Bakterien mit bekannter Hüllprotein-Sequenz (komplette Sequenz, Teile davon oder Precursor)

Bakterien	Abteilung	Gitter ^a	Gen	Accession Nummer EMBL (SWISS-PROT)
<i>Aeromonas hydrophila</i> TF7	γ-Proteobakterien	S	<i>ahs</i>	L37348 (Q44072)
<i>Aeromonas salmonicida</i> A450	γ-Proteobakterien	S	<i>vapA</i>	M64655 (P35823)

Bakterien	Abteilung	Gitter ^a	Gen	Accession Nummer EMBL (SWISS-PROT)
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne substrain 9131	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>eag</i>	X99724
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne substrain 9131	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>sap</i>	Z36946 (P49051)
<i>Bacillus licheniformis</i> NM105	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>olpA</i>	U38842 (P49052)
<i>Bacillus firmus</i> OF4	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>slpA</i>	AF242295 (Q9L655)
<i>Bacillus sphaericus</i> P-1	Bacillus/Clostridium Gruppe	S	Sequenz 8	A45814
<i>Bacillus sphaericus</i> WHO 2362	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	125	M28361 (P38537)
<i>Bacillus sphaericus</i> WHO 2362	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	80	-
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177	Bacillus/Clostridium Gruppe	S	<i>sbpA</i>	AF211170
<i>Bacillus sphaericus</i> JG-A12	Bacillus/Clostridium Gruppe	S	S-Layer	AJ292965*
<i>Bacillus sphaericus</i> NCTC 9602	Bacillus/Clostridium Gruppe	S	S-Layer	AJ292964*
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> PV72/p6	Bacillus/Clostridium Gruppe	H	<i>sbsA</i>	X71092 (P35825)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> PV72/p2	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>sbsB</i>	X98095
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>sbsC</i>	AF055578
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i> NRRL 4045	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>slpA</i>	AJ249446
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q2	Bacillus/Clostridium Gruppe	O	<i>slp</i>	X62090 (P35826)
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Finitimus</i> CTC	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>ctc</i>	AJ012290
<i>Brevibacillus brevis</i> 47	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>owp</i>	M14238 (P09333)
<i>Brevibacillus brevis</i> 47	Bacillus/Clostridium Gruppe	H	<i>mwp</i>	M19115 (P06546)
<i>Brevibacillus brevis</i> HPD 31	Bacillus/Clostridium Gruppe	H	<i>HWP</i>	D90050 (P38538)
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>Fetus</i>	ε-Proteobakterien	H,S	<i>sapA</i>	J05577 (P35827)
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>Fetus</i> 23B	ε-Proteobakterien	H,S	<i>sapA1</i>	L15800
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>Fetus</i> 82-40LP3	ε-Proteobakterien	H,S	<i>sapA2</i>	S76860
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>Fetus</i> 84-91	ε-Proteobakterien	-	<i>sapB</i>	U25133
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>Fetus</i> CIP 5396T	ε-Proteobakterien	-	<i>sapB2</i>	AF048699
<i>Campylobacter rectus</i> 314	ε-Proteobakterien	-	<i>crs</i>	AF010143
<i>Caulobacter crescentus</i> CB 15 (ATCC 19089)	α-Proteobakterien	H	<i>rsaA</i>	AE005779 (P35828)
<i>Caulobacter crescentus</i> JS3001	α-Proteobakterien	-	<i>rsaA</i>	AF193063
<i>Caulobacter crescentus</i> JS4000	α-Proteobakterien	-	<i>rsaA</i>	AF193064
<i>Clostridium difficile</i> C253	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>slpA</i>	AJ291709
<i>Clostridium difficile</i> R8366	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>slpA</i>	AJ300676
<i>Clostridium difficile</i> R7404	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>slpA</i>	AJ300677
<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	<i>cipA</i>	X67506 (Q06852)
<i>Clostridium thermocellum</i> NCIB 10682	Bacillus/Clostridium Gruppe	-	-	X67506 (Q06853)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 17965	Actinobakterien	H	<i>esp2</i>	X69103
<i>Cytophaga</i> sp. Jeang 1995	Cytophaga	-	-	AF068060
<i>Deinococcus radiodurans</i> SARK	<i>Thermus/Deinococcus</i> Gruppe	H	<i>hpi</i>	M17895 (P13126)
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	<i>Thermus/Deinococcus</i> Gruppe	H	<i>DR2508</i>	AE002080 (P56867)
<i>Halobacterium halobium</i>	Halobakterien	H	<i>csg</i>	J02767 (P08198)
<i>Haloferax volcanii</i>	Halobakterien	H	-	M62816 (P25062)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Lactobacillen	O	<i>slpA</i>	X89375 (P35829)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Lactobacillen	-	<i>slpB</i>	X89376
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 8287	Lactobacillen	O	-	Z14250 (Q05044)
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	Lactobacillen	O	<i>chsA</i>	AF001313
<i>Lactobacillus crispatus</i> M247	Lactobacillen	-	<i>S-layer</i>	AJ007839
<i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 12003	Lactobacillen	-	<i>slpNA</i>	AF253043
<i>Lactobacillus crispatus</i> LMG 12003	Lactobacillen	-	<i>slpNB</i>	AF253044
<i>Lactobacillus fermentum</i> BR 11	Lactobacillen	O	<i>bspA</i>	U97348
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 12046	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388558
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388559
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 303	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388560
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 35	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388561
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC i60	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388562
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC M696	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388563
<i>Lactobacillus helveticus</i> IMPC HLMI	Lactobacillen	-	S-layer	AJ388564
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 892	Lactobacillen	O	<i>slpH1</i>	X91199
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 1269	Lactobacillen	O	<i>slpH2</i>	X92752 (P38059)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> delta H	Methanogene/Achchaea	-	<i>MTH716</i>	AE000851 (O26812)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> delta H	Methanogene/Achchaea	-	<i>MTH719</i>	AE000851 (O26815)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> delta H	Methanogene/Achchaea	-	<i>MTH1513</i>	AE000911 (O27557)
<i>Methanococcus jannaschii</i> ATCC 43067	Methanogene/Achchaea	H	<i>MJ0822</i>	U67526 (Q58232)
<i>Methanococcus jannaschii</i> ATCC 43067	Methanogene/Achchaea	-	<i>MJ0954</i>	U67539
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSMZ 2661	Methanogene/Achchaea	-	<i>slmj1</i>	AJ311636
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> DSM 2095	Methanogene/Achchaea	-	<i>slmt1</i>	AJ308554
<i>Methanococcus vannielii</i> DSM 1224	Methanogene/Achchaea	-	<i>slmv1</i>	AJ308553
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537	Methanogene/Achchaea	H	<i>sla</i>	M59200 (Q50833)
<i>Methanosarcina mazei</i> S-6	Methanogene/Achchaea	H	<i>sigB</i>	X77929
<i>Methanothermobacter</i> <i>fervidus</i> DSM 2088	Methanogene/Achchaea	H	<i>sigA</i>	X58297 (P27373)

Bakterien	Abteilung	Gitter ^a	Gen	Accession Nummer EMBL (SWISS-PROT)
<i>Methanothermobacter sociabilis</i> DSM 3496	Methanogene/Achchaeta	H	<i>slgA</i>	X58296 (P27374)
<i>Rickettsia japonica</i> YH	α -Proteobakterien	H	<i>rOmp B</i>	AB003681 (O06653)
<i>Rickettsia prowazekii</i> Breinl	α -Proteobakterien	H	<i>spaP</i>	M37647 (Q53020)
<i>Rickettsia rickettsii</i> R	α -Proteobakterien	-	<i>p120</i>	X16353 (P14914)
<i>Rickettsia typhi</i> Wilmington	α -Proteobakterien	-	<i>slpT</i>	L04661 (P96989)
<i>Serratia marcescens</i> Sr41 Isolat 176	γ -Proteobakterien	-	<i>slaA</i>	AB007124
<i>Serratia marcescens</i> Sr41 Isolat 8000	γ -Proteobakterien	-	<i>slaA</i>	AB007125
<i>Staphylothermus marinus</i> F1	Archaea	-	-	U57967
<i>Thermoanaerobacter kivui</i> DSM 2030	<i>Bacillus/Clostridium</i> Gruppe	H		M31069 (P22258)
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	<i>Thermus/Deinococcus</i> Gruppe	H, S	<i>slp</i>	X57333 (P35830)

a: O = schräg, S = quadratisch, H = hexagonal, * diese Arbeit

Weit weniger wurden hinsichtlich ihrer molekularen Struktur untersucht. Neun näher untersuchte Gattungen (Adachi et al. 1989, Bowditch et al. 1989, Ebisu et al. 1990, Walker et al. 1992, Thomas et al. 1992, Thomas und Trust 1995, Bahl et al. 1997, Ilk et al. 1999, Gilmour et al. 2000) sollen im folgenden ausführlicher betrachtet werden, zunächst die Gram-positiven und nachfolgend die Gram-negativen Bakterien.

Das Hüllprotein (PS2) des Gram-positiven Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* bildet ein hexagonales Gitter mit einer Gitterkonstante von 13,2 nm (Bahl et al. 1997). Die Hüllproteinschicht ist in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zusammenhängend (festes Medium) oder inselförmig (flüssiges Medium) (Chami et al. 1995), ähnlich wie bei *Bacillus thuringiensis*, bei dem die Vollständigkeit der Schicht vom Wachstumsstadium abhängt (Luckevich und Beveridge 1989). Ungeklärt ist, ob es sich dabei eventuell um mehrere verschiedene Hüllproteinschichten handelt, wie zum Beispiel bei *Brevibacillus brevis* 47 (Yamada et al. 1981), *Corynebacterium diphtheriae* C4 (Kawata und Masuda 1972), *Aquaspirillum serpens* MW5 (Stewart und Murray 1982), *Nitrosocystis oceanus* (Remsen et al. 1967) und *Lamprospedia hyalina* (Austin und Murray 1990). Das Hüllprotein von *C. glutamicum* ist äußerst stabil gegenüber Detergenzien wie Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid sowie 2 % Natriumdodecylsulfat und dies bis zu Temperaturen von 100 °C (Chami et al. 1995). Ähnlich verhält es sich bei *Deinococcus radiodurans* (Baumeister et al. 1982). Die Primärstruktur zeichnet sich durch ein Fehlen signifikanter Homologien zu anderen Hüllproteinen aus, trotz einer typischen Aminosäureverteilung. Der C-Terminus von PS2 ist für die Bindung an die Zellwand verantwortlich (vergleiche: *Halobacterium halobium* (Lechner und Sumper 1987), *Haloferax volcanii* (Sumper et al. 1990) und *Rickettsia prowazekii* (Carl et al. 1990)), während der N-Terminus für die Wechselwirkungen der Monomere untereinander notwendig ist.

Brevibacillus brevis HPD31 besitzt ebenfalls ein Hüllprotein (HWP), das ein hexagonales Gitter mit einer Gitterkonstante von 18 nm ausbilden kann (Ebisu et al. 1990).

Das Hüllprotein besitzt eine Ähnlichkeit von 78 % zu dem Hüllprotein von *B. brevis* 47 und 2 SLH-Domänen. Die Aminosäureverteilung entspricht der typischen Hüllproteinzusammensetzung. Die Regulation des Gens erfolgt über Tandem-Promotoren (Ebisu et al. 1990) ähnlich wie bei *B. brevis* 47 (Adachi et al. 1989).

Bei *Geobacillus stearothermophilus* PV 72 (früher *Bacillus stearothermophilus*) konnte hingegen die Existenz zweier Hüllproteine, SbsA und SbsB in Abhängigkeit von Sauerstoffpartialdruck und Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden (Sára und Sleytr 1994, Sára et al. 1996, Kuen et al. 1997). SbsA bildet ein hexagonales Gitter mit einer Konstante von 22,5 nm bei einem Molekulargewicht der Monomere von 130 kDa. SbsB bildet ein monoklines Gitter bei einem Molekulargewicht von 98 kDa. Des weiteren stimuliert die Supplementierung des Mediums mit den Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glutamin die Hüllproteinsynthese, während der Zusatz von aromatischen (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) und basischen Aminosäuren (Histidin, Lysin, Arginin) den irreversiblen Verlust der Fähigkeit zur Hüllproteinsynthese bewirkt. Ein Erklärungsansatz ist, dass die erhöhte Konzentration an Sauerstoffradikalen, bedingt durch den erhöhten Sauerstoffpartialdruck, die Bildung von Stressproteinen auslöst, was einen erhöhten Aminosäurebedarf zur Folge hat. Außerdem könnte der erhöhte Sauerstoffpartialdruck ermöglichen, Aminosäuren auch als C-Quelle zu verwerten. Aus beiden Gründen könnte nun ein leichteres Hüllprotein zu Gunsten einer höheren Aminosäurenverfügbarkeit dominieren. SbsA und SbsB zeigen zueinander nur eine geringe Ähnlichkeit, auf DNA-Ebene 40 %, auf Aminosäureebene nur 20 % (Kuen und Lubitz 1996a). Außerdem besitzt nur SbsB drei N-terminale SLH-Domänen. Beide Hüllproteine besitzen eine zusätzliche N-terminale Domäne zur Bindung an das sekundäre Zellwandpolymer (SCWP) (Egelseer et al. 1998, Ries et al. 1997). Auch hier unterscheiden sich die Bindungsdomänen beider Typen. Außerdem besitzen die beiden unabhängigen Gene der Proteine mehrere Homologe, die durch mehrfache Rekombinationen entstanden sind. SbsA-homologe Gene sind plasmidkodiert, SbsB-homologe nicht (Bahl et al. 1997). Die Stammvariante mit SbsB verliert außerdem das Gen für SbsA. Nicht zuletzt wird das in *Escherichia coli* klonierte Produkt des Gens von SbsA transloziert, das von SbsB jedoch nicht (Kuen et al. 1996b, 1997).

Bei dem alkaliphilen Organismus *Bacillus pseudofirmus* OF4 bildet das Hüllprotein eine schräge Symmetrie aus, besitzt typische Aminosäurenanteile und drei N-terminale SLH-Motive (Gilmour et al. 2000). Außerdem hat die Hüllproteinschicht eine regulatorische Funktion hinsichtlich Ionenkonzentrationen und Ladungen, ist dabei aber nicht essentiell für ein Wachstum in alkalischen Medien.

Ebenso zeigt das Hüllproteingitter von *Bacillus sphaericus* WHO 2362 eine monokline Symmetrie (p2) (R. Wahl, persönliche Mitteilung). Die Monomere zeichnen sich durch einen stark hydrophoben N-Terminus mit drei SLH-Motiven aus (Bowditch et al. 1989). Zusätzlich befindet sich strangabwärts auf dem Genom ein zweites kryptisches Gen, dessen Produkt deutlich leichter ist: 80 kDa gegenüber 125 kDa des eigentlichen Hüllproteins. *B. sphaericus* CMM 2177 besitzt demgegenüber ein tetragonales Hüllproteingitter, dessen Monomere ähnlich wie bei *G. stearothermophilus* PV 72 über drei N-terminale SLH-Motive an ein sekundäres Zellwandpolymer in der Peptidoglykanschicht gebunden sind (Ilk et al. 1999). Betrachtet man pathogene Bakterienarten dieser Gattung, wie *Bacillus anthracis*, so stellen die Hüllproteine hier einen Virulenzfaktor dar (Messner und Sleytr 1992), vergleichbar zu Kapseln und Schleimen anderer pathogener Bakterien. Diese schließen sich jedoch auch bei diesen Arten nicht aus, sondern existieren unabhängig voneinander (Mesnage et al. 1998). Ähnlich wie bei *B. brevis* 47 (Yamada et al. 1981) und *Aquaspirillum serpens* MW5 (Stewart und Murray 1982) liegen auch bei *B. anthracis* zwei verschiedene Hüllproteine gleichzeitig vor, EA1 und Sap (Etienne-Toumelin et al. 1995, Mesnage et al. 1997). EA1 ist an der Zellwand gebunden und Sap ist ebenfalls zellwandgebunden und frei im Medium. Die Monomere Sap und EA1 haben N-terminal zueinander lediglich eine 66 %ige Identität und C-terminal eine 22 %ige Identität. EA 1 zeigt demgegenüber eine wesentlich höhere Identität zu dem Hüllprotein von *Bacillus licheniformis* OlpA von 93 % N-terminal und 63 % C-terminal. Entsprechend verhält es sich mit den Ähnlichkeiten. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass sowohl *B. anthracis* als auch *B. licheniformis* einen besonderen Kapseltyp besitzen, eine Poly- γ -D-Glutaminsäurekapsel, die den Hüllproteinschichten von EA1 und OlpA aufsitzt. Die Proteine EA1 (Gen *eag*) und Sap (Gen *sap*) besitzen jedoch beide drei N-terminale SLH-Motive, die über Pyruvatgruppen eines peptidoglycangebundenen Polysaccharids an der Zellwand gebunden sind (Mesnage et al. 2000). EA1 ist außerdem das Hauptantigen. Erstaunlicherweise bilden *sap*-Deletionsmutanten größere Kolonien und neigen zur Aggregation, während *eag*-Deletionsmutanten keine Unterschiede zum Wildtyp zeigen. Auf genetischer Ebene sind zwar die Gene *eag* und *sap* chromosomal codiert und hintereinander angeordnet, aber nicht wie bei *B. brevis* in einem Operon organisiert (Adachi et al. 1989).

Die Hüllproteine der Gattung *Lactobacillus* besitzen ebenfalls eine hüllproteintypische Aminosäurezusammensetzung, mit schrägem oder quadratischem Gitter, zeigen aber eine hohe Variabilität in der N-terminalen Aminosäuresequenz und einen konservierten C-Terminus. Dieser ist für die Bindung an der Zellwand verantwortlich (Smit et al. 2001), was einen Unterschied zu den bisher erwähnten Stämmen darstellt.

Außerdem fehlen den Hüllproteinen aller *Lactobacillus*-Arten SLH-Motive (Vidgrén et al. 1992, Boot et al. 1995, Boot und Pouwels 1996b, Morelli und Callegari 1997, Callegari et al. 1998). Zusätzlich binden die Hüllproteinschichten von *L. crispatus* Typ I und IV Kollagen (Toba et al. 1995, Sillanpää et al. 2000), und die von *L. brevis* vermitteln die Bindung an Epithelzellen des Darmes. Die Hüllproteine von *L. acidophilus* und *L. helveticus* besitzen eine Ähnlichkeit von 79 %, aber es fehlt eine signifikante Ähnlichkeit zu denen von *L. brevis* (Vidgrén et al. 1992). Dies korreliert mit der phylogenetisch näheren Verwandtschaft beider Arten. Während *L. helveticus* nur ein intaktes *slp*-Gen besitzt, existieren bei *L. acidophilus*, *L. amylovorans*, *L. gallinarum* und *L. crispatus* zwei aufeinanderfolgende *slp*-Gene (Boot et al. 1996a). Wie es am Beispiel des *slp*-Segments von *L. acidophilus* gezeigt werden konnte, kann es innerhalb dieser Kopien zu zufälligen Neuordnungen der Gene kommen, und so eine Aktivierung oder Inaktivierung der Gene durch eine Verschiebung der Expressionsstelle durch eine Inversion eines chromosomalen Segments bewerkstelligt werden (Boot und Pouwels 1996b, Boot et al. 1996c, 1996d). Im Gegensatz zur Hüllproteinexpression bei anderen Bakterien ist im genannten Fall jeweils nur ein Gen aktiv. *L. gasseri* und *L. johnsonii* besitzen demgegenüber gar keine Hüllproteinschichten (Masuda und Kawata 1983).

Im Falle des Gram-negativen Stammes *Thermus thermophilus* HB8, bei dem es sich um ein thermophiles und phylogenetisch sehr altes Bakterium handelt, besitzt die Hüllproteinschicht eine hexagonale Gittersymmetrie. Die Symmetrie der Hüllproteinschicht kann aber in gereinigtem Zustand in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode variieren und als weiterhin hexagonales, trigonales oder tetragonales Gitter vorliegen (Faraldo et al. 1988, Castón et al. 1993). Die tetragonale Variante weist eine den bakteriellen Porinen sehr ähnliche Struktur auf, was auf eine phylogenetische Verwandtschaft beider Proteine hindeutet (Sleytr 1978). Vorhandene N-terminale SLH-Motive sind für die Bindung der Hüllproteine (SlpA) an das Peptidoglykan verantwortlich (Olabarria et al. 1996). Die Expression von *slpA* ist bei *T. thermophilus* HB8 gut untersucht und es zeigt sich, dass diese und die Synthese von SlpA streng reguliert sind. Es konnte zum Beispiel SlpA weder in der Zelle noch im umgebenden Medium nachgewiesen werden. Außerdem führte eine Klonierung von *slpA* unter Verwendung eines Multicopy-Vektors nicht zu einer Überexpression von *slpA* (Lasa et al. 1992). Nicht zuletzt sind die Zellwandsynthese, die Synthese daran beteiligter Enzyme und die Expression von *slpA* eng gekoppelt.

Die Bildung intakter Hüllproteinschichten bei *Caulobacter crescentus* ist Ca^{2+} abhängig und erfolgt als hexagonales Gitter auf der Zellwand (Walker et al. 1992).

Der N-Terminus des Hüllproteins (RsaA) ist hier für die Bindung der Proteinschicht an das Lipopolysaccharid der Außenmembran verantwortlich (Walker et al. 1994) und dient als Schutz vor Bakterienparasiten wie *Bdellovibrio bacteriovorus* (Koval und Hynes 1991).

Auch bei *Campylobacter fetus* ist der N-Terminus der Hüllproteine verantwortlich für die Bindung der Proteinschicht an die Lipopolysaccharide der Außenmembran. Bemerkenswert bei diesem pathogenen Bakterium ist der Besitz mehrerer Hüllproteine, die gleichzeitig auch einen Virulenzfaktor für den Organismus darstellen (Blaser und Pei 1993a). Entsprechend des Typs der Lipopolysaccharide wird *C. fetus* in 2 Serotypen, Typ A und Typ B eingeteilt. In Übereinstimmung damit gibt es auch Hüllproteine vom Typ A (*sapA*) und vom Typ B (*sapB*). Diese bilden tetragonale oder hexagonale Gitter (Blaser 1993b, Dworkin et al. 1995a). Das Gen *sapA* besitzt dabei meist 7-9 homologe Genabschnitte, die jeweils ein konserviertes 5'-Ende und ein variables 3'-Ende besitzen (Tummuru und Blaser 1992, Blaser et al. 1994, Dworkin et al. 1995b). Bei *sapB* sieht es ähnlich aus, wobei sich dessen 5'-Ende von dem von *sapA* deutlich unterscheidet (Dworkin et al. 1995a). Die homologen Genabschnitte liegen jeweils gehäuft vor (Dworkin et al. 1995b), entweder zu mehreren hintereinander, als Tandem oder als Kasette (zum Beispiel: *sapA*-Homologes-6,2 kb Region-*sapA*-Homologes), wobei mindestens ein Homologes immer entgegengesetzt orientiert ist (Tummuru und Blaser 1992, Blaser et al. 1994, Dworkin et al. 1995b, Dworkin und Blaser 1996). Ein in der 6,2 kb Region liegender invertierter Promotor führt über eine Neuordnung der Genabschnitte durch reziproke Rekombination zum An- oder Abschalten von Genen (Blaser et al. 1994). Flankierende nicht-kodierende DNA-Abschnitte sind dabei stets identisch (Dworkin et al. 1995a).

Einige weitere Besonderheiten zeigen die Hüllproteinschichten der Gram-negativen und pathogenen Bakterien *Aeromonas salmonicida* und *Aeromonas hydrophila*. Auch hier stellen die Hüllproteine den entscheidenden Virulenzfaktor dar. Die Hüllproteine bilden tetragonale Gitter und sind in eine schwere N-terminale und eine leichte C-terminale Domäne unterteilt (Dooley et al. 1989, Thomas et al. 1992). Letztere ist für die Bindung der Hüllproteinschicht an die Zellwand verantwortlich (Thomas et al. 1992). Das Hüllprotein von *A. salmonicida* (VapA) bindet eine Reihe von Wirtsfaktoren, wie Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Kollagen (vergleiche: *Lactobacillus crispatus* Hüllprotein bindet Typ I und IV Kollagen (Toba et al. 1995, Sillanpää et al. 2000)). Interessanterweise führt eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur bei *A. salmonicida* zum Verlust der Hüllproteinschichten und damit zum Verlust der Pathogenität (Ishiguro et al. 1981). Die Hüllproteine von *A. hydrophila* (AhsA) und von *A. veronii sorbia* werden posttranslational modifiziert.

Dabei werden Tyrosin-Reste phosphoryliert (Thomas und Trust 1995). Im Gegensatz zu den anderen untersuchten pathogenen Bakterien besitzen die *Aeromonas*-Arten nur ein Hüllprotein und auch nur eine Kopie von *vapA* und *ahsA* (Noonan und Trust 1997).

Zusammenfassung

Grundlegend kann gesagt werden, dass die Hüllproteinschichten Gemeinsamkeiten hinsichtlich des Struktur- und Funktionsprinzips aufweisen, wie die Ausprägung der Proteinschicht als zweidimensionales Gitter, die Fähigkeit zur Selbstassemblierung, die übereinstimmenden Anteile bestimmter Aminosäuren, häufig vorhandene SLH-Domänen, die für die Bindung an die Zellwand verantwortlich sind, und die chromosomale Kodierung des Proteins. Zusätzlich korrelieren Ähnlichkeiten und Übereinstimmungen in der Sequenz der Hüllproteine mit dem phylogentischen Verwandtschaftsgrad der untersuchten Species, wie das im Falle der verschiedenen *Lactobacillus*-Stämme sehr deutlich wird. Andererseits spielen hier auch andere Faktoren (wie Umweltbedingungen und Wachstumsfaktoren) eine entscheidende Rolle, man denke nur an die Hüllproteinvarianten von *Geobacillus stearothermophilus* in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. Diese Faktoren zusammen lassen nur schwerlich allgemeingültige Aussagen zu. Dies lässt sich am Beispiel der Interaktion der Hüllproteinschicht mit der Zellwand besonders gut verdeutlichen.

Die Bindung der Hüllproteinschichten an die darunter liegende Zellwand kann realisiert werden über einen hydrophoben C-Terminus an die Außenmembran (*Rickettsia prowazekii*), über kovalent gebundene Fettsäurereste an ein Außenmembran-Protein (*Deinococcus radiodurans*), über Lipopolysaccharide (*Camomonas acidovorans*), über die SLH-Motive an das Peptidoglycan (*Thermus thermophilus*), über SLH-Motive an ein sekundäres Zellwandpolymer (*Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*), über SLH-Motive an das Peptidoglycan und über ein zweites Motive an ein sekundäres Zellwandpolymer (*Geobacillus stearothermophilus* PV72/p2), ohne SLH-Motive an die Zellwand (*Geobacillus stearothermophilus*, *Lactobacteriaceae*), über hydrophobe Reste an die mycolsäurehaltige Schicht (*Corynebacterium glutamicum*) oder der Besitz doppelter Hüllproteinschichten (*Brevibacillus brevis* und *Lampropedia hyalina*). Bei näherer Betrachtung zeigt sich außerdem, dass die SLH-Motive stammspezifische Unterschiede aufweisen. Nicht zu vergessen sind die zum Teil großen Unterschiede sowohl in der Primär- und Domänenstruktur der Proteine als auch hinsichtlich der genetischen Organisation mehrerer Kopien oder homologer Gene. Insgesamt handelt es sich bei den Hüllproteinen verschiedener Bakterien vielmehr um die Variation eines „Themas“, dem ähnliche Funktionsprinzipien zu Grunde liegen, die Realisierung aber unter Verwendung verschiedener Strukturen erfolgt.

Deshalb muss mit dem jetzigen Stand des Wissens angenommen werden, dass es sich bei der Entstehung der Hüllproteinschichten eher um eine analoge als eine homologe Entwicklung gehandelt hat (Bahl et al. 1997).

1.1.2 Anwendung bakterieller Hüllproteine

Insbesondere die Eigenschaft der bakteriellen Hüllproteine, sich spontan zu einschichtigen hochgeordneten Gittern zusammenlagern zu können, deren Oberfläche durch eine regelmäßige Anordnung funktioneller Gruppen und morphologisch identischer Poren verschiedener Klassen gekennzeichnet ist, machte sie besonders interessant für unterschiedlichste Anwendungen. Dies trifft vor allem auf die Bereiche der Biotechnologie, Nanotechnologie und Biomimetik zu (Sára und Sleytr 1987b, Küpcü et al. 1995a, Pum et al. 1997, Shenton et al. 1997, Breitweiser et al. 1996, 1998, Sleytr 1997c, Sleytr et al. 1999b, Weber et al. 2001).

Auf Grund der hohen Porosität von 30-70 % der Gesamtfläche und der identischen Größe der Poren mit spezifischen chemischen Eigenschaften wurden stabilisierte Hüllproteinschichten von *Geobacillus stearothermophilus* bereits zur Herstellung von Ultrafiltrationsmembranen, sogenannten SUM's verwendet, die eine Ausschlußgrenze von 30 kDa besitzen (Sára und Sleytr 1987b). Durch Verwendung verschiedener Hüllproteinschichten mit verschiedenen Porositäten und Porendurchmessern (typischerweise betragen diese 2-8 nm) ergeben sich diesbezüglich weitere Möglichkeiten zur Herstellung von Ultrafiltrationsmembranen mit anderen Ausschlußgrenzen. Eine Erweiterung dieser Möglichkeit stellt die Funktionalisierung der Hüllproteinschichten mit verschiedensten Liganden dar. So können Antikörper für Immunoassays, Antigene oder Haptene zur Entwicklung neuer Vakzine, Enzyme für bioanalytische Sensoren oder andere Liganden immobilisiert werden. Dabei ist von besonderem Nutzen, dass die Hüllproteinschichten auf unterschiedlichsten Unterlagen rekristallisiert werden können und dabei in verschiedenen Formen, wie flächig als monomolekulare Schicht oder auf Vesikeln (zum Beispiel Liposomen) Anwendung finden können. Im Falle der Bindung von Antikörpern wurden bereits positive Ergebnisse mit immobilisierten monoklonalen IgG's oder IgE's für Reaktionszonen auf Teststreifen nach dem Prinzip des Festphasen-Immunoassays erzielt (Breitweiser et al. 1996, 1998). Auch bei der Vakzine-Entwicklung, wie zum Beispiel bei Versuchen zur Immunisierung von Mäusen gegen *Streptococcus pneumoniae*, wurden Hüllproteinschichten erfolgreich eingesetzt. Dazu wurden Oligosaccharide aus Kapseln verschiedener *S. pneumoniae*-Serotypen an Hüllproteinschichten gekoppelt und den Mäusen injiziert. Es zeigte sich, dass derartig behandelte Mäuse Antikörper gegen die verschiedenen Serotypen bilden.

Wurden nun den Mäusen thermisch abgetötete *S. pneumoniae*-Zellen verabreicht, so wurde eine zelluläre Immunantwort ausgelöst. Vergleichsexperimente mit gekoppelten intakten Polysacchariden blieben ohne Effekt (Malcolm et al. 1993). Auch verschiedene Enzyme (β -Glucosidase, Glucoseoxidase, Invertase oder Naringinase) konnten bereits in Form von dichten Monolagen an Hüllproteinschichten ohne Aktivitätsverlust gebunden werden (Küpcü et al. 1995a, Sára und Sleytr 1989). Ein neuer Ansatz ist die Nutzung vernetzter Hüllproteine von *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricans* I111-69 in Form von Mikropartikeln (Zellbruchstücke) zur *in vitro* Reinigung von Blut (Weber et al. 2001). Dabei wurde Protein A mittels 1-Ethyl-3-(N,N'-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid auf Zellwandbruchstücken immobilisiert und zur spezifischen Bindung von IgG verwendet. Dies soll die Möglichkeit eröffnen, bestimmte Antikörper oder andere Moleküle im Blut, die zum Beispiel für verschiedene Autoimmunkrankheiten verantwortlich sind, zu binden und damit die Krankheit behandeln zu können.

Eine strukturstabilisierende Rolle spielen die Hüllproteinschichten im Hinblick auf die Verwendung an Lipidmembranen. Insbesondere die Erforschung von Transportvorgängen, der Funktion und Bedeutung peripherer und integraler Proteine sowie eine mögliche Anwendung dieser Systeme war bislang auf Grund der geringen Stabilität von Lipidmembranen nur bedingt möglich. Abhilfe konnte hier durch die Stabilisierung nicht nur planarer, sondern auch sphärischer Lipid-Doppelschichtsysteme mittels Hüllproteinschichten geschaffen werden (Pum et al. 1993, Pum und Sleytr 1994, Küpcü et al. 1995b), ohne dabei deren Funktion zu beeinträchtigen. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Grundlagenforschung und Anwendung der Membranen in der Diagnostik, Physiologie und Biosensor-Entwicklung. Als Beispiel können hüllproteinstabilisierte Liposomen zur Ummantelung von hochaktiven Molekülen in der Pharmazie, oder als Träger von Antigenen oder Haptenen genannt werden. Eine weitere Anwendung ist die Erzeugung von Fusionsproteinen aus einem funktionellen Teil, wie dem aktiven Zentrum eines Enzyms und den strukturbildenden Hüllproteinen verschiedener Bakterien, oder zur Nutzung der Hüllproteine in der Vakzine-Entwicklung, wie dies im Falle der infektiösen hämatopoetischen Nekrose unter Verwendung von *Caulobacter crescentus* Hüllproteinen bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Simon et al. 2001). Auf diese Weise entsteht ein funktionelles und zur Selbstassemblierung befähigtes Molekül.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Hüllproteinschichten als biologisches Template zur Erzeugung metallischer Nanostrukturen zu nutzen. Dazu wird die sogenannte „Bottom-up“ Strukturierung verwendet, bei der man die Nanostrukturen aus einzelnen Bausteinen, wie Atome oder Moleküle, aufbaut.

Mit Hilfe dieses Strukturierungsansatzes konnten bereits hoch geordnete Halbleiterschichten oder definierte metallische Nanocluster aus CdS (Shenton et al. 1997), Au (Dieluweit et al. 1998, Dieluweit 1999), Pt (Kirsch 1998, Dieluweit 1999, Mertig 1999, Pompe 1999), Pd (Kirsch 1998, Dieluweit 1999, Pompe et al. 1999, Teil dieser Arbeit, Wahl et al. 2001a) oder Ni, Pb und Fe (Dieluweit 1999) hergestellt werden. Da die Clusterbildung bevorzugt in den Poren stattfindet (R. Wahl, persönliche Mitteilung), haben die Cluster eine reproduzierbare, sehr enge Größenverteilung. Nur durch die Verwendung von Hüllproteinschichten ist es derzeit möglich, metallische Cluster bestimmter Größe (variabel von 3-15 nm) und symmetrischer Anordnung zu erzeugen (Sleytr und Beveridge 1999a). Die mit Platin und Palladium metallisierten Hüllproteinschichten stellen auf Grund der großen spezifischen Oberfläche eine katalytisch hochaktive Schicht dar. Des weiteren können mit Hilfe von Hüllproteinschichten nach erfolgter Strukturierung spezifische metallische Konstrukte erzeugt werden. Realisierbar wurde dies durch einen Abtrag von Teilen der Hüllproteinschichten mittels partieller UV-Belichtung unter Verwendung von Fotomasken (Pum et al. 1997). Mögliche Anwendungen zielen auf die Bereiche der Halbleitertechnik oder Fotomikrolithographie, bei denen die Verwendung von Hüllproteinschichten als neuartiges Resistmaterial auf Grund der geringen Schichtdicke Vorteile erwarten lässt.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hüllproteinschicht des Cyanobakteriums der Gattung *Synechococcus* hochgeordnete Kristallisationsplätze bietet (Schultze-Lam et al. 1992). Damit konnte erstmals eine kontrollierte Biomineralisation an Hüllproteinschichten am Beispiel von CaSO_4 und CaCO_3 nachgewiesen werden.

1.2 Perspektiven zur Bioremediation radionuklid- und schwermetallbelasteter Abwässer mittels Bakterienisolaten von Uranabfallhalden

In den Bundesländern Sachsen und Thüringen wurde durch die Wismut AG im Zeitraum von 1946-1990 im großen Maßstab Uranerz gefördert. Von den 1200 Mio. Tonnen gefördertem Erz wurden 1000 Mio. Tonnen auf Halde geschüttet und 200 Mio. Tonnen weiterverarbeitet (Wismut 1999). Insgesamt konnten daraus rund 231000 Tonnen Natururan gewonnen werden, was die Wismut zu diesem Zeitpunkt zum drittgrößten Uranproduzenten der Erde machte. Nach der Einstellung der Uranerzgewinnung und der Umwandlung der Sowjetisch-Deutschen Wismut AG in die bundesdeutsche Wismut GmbH im Jahre 1991 begann diese mit der Sanierung der Hinterlassenschaften, wie Halden, Schächten und Absetzanlagen.

Neben der Sanierung über Tage durch die Demontage stillgelegter Betriebsanlagen und die Verwahrung kontaminierter Betriebsflächen vor Ort begann eine Sanierung unter Tage durch die Entsorgung, sichere Verwahrung und abschließende Flutung der untertägigen Hohlräume (Wismut 1999).

In beiden Fällen gilt die besondere Aufmerksamkeit umweltgefährdenden Stoffen, wie zum Beispiel dem radioaktiven und toxischen Element Uran, anderen toxischen Metallen oder Halbmetallen wie Nickel, Blei und Arsen oder wassergefährdenden Stoffen wie Ölen, Fetten, Treibstoffen und Säuren. Neben chemisch-technischen Verfahren zur Reinigung kontaminierter Wässer und Böden bietet auch die Mikrobiologie interessante Ansätze zur Lösung dieser Aufgaben. Betrachtet man insbesondere Bakterien, die aus radionuklid- und schwermetallbelasteten Habitaten isoliert wurden, so konnten bereits zahlreiche Entgiftungsmechanismen und Überlebensstrategien der verschiedenen Bakterien zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen der Zellen nachgewiesen werden. Aufbauend auf diese spezifische Anpassung der Bakterien erscheint die Entwicklung neuartiger Bioremediationskonzepte möglich. Wie im vorigen Kapitel dargelegt, wurden bereits einige interessante Eigenschaften der Hüllproteinschichten entdeckt. Zum einen ist dies die Funktion des hochgeordneten Gitters als Molekül- oder Ionenfalle zu wirken (Beveidge 1979, Sára und Sleytr 1987a, Sára et al. 1992) und zum anderen die Bedeutung der Poren als Kristallisationsstellen, was letztendlich eine kontrollierte Biomineralisation ermöglicht. Bedenkt man außerdem die besondere Bedeutung der Hüllproteinschichten als Grenzfläche zwischen Zellinnerem und umgebendem Medium, lässt sich vermuten, dass diese an Entgiftungsmechanismen durch Bindung toxischer Metalle beteiligt sein könnten. Zusätzlich ist aus Untersuchungen bekannt, dass bakterielle Haldenisolat von Uranabfallhalden in der Lage sind, spezifisch einige Radionuklide und Schwermetalle reversibel zu binden (Selenska-Pobell et al. 1999).

Unter Ausnutzung der genannten Eigenschaften durch Immobilisierung der intakten Bakterien, Dauerformen der Bakterien, Teilen der Zellhülle, nativer oder modifizierter Hüllproteinschichten in einer geeigneten Trägermatrix könnten metallselektive Filter entwickelt werden, die in der biologischen Sanierung erwähnter Sicker- oder Flutungswässer Verwendung finden. Als Trägermatrix eignen sich speziell Sol-Gel-Keramiken (Caturan et al. 1989, Inama et al. 1993, Fennouh et al. 1999, 2000, Finnie et al. 2000). Insbesondere als Verbundmaterialmaterial besitzen diese gegenüber anderen Materialien eine Reihe von Vorteilen (Böttcher 2000) mit biologischen Komponenten, sogenannten Bioceren: 1) es können sowohl dünne Schichten (Beschichtungen) als auch Bulkmaterialien hergestellt werden, 2) gute mechanische, thermische und photochemische Stabilität,

3) sie können weder von Mikroorganismen umgesetzt werden, noch sind sie für diese toxisch und 4) die Porosität und der Gehalt an Biokomponente können in bestimmten Grenzen frei variiert werden. Aus diesen Gründen können Diffusionsprozesse und Wechselwirkungen mit Gasen und gelösten Komponenten sehr effizient erfolgen. Es ist außerdem möglich, den Herstellungsprozess so zu modifizieren, dass eine Schädigung der zu immobilisierenden Biokomponenten, wie zum Beispiel Enzyme (Braun et al. 1990, Yamanaka et al. 1992), Bakterien (Armon et al. 2000, Fennouh et al. 1999, 2000, Finnie et al. 2000,) und Hefen (Caturan et al. 1989, Inama et al. 1993, Al-Saraj et al. 1999) minimiert werden kann (Livage 1996, Böttcher 2000).

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit umfasst mehrere Aspekte. Als erstes sollte aus der Zahl identifizierter Haldenisolate der Uranabfallhalde „Haberlandhalde“ bei Johanngeorgenstadt im Bundesland Sachsen ein Bakterium ausgewählt werden, das nicht nur auf Grund des Standorts an die Gegenwart von Radionukliden und Schwermetallen angepasst ist, sondern auch Hüllproteine besitzt. Nach erfolgter Auswahl sollte das Protein isoliert und hinsichtlich seiner Struktur untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Sequenzierung von Teilen des Proteins und der Vergleich mit anderen bereits bekannten Hüllproteinen. Im folgenden war die Wechselwirkung des Proteingitters mit biotechnologisch relevanten Metallen sowohl im Hinblick auf katalytische Anwendungen als auch auf Bioremediationsvorhaben von Interesse. Nach genauerer Kenntnis des Potentials der Hüllproteine sollten erste Versuche zur biotechnologischen Nutzung der Hüllproteinschichten gemacht werden.

Zur Umsetzung der Ziele sollte innerhalb der identifizierten Bakterienarten, insbesondere der dominierenden *Bacillus*-Arten, ein Screening hinsichtlich vorhandener Hüllproteine erfolgen. Nach positivem Befund sollte eine Isolierungsmethode etabliert und als Routine eingeführt werden. Die Struktur der isolierten Hüllproteine sollte mittels verschiedener mikroskopischer Techniken, wie Transmissionselektronenmikroskopie und Atomkraftmikroskopie, bestimmt werden. Des Weiteren sollten die Proteine sowohl über proteinchemische Methoden als auch durch Verwendung genetischer Arbeitstechniken näher charakterisiert und vor allem Teile der Primärstruktur aufgeklärt werden. Die Bestimmung möglicher Metall-Bindungsstellen am Hüllprotein und in der Zellwand war ein weiterer zu bearbeitender Punkt. Insbesondere sollten für genauere Untersuchungen verschiedene spektroskopische Arbeitsmethoden, wie die Infrarot-Spektroskopie und die Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) genutzt werden. Aufbauend auf erhaltene Ergebnisse sollten letztendlich erste Versuche zur anwendungsorientierten Umsetzung gemacht werden, insbesondere zur Nutzung der Hüllproteinschichten in katalytischen Prozessen und zur Konstruktion metallbindender Filter auf der Basis einer SiO_2 -Matrix. Im Vergleich dazu sollen die Bindungseigenschaften von auf gleiche Weise immobilisierten intakten Bakterien oder Dauerformen der Bakterien untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Versuchsobjekte

Für die Auswahl der Versuchsobjekte als Grundlage dieser Arbeit waren mehrere Aspekte ausschlaggebend: 1) Bei den verwendeten Bakterien sollte es sich um Isolate von radionuklid- und schwermetall-belasteten Halden handeln. Der Grund hierfür ist zum einen die zu erwartende Adaptation an hohe Konzentrationen radioaktiver und toxischer Metalle oder Halbmetalle und zum anderen die Maßgabe, dass bei Bioremediationsprozessen Isolate der zu reinigenden Halde (unter dem Aspekt der ungewollten Freisetzung habitatfremden Bakterien) vorzuziehen sind. 2) Die Bakterien sollten Gattungen angehören, die in Kultur hohe Dichten bei geringen Verdopplungszeiten erreichen, ohne jedoch einen hohen apparativen Aufwand zu erfordern und 3) die Haldenisolate müssen Hüllproteinschichten mit metallbindenden Eigenschaften (Selektivität und Kapazität) besitzen. Bei der Halde handelte es sich um die Uranabfallhalde „Haberland“ in der Nähe von Johanngeorgenstadt in Sachsen (Deutschland), und aufbauend auf die Analyse dort vorkommender Bakterien wurden mesophile Arten der Gattung *Bacillus* im Hinblick auf die zuvor genannten Bedingungen ausgewählt. Auf Grund des ubiquitären Vorkommens der Bazillen und der Fähigkeit, Sporen zu bilden, war diese Gattung besonders erfolgversprechend.

3.2 Organismen und Zellanzucht

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Haldenisolate *Bacillus sphaericus* JG-A12, *B. megaterium* JG-A22, *B. cereus* JG-A30, *B. thuringiensis* JG-B10, die Referenzstämme *Sporosarcina ureae* DSM 320, *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. sphaericus* WHO 2362, *B. sphaericus* CCM 2177, *B. megaterium* NRRL B5385, *B. cereus* ATCC 4415 und *B. thuringiensis* 4045 subsp. *galleriae* verwendet. Die Haldenisolate wurden aus Bodenproben der Uranabfallhalde „Haberland“ isoliert. Alle aufgeführten Bakterienstämme wurden mit Ausnahme von *Sporosarcina ureae* DSM 320 der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie, Institut für Radiochemie, Forschungszentrum Rossendorf entnommen. Letzteres wurde aus der Stammsammlung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried über Dr. Engelhardt bezogen. Für die Kultivierung unter sterilen Bedingungen wurden benötigte Geräte und Medien vor der Verwendung durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert (HV 25 und HV 110, Wolf, Bad Überkingen-Hausen). Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Zur Herstellung von Lösungen wurde entweder vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) oder Seralpur-Wasser (Reinstwasser) verwendet.

Die Gewinnung des Wassers erfolgte über einen Seraldest SD Wasservollentsalzer (Seral, Ransbach-Baumbach) oder eine Seralpur Delta UV/UF-Anlage (Seral, Ransbach-Baumbach).

3.2.1 Anzucht der *Bacillus*- und *Sporosarcina*-Stämme

Die Anzucht der *Bacillus*-Arten erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30 °C entweder in Erlenmeyerkolben oder in Laborflaschen von 5 l Volumen. Die Erlenmeyerkolben wurden dazu maximal bis zu einem Drittel mit Medium gefüllt und mit 150 rpm im Schüttel-Wasserbad (GFL-1092, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) geschüttelt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in modifizierten 5 l Laborflaschen (Arbeitsvolumen 4 l, Schott Glas, Mainz), die mit 10 ml Vorkultur beimpft wurden. Die Begasung erfolgte mit Luft mit einer Flußrate von 3 l min⁻¹. Als Medium wurde NB-Medium (8 g l⁻¹, Bacto[®] Nutrient Broth, Difco Laboratories, Detroit) verwendet. Feste Medien wurden durch Zugabe von 15 g l⁻¹ Agar hergestellt.

Sporosarcina ureae DSM 320 wurde in gleicher Weise kultiviert, jedoch in einem anderen Medium. Für einen Liter gebrauchsfertige Kulturbrühe wurden 10 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 1,1 g Glucose, 7,2 g Na₂HPO₄·12 H₂O in 1000 ml VE-Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und autoklaviert.

3.2.2 Ernte und Aufbewahrung der Zellen

Das Zellwachstum wurde durch Messen der optischen Dichte der Zellsuspension bei 436 oder 600 nm (d = 1 cm) in einem Spektralfotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge) gegen unbeimpftes Medium als Referenz gemessen. Die Ernte erfolgte in der spät-exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 10000 g für 20 min (Hochgeschwindigkeitszentrifuge Sorvall[®] RC-5B Plus, Kendro Laboratory Products, Osterode).

3.2.3 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Stammkulturen der Bakterien wurden alle 4 Wochen auf Agar-Platten mit NB-Medium oder *Sporosarcina*-Medium überimpft und unter aeroben Bedingungen bei 30 °C inkubiert. Zusätzlich wurde zu Beginn der Arbeiten frische Zellmasse der Bakterien in frischem Medium resuspendiert, auf Glasperlen pipettiert und bei -80 °C aufbewahrt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da häufiges Überimpfen und Kultivieren von Bakterien mit Hüllproteinen zum irreversiblen Verlust der Hüllproteine führen kann (persönl. Mitteilung Engelhardt).

Reinheitskontrollen wurden vor jedem Überimpfen durchgeführt: mikroskopisch im Durchlicht bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrast (Mikroskop Amplival, Carl Zeiss, Jena) und makroskopisch durch Ausstreichen der Bakterien im Verdünnungsverfahren auf Agar-Platten.

3.3 Isolierung von Sporen

Zur Gewinnung von Sporen der *Bacillus*-Stämme wurden die Zellen in Sporulationsmedium (8 g l^{-1} Bacto[®] Nutrient Broth, 10 mg l^{-1} $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) entsprechend der Angaben in Kap. 3.2.1 für mindestens 24 h kultiviert. Dabei wurde die Sporulation der Bakterien mikroskopisch verfolgt und fortlaufend das Verhältnis intakter Zellen zu Sporen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nachdem mindestens 70 % der Bakterien sporuliert waren, wurden die Sporen durch Zentrifugation bei 10000 g für 20 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert. Um das Auskeimen der Sporen zu verhindern, wurden alle weitere Schritte bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Das Pellet wurde danach zweimalig in Seralpur-Wasser gewaschen und in dem 10fachen Volumen Lysemedium 1 ($0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ Lysozym in Seralpur-Wasser) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Sporen erneut durch Zentrifugation bei 10000 g für 20 min sedimentiert, zweimalig in Seralpur-Wasser gewaschen, in dem 10fachen Volumen Lysemedium 2 ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Trypsin in Seralpur-Wasser) resuspendiert und wiederum für 24 h inkubiert. Dieser abwechselnde Verdau mit Lysozym und Trypsin (Murrell 1969) wurde fortgesetzt, bis die Suspension maximal 5 % intakte Bakterien oder Zellhüllen enthielt. Danach wurden die Sporen bei 10000 g für 20 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, in dem gleichen Volumen Seralpur-Wasser resuspendiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4 Isolierung von Hüllproteinen und Hüllproteinschichten

3.4.1 Allgemeine Isolierungsbedingungen

Zur Isolierung der nativen Hüllproteinschichten wurde eine modifizierte Methode nach Engelhardt et al. (1986, Sprott et al. 1994) verwendet. Die einzelnen Isolierungsschritte wurden alle aerob und unter Eiskühlung durchgeführt. Alle Suspensionen und Lösungen wurden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.4.2 Herstellung von Zellextrakten

3.4.2.1 Mechanischer Zellaufschluß

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden 1-30 g Zellen in 50 mM TRIS, 3 mM NaN₃, 1 mM MgCl₂ pH 7,5 (im Folgenden als Standard-Puffer bezeichnet) im Verhältnis 1:1 (w/v) resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase II und RNase versetzt. Im Falle von *B. sphaericus* JG-A12 wurden vor weiteren Schritten die Zellen für 10 min unter Eiskühlung mittels eines Ultra-Turrax bei maximaler Leistung (IKA T8, IKA Labortechnik, Stauffen) von Geißeln befreit (Sprott et al. 1994) und die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5403, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) für 10 min bei 6000 g und 4 °C gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit Standard-Puffer im Verhältnis 1:1 (w/v) resuspendiert. Anschließend wurden der Suspension Glasperlen (Ø 0,1 mm und kleiner) im Verhältnis 1:2 (v/v) zugesetzt und derartig mit Puffer oder Glasperlen korrigiert, dass ein Gemenge mit honigartiger Konsistenz entstand. Der Zellaufschluß erfolgte in einer Schwingmühle (MM 2000, Retsch GmbH & Co. KG, Haan) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff für 10 min bei maximaler Schwingungszahl (Schütte und Kula 1988). Zur Trennung der Glasperlen von den Rohextrakten wurden diese mehrfach mit Puffer gewaschen, die Überstände vereinigt und bei 400 g für 10 min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet (ganze Zellen) wurde verworfen und der Überstand (zellfreier Rohextrakt) für die Isolierung der Hüllproteine oder für weitere Experimente verwendet.

3.4.2.2 Zellaufschluß mit Guanidiniumhydrochlorid

Zur schnellen Herstellung zellfreier Rohextrakte für Analysen der Proteinprofile hinsichtlich der Existenz prädominanter Banden und damit möglicher Hüllproteine wurde eine modifizierte Methode nach Goundry et al. (1967) verwendet. Dazu wurden Zellen im Verhältnis 1:10 (w/v) mit 5 M Guanidiniumhydrochlorid in 50 mM TRIS-Base, pH 7,2 resuspendiert und für 3 h bei RT inkubiert. Das chaotrope Guanidiniumhydrochlorid vermindert hydrophobe Effekte, die hauptsächlich für die Wechselwirkungen der Proteinmonomere untereinander und mit der Zellwand verantwortlich sind. Dies führte im Falle der verwendeten Bakterien neben einer Solubilisierung der Hüllproteine auch zur vollständigen Lyse der Zellen.

3.4.3 Präparation der Hüllproteinschichten und Lagerung

Für die Isolierung der Hüllproteinschichten wurde nur der mechanische Zellaufschluß durchgeführt.

Der so gewonnene zellfreie Rohextrakt (Cytoplasma und Zellwände) wurde bei 12400 g für 60 min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand (Cytoplasma) verworfen und das Pellet (komplette Zellwände aus Plasmamembran, Peptidoglykan und Hüllprotein) zweimal in Standard-Puffer gewaschen. Zum Lösen der Plasmamembran wurde das Pellet in Standard-Puffer mit 1 % Triton X-100 resuspendiert, 20 min bei RT leicht geschüttelt, anschließend bei 12400 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet (Peptidoglykan und Hüllprotein) erneut zweimal gewaschen. Die Zellwände wurden zum Verdau des Peptidoglykans in Standard-Puffer mit 0,2 mg ml⁻¹ Lysozym und je einer Spatelspitze DNase II und RNase resuspendiert und bei 30 °C für 6 h im Wasserbad geschüttelt. Nach der Zentrifugation des Ansatzes bei 12400 g für 60 min bei 4 °C besteht das Pellet aus einer weißen und einer beigefarbenen Schicht. Unter Verwendung des Überstandes wurden beide Schichten selektiv resuspendiert und durch Zentrifugation bei 12400 g für 60 min bei 4 °C voneinander getrennt. Durch mehrfache Wiederholung des Vorgangs und jeweiliger Vereinigung der Suspensionen der weißen Schicht (Hüllproteine) erhält man gereinigte Hüllproteinschichten. Die Verwendung des Überstandes zur Trennung beider Schichten ist notwendig, da die polymeren Gitter der Hüllproteine in einem Gleichgewicht mit den Monomeren stehen und die Verwendung von frischem Puffer zu einer deutlich verringerten Ausbeute führte (eigene Untersuchungen). Abschließend wurden die Hüllproteine einmalig mit Standard-Puffer gewaschen und bei 4 °C gelagert.

3.5 Rekrystallisation von Hüllproteingittern

Die Rekrystallisation der Hüllproteinschichten wurde als optionaler Reinigungsschritt zur Abtrennung sedimentierbarer Verunreinigungen wie Geißeln oder Zellwandbestandteile gemäß einer modifizierten Methode nach Messner und Sleytr (1988) durchgeführt.

3.5.1 Solubilisierung der Hüllproteine

Zur Solubilisierung der Proteine wurde die Hüllproteinsuspension mit einer eingestellten Proteinkonzentration von 20 mg ml⁻¹ mit der fünffachen Menge (v/v) 6 M Guanidiniumhydrochlorid in 50 mM TRIS, pH 7,2 versetzt und 6 h bei RT gerührt. Durch erneute Zentrifugation bei 12400 g für 60 min bei 4 °C wurden nicht hydrolysierte Peptidoglykanreste, Geißeln, und andere sedimentierbare Zellwandbestandteile von den gelösten Hüllproteinen getrennt.

3.5.2 Dialyse der Proteinproben und Rekrystallisation

Die in 3.5.1 gewonnene Proteinlösung wurde in der Folge in einen zuvor in VE-Wasser ausgekochten und gespülten Dialyseschlauch (Spectra/Por[®], Ausschlußgrenze 12-14 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, California, USA) überführt und gegen 2 l 10 mM CaCl₂ für 24 h bei 4 °C unter ständigem Rühren dialysiert. Während dieser Zeit findet eine Reassemblierung der Hüllprotein-Monomere zu Schichten statt. Die Hüllproteinschichten wurden erneut bei 12400 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert, in Standard-Puffer resuspendiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten und Proteinsuspensionen der einzelnen Reinigungsschritte erfolgte nach Lowry et al. (1951) mit dem Proteinbestimmungs-kit von Sigma (Sigma Diagnostics, Deisenhofen). Dabei erfolgt eine Komplexbildung zwischen dem alkali-schen Kupfertartrat mit den Peptidbindungen. Unter Zugabe des Phenol-Reagenz bildet sich ein violetter Farbstoff, dessen Konzentration durch die Messung der Absorption im Wellenlängenbereich von 500-800 nm bestimmt werden kann. Dazu wurden 10-200 µl Probe mit 0,1 M NaCl (zur Reduktion störender Einflüsse durch Ampholyte) auf 1 ml aufgefüllt, mit 0,1 ml Natriumdeoxycholat-Lösung (1,5 mg ml⁻¹) versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml 72 %iger (w/v) Trichloressigsäure wurde der Ansatz gemischt und bei 23100 g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,0 ml Lowry-Reagenz mit Natriumdodecylsulfat aufgenommen, mit 1 ml VE-Wasser verdünnt, gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 0,5 ml Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz versetzt, sofort gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 750 nm (d=1cm) im Spektralfotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge) gegen eine Referenz aus Standardpuffer, der entsprechend den Proben behandelt wurde, gemessen. Die Eichkurve (Abb. 3.6) wurde unter identischen Bedingungen mit 0-400 µg Rinderserumalbumin (BSA) in 1 ml 0,1 M NaCl erstellt.

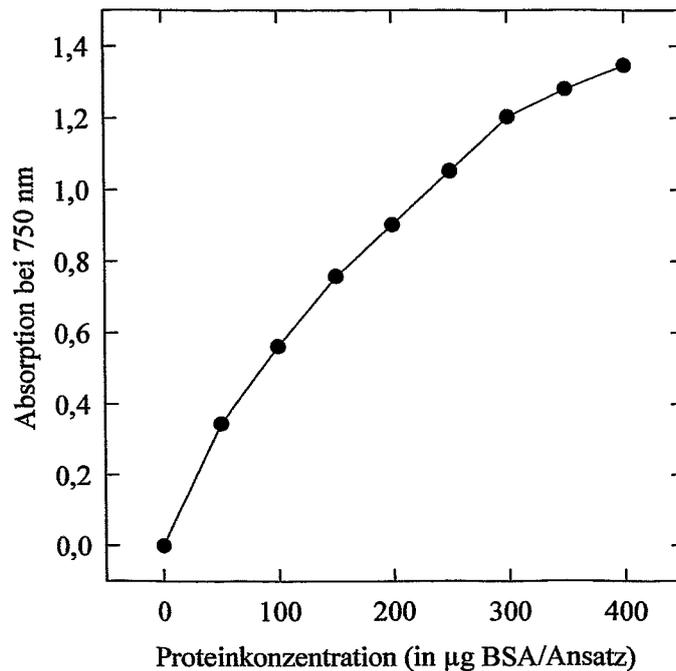


Abb. 3.6: Eichkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Eichkurve wurde mit 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 und 400 µg Rinderserumalbumin pro 1 ml 0,1 M NaCl erstellt.

3.7 Bestimmung von Trockengewichten

Die Bestimmung der Trockengewichte von Zellen, Sporen, Zellwänden oder Proteinen erfolgte nach Einwaage einer definierten Menge des jeweiligen Feuchtgewichts und der Trocknung der Proben im Vakuumtrockenschrank (Heraeus Kompakt Vakuumschrank VT 6025, Kendro Laboratory Products, Hanau) bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz (Koch 1994). Die Proben wurden dazu in regelmäßigen Abständen aus dem Trockenschrank entnommen, im Exsikkator auf RT abgekühlt und mittels einer Analysenwaage (MasterPro LA120S, Sartorius, Göttingen) gewogen. In gleicher Weise wurden zuvor die Leergewichte der verwendeten Reaktionsgefäße und die Trockengewichtsanteile der jeweils verwendeten Puffer oder von Wasser bestimmt.

3.8 Analyse von Proteinlösungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Analytische denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) wurden im vertikalen System (Bio-Rad Mini-PROTEAN® II oder DCode®-System, Netzgerät: Bio-Rad PowerPac 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules) im diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Das Trenngel war entweder 50 mm hoch, 90 mm breit und 0,75, 1 oder 1,5 mm dick (Mini-Protean® II Kammer) oder 120 mm hoch, 160 mm breit und 1 mm dick (DCode®-System). In beiden Fällen wurde ein 10 mm hohes Sammelgel auf das Trenngel gegossen, und ein Kamm zur Ausbildung von 10, 15 oder 20 Probestaschen (39, 49 oder 98 µl Volumen) eingesetzt.

3.8.1 Herstellung der Gele

Benötigte Lösungen:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe)

Acrylamid, 30 % (w/v)

N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,8 % (w/v)

Trenngelpuffer 1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer 0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8

10x Laufpuffer 0,25 M TRIS, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS (pH ≈ 8,3)

Die Komponenten des Trenngels wurden gemäß dem Pipettierschema (Tab. 3.8.1), mit Ausnahme von 10 % SDS, TEMED und Ammoniumperoxodisulfat (APS) in ein Becherglas pipettiert und unter Rührung im Vakuum entgast. Nach Zugabe von 10 % SDS, TEMED und 10 % Ammoniumperoxodisulfat wurde die Lösung zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und mit Wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Die Polymerisation dauerte 45-60 min; danach wurde das Butanol entfernt, und die Geloberkante mit VE-Wasser gespült. Die Komponenten des Sammelgels wurden gemischt und auf das Trenngel gegossen. Zur Ausbildung von 10-15 Probestaschen wurde ein Trogformer eingesetzt. Nach 30-45 min wurde dieser entfernt und die Taschen mit VE-Wasser gespült. Das Gel wurde dann in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Für denaturierende Gele wurde ein 4%iges Sammelgel und ein 5 - 12%iges Trenngel verwendet.

Tab. 3.8.1: Pipettierschema zur Herstellung von Gelen: Die Angaben sind in ml pro zwei Gele in der Mini-PROTEAN® II Kammer und in ml pro Gel für das DCode®-System (Mengen in Klammern)

	Trenngel				Sammelgel
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	4 %
Acrylamid/Bis (37,5:1)	3,34	5	6,68	8	1,33
Trenngelpuffer	5	5	5	5	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	2,5
Seralpur-Wasser	11,34	9,7	8,04	6,7	6,07
10 % (w/v) SDS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
TEMED	0,01 (0,008)	0,01 (0,008)	0,01 (0,008)	0,01 (0,008)	0,01
10 % (w/v) APS	0,1 (0,08)	0,1 (0,08)	0,1 (0,08)	0,1 (0,08)	0,05

3.8.2 Probenbehandlung und Durchführung der Elektrophorese

Die zu untersuchenden Proben enthielten 0,5-150 µg Protein in maximal 45 µl Volumen. Bei denaturierenden Gelen wurde die Probe mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und 4 min bei 95 °C im Wasserbad (Typ WB 7, Memmert, Schwabach) inkubiert. Probenpuffer:

TRIS	1,97 g
Bromphenolblau	5 mg
Glycerin	5,8 ml
SDS	1 g
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
Seralpur-Wasser	ad 50 ml

Als Referenz diente ein Protein-Molekulargewichtsstandard, high range (Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Germany): Myosin (H-Kette, 200 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), Rinder-serumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), β-Lactoglobulin (18,4 kDa), Lysozym (14,3 kDa). Alternativ wurden zusätzlich α₂-Makroglobulin (181 kDa) und β-Galactosidase (*E.coli*, 116 kDa) verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe einer 100 µl Hamilton-Spritze in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 50 V im Sammelgel und von 200 V im Trenngel bei RT durchgeführt und nach Erreichen der Gelunterkante (Anode) durch die Bromphenolblaufront beendet.

3.8.3 Unspezifische Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250

Proteine können im Polyacrylamidgel über eine unspezifische Färbung mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue nachgewiesen werden. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, insbesondere an Arginin, weniger an Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Stoschek 1990).

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R-250	500 mg
	Methanol (98 %)	408 ml
	Essigsäure (100 %)	100 ml
	VE-Wasser	492 ml
Entfärbelösung:	Methanol (98 %)	500 ml
	Essigsäure (100 %)	100 ml
	VE-Wasser	1400 ml

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde dazu das Gel aus der Kammer entnommen und in einer verschließbaren Wanne mit Färbelösung auf einem Horizontalschüttler bei 50 rpm (IKA Vibrax-VXR, IKA Labortechnik, Staufen) für mindestens 1 h gefärbt. Die Entfärbung erfolgte anschließend über Nacht. Die Empfindlichkeitsgrenze dieser Färbung liegt bei 0,1-1,0 µg Protein pro Bande.

3.8.4 Unspezifische Silberfärbung

Nach erfolgter unspezifischer Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 besteht bei unzureichender Färbung der Proteine die Möglichkeit einer ebenfalls unspezifischen Silberfärbung nach einer modifizierten Methode nach Morrissey (1981, Hoefler 1994). Dabei werden Silber-Ionen von Proteinen gebunden und durch Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen und Peptidbindungen zu Silberkeimen reduziert. Unter Verwendung starker Reduktionsmittel erfolgt eine vollständige Reduktion aller Silber-Ionen im Gel zu metallischem Silber. Dies erfolgt in der Nähe von Silberkeimen jedoch wesentlich schneller als im restlichen Gel, was insbesondere zur Braunfärbung der Proteine führt. Damit nicht alle Ionen im Gel reduziert werden, wird die Reaktion bei ausreichender Färbung der Proteine durch eine starke pH-Erniedrigung gestoppt.

Für die Färbung werden folgende Lösungen benötigt:

Entfärbelösung I:	Methanol (98 %)	400 ml
	Essigsäure (100 %)	70 ml
	VE-Wasser	530 ml
Entfärbelösung II:	Methanol (98 %)	50 ml
	Essigsäure (100 %)	70 ml
	VE-Wasser	880 ml
Vernetzer-Lösung:	Glutaraldehyd (50 %)	20 ml
	VE-Wasser	80 ml
DTT-Lösung:	1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	5 mg
	VE-Wasser	ad 1000 ml
Silbernitrat-Lösung:	AgNO ₃	1 g
	VE-Wasser	ad 1000 ml
Natriumcarbonat-Lösung:	Na ₂ CO ₃	60 g
	VE-Wasser	ad 2000 ml
Entwicklerlösung:	3 % Natriumcarbonatlösung	200 ml
	Formaldehyd (37 %)	100 µl

Das Gel wurde entweder nach erfolgter Coomassie Brillant Blue-Färbung oder direkt nach Beendigung der Gelelektrophorese in einer verschließbaren Wanne mit 100 ml Entfärbelösung I auf einem Horizontalschüttler bei 50 rpm für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Entfärbelösung I durch 100 ml Entfärbelösung II ersetzt und vorsichtig für 30 min bei RT geschüttelt. Die Entfärbelösung II wurde verworfen und durch 100 ml Quervernetzungslösung ersetzt und erneut für 30 min geschüttelt. Danach wurde die Quervernetzerlösung abgossen und das Gel mehrfach für 2 h mit Wasser gewaschen (alternativ kann das Gel in 2 l Wasser über Nacht gelagert und am nächsten morgen 30 min mit frischem Wasser gespült werden). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Gel mit DTT-Lösung übergossen und 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde danach sorgfältig abgossen, 100 ml der Silbernitrat-Lösung zugegeben und 30 min leicht geschüttelt. Das Gel wurde erneut in VE-Wasser gewaschen, kurz geschwenkt und das Wasser wieder abgossen. 50 ml Entwickler-Lösung wurden zugegeben, kurz geschwenkt und abgossen.

Dies wurde insgesamt zweimal wiederholt, dann 100 ml der Entwickler-Lösung zum Gel gegeben. Die Braunfärbung der Banden erfolgte unter leichtem Schütteln. Um die Färbung zu stoppen, wurde die Entwickler-Lösung abgossen, das Gel sofort mit Wasser gewaschen und mit Entfärbelösung II versetzt. Das Gel wurde mehrfach mit Entfärbelösung II gewaschen, mit Wasser gespült und zur Lagerung in Folie eingeschweißt. Die Empfindlichkeitsgrenze dieser Färbung liegt bei 2-5 ng Protein pro Bande.

3.8.5 Spezifische Färbung von Glykoproteinen

Der spezifische Nachweis von Glykoproteinen in SDS-Gelen erfolgte mittels der Methode nach Zacharius et al. (1969, McGuckin und McKenzie 1958). Dabei werden durch Periodsäureoxidation C-C-Bindungen mit OH-Gruppen in korrespondierender Position gespalten und in Aldehydgruppen (Dialdehyde) überführt. Diese können über ein Aldehydreagenz wie das Schiff's Reagenz unter Bildung eines roten Farbstoffs nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgte bei 25 °C. Lösungen für die Färbeprozedur:

Trichloressigsäure	12,5 %
Periodsäure	1 % in 3 %iger Essigsäure
Silbernitratlösung	0,1 N
Metabisulfit	0,5 %
Essigsäure	3-7,5 %

Schiff's Reagenz = Fuchsin-schweflige Säure (hergestellt nach McGuckin 1958)

Zum spezifischen Nachweis von Glykoproteinen wurde das Gel in 25-50 ml 12,5 % Trichlor-essigsäure für 30 min geschwenkt. Danach wurde das Gel mit VE-Wasser gespült und in 1 % Periodsäure, hergestellt in 3 %iger Essigsäure, für 50 min inkubiert. Anschließend wurde die Periodsäure durch sechsmaliges Waschen des Gels mit 200 ml VE-Wasser für 10 min oder über Nacht entfernt. Alternativ dazu erfolgte nach dem letzten Waschschrift ein Test auf IO_3^- -Ionen durch Inkubation mit 0,1 N Silbernitrat-Lösung. Konnten keine IO_3^- -Ionen nachgewiesen werden, wurden zwei weitere Waschschriffe durchgeführt. Das Gel wurde dann unter Lichtausschluß mit Schiff's Reagenz für 50 min inkubiert und 3 mal mit 25-50 ml frisch hergestellter 0,5 %iger Metabisulfit-Lösung für 10 min gewaschen. Die Hintergrundfärbung konnte durch mehrfaches Waschen mit VE-Wasser entfernt werden. Das Gel ist in 3-7,5 % Essigsäure lagerfähig.

Als positive Referenzen wurde saures α_1 -Glykoprotein (= Orosomucoid, Sigma, Deisenhofen) sowie α_2 -Makroglobulin ($M_r = 181$ kDa, Sigma, Deisenhofen) und als negativ Referenz Hüllprotein von *Sporosarcina ureae* DSM 320 (persönliche Mitteilung R. Wahl) verwendet.

3.8.6 Videodensitometrischer Scan und computergestützte Auswertung der Proteinprofile im Polyacrylamidgel

Die Dokumentation analytischer Gele erfolgte mit Gel Print System 2000i (MWG Biotech, Ebersberg). Die computergestützte Auswertung des videodensitometrischen Scans erfolgte mit dem Programm RFLPScan[®] (Scanalytics, Billerica, USA). Dabei konnte über die Integration der Peakflächen und über die R_f -Werte der Proteine sowohl deren relativer Anteil am Proteingemisch als auch deren Größe bestimmt werden.

3.9 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenzen von Proteinen oder Proteinfragmenten erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden die Proteine in der Probe mittels einer denaturierenden PAGE gemäß ihrem Molekulargewicht separiert. Die getrennten Proteine oder Fragmente wurden anschließend über einen elektrophoretischen Transfer (Western-Blot) von dem Gel auf eine zur Sequenzierung geeignete Membran mit hoher Proteinbindungskapazität (PVDF-Membran) übertragen. Nach dem vollständigen Transfer wurden gebundene Proteine auf der Membran mit dem Farbstoff Ponceau S angefärbt. Die gewünschten Proteinbanden wurden aus der Membran herausgeschnitten und direkt für die Sequenzierung verwendet.

3.9.1 Präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Präparation der Proteine oder Proteinfragmente zur Sequenzanalyse erfolgte durch die Auftrennung der nativen Hüllproteine oder der Verdauungsansätze über denaturierende PAGE. Dazu wurde entsprechend der Beschreibung in Kap. 3.8.1 und 3.8.2 vorgegangen, jedoch nachfolgende Besonderheiten berücksichtigt: zur Herstellung der Gele und Lösungen wurden ausschließlich hochreine Substanzen verwendet, da Verunreinigungen der Chemikalien mit reaktiven Substanzen zur Blockierung der Seitenketten der Aminosäuren führen können.

Außerdem wurden alle Lösungen zusätzlich durch ein 0,45 µm Filter (Rotilabo® Spritzenfilter, steril aus Zellulosemischester, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) filtriert und im Vakuum entgast. Um eine Reaktion der Seitenketten der Aminosäuren mit überschüssigen freie Radikale und Oxidantien aus der Polymerisierungsreaktion des Gels zu vermeiden, erfolgte die Polymerisation der Gele über Nacht bei RT (Hunkapiller et al. 1983, Madsudaira 1990). Ferner wurde die Denaturierung der Proben bei 80 °C für 10 min durchgeführt, um auch dabei unspezifische Reaktionen zu verhindern. Da für eine Sequenzierung mindestens 100 µg Protein notwendig sind, wurden in Abhängigkeit von der Zahl der verwendeten Spuren 20-150 µg Protein pro Spur aufgetragen.

3.9.2 Western-Blot

Die getrennten Fragmente auf dem Gel wurden auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Sequi-Blot® PVDF-Membran, Proteinbindungskapazität 170-200 µgcm⁻², Bio-Rad Laboratories, Hercules) übertragen. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in einer horizontalen, halbtrockenen Transferkammer (Trans-Blot® SD, Bio-Rad Laboratories, Hercules) im diskontinuierlichen Puffersystem (Westermeier et al. 1988) zur Minimierung von Unterschieden hinsichtlich der Wanderungsgeschwindigkeiten unterschiedlich großer Proteine. Für den Blot erforderliche Lösungen:

	5x TRIS-CAPS-Puffer 60 mM TRIS-Base	
	40 mM CAPS	
Anodenpuffer:	5x TRIS-CAPS-Puffer	20 ml
	99,8 % Methanol	15 ml
	Seralpur-Wasser	65 ml
Kathodenpuffer:	5x TRIS-CAPS-Puffer	20 ml
	10 % (w/v) SDS	1 ml
	Thioglycolat	1,14 g
	Seralpur-Wasser	79 ml

Es wurden eine PVDF-Membran und zwei extra dicke Filterpapiere (7,5x10 cm, Bio-Rad Laboratories, Hercules) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Danach wurde die PVDF-Membran 10-15 min in 99,8%igem Methanol und anschließend mindestens 30 min in Anodenpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wird währenddessen in Kathodenpuffer äquilibriert.

Die Schichtung für den Blot setzte sich wie folgt zusammen: ein in Anodenpuffer getränktes Filterpapier wurden luftblasenfrei auf die mit Seralpur-Wasser angefeuchtete Platinanode gelegt. Darauf wurde zuerst die Membran und dann das Gel gelegt. Es folgte ein mit Kathodenpuffer getränktes Filterpapier. Um vorhandene Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zwischen den einzelnen Schichten zu entfernen, wurde jede Lage mit einem Glasstab leicht gewalzt. Danach wurde die Kathode aus rostfreiem Stahl mit Seralpur-Wasser angefeuchtet und unter leichtem Druck aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von $1,5 \text{ mA cm}^{-2}$ (68 mA) und dauerte 30-60 min.

3.9.3 Färben und Entfärben der PVDF-Membran

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran 3 mal für jeweils 5 min in VE-Wasser gespült und anschließend für 30 min in 0,1 % (w/v) Ponceau S-Färbelösung (Sambrook et al. 1989) inkubiert und die Hintergrundfärbung mit VE-Wasser ausgewaschen.

Färbelösung	Ponceau S	100 mg
	Essigsäure (100 %)	5 ml
	VE-Wasser	ad 100 ml

Nach dem Entfärben wurde die Membran mehrere Stunden an der Luft auf Filterpapier getrocknet, anschließend in einen mit N_2 begasten Gefrierbeutel eingeschweißt und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

3.9.4 Sequenzanalyse der N-terminalen Aminosäuren

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurde am Institut für Biochemie der Universität Leipzig durch Hr. Dr. J. Bär durchgeführt. Die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteinbanden wurden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und zur Sequenzierung in einen Gas-Flüssigphasensequensator (pulsed liquid phase protein/peptid sequencer 473 A, Applied Biosystems, Funkstadt) mit gekoppeltem Phenylthiohydantoin-Aminosäure-Analyzer (610 A, Applied Biosystems, Funkstadt) eingesetzt.

3.10 Limitierte Proteolyse von Hüllproteinen

3.10.1 Vorbehandlung der Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin

Viele Endoproteasen besitzen die Fähigkeit, in Abhängigkeit von der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteinsubstrats, der Dauer der Proteolyse, der Inkubationstemperatur, dem Enzym:Substrat-Verhältnis sowie der Ionenstärke das Protein vollständig in einzelne Aminosäuren zu spalten. Um eine limitierte Proteolyse zu erreichen darf keine vollständige Spaltung der Proteine erfolgen. Deshalb wurde mit nativen Hüllproteinen sowie mit langen Proteolysezeiten bei niedrigen Temperaturen gearbeitet, bei mittleren Enzym:Substrat-Konzentrationen und mit Proteasen mit geringer Spezifität (Beynon und Bond 1989, Carrey 1990). Die folgenden Proteasen wurden dazu kurz vor Gebrauch entsprechend ihrer pH-Optima in geeigneten Pufferlösungen aufgenommen, gegebenenfalls durch den Zusatz von Ca^{2+} -Ionen aktiviert sowie stabilisiert (Flannery et al. 1989) und sterilfiltriert:

Trypsin	(Serin-Endoprotease, Rinder-Pankreas, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg) in Lösung A: 100 mM TRIS-Base, 1 mM HCl, 2mM CaCl_2 , pH 8,6
α -Chymotrypsin	(Serin-Endoprotease, Rinder-Pankreas, Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg) in Lösung B: 100 mM TRIS-Base, 1mM HCl, pH 8,0
Proteinase K	(Serin-Endoprotease, <i>Tritirachium album</i> , Sigma, Deisenhofen) in Lösung C: 100 mM TRIS-HCl, 1 mM CaCl_2 , pH 8.0
Thermolysin	(Zink-Endoprotease, <i>Bacillus thermoproteolyticus rokko</i> , Sigma, Deisenhofen) in Lösung D: 1 mM CaCl_2

3.10.2 Verdau der Hüllproteine

Zur Gewinnung proteolytischer Fragmente der Hüllproteine wurden diese mit Proteasen im Verhältnis von 80:1, 50:1 oder 10:1 (w/w) verdaut. Unter Einhaltung steriler Kautelen wurde dazu entweder isoliertes Hüllprotein oder intakte Zellen durch Zentrifugation bei 12400 g für 60 min bei 4 °C oder bei 6000 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, in den entsprechenden Lösungen (A, B, C, D) mit gelöster Protease gemäß dem Pipettierschema in Tab 3.10.2 resuspendiert und bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 3 h, 6 h, 1 d und 2 d wurde eine Probe von 50 μl entnommen.

Diese Polymere unterschiedlicher Kettenlänge können mit Amino-, Imino- und Guanidino-
gruppen reagieren und so in Abhängigkeit von dem pH-Wert, der Temperatur, der Glutar-
aldehydkonzentration und der Inkubationszeit Proteine oder andere biologische Moleküle
vernetzen. Bei der Reaktion im leicht basischen Milieu können Aminogruppen mit den
Aldehydgruppen und den C-C-Doppelbindungen des Polymers reagieren (siehe Abb.
3.11.1b).

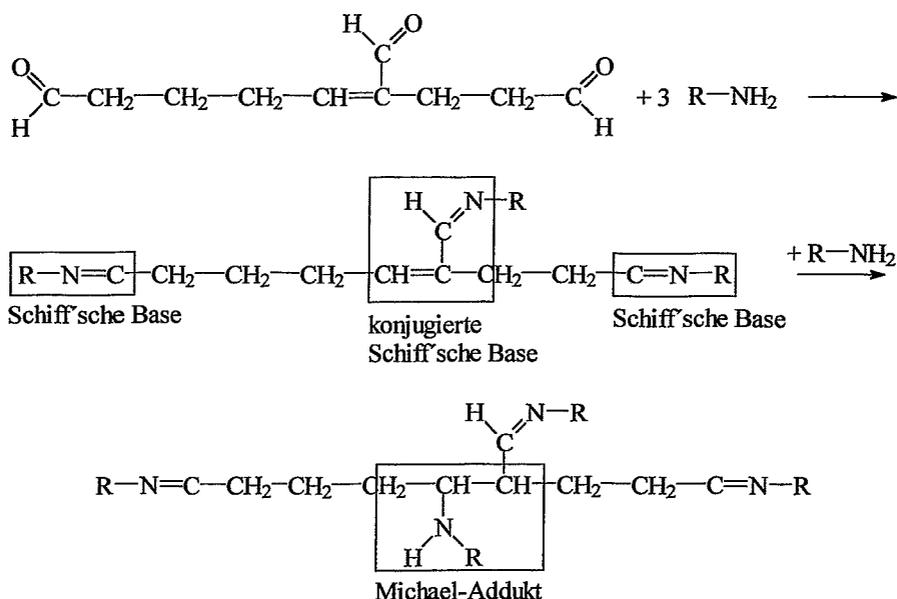


Abb. 3.11.1b: Reaktionsschema von Glutaraldehyd mit primären Aminogruppen

Reagieren primäre Aminogruppen mit den endständigen Aldehydgruppen, so entstehen Schiff'sche Basen. Findet eine Reaktion mit der Aldehydseitenkette statt, so entsteht dabei eine stabilere konjugierte Schiff'sche Base. Ein noch stabileres Produkt entsteht durch eine Michael-Addition der Aminogruppe an die C-C-Doppelbindung. Auf Grund dieser Reaktionen bewirkt die Vernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd einen Verlust positiver Ladungen, wodurch das Proteinmolekül eine negative Nettoladung erhält.

Zur Vernetzung der nativen Hüllproteinschichten wurden diese in der 50fachen Menge (w/v) 2,5 %iger Glutaraldehyd-Lösung in 100 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 6,8 resuspendiert und für 2 h bei RT geschüttelt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das gleiche Volumen einer 2,5 %igen Ethanolamin-Lösung zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 12400 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit VE-Wasser gewaschen. Die vernetzten Hüllproteinschichten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.11.2 Vernetzung mit 1-Ethyl-3-(N,N'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid

Eine Methode zur Vernetzung von Proteinen im Hüllproteingitter über die α -Carboxylgruppen am C-terminalen Ende von Proteinen und die β - und γ -Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure stellt die Amidierung der Carboxylgruppen dar. Diese kann über die Aktivierung mit Carbodiimiden wie 1-Ethyl-3-(N,N'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) in Anwesenheit von Aminen erfolgen (Hoare und Koshland 1967). Dabei bindet das Carbodiimid an den Sauerstoff des Carboxylatanions, wodurch ein reaktives Zwischenprodukt entsteht, das mit vorhandenen Aminen zum entsprechenden Amid reagiert (Abb. 3.11.2). EDC besitzt eine gute Wasserlöslichkeit, hohe Reaktivität und hohe Spezifität.

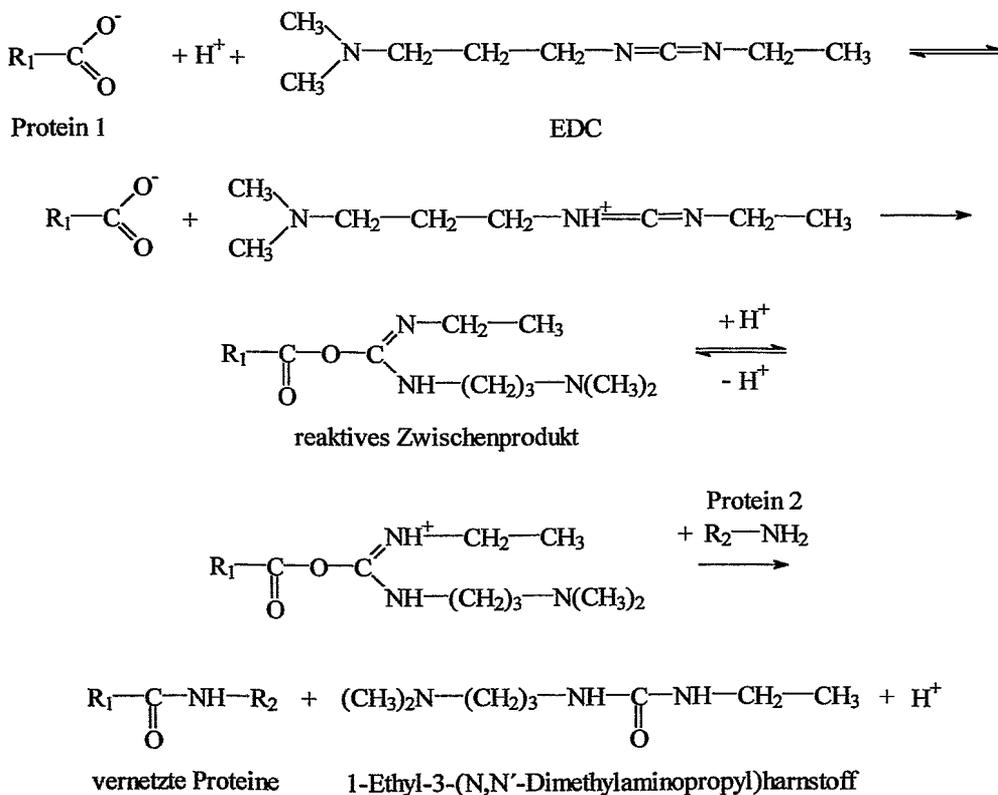


Abb. 3.11.2: Amidierung von Carboxylgruppen mittels EDC

Zur Vernetzung der nativen Hüllproteinschichten wurden der Proteinsuspension der 5000fache molare Überschuß an EDC als Festsubstanz zugesetzt, gelöst und für zwei Tage bei RT geschüttelt. Danach wurde der Ansatz bei 12400 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit VE-Wasser gewaschen. Die vernetzten Hüllproteinschichten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.11.3 Untersuchungen zur pH-Stabilität der Hüllproteingitter

Die Untersuchung der pH-Stabilität nativer Hüllproteinschichten erfolgte durch Aufnahme von UV/VIS-Spektren (siehe dazu Kap. 3.18.1) der Proteinsuspension oder Proteinlösung in Citrat-Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer.

Zur Durchführung wurden je 300 µg native oder vernetzte Hüllproteinschichten in 1000 µl Puffer aus 0,1 M Zitronensäure und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat mit pH-Werten von 2-9 resuspendiert, 10 min bis 48 h bei RT inkubiert und das Spektrum aufgenommen.

3.12 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® C+T Kits von Macherey-Nagel (Macherey Nagel GmbH, Düren) und der darin enthaltenen Chemikalien (Puffer T1, B5, BE). Dazu wurden die Zellen von 1,5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min bei 4 °C gewonnen, in 1ml TEN-Puffer (10 mM TRIS-Base, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert und bei 6000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 180 µl T1-Puffer resuspendiert, mit 25 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹) versetzt und nach dem Mischen des Ansatzes bei 56 °C für 30 min unter gelegentlichem Schütteln lysiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl B3-Puffer versetzt und bei 70 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl 96 % Ethanol wurde der Ansatz gemischt und auf eine NucleoSpin-Säule in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgetragen, 1 min bei 6000 g bei RT zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Säule wurde dann zweimal gewaschen, indem jeweils 500 µl der Lösung B5 aufgetragen und die Säule für 1 min bei 6000 g bei RT zentrifugiert wurde. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 6000 g und RT, um restliche B5-Lösung vollständig zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und 100 µl auf 70 °C vorgeheizter BE-Puffer aufgetragen. Der Ansatz wurde für 1 min bei 70 °C inkubiert und die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 6000 g und RT eluiert. Der Erfolg der Isolation wurde mittels konventioneller Agarosegelelektrophorese überprüft und die DNA bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.13 Agarosegelelektrophorese

3.13.1 Herstellung konventioneller Agarose-Gele

Für konventionelle Agarosegelelektrophoresen wurden submerse, horizontale Gele verwendet, bei denen die Trennung der DNA im elektrischen Feld für 1,5 h bei 3,4 V/cm (Netzgerät Bio-Rad PowerPac 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules) erfolgte.

Dazu waren folgende Lösungen erforderlich:

TBE-Puffer:	TRIS-Base	90 mM,
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2 mM
3x Stopp-Mix:	Harnstoff	4 M
	Saccharose	50 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanolblau	0,25 % (w/v)
	EDTA	50 mM
KBL	1 kb Plus DNA Ladder	3 µl
	Stopp-Mix (3x)	6 µl
	VE-Wasser	21 µl

Zur Trennung der DNA wurden 1,2 %ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Dazu wurde die Agarose in den TBE-Puffer gegeben und durch kurzes Kochen in der Mikrowelle gelöst. Diese Lösung wurde luftblasenfrei in die Gelkammer mit eingelegtem Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Jeweils 1-2 µl Probe wurden dann mit 2 µl VE-Wasser und 2 µl Stopp-Mix (3x) versetzt, gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als Längenstandard diente ein Kilobasenleiterstandard (1kb Plus DNA Ladder: 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3000, 5000 und 12000 bp, GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 mg ml⁻¹) gefärbt und anschließend kurz in VE-Wasser geschwenkt. Die DNA konnte mittels eines UV-Transilluminators im Gel Print 2000i (MWG Biotech, Ebersberg) sichtbar gemacht und als digitales Bild gespeichert werden.

3.13.2 Herstellung von Gelen zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten

Für die Auftrennung der Restriktionsfragmente wurden ebenfalls submerse, horizontale Gele verwendet, bei denen die Trennung der DNA im elektrischen Feld für 4 h bei 2,5 V cm⁻¹ (Netzgerät Bio-Rad PowerPac 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules) erfolgte.

Es wurden dieselben Lösungen wie in Kap. 3.13.1 beschrieben verwendet. Zur Trennung der DNA-Fragmente wurden 3,5 %ige Agarosegele (Small DNA Low Melt Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) in TBE-Puffer verwendet.

Die Agarose wurde in den TBE-Puffer gegeben, das Gesamtgewicht zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlusts während der Erwärmung bestimmt, gründlich erwärmt und für mindestens 1 h bei 70 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut das Gesamtgewicht bestimmt und die Differenz mit Seralpur-Wasser ausgeglichen. Das Gel wurde luftblasenfrei in die Gelkammer mit eingelegtem Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses mit TBE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und für mindestens 1 h bis über Nacht zur vollständigen Verfestigung bei RT stehen gelassen. Es wurde dann der komplette Verdauungsansatz mit 2 µl dreifach konzentriertem Stopp-Mix versetzt, gemischt und in die Geltasche pipettiert. Als Längenstandard diente erneut der Kilobasenleiterstandard (siehe Kap. 3.13.1). Die Dokumentation der Gele erfolgte in gleicher Weise wie zuvor beschrieben.

3.14 Sequenzanalysen der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Zur Sequenzanalyse der Hüllproteingene beider *B. sphaericus*-Stämme waren mehrere Teilschritte nötig. Zunächst wurden auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenzen der nativen Hüllproteine und der proteolytisch gewonnenen Fragmente Vorwärts- und Rückwärts-Primer entworfen. Diese Primer wurden dann zur Vervielfältigung (Amplifikation) der durch die Primer begrenzten Genteilstücke verwendet. Die gereinigten Amplifikate wurden dann direkt zur Sequenzierung genutzt. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau M. Schnorpfeil und Frau K. Flemming durchgeführt.

3.14.1 Primerdesign auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenzen

Das Primerdesign erfolgte auf der Grundlage der N-terminalen Aminosäuresequenzen der nativen Hüllproteine und der proteolytisch gewonnenen Fragmente. Dazu wurde für Vorwärts-Primer die jeweilige Aminosäuresequenz in die entsprechende DNA-Sequenz umgeschrieben und unter Berücksichtigung aller Möglichkeiten gemäß des degenerierten genetischen Codes die Basensequenz im Einbuchstabencode zur Bestellung der Primer verwendet.

Für Rückwärts-Primer wurde erneut die Aminosäuresequenz in die entsprechende DNA-Sequenz unter Berücksichtigung aller Möglichkeiten gemäß des degenerierten genetischen Codes übersetzt, die Basenabfolge in die komplementäre Sequenz umgeschrieben und in 3'→5'-Richtung gelesen im Einbuchstabencode zur Bestellung der Primer verwendet. Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG-Biotech AG (Ebersberg) im Reinheitsgrad „High Purity Salt Free[®]“ (HPSF[®]).

3.14.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifikation von Teilen des Hüllproteingens wurde die Gesamt-DNA der jeweiligen Bakterien einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit hüllproteinspezifischen Primern unterzogen. Dabei flankieren zwei Primer, ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer, das Amplifikat. Es wurden Primer gemäß der in Kap. 3.14.1 gemachten Angaben verwendet. Ein Amplifikationszyklus umfasst insgesamt vier Schritte: 1.) die Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei mindestens 92 °C, 2.) das spezifische Anheften der Primer an die DNA, 3.) die Kettenverlängerung durch die *Taq*-Polymerase (bei dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase von 72 °C), dabei gilt, dass ca. 1 kb pro min synthetisiert wird und 30-35 Zyklen zu einer ausreichenden Vervielfältigung der DNA (nach 30 Zyklen sind theoretisch $2,15 \times 10^9$ Stränge entstanden) notwendig sind und 4.) die Verlängerung, durch die die Synthese kompletter Stränge sichergestellt wird. Ein PCR-Ansatz mit einem Volumen von 10-100 µl setzte sich wie folgt zusammen: je 1 µM Primer1 oder Primer2, je 1,25 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Germany), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) BSA, 10 % (v/v) 10x Polymerase-Puffer (100 mM TRIS-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01 % (w/v) Gelatine, PE Applied Biosystems, Foster City, USA) und 0,05 U µl⁻¹ AmpliTaq Gold[®] (5 U µl⁻¹, PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Die genannten Komponenten wurden als „Master-Mix“ zusammen pipettiert und auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verteilt. Nach Zugabe von 0,05 ng µl⁻¹ Template-DNA wurden die Ansätze gemischt, zentrifugiert und die Reaktionsgefäße in einen Thermocycler mit Deckelheizung (105 °C) (T3 Thermocycler, Biometra[®], Göttingen) überführt. Es wurde jeweils auch eine Kontrolle in gleicher Weise hergestellt jedoch ohne Zugabe von DNA. In Tabelle 3.14.2 ist beispielhaft ein Programm zur Amplifikation von DNA aufgeführte. Die Temperaturen während der Anheftung wurde dabei entsprechend den Schmelztemperaturen der verwendeten Primern angepaßt.

Tab. 3.14.2: Temperatur-Programm zur Amplifikation von DNA mittels PCR

Schritte	Temperatur	Zeit (in min)	Wiederholungen
Denaturierung und Aktivierung	95 °C	3	1x
Denaturierung	95 °C	1	
Anheftung	60 °C	1	
Verlängerung	72 °C	1	5x
Denaturierung	94 °C	1	
Anheftung	58 °C	1	
Verlängerung	72 °C	1	25x
Abschließende Verlängerung	72 °C	10	1x
Pause	4 °C		

Der Erfolg der Amplifikation wurde durch eine konventionelle Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.14.3 Reinigung der Amplifikate

Zur Verwendung der Amplifikate als Template für Sequenzierungsreaktionen war es notwendig, den Ansatz von Salzen, Primern, Einzelstrang-DNA, dNTP's, Enzymen und anderen niedermolekularen Bestandteilen zu befreien. Dies erfolgte unter Verwendung des QuickStep® PCR Purification Kit (Version 4) (MoBiTec, Göttingen) und der darin enthaltenen Materialien und Säulen (SOPE Resin in 0,5 M Kaliumacetat und 0,5 mM EDTA, Pipettenspitzen, Gelfiltrationssäule in ultra reinem Wasser).

Dazu wurde das SOPE Resin vorsichtig resuspendiert und eine gemäß dem Volumen der Probe vorgegebene Menge entnommen. Das SOPE Resin wurde erneut vorsichtig mit der Probe vermischt und für 3 min bei RT stehen gelassen. Währenddessen wurde die Gelfiltrationssäule in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 3 min bei 750 g zentrifugiert und in ein sauberes Reaktionsgefäß umgesetzt. Die vorbereitete Probe wurde dann mittig auf die Säule aufgetragen und das gereinigte PCR-Produkt durch Zentrifugation für 2 min bei 750 g gewonnen. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.14.4 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion beruht auf einer kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Replikation des Templates durch Zugabe von Didesoxynucleotiden (Didesoxymethode nach Sanger) unter Verwendung nur eines Primers.

Zur Durchführung dieser Kettenabbruchreaktion wurde der ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) genutzt.

Dazu wurden für einen Ansatz insgesamt 50 ng Template-DNA eingesetzt, 1,8 µl BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix und 6,2 pmol eines Primers zugefügt und mit Seralpur-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde durch kurze Zentrifugation vereinigt und in den Thermocycler gesetzt. In Tabelle 3.14.4 ist beispielhaft ein verwendetes Programm aufgeführt. Die Temperaturen der Anheftung wurden auch dabei entsprechend den Schmelztemperaturen der verwendeten Primern angepaßt.

Tab. 3.14.4: Temperatur-Programm für die Sequenzierungsreaktion

Schritte	Temperatur	Zeit (in min)	Wiederholungen
Denaturierung und Aktivierung	96 °C	2	1x
Denaturierung	96 °C	0,5	
Anheftung	58 °C	0,25	
Verlängerung	60 °C	8	30x

Zur Reinigung der Amplifikate wurde nach der PCR eine Ethanol/Natriumacetat-Fällung bei RT durchgeführt. Dazu wurde 10 µl Reaktionsansatz mit 90 µl VE-Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 250 µl Ethanol (99,8 %) versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 15 min bei 12800 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol versetzt und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 12800 g und RT wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet für 10 min in der Sicherheitswerkbank getrocknet und mit 25 µl Template Suppression Reagent (TSR) versetzt. Nach vorsichtigem Mischen des Ansatzes wurde dieser 2 min bei 95 °C denaturiert und danach schockartig in Eis gekühlt, um eine erneute Doppelstrangbildung zu verhindern. Die automatische Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) durch Trennung in einer Kapillare mit einem Durchmesser von 50 µm und einer Länge von 61 cm in POP6-Gel. Der Auftrag der Probe erfolgte durch Elektrokinese für 50 s bei 2,5 kV. Die eigentliche Trennung wurde mit einer Spannung von 12,2 kV bei 50 °C für 120-150 min durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der „DNA Sequencing Software“ und der „Autoassembler Software“ von PE Applied Biosystems.

3.15 Identifikation und Differenzierung von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 mittels PCR und RFLP

Zur Identifizierung und Differenzierung der Stämme *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 wurde jeweils isolierte DNA (Kap. 3.12) einer Amplifikation mit hüllprotein-spezifischen Primern unterzogen (Kap. 3.14.2) und das PCR-Produkt anschließend mit der Endonuclease *MseI* (Schnittstelle des Enzyms 5'-T[↓]TAA-3') verdaut.

Für einen Ansatz wurde dazu 25 ng Amplifikat mit 1 µl *MseI* spezifischem Puffer Reakt 1 (Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Germany) und 5 U *MseI* (5 U µl⁻¹, Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Germany) versetzt und auf 10 µl mit VE-Wasser aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht im Wasserbad. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2 µl 3x Stopp-Mix (Kap. 3.13.1) beendet und mittels Agarose-Gelelektrophorese gemäß Kap. 3.13.2 analysiert.

3.16 Mikroskopische Untersuchungen

3.16.1 REM-Abbildung intakter Bakterien

Die rasterelektronenmikroskopischen (REM) Untersuchungen wurden am Institut für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden an einem Niedrigspannungs-Rasterelektronenmikroskop Gemini 982 (LEO-Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen) durch Frau O. Trommer und Frau S. Matys durchgeführt. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in dieser Arbeit zur Betrachtung von Oberflächenformen räumlich strukturierter Objekte und für energiedispersive Röntgenmikroanalysen (EDX-Analyse, NORAN Röntgendetektor) auf den betrachteten Oberflächen eingesetzt. Der nutzbare Vergrößerungsbereich bei der Rasterelektronenmikroskopie reicht von etwa fünffach bis zu 100000fach. Das erreichbare Auflösungsvermögen ist im Vergleich zum Lichtmikroskop um den Faktor 100 größer, die erreichbare Tiefenschärfe sogar um den Faktor 300.

Die Bakterien wurden dafür zunächst in 0,1 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer, pH 7,5 gewaschen und anschließend in 3% Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer, pH 7,5 für 16 h bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal in 0,1 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer pH 7,5 gewaschen und abschließend für mindestens 18 h bei 4 °C in 0,1 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer gelagert. Im folgenden wurden die Zellen auf eine Polycarbonatmembran (Isopore Membran 0.22 µm, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) aufgebracht und im Vakuumtrockenschrank bei 30 °C getrocknet. Die Filter wurden auf einem Probenhalter fixiert.

Im Falle von Proben mit sorbiertem Metall (Bakterienzellen, Xerogele oder Biocere) wurden die Proben zunächst dreimal in 0,9 % NaClO₄-Lösung, pH 4,5 gewaschen, mit Kohle-Leit-Tabs und in Leitsilber eingebettet direkt auf den Probenhalter aufgebracht. Anschließend wurden die Präparate mit Kohlenstoff besputtert (Baltec MED 010 Kleinbeschichtungsanlage, BAL-TEC AG, Liechtenstein).

3.16.2 AFM-Abbildung intakter Bakterien und isolierter Hüllproteinschichten

Die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen (AFM) wurden am Institut für Werkstoffwissenschaft der Technischen Universität Dresden an einem Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Veeco Metrology Group Santa Barbara, California, USA) in direkter Zusammenarbeit mit Herrn R. Wahl und Frau S. Matys durchgeführt. Die Rasterkraftmikroskopie wurde zur Betrachtung von Oberflächenstrukturen (Bakterien und Hüllproteinschichten) verwendet. Der Vorteil dieser Technik ist, dass Proben unter physiologischen Bedingungen, also im nativen Zustand betrachtet werden können (Müller et al. 1996, Dufrêne 2001). Der nutzbare maximale Scanbereich beträgt 150 µm x 150 µm mit einer minimal messbaren vertikalen Auslenkungen der Spitze im sub-Ångström-Bereich. Alle Untersuchungen wurden im Tapping Mode an Luft durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden die Proben als Suspension auf luftoxidierte Si-Wafer aufgetropft, 3 min stehen gelassen, dann die überstehende Flüssigkeit mittels Filterpapier abgesaugt und die Prozedur mit VE-Wasser zum Waschen der Probe wiederholt. Die Trocknung erfolgte an Luft oder im Vakuumtrockenschrank bei 30 °C für mindestens 3 h.

3.16.3 TEM-Abbildung isolierter Hüllproteinschichten

Die transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchungen wurden am Institut für Angewandte Physik der Technischen Universität Dresden an einem Hochleistungs-Transmissions-Elektronenmikroskop CM 200 (Philips, Eindhoven, Niederlande) mit einer Wolfram-Kathode bei 160 oder 200 kV in direkter Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Kirsch und Herrn R. Wahl durchgeführt. Es sind Vergrößerungen zwischen 100fach bis 800000fach möglich. Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde zur Analyse von Gitterstrukturen von Hüllproteinschichten verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden die Zell- oder Hüllproteinsuspensionen im Verhältnis 1:25 mit Standard-Puffer verdünnt, ein Tropfen der Suspension auf ein mit Kohlefilm überzogenes TEM-Netzchen aus Kupfer aufgebracht und für 1 min inkubiert.

Danach wurde überstehende Flüssigkeit mittels Filterpapier entfernt, ein Tropfen 2 %ige Uranylacetat-Lösung zur Negativ-Kontrastierung aufgebracht und für 30 bis 60 s inkubiert. Die überstehende Lösung wurde erneut mit Filterpapier entfernt und die Probe an der Luft getrocknet.

3.17 Untersuchungen zu den Wechselwirkungen intakter Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 mit Metallen

3.17.1 Metallisierung der Hüllproteinschichten mit Platin oder Palladium

Die Metallisierung der nativen oder rekristallisierten Hüllproteinschichten mit Platin und Palladium erfolgte am Institut für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden durch Herrn R. Wahl. Dazu wurden 10-30 mg Hüllproteinschichten in 1,5 ml Standard-Puffer mit 5 ml einer mindestens 24 h im Dunkeln bei RT gealterten 30 mM K_2PtCl_4 - oder K_2PdCl_4 -Lösung versetzt und für 24 h unter Lichtausschluß auf einem Schüttler bei 700 Umin^{-1} inkubiert. Die Ansätze wurden danach bei RT zweimal gegen 800 ml Seralpur-Wasser für mindestens 3 h dialysiert (Dialyseschlauch VISKING type 8/32, mit einer Ausschlußgrenze von 10-20 kDa). Die metallisierten Hüllproteinschichten wurden durch Zentrifugation bei 15000 g bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min sedimentiert und in 1 ml Seralpur-Wasser resuspendiert. Referenzproben von Hüllproteinschichten ohne Metallisierung wurden in gleicher Weise hergestellt, es wurde lediglich statt der K_2PtCl_4 -Komponente die entsprechende Konzentration von KCl verwendet.

3.17.2 Inkubation der Hüllproteinschichten mit Uran

Die Untersuchungen der Wechselwirkungen von Uran mit Hüllproteinschichten sind auf Grund der Löslichkeit des Urans nur bei sauren pH-Werten möglich, um die Bildung unlöslicher Oberflächenausfällungen zu vermeiden. Dies ist insbesondere bei höheren Urankonzentrationen zu bedenken. Die Abbildung 3.17.2 zeigt die Speziesverteilung des Urans von $9 \times 10^{-4} \text{ M}$ Uranylнитrat in 0,9 % $NaClO_4$ -Lösung, pH 4,5 an Luft. Bei pH 4,5 liegen 49 % des Urans als UO_2^{2+} und 30 % als $(UO_2)_2(OH)_2^{2+}$ vor. Die Anteile der anderen Spezies liegen alle unter 10 %.

Speziationsdiagramm von 9×10^{-4} M Uranylнитrat in 0,9 % NaClO_4 -Lösung

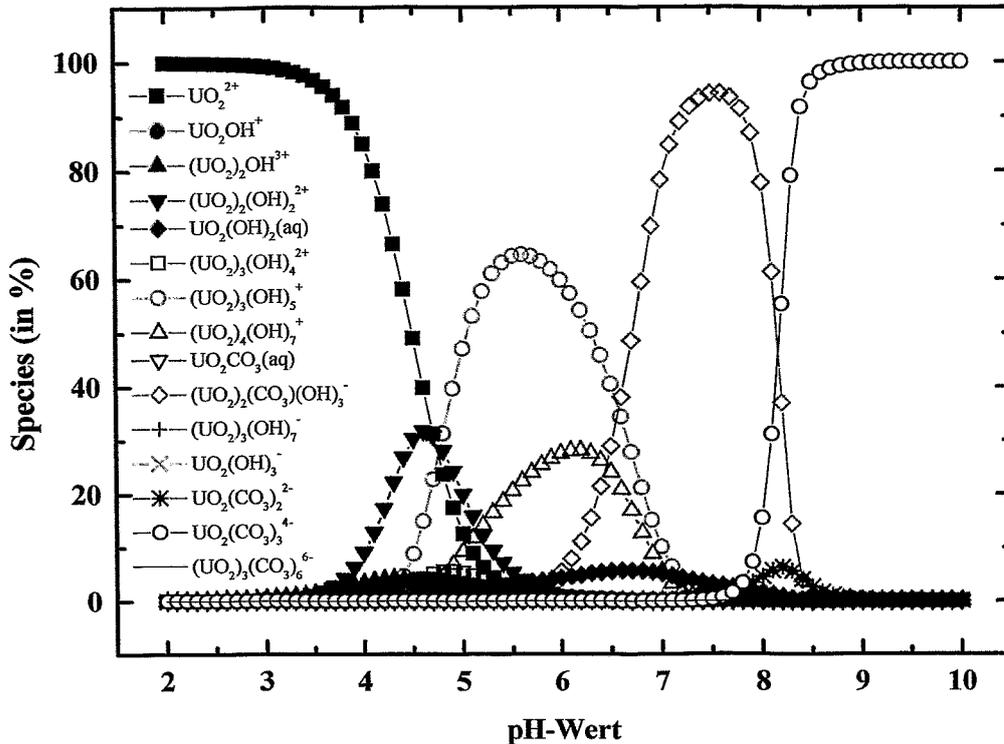


Abb. 3.17.2: Speziationskurve von 9×10^{-4} M Uranylнитrat in 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 an Luft, erstellt mit dem Programmpaket "EQ3/6" und der NEA Datenbasis (Wolery 1992, Grenthe et al. 1992).

Zur Vermeidung von Ausfällungen des Urans durch die Bildung unlöslicher Hydrolyseprodukte, wurden die Experimente bei einem pH-Wert von 4,5 durchgeführt. Da bei diesem pH-Wert native Hüllproteinschichten bereits in Monomere dissoziieren, wurden die Untersuchungen mit Glutardialdehyd- oder EDC-stabilisierten Hüllproteinschichten (Kap. 3.11.1 und 3.11.2) durchgeführt.

Es wurden 20 mg vernetzte Hüllproteinschichten zweimal in 10 ml 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 gewaschen, der pH-Wert kontrolliert und durch Zentrifugation bei 12400 g und 4 °C für 30 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml 9×10^{-4} M Uranylнитrat in 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 resuspendiert und für 2 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die vernetzten Hüllproteinschichten mit sorbiertem Uran wurden erneut durch Zentrifugation bei 12400 g und 4 °C für 30 min sedimentiert und je dreimal mit 10 ml 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 und dreimal mit 10 ml VE-Wasser, pH 4,5 gewaschen.

3.18 Spektroskopische Untersuchungen der nativen und quervernetzten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 und ihrer Metall-Protein-Komplexe

3.18.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die Aufzeichnung der UV/VIS-Spektren erfolgte zur Beurteilung der Quartärstruktur der Hüllproteine, so dass überprüft werden konnte, ob die Hüllproteine als intaktes Gitter (Polymer) oder als dissoziierte Monomere vorliegen. Die Dissoziation der Hüllproteinschichten in die Monomere konnte dabei durch die Änderung der Spektren verfolgt werden. Hüllproteinschichten zeigen eine Lichtstreuung und ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Dissoziierte Hüllproteine liegen gelöst im Puffer vor und zeigen deshalb ausschließlich ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das Absorptionsmaximum bei 280 nm ist auf die Absorption der Aminosäuren Tryptophan (Absorptionsmaxima bei 219 und 279 nm), Tyrosin (Absorptionsmaxima bei 193, 222 und 275 nm) und in geringerem Maße auch auf Phenylalanin (Absorptionsmaxima bei 188, 206 und 257 nm) bei dieser Wellenlänge zurückzuführen (Lottspeich und Zorbas 1998).

Die UV/VIS-Spektren gereinigter Hüllproteine und Hüllproteinschichten wurden im Bereich von 200-700 nm in einem Spektralfotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Cambridge) in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas suprasil® (Halbmicro, d = 1cm, Hellma®, Mühlheim) gegen eine Basislinie des entsprechenden Probenpuffers aufgezeichnet. Die Spaltbreite betrug bei allen Messungen 1 nm.

3.18.2 IR-Spektroskopie

Durch die Absorption von Lichtenergie im Bereich von 0,8-500 µm werden in Molekülen unterschiedliche mechanische Schwingungen von Atomen und funktionellen Gruppen angeregt. Diese Schwingungen liefern dem Molekül entsprechend ein charakteristisches Spektrum. Binden Liganden spezifisch an diese Moleküle, so verändern sich die Teile des Spektrums, die den an der Bindung beteiligten Atomen oder Gruppen zugeordnet werden können. Auf diese Weise lassen sich mögliche Bindungsstellen identifizieren. Außerdem lässt die Methode Aussagen über die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen und deren Änderungen zu. Insbesondere leisten bei Proteinen das Polypeptidrückgrat, die Aminosäureseitenketten sowie eventuell vorhandene Kofaktoren einen Beitrag zum Infrarotspektrum. Ebenso trifft dies für häufig in Proteinproben vorhandene Substanzgruppen wie Detergenzien und Lipide, aber auch für Wasser zu.

Das Ziel der Aufnahme von Infrarotspektren war die Identifizierung der für die Metall-Bindung relevanten funktionellen Gruppen des Proteins und die gleichzeitige Beurteilung möglicher Änderungen in der Tertiärstruktur. Die FT-IR-Spektren (Fouriertransformierte Infrarotspektren) wurden im Bereich von $4000\text{-}370\text{ cm}^{-1}$ in einem FT-IR Spektrometer Spektrum 2000 (PerkinElmer Analytical Instruments, Shelton, USA) aufgenommen.

Die Probenvorbereitung zur IR-spektroskopischen Untersuchung erfolgte durch Trocknung der Proben im Vakuumtrockenschrank bei 30 °C für mindestens 24 h. Die trockenen Proben wurden anschließend mit Hilfe eines Handhomogenisators pulverisiert und als KBr-Preßlinge (1,2 mg der Probe und 300 g Kaliumbromid) gemessen.

3.18.3 Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) der Protein-Metall-Komplexe

Die Röntgenabsorptionsspektroskopie nutzt die Tatsache, dass die Energie eines monochromatischen Röntgenstrahls beim Durchgang durch Materie geschwächt wird. Außerdem nimmt der lineare Absorptionskoeffizient mit steigender Energie des einfallenden Röntgenstrahls zunächst ab, bis ein Energieniveau erreicht wird, das ausreicht, ein Elektron aus einer inneren Schale abzuspalten. In diesem Fall steigt der Absorptionskoeffizient sprunghaft an (Kante), um danach wieder kontinuierlich abzufallen. Zum einen sind diese Kanten elementspezifisch und zum anderen kann der Verlauf des Absorptionskoeffizienten als Funktion der Energie des einfallenden Röntgenstrahls an den Kanten und direkt danach bestimmten Modulationen unterliegen. Diese sind abhängig vom Abstand, der Zahl und der Art benachbarter Atome. Dadurch wird es möglich, die atomare Umgebung des absorbierenden Atoms zu bestimmen (Bertagnolli und Ertel 1994). Der kantennahe Energiebereich wird dabei als XANES- und der kantenferne als EXAFS-Bereich bezeichnet.

Die Untersuchungen wurden an der Rossendorfer Beamline (ROBL, BM 20) der Europäischen Synchrotron-Strahlungsquelle (European Synchrotron Radiation Facility - ESRF) in Grenoble, Frankreich (Reich et al. 2000), in direkter Zusammenarbeit mit Herrn Dr. M. Merroun und Herrn Dr. C. Hennig durchgeführt. Für die Wechselwirkungen der Hüllproteinschichten mit Uran erfolgte die Messungen an der L_{III} -Kante. Je nach Konzentration der Metalle wurden die Spektren in Transmission oder Fluoreszenz aufgenommen. Nur bei Fluoreszenzmessungen wurden acht Spektren jeder Probe aufgenommen und nach Abzug des Hintergrundsignals gemittelt. Die Energiekalibrierung der Spektren wurde für die L_{III} -Kante des Urans bei 17200 eV oder mit Hilfe eines gleichzeitig gemessenen Spektrums von Yttrium-Folie an der K-Kante bei 17038 eV vorgenommen.

Die Phasen- und Amplitudenfunktionen bei den EXAFS-Rechnungen wurde mit dem Programm FEFF 8 (Ankudinov et al. 1998) erstellt.

Für die EXAFS-Untersuchungen wurden die metallisierten Proben im Vakuumtrockenschrank bei 30 °C für mindestens 24 h getrocknet und anschließend mittels eines Handhomogenisators pulverisiert. Die Pulver wurden dann auf ein Kapton-Klebeband (Polyimid, 3M, St. Paul, Minnesota, USA) aufgebracht und in insgesamt 5-6 Lagen übereinander geklebt.

3.19 Bestimmung der Phosphorgehalte ganzer Zellen, Sporen, Zellwände und nativer Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 mittels Massenspektroskopie (ICP-MS)

Die Quantifizierung der Phosphatgruppen von Zellen, Zellwänden und Hüllproteinen diente der Abschätzung der Anzahl möglicher Gruppen zur Bindung von Metallen. Dazu wurden die Zellen, Zellwände oder Hüllproteinschichten mit Trockenmassen von 100-500 mg 10 mal mit 30 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung und 1 mal mit 30 ml sterilem Seralpur-Wasser gewaschen. Die Pellets wurden anschließend in 3-8 ml sterilem Seralpur-Wasser aufgenommen, um eine Endkonzentration von 60 mg Trockengewicht ml⁻¹ zu erhalten. Die Suspensionen wurden dann mit 3-4 ml HNO₃ und 100 µl H₂O₂ in einer Mikrowelle (Büchi Labortechnik GmbH, Konstanz) aufgeschlossen und auf 20-30 ml mit Seralpur-Wasser aufgefüllt. Der Phosphorgehalt wurde mittels Massenspektroskopie (Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Hochfrequenzplasma, ICP-MS) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. W. Wiesener und Frau U. Schäfer bestimmt.

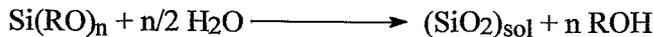
3.20 Immobilisierung von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602-Zellen, Sporen und ihrer Hüllproteinschichten in SiO₂-Xerogelen

3.20.1 Herstellung von Sol-Gel-Keramiken

Zur Immobilisierung verschiedener Biokomponenten wurde die Sol-Gel-Technik (Caturan et al. 1989, Brau et al. 1990, Inama et al.1993, Fennouh et al. 1999, 2000, Finnie et al. 2000) genutzt. Dabei werden Siliziumoxid-Nanosole, die durch sauer oder basisch katalysierte Hydrolyse der korrespondierenden Metallalkoxide (Tetraethylorthosilicate, TEOS) gewonnen werden, mit der entsprechenden biologischen Komponente vermischt und durch Änderung des pH-Wertes oder durch Temperaturerhöhung geliert (Abb. 3.20.1). In Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen (pH-Wert, Lösungsmittel, Ko-Kondensation, Alterung, Trocknungsstufe, Verwendung von Penetrationsmitteln) können Strukturvarianten mit Porendurchmessern von 5-200 nm bei Oberflächen von bis zu 1000 m² g⁻¹ hergestellt werden.

Nach der Trocknung entstehen auf diese Art Bulkprodukte (Xerogele und Biocere), die für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden. Die Herstellung der Xerogele und Biocere erfolgte in direkter Zusammenarbeit mit Herrn U. Soltmann der Arbeitsgruppe Dünnschichtdiagnostik der Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e.V. (GMBU) in Sebnitz.

1) Bildung der Siliziumoxid-Sole durch Hydrolyse



2) Bildung der Siliziumoxid-Gele durch Kondensation der Sole (Sol-Gel-Prozess)

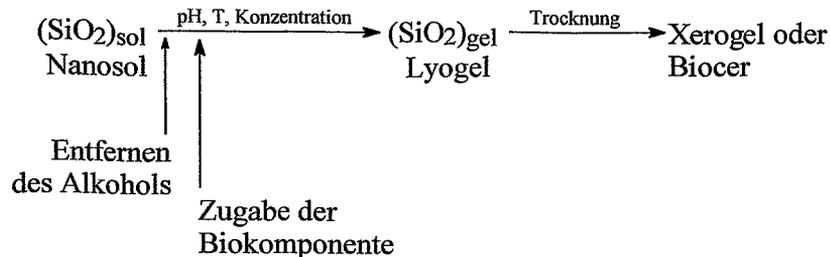


Abb. 3.20.1: Silizium Sol-Gel-Reaktion

3.20.2 Herstellung von Bioceren mit intakten Zellen, Sporen oder stabilisierten Hüllproteinschichten

Die Herstellung von Xerogelen oder Bioceren mit verschiedenen Biokomponenten erfolgte entweder mit alkalischem Sol 194KAF oder mit saurem Sol 135AF (beide von Feinchemie GmbH, Sebnitz). Die Sole hatten einen Feststoffgehalt von 4,2 % gelöst in 70 % Ethanol. Durch Begasung mit Druckluft wurden die Sole von dem Alkohol befreit und mit 5 M NaOH-Lösung neutralisiert. Nach Zugabe der Biokomponente (Bakterien in 0,9 % NaCl-Lösung, pH 7,5, Sporen in Seralpur-Wasser und stabilisierte Hüllproteine in Seralpur-Wasser, jeweils in verschiedenen Konzentrationen) wurden die Sole gründlich gemischt und zur Gelierung in Petrischalen gegossen. Das entstandene Lyogel wurde in Würfel mit einer Kantenlänge von 1-2 mm zerschnitten, in der Sicherheitswerkbank luftgetrocknet und gegebenenfalls anschließend im Schüttelsieb (200 mm Durchmesser, Retsch GmbH & Co. KG, Haan) klassiert (Partikelgröße 355-500 μm). Als Kontrollen wurde jeweils Xerogele in gleicher Weise ohne Biokomponente hergestellt. Alternativ wurde dem Sol 20 % Sorbit (bezogen auf den SiO_2 -Anteil) als Penetrationsmittel zugesetzt oder die Gele wurden gefriergetrocknet.

Nach der Trocknung wurden die Xerogele und Biocere mit 0,9 %NaClO₄-Lösung äquibriert und mit 1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt.

3.20.3 Mikroskopische Charakterisierung der Biocere

Die mikroskopischen Untersuchungen an Xerogelen oder Bioceren erfolgten im Stereomikroskop im Auflicht bei 50facher Vergrößerung (Stemi SV6, Zeiss, Jena) und im Rasterelektronenmikroskop (siehe Kap. 3.16.1) in direkter Zusammenarbeit mit Frau S. Matys am Institut für Werkstoffwissenschaft der TU Dresden.

3.20.4 Bestimmung der metallbindenden Kapazitäten von Xerogelen und Bioceren

Die Bestimmung der metallbindenden Eigenschaften der Xerogele und Biocere erfolgte am Beispiel der Elemente Uran und Kupfer. Aus den in Kapitel 3.17.2 genannten Gründen wurden die Bindungsexperimente mit Uran bei pH 4,5 durchgeführt. Die Berechnung der Speziationsverteilung des Kupfers unter diesen Bedingungen mittels des Programmpackets "EQ3/7" ergab, dass Kupfer ausschliesslich als freies Ion vorliegt. Aus diesem Grund konnten die Experimente bei gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

Dazu wurden 100 oder 200 mg Xerogel und Biocer mit unterschiedlichen Biokomponenten (verschiedene Konzentrationen von Bakterien, Sporen oder stabilisierten Hüllproteinen) 1-11 mal mit Metallsalz-Lösungen versetzt. Parallel dazu wurden als Kontrolle die jeweils freie Biokomponente in gleicher Weise behandelt. Ebenso wurde mit je einem leeren Inkubationsgefäß verfahren, um die unspezifische Sorption der Metallionen an die Gefäßwand bestimmen zu können

Es wurden pro Ansatz 10-35 ml von 1×10^{-4} M, 3×10^{-4} M oder 9×10^{-4} M UO₂(NO₃)₂ x 6 H₂O oder CuCl₂ jeweils in 0,9 %iger NaClO₄-Lösung, pH 4,5 verwendet (Dawson et al. 1998). Die Ansätze wurden mehrfach mit den Metallsalz-Lösungen für 0,5 bis 120 h bei RT inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde danach abgossen, die Proben 2 mal mit 5 ml 0,9 %iger NaClO₄-Lösung gewaschen und mit 10-35 ml 0,9 %iger NaClO₄-Lösung für 24 h bei RT geschüttelt. Nach erneutem Dekantieren der Flüssigkeit folgten 2-3 Desorptionsschritte durch Inkubation der Ansätze mit 10-35 ml 0,5 M Tri-Natriumzitat Dihydrat-HCl-Puffer, pH 4,5 für je 24 h. Für zeitabhängige Kinetiken wurden nach 0,5, 1, 2, 4, 7, 24 und 48 h je 0,5 ml des Ansatzes entnommen und die Metallkonzentration der Lösungen mittels ICP-MS in Zusammenarbeit mit Frau Dr. W. Wiesener und Frau U. Schäfer bestimmt. Bei allen anderen Untersuchungen wurde nach jedem Inkubationsschritt und vor dem Tausch der Lösungen 0,5 ml des Ansatzes entnommen und ebenfalls die Metallkonzentrationen bestimmt.

3.21 Chemikalien

Mit nachfolgenden Ausnahmen wurden alle Chemikalien für die genannten Experimente von den Firmen Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) in den Reinheitsgraden reinst oder zur Analyse bezogen:

Difco Laboratories, Detroit

Agar, Bacto[®] Trypton, Bacto[®] Hefeextrakt

Linde, Höllriegelskreuth

N₂ (99,9 % v/v)

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Charakterisierung verschiedener *Bacillus*-Haldenisolate und Referenzstämme

4.1.1 Wachstumskurve von *Bacillus sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602

Für Untersuchungen an vegetativen Zellen ist es von besonderer Bedeutung, die Zellen zum optimalen Zeitpunkt zu ernten. Um eine genaue Beurteilung der Wachstumsphase während der Zellzucht zu ermöglichen, wurden Wachstumskurven der ausgewählten Bakterienstämme aufgenommen. Je eine repräsentative Wachstumskurve beider Stämme ist in Abb. 4.1.1a dargestellt. Diese Kenntnis ermöglicht es, eine maximale Ausbeute an vegetativen Zellen bei gleichzeitigem minimalen Anteil an Sporen zu erhalten

Das Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 besitzt unter den gewählten Wachstumsbedingungen während des exponentiellen Wachstums eine Verdopplungszeit von $t_d = 0,6$ h und eine Wachstumsrate von $1,15 \text{ h}^{-1}$. Der Referenzstamm *B. sphaericus* NCTC 9602 besitzt demgegenüber eine Verdopplungszeit von $t_d = 0,62$ h und eine Wachstumsrate von $1,11 \text{ h}^{-1}$.

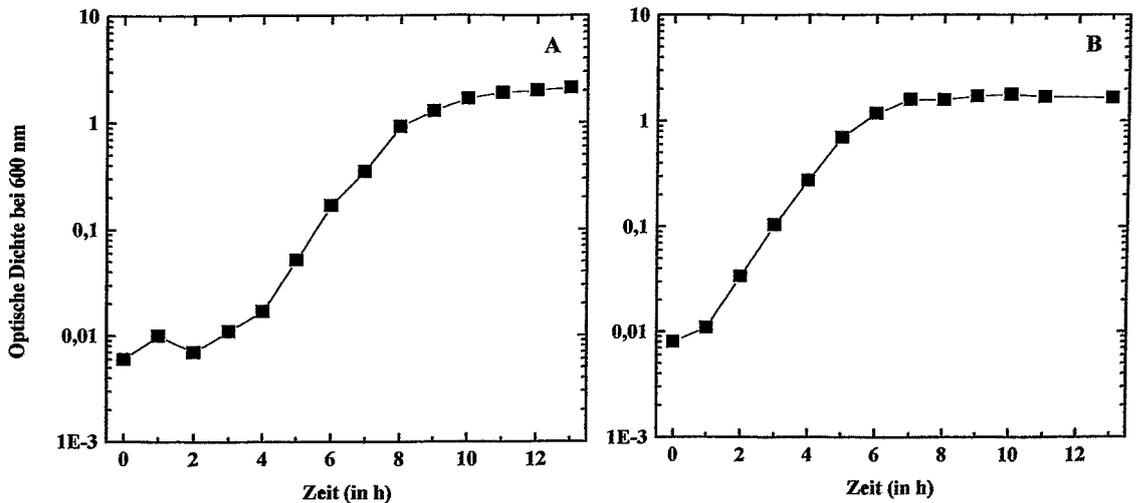


Abb. 4.1.1a.: Wachstumskurve von *B. sphaericus* JG-A12 (A) und NCTC 9602 (B). Die Anzucht erfolgte unter Begasung mit Luft mit einer Durchflussrate von 3 l min^{-1} . Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt.

Die Ernte erfolgte in der spätlogarithmischen Wachstumsphase. Es zeigte sich, dass das Haldenisolat mit Erreichen der stationären Wachstumsphase zu sporulieren beginnt, der Referenzstamm hingegen selbst während der stationären Phase keine Sporenbildung zeigt. Nur eine mehrfache Vorbehandlung der Vorkultur durch Pasteurisieren und die Verwendung von NB-Medium mit $\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ (10 mg l^{-1}) ermöglicht die teilweise Sporulation auch beim Referenzstamm NCTC 9602.

Durchschnittlich konnte ein Zellertrag von 1,4 g Feuchtgewicht pro Liter Kultur erzielt werden, was einem Trockengewicht von $0,28 \text{ g l}^{-1}$ und einem maximal möglichen Hüllprotein-ertrag von 21 mg Hüllprotein pro Liter entspricht. Atomkraftmikroskopische Aufnahmen beider Stämme zeigen keine erkennbaren Unterschiede im Habitus (siehe Abb.4.1.1b). Beide Stämme sind durch Geißeln bewegliche Bakterien.

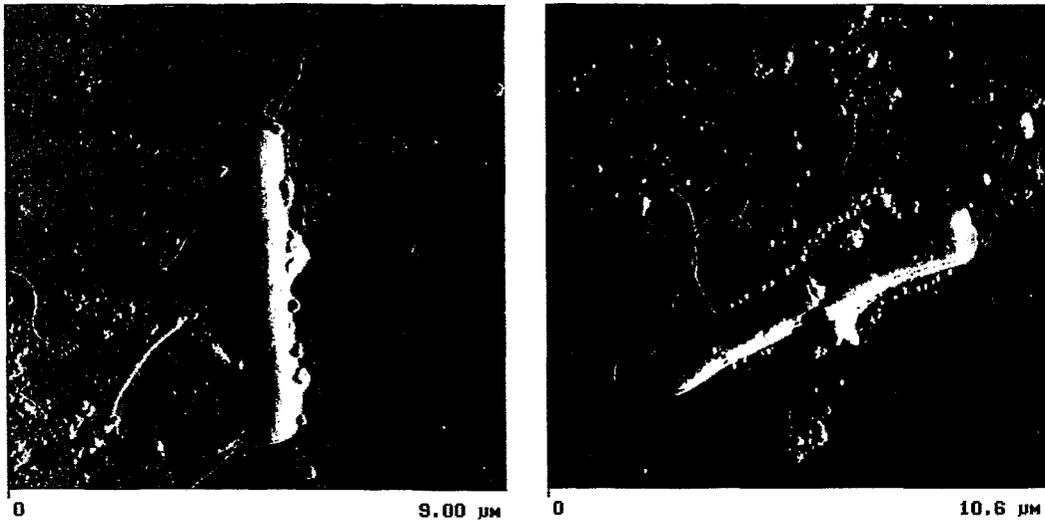


Abb. 4.1.1b: AFM-Aufnahme (Amplitudenbilder) des Haldenisolats JGA-12 (links) und des Referenzstamms NCTC 9602 (rechts)

4.1.2 Nachweis der Hüllproteine im Proteinprofil des zellfreien Rohextrakts

Der hohe Anteil der Hüllproteine von 10-15 % am Gesamtprotein ermöglicht eine erste Einschätzung der Existenz von Hüllproteinen über das Proteinprofil des zellfreien Rohextrakts in der SDS-PAGE. Sind Hüllproteine vorhanden, so zeigt sich dies in Form einzelner prädominanter Banden. Auf diese Art wurde in den Haldenisolaten *B. sphaericus* JG-A12, *B. megaterium* JG-A22, *B. cereus* JG-A30, *B. thuringiensis* JG-B10 und den Referenzstämmen *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. megaterium* NRRL B5385, *B. cereus* ATCC 4415, *B. thuringiensis* 4045 subsp. *galleriae* ein Hüllproteinscreening durchgeführt. Im Falle mancher *Bacillus*-Stämme ist diese Methode nicht eindeutig, da zum Beispiel die moskitopathogenen Stämme *B. sphaericus* WHO 2362 (Lewis et al. 1987) und *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* NRRL 4045 (Mesnage et al. 2001) ein weiteres Protein besitzen, das ebenfalls einen hohen Anteil am Gesamtprotein ausmacht. Es handelt sich dabei um moskitopathogene Proteine, welche in Form von Einschlusskörpern in der Zelle vorliegen. In den Abbildungen 4.1.2a und 4.1.2b sind die verschiedenen Proteinprofile der Rohextrakte erstgenannter Bakterien abgebildet.

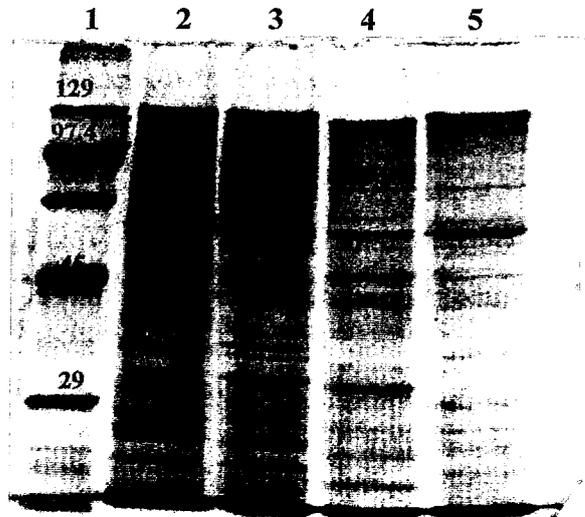


Abb. 4.1.2a: Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte von *B. sphaericus* JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362 und CCM2177 im 10 %igen silbergefärbten SDS-Gel
Spur 1: Molekulargewichtsstandard (+ 129 kDa Hüllprotein von CCM 2177).
Spur 2: Zellfreier Rohextrakt von JG-A12 (5 µg Protein).
Spur 3: Zellfreier Rohextrakt von NCTC 9602 (5 µg Protein).
Spur 4: Zellfreier Rohextrakt von WHO 2362 (5 µg Protein).
Spur 5: Zellfreier Rohextrakt von CCM 2177 (5 µg Protein).

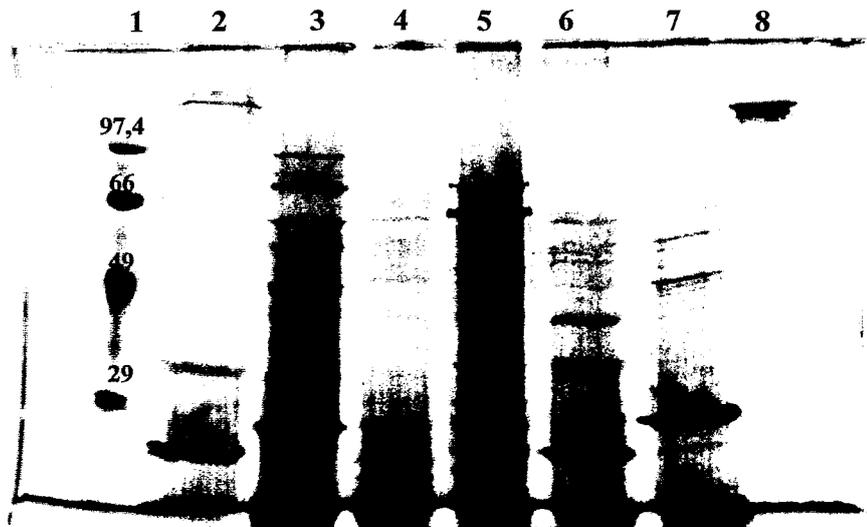


Abb. 4.1.2b: Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte verschiedener *Bacillus*-Stämme im 10 %igen silbergefärbten SDS-Gel.
Spur 1: Molekulargewichtsstandard
Spur 2: Zellfreier Rohextrakt von *B. cereus* ATCC 4415 (5 µg Protein).
Spur 3: Zellfreier Rohextrakt von *B. cereus* JG-A30 (5 µg Protein).
Spur 4: Zellfreier Rohextrakt von *B. megaterium* NRRL B5385 (5 µg Protein).
Spur 5: Zellfreier Rohextrakt von *B. megaterium* JG-A22 (5 µg Protein).
Spur 6: Zellfreier Rohextrakt von *B. thuringiensis* 4045 subsp. *galleriae* (5 µg Protein).
Spur 7: Zellfreier Rohextrakt von *B. thuringiensis* JG-B10 (5 µg Protein).
Spur 8: Hüllprotein von *B. sphaericus* CCM 2177.

Es zeigt sich, dass alle *B. sphaericus*-Stämme eine prädominante Proteinbande aufweisen, die bei den Referenzstämmen NCTC 9602, WHO 2362 und CCM 2177 ein nahezu der Literatur entsprechendes Molekulargewicht aufweisen.

So besitzt das Hüllprotein von *B. sphaericus* JG-A12 ein Molekulargewicht von 129 kDa, das von NCTC 9602 eines von 127 kDa ((142 ± 4) kDa, Hastie und Brinton 1979a), das von WHO 2362 eines von 122 kDa (125 kDa, Bowditch et al. 1989) und das von CCM 2177 eines von 126 kDa (129 kDa, Ilk et al. 1999). Demgegenüber zeigen zwar alle anderen *Bacillus*-Stämme, mit der Ausnahme von *B. megaterium* NRRL B5385, ebenfalls prädominante Banden im Proteinprofil, besitzen aber keine Hüllproteine. Das Fehlen von Hüllproteinen konnte über den Versuch einer Isolierung und mikroskopische Analyse mittels AFM und TEM der einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. Es war außerdem nicht möglich, mittels einer Literaturrecherche die jeweiligen prädominanten Banden bestimmten Proteinen zuzuordnen. Aus diesem Grund stellten ausschließlich die *B. sphaericus*-Stämme geeignete Versuchsobjekte für die geplanten Untersuchungen dar. Insbesondere wurde neben dem Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 der phylogenetisch nächstverwandte *B. sphaericus* NCTC 9602 (Selenska-Pobell et al. 1999) für weitere Untersuchungen ausgewählt.

4.2 Entwicklung einer schnellen Methode zum Nachweis von Hüllproteinen an ganzen Zellen mittels AFM und TEM

Die zuvor beschriebene Methode zur ersten Einschätzung hinsichtlich der Existenz von Hüllproteinen ist auf Grund der beschriebenen Ergebnisse nur unzureichend. Demgegenüber gibt es die Möglichkeit der Gefrierbruch-Präparation der Zellen (Sleytr 1970, Sleytr und Messner 1983) oder die direkte Isolierung möglicher Hüllproteine gemäß der in Kap. 3.4 beschriebenen Methode nach Engelhardt et al. (Engelhardt et al. 1986). Beide Methoden sind aber sowohl vom präparativen als auch vom zeitlichen Aspekt her sehr aufwendig und eignen sich deshalb nicht für ein schnelles Screening vieler Bakterien hinsichtlich der Existenz von Hüllproteinen. Insbesondere für Gram-positive Bakterien konnte im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit R. Wahl vom Institut für Werkstoffwissenschaft der TU-Dresden eine neue und einfach durchzuführende Methode zum Hüllproteinscreening entwickelt werden, bei der der Nachweis mittels mikroskopischer Abbildungsverfahren wie AFM oder TEM erfolgen kann (Wahl et al. 2001b). Das Verfahren kann bereits mit geringsten Mengen an Reinkulturen von Bakterien durchgeführt werden und macht in vielen Fällen eine zusätzliche Kultivierung der zu untersuchenden Bakterien unnötig. Der Nachweis beruht auf dem Ablösen der Hüllproteinschichten direkt von intakten Zellen. Dies erfolgt über die Inkubation der Zellen mit Lysozym und damit über die Hydrolyse des Peptidoglycans, das für die Bindung der Hüllproteinschichten auf der bakteriellen Zellwand unerlässlich ist (eigene Arbeiten).

Die freien Hüllproteinschichten können dann im AFM oder TEM nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig eine direkte Bestimmung der Gittersymmetrie, Gitterkonstante und im Falle des AFM auch der Dicke der Hüllproteinschicht möglich wird (Arbeiten von R. Wahl). Dazu wurden entweder Kolonien von einer Agarplatte mittels einer Impfföse aufgenommen oder minimal 100 µl einer Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 4500g sedimentiert und jeweils in dem gleichen Volumen Standardpuffer mit 0,2 mg ml⁻¹ Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde für 6 h bei 30 °C inkubiert und direkt für elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet. Je nach Lysozym-Empfindlichkeit der untersuchten Bakterien muss die Inkubationszeit eventuell verkürzt werden, um eine Lyse der Zellen zu verhindern. Die AFM- und TEM-Proben wurden gemäß der in Kap. 3.16 beschriebenen Methode hergestellt und analysiert. Untersuchungen an *B. sphaericus* JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362, CCM 2177 und an *Sporosarcina ureae* DSM 320 zeigten eindeutig positive Befunde. In Abb. 4.2 im linken Bild ist eine AFM-Aufnahme einer *B. sphaericus* NCTC 9602 Zelle zu sehen; links neben der Bakterienzelle ist ein freies Stück der Hüllproteinschicht zu erkennen.

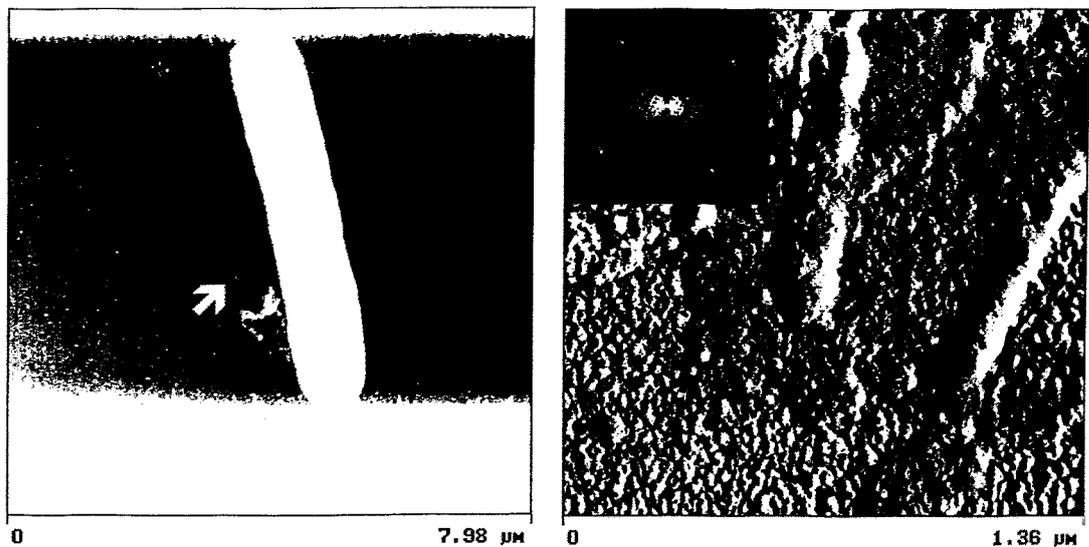


Abb. 4.2.: Im linken Bild ist eine AFM-Aufnahme (Höhenbild) von *B. sphaericus* NCTC 9602 mit freier Hüllproteinschicht (siehe Pfeil) gezeigt, rechts eine AFM-Aufnahme (Amplitudenbild) freier Hüllproteinschichten des selben Ansatzes mit eingeblendetem Powerspektrum.

Das rechte Bild der Abb. 4.2 zeigt eine weitere AFM-Aufnahme des selben Ansatzes, bei der die freie Hüllproteinschicht mit der für *B. sphaericus* NCTC 9602 typischen tetragonalen Gitterstruktur zu sehen ist (links oben: Einblendung des Powerspektrums des Gitters). Das Auffinden der freien Hüllproteinschichten ist auf Grund ihrer häufigen Nähe zum Bakterium leicht.

Außerdem enthielten die Ansätze trotz der verhältnismäßig geringen Zellzahl viele freie Hüllproteinschichten gut sichtbarer Größe (mehrere hundert Nanometer in Länge und Breite) und Reinheit. Allerdings lässt die Methode nur einen sicheren positiven Befund zu; können keine freien Hüllproteinschichten detektiert werden, so kann deren Existenz nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Charakterisierung der gereinigten Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

4.3.1 Reinheitskontrolle und Abschätzung des Molekulargewichts des gereinigten Hüllproteins mittels SDS-PAGE

Der Erfolg der Hüllproteinisolierung wurde mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 3.8) kontrolliert. Betrachtet man die Proteinprofile des Haldenisolats *B. sphaericus* JG-A12 und des Referenzstammes *B. sphaericus* NCTC 9602, so lässt sich erkennen, dass bei identischen Kulturbedingungen beide Stämme ein ähnliches, jedoch nicht gleiches Proteinprofil besitzen. Die Proteinprofile beider Stämme und die der isolierten Hüllproteine sind in Abb. 4.3.1a dargestellt.

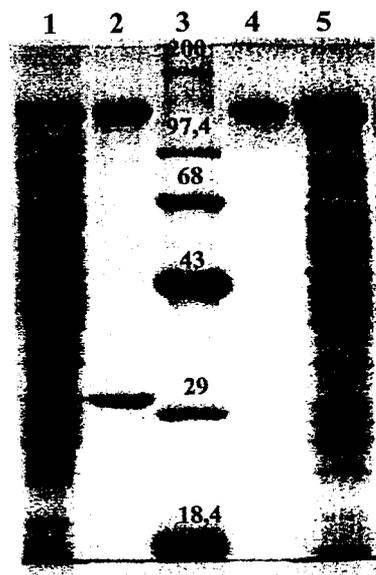


Abb. 4.3.1a: Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte und der isolierten Hüllproteine beider *B. sphaericus*-Stämme JGA-12 und NCTC 9602 im 10 %igen Coomassie Brillant Blau-gefärbten SDS-Gel

Spur 1: Zellfreier Rohextrakt von JG-A12 (30 µg Protein).

Spur 2: isoliertes Hüllprotein von JG-A12 (6 µg Protein).

Spur 3: Molekulargewichtsstandard.

Spur 4: isoliertes Hüllprotein von NCTC 9602 (6 µg Protein).

Spur 5: zellfreier Rohextrakt von NCTC 9602 (30 µg Protein).

Auffallend ist außerdem die Existenz einer zweiten Proteinbande in der Hüllproteinfraktion des Haldenisolats *B. sphaericus* JG-A12. Zur Identifizierung des leichten Proteins und für Vergleichsanalysen mit bereits bekannten Hüllproteinsequenzen wurden alle drei Proteinbanden durch einen Westernblot auf eine PVDF-Membran überführt und so für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren vorbereitet (siehe Kap. 3.9). Die computergestützte Auswertung des videodensitometrischen Scans mehrerer vergleichbarer Gele mit Hilfe des Programms RFLPScan (Scanalytics, Billerica, USA) ermöglichte die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts des schweren Proteins beider Stämme mit (135 ± 5) kDa. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert für das Hüllprotein von *B. sphaericus* NCTC 9602 von (142 ± 4) kDa (Hastie und Brinton 1979a). Das Molekulargewicht des zweiten, leichten Proteins in der Hüllproteinfraktion des Haldenisolats beträgt (30 ± 2) kDa. TEM-Aufnahmen der isolierten Hüllproteine zeigten ebenfalls die Reinheit der Fraktion und lassen die Vermutung zu, dass es sich bei dem zweiten Protein der Hüllproteinfraktion des Haldenisolats um das Strukturprotein der Geißel handelt (Abb. 4.3.1b, ein mögliches Geißelfragment ist mit einem Pfeil gekennzeichnet).

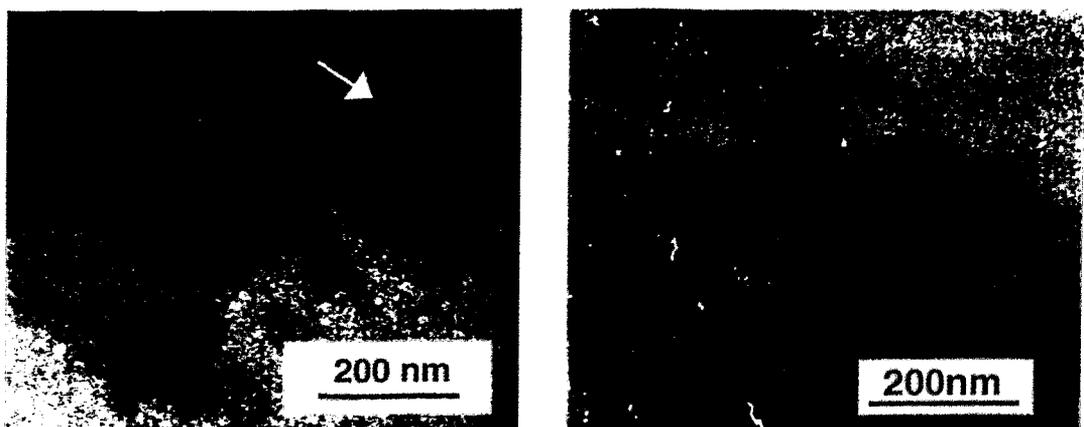


Abb. 4.3.1b: TEM-Aufnahmen der isolierten Hüllproteinschichten des Haldenisolats JG-A12 (links, der Pfeil kennzeichnet ein mögliches Geißelfragment) und des Referenzstamms NCTC 9602 (rechts)

Beide Hüllproteinschichten zeigen eine tetragonale Symmetrie (p4) mit Gitterkonstanten von 12,5 nm für JG-A12 und von 12,9 nm für NCTC 9602. Aufbauend auf die Beobachtung hinsichtlich der Verunreinigung der Hüllproteinfraktion von *B. sphaericus* JG-A12 wurde die Isolierungsmethode der Hüllproteine dahingehend modifiziert, dass die Geißeln der JG-A12 Zellen jeweils vor dem Zellaufschluß mittels 10 minütiger Homogenisation der Zellsuspension mit einem Ultra-Turrax bei maximaler Leistung (siehe Kap. 3.4.2.1) und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 6000 g und 4 °C entfernt wurden.

Der Erfolg dieser Methode konnte in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 4.3.1c, Spur 7). Auf diese Weise konnte in weiteren Hüllproteinisolierungen die Verunreinigung der Präparation auf einfache Weise vermieden werden. Die Analyse der Proteinprofile der einzelnen Fraktionen der Hüllproteinisolierung von *B. sphaericus* JG-A12 mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 4.3.1c dargestellt.

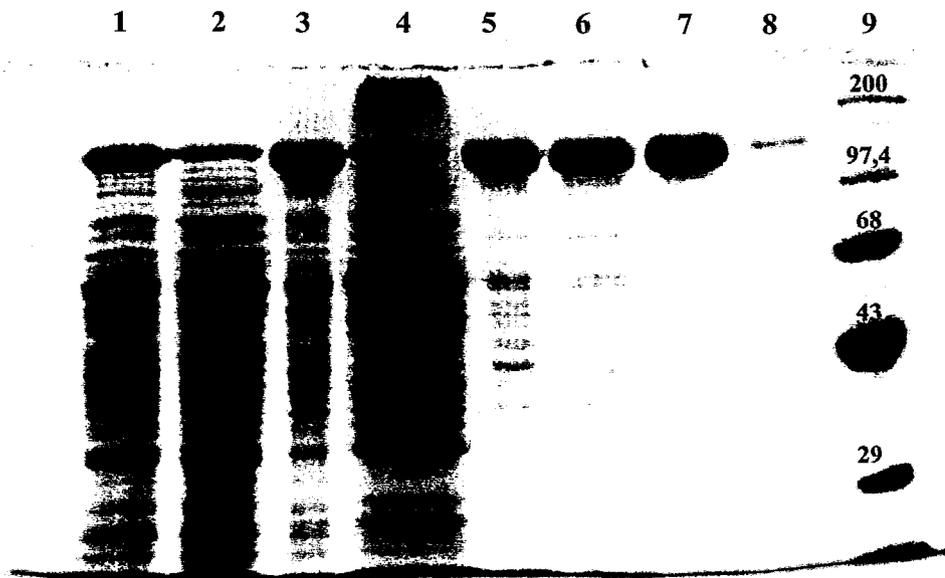


Abb. 4.3.1c.: SDS-PAGE (im 7,5 %igen Coomassie Brillant Blau-gefärbten Gel) der einzelnen Fraktionen während der Hüllproteinisolierung (*B. sphaericus* JG-A12)

Spur 1: Zellfreier Rohextrakt (34 µg Protein). Spur 6: Lysozym-verdautes Murein (9 µg Protein).
 Spur 2: Cytoplasma (25 µg Protein). Spur 7: isoliertes Hüllprotein (5 µg Protein).
 Spur 3: Zellwand (18 µg Protein). Spur 8: gereinigtes Hüllprotein (1 µg Protein).
 Spur 4: Membran (47 µg Protein). Spur 9: Molekulargewichtsstandard.
 Spur 5: Mureinsacculus + Hüllprotein (11 µg Protein).

Die einzelnen Isolierungsschritte zeigen eine fortschreitende Reinigung des Hüllproteins von *B. sphaericus* JG-A12 (Abb. 4.3.1a). Die Proteinprofile der einzelnen Fraktionen der Isolierungsschritte belegen, dass das Hüllprotein mit der gewählten Methode bis zur Homogenität gereinigt werden konnte, ohne dass eine erneute Verunreinigung durch ein weiteres Protein festgestellt wurde.

4.3.2 Ausbeute der Hüllproteinisolierung

Da die Hüllproteine keinerlei enzymatische Aktivität besitzen, ist eine Beurteilung der Effizienz der Isolierung in diesem Fall nicht über die Erstellung einer Anreicherungstabelle möglich, sondern muss auf der Basis theoretischer Werte erfolgen. Wie bereits in Kap. 4.1.1 beschrieben, wurden durchschnittlich 1,4 g Feuchtwicht pro Liter Kulturbrühe erhalten. Dies entspricht bei beiden *B. sphaericus*-Stämmen einem Trockengewicht von 0,28 g l⁻¹.

50 % des Trockengewichts sind dem Gesamtprotein zuzuschreiben, woraus resultiert, dass bei einem maximal möglichen Anteil von 15 % der Hüllproteine am Gesamtprotein ein maximaler Hüllproteinерtrag von 21 mg l^{-1} möglich ist. Legt man dies zu Grunde, so entspricht die durchschnittlich erreichte Ausbeute der Hüllproteine von $(21,9 \pm 1,8) \text{ mg l}^{-1}$ (6 ausgewertete Isolierungen) einem Anteil von 100 %. Die Schwankungen sind dadurch zu erklären, dass die Hüllproteinmonomere mit den Hüllproteinschichten im Gleichgewicht zu stehen scheinen und entsprechende Verluste zu verzeichnen sind, wenn bei der Isolierung mit unterschiedlich großen Volumina des Waschpuffers gearbeitet wird. Dieser Befund wurde ausschließlich aus der Beobachtung abgeleitet, dass die Menge an sedimentierbaren Hüllproteinschichten direkt vom Volumen des eingesetzten Waschpuffers abhängig ist. Außerdem war eine deutliche Steigerung der Ausbeute möglich, wenn zur selektiven Resuspension des Pellets stets der selbe Waschpuffer verwendet wurde. Dies ist insbesondere in den letzten Reinigungsschritten relevant, da hier lediglich die oben sitzende Schicht reiner Hüllproteinschichten von einer darunter liegenden Schicht von Verunreinigungen getrennt werden muss.

4.3.3 Glykosylierung der S-Layer

Für den Nachweis wurden zwei identische 10 %ige SDS-Gele gegossen und zusammen in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Auf beide Gele wurden identische Proben aufgetragen und anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Ein Gel wurde unspezifisch mittels Coomassie Brilliant Blue R 250 (Kap. 3.8.3) gefärbt. Das zweite Gel wurde einer Glykoprotein-spezifischen Färbung mittels Schiff's Reagenz (Kap. 3.8.5) unterzogen. Ein positiver Befund zeigte sich dabei durch die Bildung einer roten Bande im Gel. In Abb. 4.3.3a. ist das Coomassie gefärbte und in Abb. 4.3.3b das spezifisch gefärbte Gel abgebildet.

Sowohl die Positiv- als auch die Negativreferenz zeigen das zu erwartende Ergebnis. Demgegenüber kann für keines der analysierten Hüllproteine der verschiedenen *B. spahericus* Stämme ein positiver Befund erhalten werden.

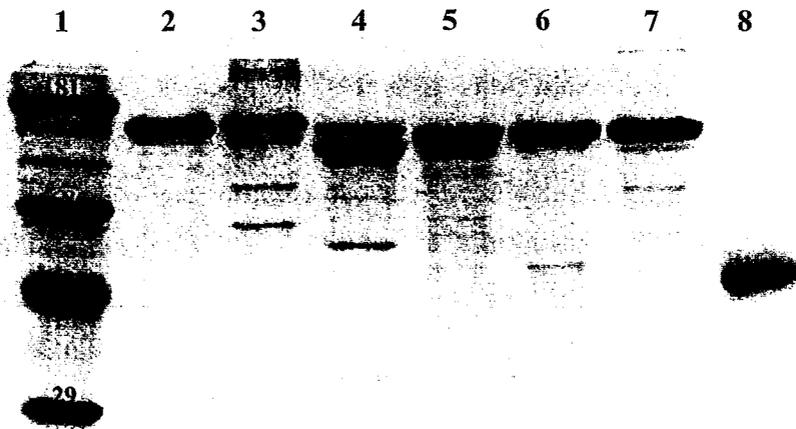


Abb. 4.3.3a.: SDS-PAGE (im 10 %igen Coomassie Brillant Blau-gefärbten Gel) verschiedener Hüllproteine und eines Glykoproteins

- Spur 1: Molekulargewichtsstandard (je 10 µg Protein).
- Spur 2: gereinigtes Hüllprotein von *B. sphaericus* JG-A12 (10 µg Protein).
- Spur 3: gereinigtes Hüllprotein von *B. sphaericus* NCTC 9602 (10 µg Protein).
- Spur 4: gereinigtes Hüllprotein von *B. sphaericus* WHO 2362 (10 µg Protein).
- Spur 5: gereinigtes Hüllprotein eines anderen *B. sphaericus* Stammes (Apitz und van Pée 2001, persönliche Mitteilung K.H. van Pée, 10 µg Protein)
- Spur 6: gereinigtes Hüllprotein eines anderen *B. sphaericus* Stammes (Apitz und van Pée 2001, persönliche Mitteilung K.H. van Pée 10 µg Protein), isoliert mittels Triton/GuanidiniumHCl-Methode (Sleytr 1976).
- Spur 7: gereinigtes Hüllprotein von *S. ureae* DSM 320 (10 µg Protein).
- Spur 8: saures α_1 -Glykoprotein (10 µg Protein).

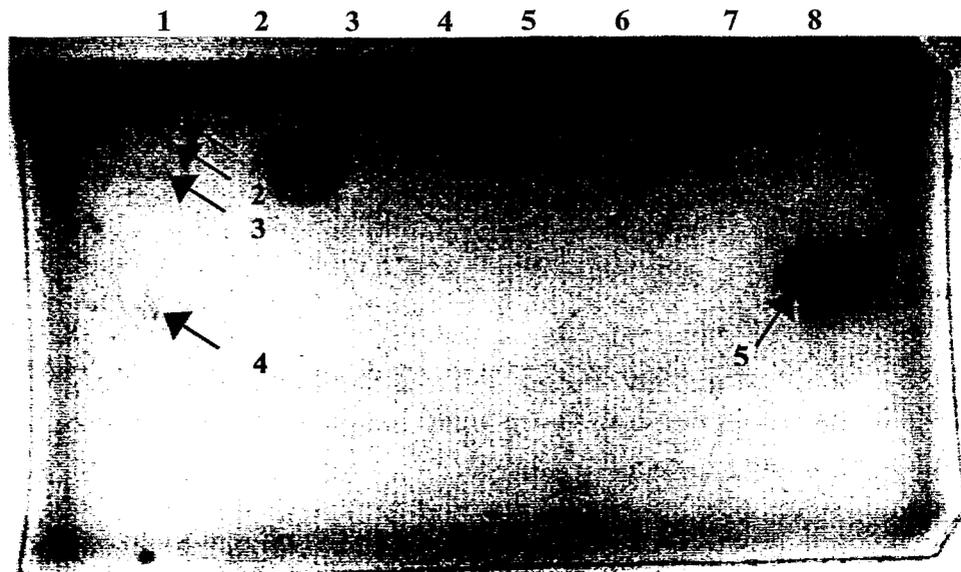


Abb. 4.3.3b.: SDS-PAGE (im 10 %igen Gel) verschiedener Hüllproteine und eines Glykoproteins nach spezifischer Färbung (Rotfärbung) zum Nachweis von Glykoproteinen. Die Spurbelegung entspricht der von Abb. 4.3.3a, es wurden lediglich von jeder Probe 30 µg Protein aufgetragen.

- Pfeil 1: α_2 -Makroglobulin ($M_r = 181$ kDa, 14 µg Protein).
- Pfeil 2,3: vermutlich Abbauprodukte des α_2 -Makroglobulins.
- Pfeil 4: Carboanhydrase ($M_r = 29$ kDa, 30 µg Protein)
- Pfeil 5: saures α_1 -Glykoprotein (30 µg Protein).

4.4 Stabilität nativer und vernetzter Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Auf Grund des Ziels, die Hüllproteine zur Entwicklung metallbindender Filter einzusetzen, und der Tatsache, dass die Bodenproben der verschiedenen Probennahmestellen auf der Uranabfallhalde „Haberland“ bei Johanngeorgenstadt pH-Werte zwischen 4 und 7 aufweisen, musste die pH-Stabilität der nativen Hüllproteinschichten mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Da die Wechselwirkungen der Hüllproteinmonomere untereinander nicht auf kovalenten, sondern insbesondere auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, und zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der typischen Gitterstruktur spielen, zerfallen die Hüllproteinschichten unter Einwirkung von Wasserstoffbrücken zerstörenden Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, komplexbildenden Reagenzien wie EDTA oder EGTA (Beveridge und Murray 1976), und bei niedrigen pH-Werten ($< \text{pH } 4$). Intakte Hüllproteinschichten zeigen im UV/VIS-Spektrum eine Absorption plus eine Lichtstreuung. Die Monomere hingegen zeigen ausschließlich eine Absorption bei 280 nm.

Die Untersuchungen mittels der UV/VIS-Spektroskopie zeigten, dass die isolierte Hüllproteinschicht des Haldenisolats JG-A12 bei pH-Werten unter 4,5 in Monomere zerfällt, während die isolierte Hüllproteinschicht des Referenzstammes NCTC 9602 bereits bei pH-Werten unter 5 in die Monomere dissoziiert (Abb. 4.4a und 4.4b).

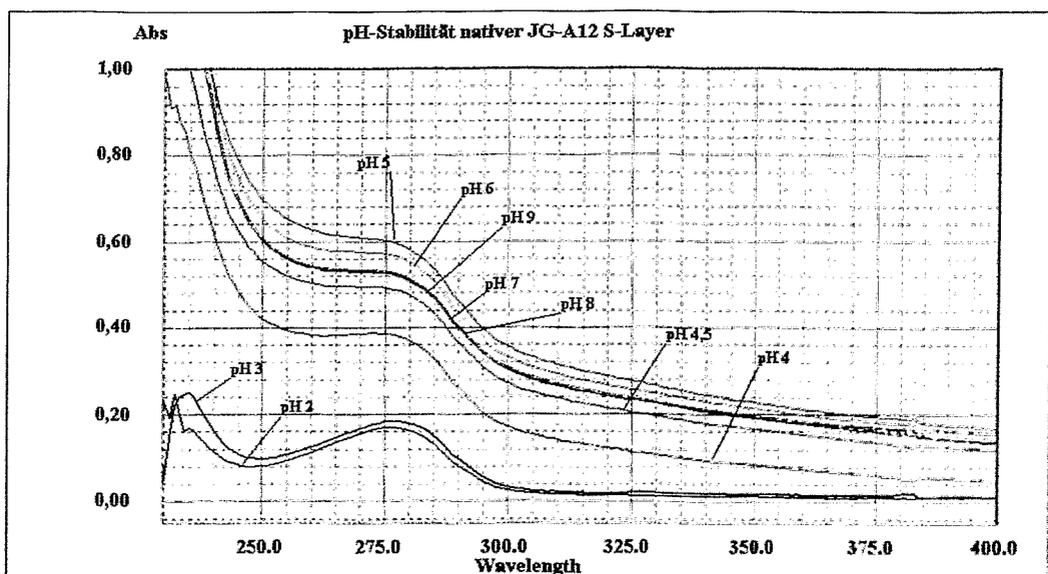


Abb. 4.4a: pH-abhängige Dissoziation der Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12

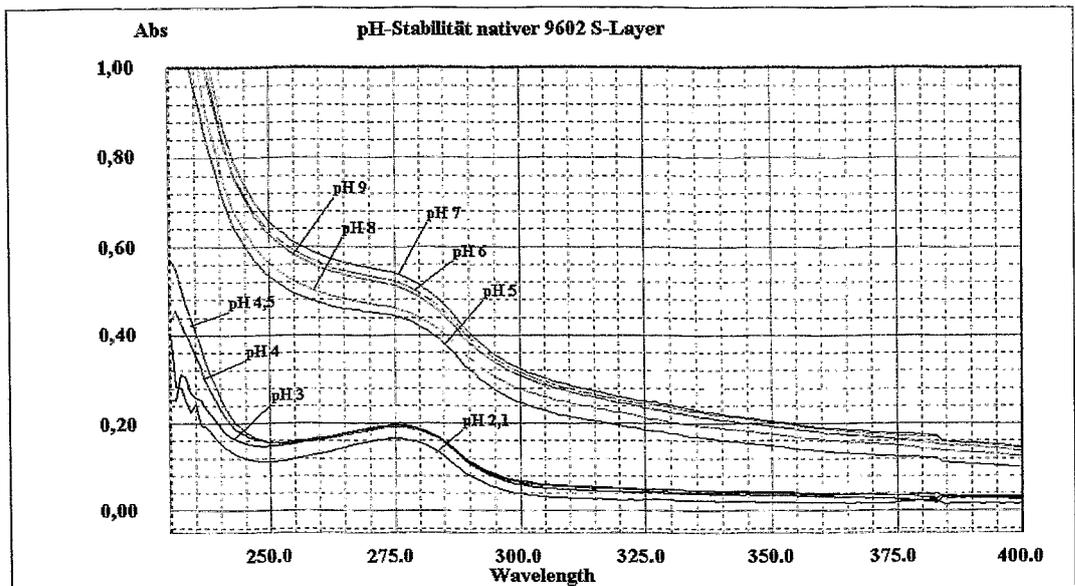


Abb. 4.4b: pH-abhängige Dissoziation der Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602

Dieser Vorgang ist irreversibel und kann durch Titrierung des pH-Werts auf pH 7 nicht wieder rückgängig gemacht werden. Demzufolge ist die Verwendung nativer Hüllproteinschichten in sauren Lösungen nicht möglich.

Stabilisiert man die Hüllproteinschichten hingegen mit Vernetzungsreagenzien wie Glutaraldehyd oder 1-Ethyl-3-(*N,N'*-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC), so zeigt sich eine deutlich höhere Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten (Abb. 4.4c-f). Im Falle der Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten bleiben diese im untersuchten pH-Bereich als Schicht erhalten und dissoziieren nicht.

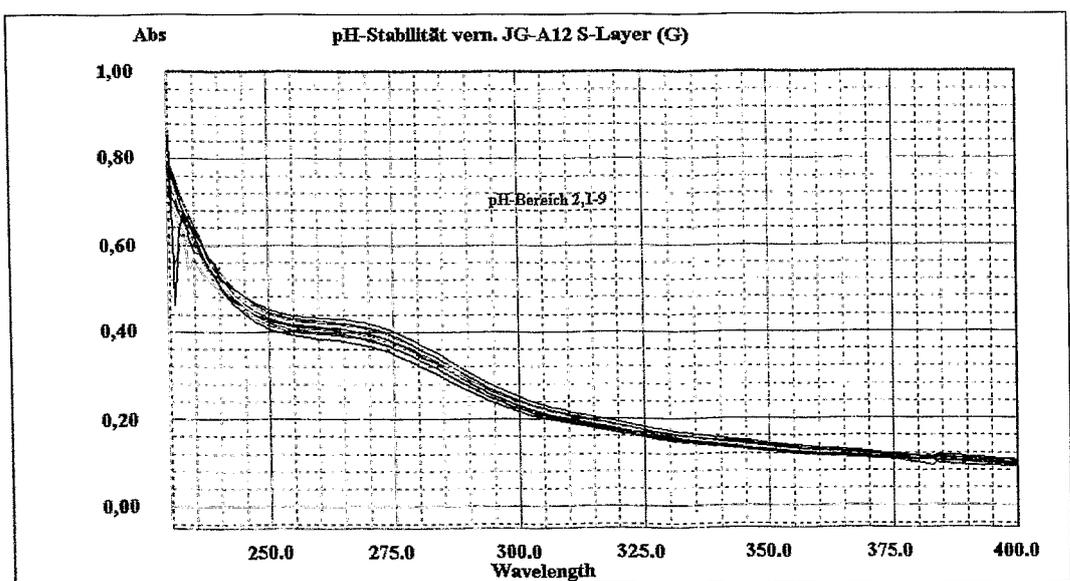


Abb. 4.4c: pH-abhängige Dissoziation der Glutaraldehyd-vernetzten (G) Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12

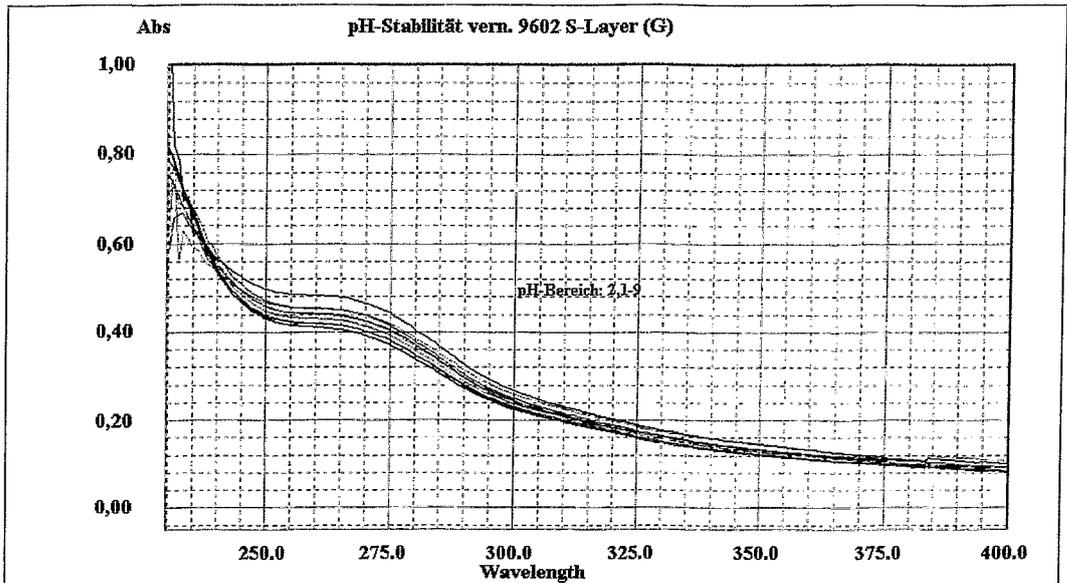


Abb. 4.4d: pH-abhängige Dissoziation der Glutaraldehyd-vernetzten (G) Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602

Vernetzt man die Hüllproteinschichten mit EDC, so zeigt sich vor allem bei den Proteinschichten des Referenzstamms, dass diese trotz der Stabilisierung nur bis zu einem pH-Wert von 4 stabil sind. Es zeigte sich außerdem, dass die Stabilität der EDC-vernetzten Proteinschichten von dem Überschuss an EDC und der Inkubationsdauer abhängig ist. Um die in Abbildung 4.4e und 4.4f dargestellte Stabilität zu erreichen, wurde der 5000fache molare Überschuss von EDC verwendet und der Ansatz für zwei Tage inkubiert. Bei geringeren Mengen oder kürzerer Inkubationszeit dissoziieren die Schichten bereits bei schwach sauren pH-Werten.

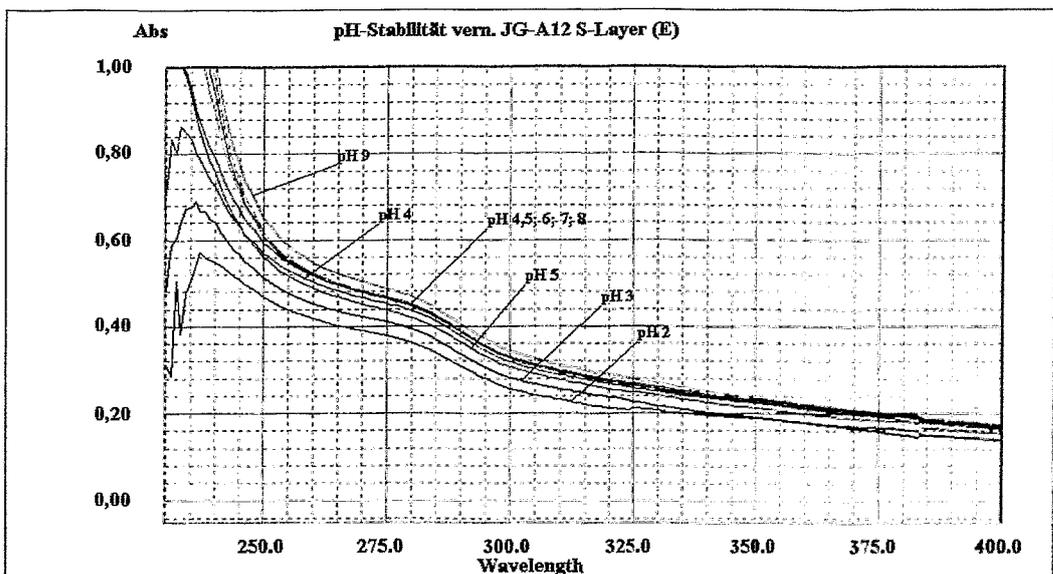


Abb. 4.4e: pH-abhängige Dissoziation der EDC-vernetzten (E) Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12

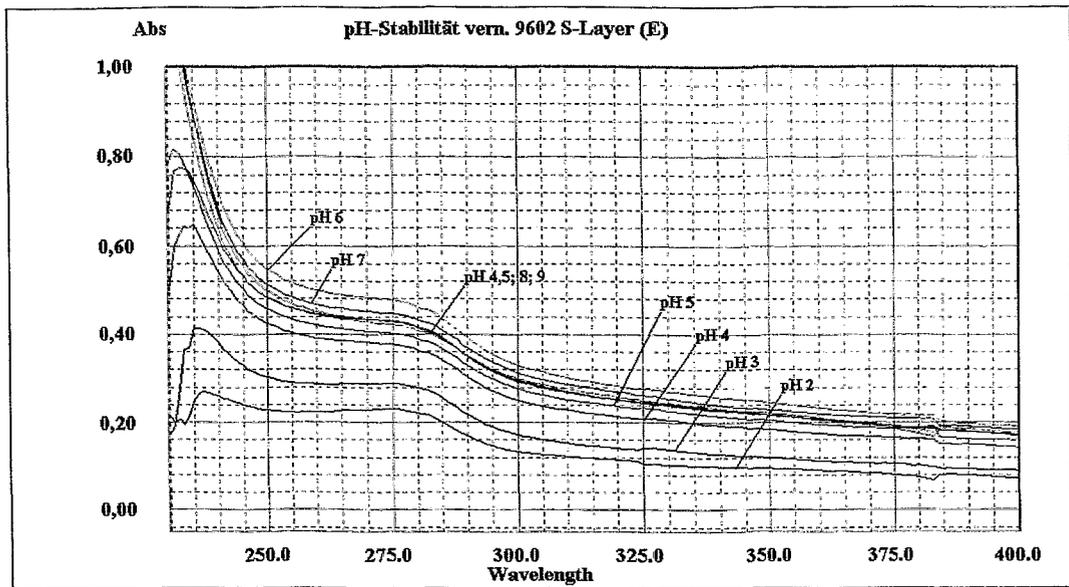


Abb. 4.4f: pH-abhängige Dissoziation der EDC-vernetzten (E) Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602

AFM-Aufnahmen der vernetzten Hüllproteinschichten bestätigen außerdem die Unversehrtheit der Gitterstruktur (siehe Abb. 4.4g), zeigen allerdings auf Grund einer deutlichen Schichtdickenzunahme und sichtbaren Überlagerung mehrerer Hüllproteinschichten, dass die Vernetzung auch zwischen den einzelnen Hüllproteinschichten erfolgte.

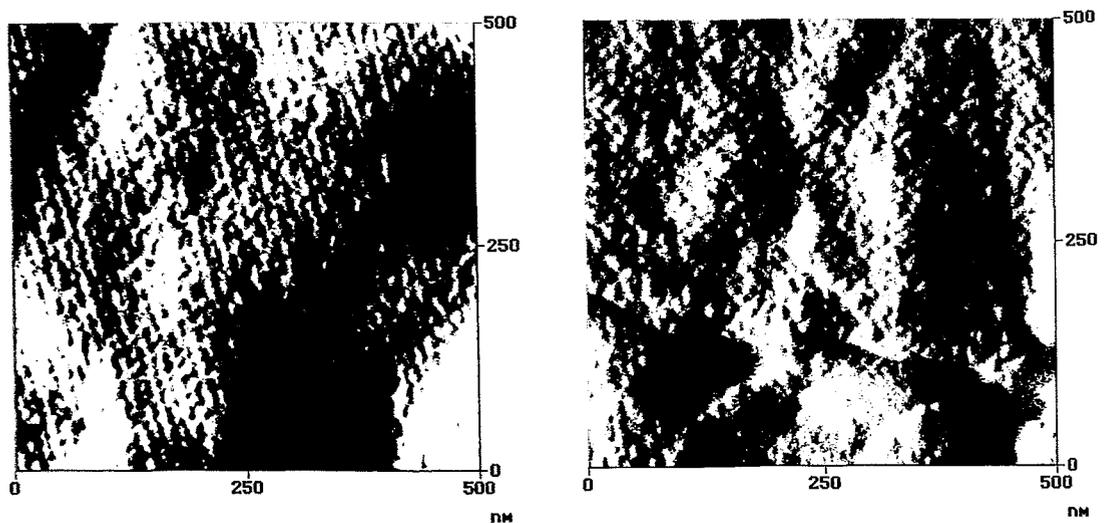


Abb. 4.4g: AFM-Aufnahmen vernetzter Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 (links, Vernetzung mit EDC) und von NCTC 9602 (rechts, Vernetzung mit Glutaraldehyd)

4.5 N-terminale Aminosäuresequenz der nativen Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Die gereinigten Hüllproteine beider Stämme wurden über eine SDS-PAGE getrennt (Kap. 3.8). Das Gel wurde im Fall des gereinigten JG-A12 Hüllproteins 3 mal mit je 30 µg Protein beladen und im Fall des 9602 Hüllproteins 3 mal mit 20 µg. Die erhaltenen Banden wurden in einer semitrockenen Transferkammer im diskontinuierlichen Puffersystem auf eine Sequi-Blot® PVDF-Membran mit einer Bindungskapazität von 170-200 µg Protein cm⁻² geblottet (Kap. 3.9). Die Vollständigkeit des Transfers wurde durch Färbung des geblotteten Gels bestätigt. Auf der Blotmembran wurden die Banden anschließend über eine Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht, die 135 kDa und 30 kDa Bande des Ansatzes von JG-A12 sowie die 135 kDa Bande des 9602 Ansatzes ausgeschnitten, und in einem automatischen EDMAN-Abbau (Kap. 3.9.4) die N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Es konnten 26, 27 und 20 Aminosäuren der entsprechenden Proteine sequenziert werden. Der jeweilige N-Terminus ist in Abb. 4.5a dargestellt.

		1		11		21
<i>B. sphaericus</i> JG-A 12	(135 kDa)	AGFSDVAGND	HEVHINALAD	AGLVNG		
	(30 kDa)	MRIQHNISAL	NTHRNLTFNN	TQASKRL		
<i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	(135 kDa)	AGFSDVAGND	HEVHINALAD			

Abb. 4.5a.: N-terminale Aminosäuresequenzen der isolierten Proteine

Die beiden 135 kDa schweren Proteine beider Stämme zeigen eine 100%ige Übereinstimmung der N-terminalen Sequenz. Dieser Befund ist nicht überraschend, da im Rahmen genomischer Analysen *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 sehr ähnliche Fingerabdrücke aufweisen und es sich bei dem N-Terminus der Hüllproteine von Bazillen um die zellwandbindende Region handelt. Dies wird auch durch das Vorhandensein mehrerer Konsensussequenzen der SLH-Domäne bestätigt. Die zur Konsensussequenz übereinstimmenden Aminosäuren sind grau unterlegt dargestellt, die häufig in SLH-Domänen vorhandenen Reste schwarz unterlegt. Bei dem zweiten 30 kDa schweren Protein des JG-A12 Ansatzes handelt es sich nicht um ein zweites Hüllprotein. Sequenzvergleiche mit bekannten Proteinen mittels BlastP-Analysen unter Verwendung der Datenbanken PIR und NR-AA zeigten, dass es sich bei diesem Protein um Flagellin handelt. Vergleiche mit nächst verwandten Flagellinen anderer Bakterienstämme sind in Abb. 4.5b dargestellt. Übereinstimmende Aminosäuren sind grau unterlegt. Die gleichzeitige Isolierung der Geißelproteine ist in der Methodik der Hüllproteinisolierung begründet.

Während der Hüllproteinisolierung werden alle niedermolekularen Proteinoligomere abgetrennt, da diese sich in Lösung befinden und lediglich ungelöste Proteinpolymere werden durch Zentrifugationen sedimentiert. Übrig bleiben alle Proteinpolymere mit ähnlichem Sedimentationskoeffizienten. Offensichtlich ist dies beim Haldenisolat JG-A12 der Fall, nicht aber bei dem Referenzstamm NCTC 9602.

	1	11	21
<i>B. sphaericus</i> JG-A 12 (30 kDa)	MRIQHNSAL	NTHRNLTFNN	TQASKRL
<i>Leptospira interrogans</i> (34K core)	MRINENIAAL	NTLNRLSSNN	SASQKNM
<i>B. subtilis</i> I168 (<i>hag</i>)	MIINENLAAI	NSHRVLKFN	NEVAKNM

Abb. 4.5b.: N-terminale Aminosäuresequenzen verschiedener Flagelline

Damit konnte die Vermutung, dass es sich bei dem zweiten Protein in der Hüllproteinfraktion des Haldenisolates um das Strukturprotein der Geißel (Flagellin) handelt, eindeutig bestätigt werden.

4.6 Proteolytische Analyse der Hüllproteine des Haldenisolats *B. sphaericus* JG-A12 im Vergleich zu den Hüllproteinen der Referenzstämme *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. sphaericus* WHO 2362 und *B. sphaericus* CCM 2177

Eine umfassendere Analyse der Hüllproteine des Haldenisolats *B. sphaericus* JG-A12 und des Referenzstamms *B. sphaericus* NCTC 9602 war durch eine limitierte Proteolyse möglich. Durch den Verdau von nativen Proteinen mit verschiedenen Proteasen lassen sich zum einen Domänenstrukturen erkennen und zum anderen ist eine Abschätzung der Unterschiede der Primärstruktur beider Proteine möglich. Die Voraussetzung für einen proteolytischen Verdau von nativem Protein ist das Vorhandensein von spezifischen Spaltsequenzen in zugänglichen oder exponierten Bereichen. Derartige Bereiche sind zum Beispiel Schlaufen oder Regionen zwischen verschiedenen Domänen. Dies ist bei schweren, komplex strukturierten Proteinen leichter als bei leichten einfach strukturierten (North 1989). Die Bedeutung der Hüllproteinschicht als Grenzfläche zwischen dem Zellinneren und der Umgebung läßt vermuten, dass Hüllproteine allgemein eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen zeigen als andere Proteine.

4.6.1 Limitierte Proteolyse der Hüllproteine mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin

Die Analyse der proteolytischen Ansätze erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 4.6.1a). Erste Versuche wurden mit den beiden *B. sphaericus* Stämmen JG-A12 und NCTC 9602 durchgeführt. Zunächst fällt auf, dass bei erfolgreicher limitierter Proteolyse beider Hüllproteine stets eine identische Bande zu detektieren ist, der in beiden Fällen ein apparentes Molekulargewicht von 105 kDa entspricht. Zusätzliche auffallende Banden waren nicht zu erkennen. Im weiteren zeigte sich ein Unterschied zwischen den Ansätzen des JG-A12- und des NCTC 9602-Hüllproteins hinsichtlich der Stabilität gegenüber Proteasen. So besitzt das Hüllprotein des Haldenisolats gegenüber allen drei untersuchten Proteasen eine deutlich geringere Beständigkeit unter den gewählten Versuchsbedingungen und im Vergleich zu dem Hüllprotein des Referenzstamms. Besonders deutlich zeigt sich dies durch den vollständigen Abbau des Hüllproteins bei Verwendung von Proteinase K. Die Bandenmuster der proteolytischen Ansätze mit Trypsin und Chymotrypsin sind jeweils völlig unterschiedlich und weisen darum auf eine Verschiedenheit der Primärstruktur beider Proteine hin.

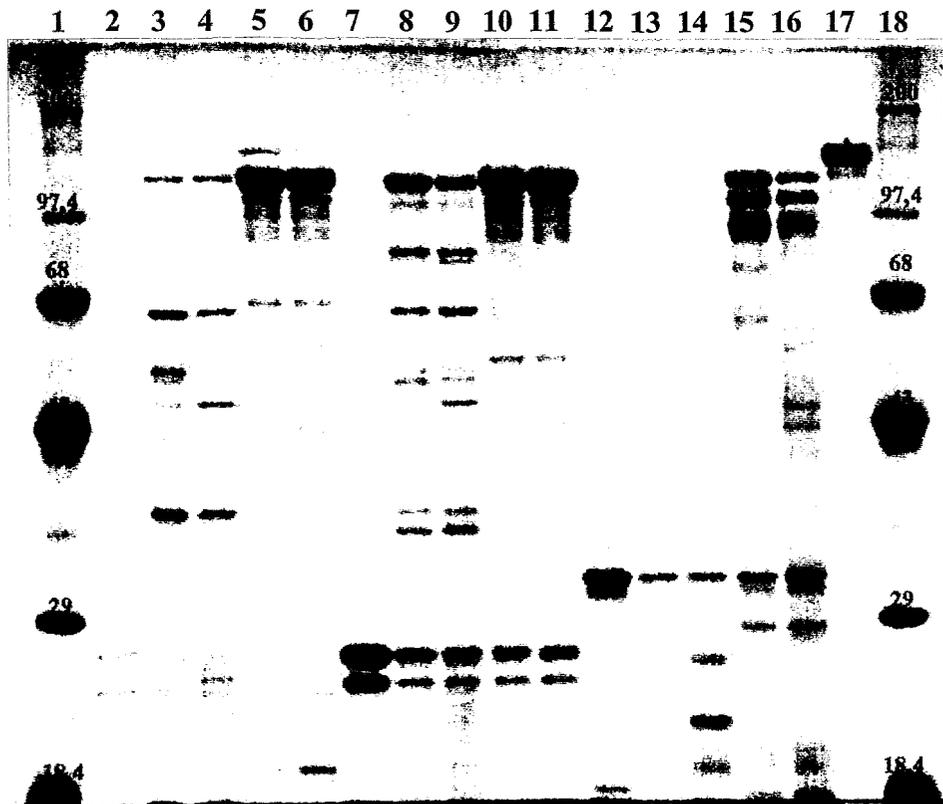


Abb. 4.6.1a.: SDS-PAGE (im 10 %igen silbergefärbten Gel) der proteolytischen Ansätze (Ansatz 1, Kap 3.8.2) der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602, verdaut mit Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K.

Spur 1, 18: Molekulargewichtsstandard.

Spur 2: 5 µg Trypsin.

Spur 3: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Trypsin (einen Tag).

Spur 4: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Trypsin (zwei Tage).

Spur 5: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Trypsin (einen Tag).

Spur 6: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Trypsin (zwei Tage).

Spur 7: 5 µg Chymotrypsin.

Spur 8: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Chymotrypsin (einen Tag).

Spur 9: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Chymotrypsin (zwei Tage).

Spur 10: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Chymotrypsin (einen Tag).

Spur 11: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Chymotrypsin (zwei Tage).

Spur 12: 5 µg Proteinase K.

Spur 13: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Proteinase K (einen Tag).

Spur 14: 10 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,2 µg Proteinase K (zwei Tage).

Spur 15: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Proteinase K (einen Tag).

Spur 16: 10 µg 9602 Hüllprotein + 0,2 µg Proteinase K (zwei Tage).

Spur 17: 2 µg gereinigtes JG-A12 Hüllprotein.

In weiteren Experimenten wurde eine proteolytische Vergleichsanalyse mit den Hüllproteinen der *B. sphaericus* Stämme JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362 und CCM 2177 durchgeführt. In Abbildung 4.6.1.b ist das Gel einer SDS-PAGE der Verdauungsansätze dargestellt. Auch hier ergibt sich ein zur vorherigen Situation unverändertes Bild.

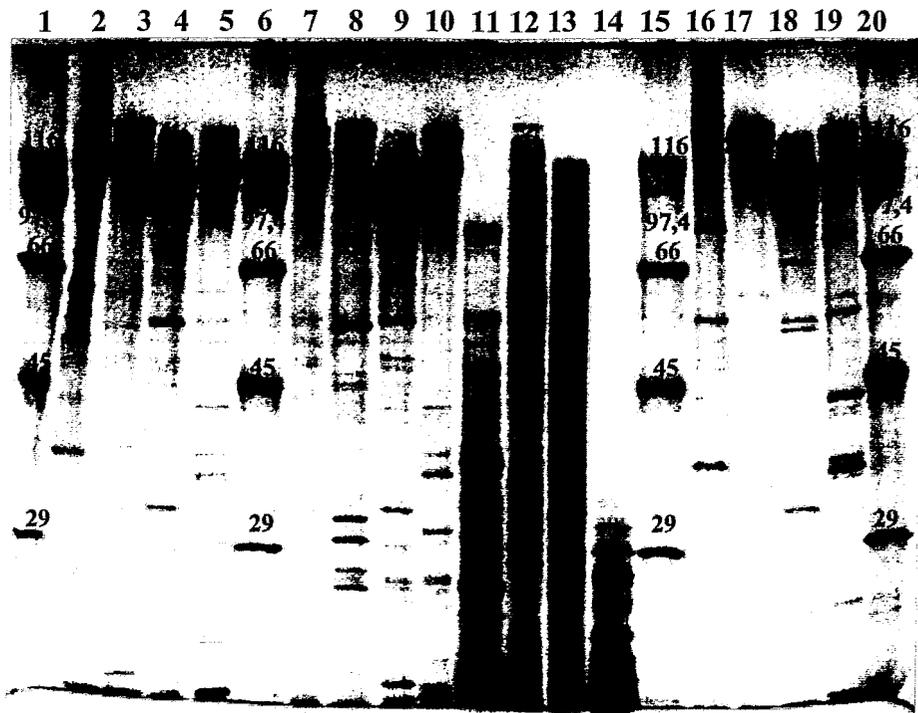


Abb. 4.6.1b.: SDS-PAGE (im 10 %igen silbergefärbten Gel) der proteolytischen Ansätze (Ansatz 3, Kap 3.8.2) der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12, *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. sphaericus* WHO 2362 und *B. sphaericus* CCM 2177 mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin. Alle Verdauungsansätze wurden für zwei Tage bei 4°C inkubiert
Spur 1, 6, 15, 20: Molekulargewichtsstandard.

- Spur 2:** 20 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,25 µg Trypsin.
Spur 3: 20 µg 9602 Hüllprotein + 0,25 µg Trypsin.
Spur 4: 20 µg 2362 Hüllprotein + 0,25 µg Trypsin.
Spur 5: 20 µg 2177 Hüllprotein + 0,25 µg Trypsin.
Spur 7: 20 µg JGA12 Hüllprotein + 0,25 µg Chymotrypsin.
Spur 8: 20 µg 9602 Hüllprotein + 0,25 µg Chymotrypsin.
Spur 9: 20 µg 2362 Hüllprotein + 0,25 µg Chymotrypsin.
Spur 10: 20 µg 2177 Hüllprotein + 0,25 µg Chymotrypsin.
Spur 11: 20 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,25 µg Proteinase K.
Spur 12: 20 µg 9602 Hüllprotein + 0,25 µg Proteinase K.
Spur 13: 20 µg 2362 Hüllprotein + 0,25 µg Proteinase K.
Spur 14: 20 µg 2177 Hüllprotein + 0,25 µg Proteinase K.
Spur 16: 20 µg JG-A12 Hüllprotein + 0,25 µg Thermolysin.
Spur 17: 20 µg 9602 Hüllprotein + 0,25 µg Thermolysin.
Spur 18: 20 µg 2362 Hüllprotein + 0,25 µg Thermolysin.
Spur 19: 20 µg 2177 Hüllprotein + 0,25 µg Thermolysin.

Im Falle des Verdaus mit Trypsin, Chymotrypsin und Thermolysin entsteht nach einer limitierten Proteolyse eine identische Bande mit hohem Molekulargewicht, das bei *B. sphaericus* JG-A12 ein apparentes Molekulargewicht von $(116,6 \pm 5,1)$ kDa, bei *B. sphaericus* NCTC 9602 von $(117,8 \pm 3,8)$ kDa, bei *B. sphaericus* WHO 2362 von $(101,5 \pm 5,4)$ kDa und bei *B. sphaericus* CCM 2177 von $(111,0 \pm 3,5)$ kDa besitzt. Insgesamt sieht auch hier die Fragmentverteilung sehr uneinheitlich aus, so dass bei den Hüllproteinen der untersuchten *B. sphaericus*-Stämme deutliche Unterschiede hinsichtlich der Primärstruktur zu erwarten sind.

Dennoch zeigen die Bandenmuster der proteolytischen Ansätze mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin auch einige Übereinstimmungen bei den entstehenden Fragmenten, die in Tabelle 4.6.1 aufgelistet sind.

Tab. 4.6.1: Entstehende Fragmente mit identischem Molekulargewicht nach einem proteolytischen Verdau der Hüllproteine der *B. sphaericus*-Stämme JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362 und CCM 2177 mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin.

Molekulargewicht der proteolytischen Fragmente (in kDa)									
	JG-A12 Trypsin	9602 Trypsin	2362 Trypsin	2177 Trypsin	2362 Chymo- trypsin	2177 Chymo- trypsin	JG-A12 Thermo- lysin	2362 Thermo- lysin	2177 Thermo- lysin
F1			104± 0,2		104± 0,2				
F2			55,8± 0,2	55,8± 0,2					
F3							55,0±0,2	55,0±0,2	
F4					42,4± 0,0	42,4± 0,0			
F5	37,4± 0,3		37,4± 0,3	37,4± 0,3					
F6							36,4±0,3		36,4±0,3
F7	30,1± 0,3	30,1± 0,3							
F8		29,1± 0,6	29,1± 0,6	29,1± 0,6					

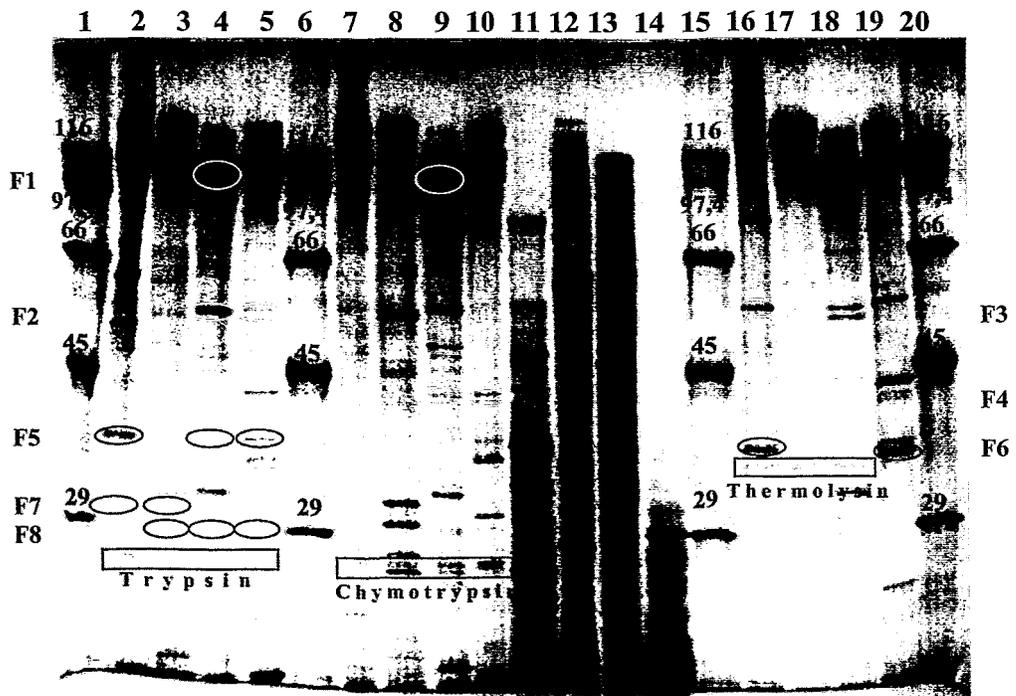


Abb. 4.6.1c.: SDS-PAGE aus Abb. 4.6.1b mit Markierungen der übereinstimmenden proteolytischen Fragmente und den enthaltenen Proteasen.

Der intensive Verdau der Hüllproteine mit Proteinase K ist darauf zurückzuführen, dass die Inhibierung dieser Protease mit den verwendeten PMSF-Konzentrationen nur bedingt möglich ist. Offensichtlich widersteht dieses Enzym der Proteindenaturierung während der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE längere Zeit, was zu einem weiteren Verdau der partiell denaturierten Hüllproteinfragmente führt.

4.6.2 N-terminale Aminosäuresequenzen ausgewählter Fragmente des proteolytischen Verdaus

Nach der proteolytischen Spaltung der Hüllproteine der *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin konnte von beiden Proteinen prädominante Fragmente mit einem apparenten Molekulargewicht von je 105 kDa gewonnen werden (Kap. 4.6.1). Die Fragmentgemische der entsprechenden Verdauungsansätze wurden zunächst mittels einer präparativen SDS-PAGE (Kap. 3.9.1) im 5% oder 10%igen Trenngel aufgetrennt. Dabei wurde die Gelelektrophorese länger fortgeführt, um ausschließlich die schweren Fragmente zu erhalten. Es wurden pro Spur 100 µg Protein aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Fragmente mittels Western Blot (Kap. 3.9.2) vollständig auf eine PVDF-Membran überführt und diese nachfolgend mit Ponceau S gefärbt (Abb. 4.6.2a und c).

1. Ansatz

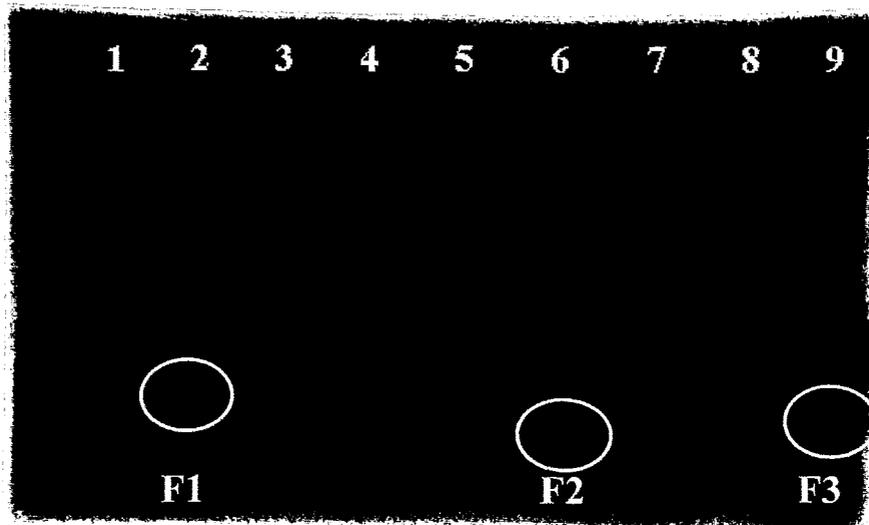


Abb. 4.6.2a.: PVDF-Membran gefärbt mit Ponceau S (Ansatz 4, Kap 3.10.2): Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602, verdaut mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin. Alle Verdauungsansätze wurden für zwei Tage bei 4°C inkubiert

Spur 1: 100 µg JG-A12 Hüllprotein + 2 µg Trypsin.

Spur 2: 100 µg JG-A12 Hüllprotein + 2 µg Chymotrypsin.

Spur 3: 100 µg JG-A12 Hüllprotein + 2 µg Proteinase K.

Spur 4: 100 µg JG-A12 Hüllprotein + 2 µg Thermolysin.

Spur 5: 10 µg natives 9602 Hüllprotein.

Spur 6: 100 µg 9602 Hüllprotein + 2 µg Trypsin.

Spur 7: 100 µg 9602 Hüllprotein + 2 µg Chymotrypsin.

Spur 8: 100 µg 9602 Hüllprotein + 2 µg Proteinase K.

Spur 9: 100 µg 9602 Hüllprotein + 2 µg Thermolysin.

Markierte und bezeichnete Fragmente wurden zur Sequenzierung verwendet.

Die in Abbildung 4.6.2a markierten Fragmente (F1, F2, F3) wurden aus der Membran ausgeschnitten und in einem automatischen EDMAN-Abbau (Kap. 3.9.4) die N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Es konnten 13, 17 und 14 Aminosäuren der entsprechenden Proteinfragmente eindeutig bestimmt werden. Der jeweilige N-Terminus ist in Abb. 4.6.2b dargestellt.

<i>B. sphaericus</i> JG-A 12	F1	(Chymotrypsin)	RIENV VNNPP AGV
<i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	F2	(Trypsin)	TIENV VLNAP EAGAA AV
	F3	(Thermolysin)	VLNAP EAGAA AVKA

Abb. 4.6.2b.: N-terminale Aminosäuresequenzen der isolierten Fragmente

Betrachtet man die N-terminalen Aminosäuren der Fragmente F2 und F3 von *B. sphaericus* NCTC 9602, zeigt sich trotz der verschiedenen Spezifitäten der verwendeten Proteasen eine überlappende Sequenz.

4.7 Primerdesign auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenzen der nativen Hüllproteine und proteolytischen Fragmente

Für eine genaue Analyse der N-terminalen Domänen der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 auf DNA-Ebene wurden aufbauend auf der Kenntnis der N-terminalen Aminosäuren der nativen Proteine und der dominierenden proteolytisch gewonnenen Fragmente geeignete Primer entworfen (Kap.3.14.1). Dazu wurden zunächst die den Aminosäuren zuzuordnenden Codons aufgeschrieben und entsprechend der Variabilität im Einbuchstabencode als degenerierte Sequenz dargestellt. Für Vorwärts-Primer entsprach dies bereits den zu bestellenden Primern. Für die entsprechenden Rückwärts-Primer wurde die degenerierte Sequenz komplementär umgeschrieben und die Basensequenz von 3'→5'-Richtung gelesen. Das Ergebnis dieser Prozedur ist nachfolgend ausführlich dargestellt.

1. Ansatz

1) Primerdesign auf der Basis der identischen N-Termini der nativen Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

AMINOSÄUREN:	1	A	G	F	S	D	V	A	G	N	D	H	E	V	10
DNA CODONS:		GCU	GGU	UUU	UCU	GAU	GUU	GCU	GGU	AAU	GAU	CAU	GAA	GUU	
(5'→3')		GCC	GGC	UUC	UCC	GAC	GUC	GCC	GGC	AAC	GAC	CAC	GAG	GUC	
		GCA	GGA		UCA		GUA	GCA	GGA					GUA	
		GCG	GGG		UCG		GUG	GCG	GGG					GUG	
PRIMER:		GCN	GGN	TTY	TCN	GAY	GTN	GCN	GGN	AAY	GAY	CAY	GAR		
	SLV3	-----													
	SLV4	-----													

2) Primerdesign auf der Basis des N-Terminus des Hüllproteinfragments F1 von *B. sphaericus* JG-A12, gewonnen durch einen proteolytischen Verdau mit Chymotrypsin

AMINOSÄUREN:	R	I	E	N	V	V	N	N	P	P	A	G	V
DNA CODONS:	CGU	AUU	GAA	AAU	GUU	GUU	AAU	AAU	CCU	CCU	GCU	GGU	GUU
(5'→3')	CGC	AUC	GAG	AAC	GUC	GUC	AAC	AAC	CCC	CCC	GCC	GGC	GUC
	CGA	AUA			GUA	GUA			CCA	CCA	GCA	GGA	GUA
	CGG				GUG	GUG			CCG	CCG	GCG	GGG	GUG
	AGA												
	AGG												
DIREKT:	MGN	ATH	GAR	AAY	GTN	GTN	AAY	AAY	CCN	CCN	GCN	GGN	GTN
KOMPLEMENTÄR:	KCN	TAD	CTY	TTR	CAN	CAN	TTR	TTR	GGN	GGN	CGN	CCN	CAN
PRIMER (REV):	NAC	NCC	NGC	NGG	NGG	RTT	RTT	NAC	NAC	RTT	YTC	DAT	NCK
	SLR3	-----											
	SLR4	-----											

3) Primerdesign auf der Basis des N-Terminus des Hüllproteinfragments F2 von *B. sphaericus* NCTC 9602, gewonnen durch einen proteolytischen Verdau mit Trypsin

AMINOSÄUREN	T	I	E	N	V	V	L	N	A	P	E	A	G
DNA CODONS:	ACU	AUU	GAA	AAU	GUU	GUU	CUU	AAU	GCU	CCU	GAA	GCU	GGU
(5'→3')	ACC	AUC	GAG	AAC	GUC	GUC	CUC	AAC	GCC	CCC	GAG	GCC	GGC
	ACA	AUA			GUA	GUA	CUA		GCA	CCA		GCA	GGA
	ACG				GUG	GUG	CUG		GCG	CCG		GCG	GGG
							UUA						
							UUG						
DIREKT:	ACN	ATH	GAR	AAY	GTN	GTN	YTN	AAY	GCN	CCN	CAR	GCN	GGN
KOMPLEMENTÄR:	TGN	TAD	CTY	TTR	CAN	CAN	RAN	TTR	CGN	GGN	CTY	CGN	CCN
PRIMER (REV):	NCC	NGC	YTC	NGG	NGC	RTT	NAR	NAC	NAC	RTT	YTC	DAT	NGT
	SLR1	-----											
	SLR2	-----											

2. Ansatz

4) Primerdesign auf der Basis des N-Terminus des Hüllproteinfragments von *B. sphaericus* JG-A12, gewonnen durch einen proteolytischen Verdau mit Thermolysin

AMINOSÄUREN	A	V	T	T	T	S	Y	T	Q	K	Y	T	A
DNA CODONS:	GCU	GUU	ACU	ACU	ACU	UCU	UAU	ACU	CAA	AAA	UAU	ACU	GCU
(5'→3')	GCC	GUC	ACC	ACC	ACC	UCC	UAC	ACC	CAG	AAG	UAC	ACC	GCC
	GCA	GUA	ACA	ACA	ACA	UCA		ACA				ACA	GCA
	GCG	GUG	ACG	ACG	ACG	UCG		ACG				ACG	GCG
							AGU						
							AGC						
DIREKT:	GCN	GTN	ACN	ACN	ACN	WSN	TAY	ACN	CAR	AAR	TAY	ACN	GCN
KOMPLEMENTÄR:	CGN	CAN	TGN	TGN	TGN	WSN	ATR	TGN	GTY	TTY	ATR	TGN	CGN
PRIMER (REV):							NGC	NGT	RTA	YTT	YTG	NGT	RTA
	SLR10	-----											

Durch die bekannten N-terminalen Aminosäuresequenzen der nativen Hüllproteine konnten auf diese Weise zwei für beide *B. sphaericus*-Stämme spezifische Vorwärts-Primer (SLV3 und SVL4) abgeleitet werden. Durch die Kenntnis der N-terminalen Aminosäuresequenzen der verschiedenen proteolytisch gewonnenen Hüllproteinfragmente konnten demgegenüber mehrere stammspezifische Rückwärts-Primer entworfen werden. Die Rückwärts-Primer von *B. sphaericus* JG-A12 (SLR3 und SLR4) zeigen jedoch entsprechend ihrer Reihenfolge Ähnlichkeiten zu den Rückwärts-Primern von *B. sphaericus* NCTC 9602 (SLR1 und SLR2), was in der Ähnlichkeit der N-terminalen Aminosäuresequenzen beider Fragmente begründet ist. Außerdem konnte ein zusätzlicher Rückwärtsprimer für die spezifische Amplifikation eines Teils des Hüllproteingens von *B. sphaericus* JG-A12 gewonnen werden.

Der komplette Primersatz sah wie folgt aus:

PRIMER

SLV3:	5`-GCN GGN TTY TCN GAY GTN GCN GGN-3`	für JG-A12 und 9602
SLV4:	5`-GAY GTN GCN GGN AAY GAY CAY GAR-3`	für JG-A12 und 9602
SLR1:	5`-NCC NGC YTC NGG NGC RTT NAR NAC-3`	für 9602
SLR2:	5`-RTT NAR NAC NAC RTT YTC DAT NGT-3`	für 9602
SLR3:	5`-NAC NCC NGC NGG NGG RTT RTT NAC-3`	für JG-A12
SLR4:	5`-NGG RTT RTT NAC NAC RTT YTC DAT-3`	für JG-A12
SLR10:	5`-NGC NGT RTA YTT YTG NGT RTA-3`	für JG-A12

4.8 Nukleinsäuresequenzen von Teilen der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

4.8.1 Nukleinsäuresequenzen des 5'-Endes des strukturellen Teils der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Zur hüllproteinspezifischen Amplifikation des 5'-Endes des strukturellen Teils der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 wurde zunächst von beiden Bakterien aus 1 und 1,5 ml Kultur DNA isoliert (Kap. 3.12). Der Erfolg der DNA-Isolierung wurde mittels einer konventionellen Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 4.8.1a) überprüft. Es zeigte sich, dass die Isolierung der DNA für beide Bakterienstämme erfolgreich war.

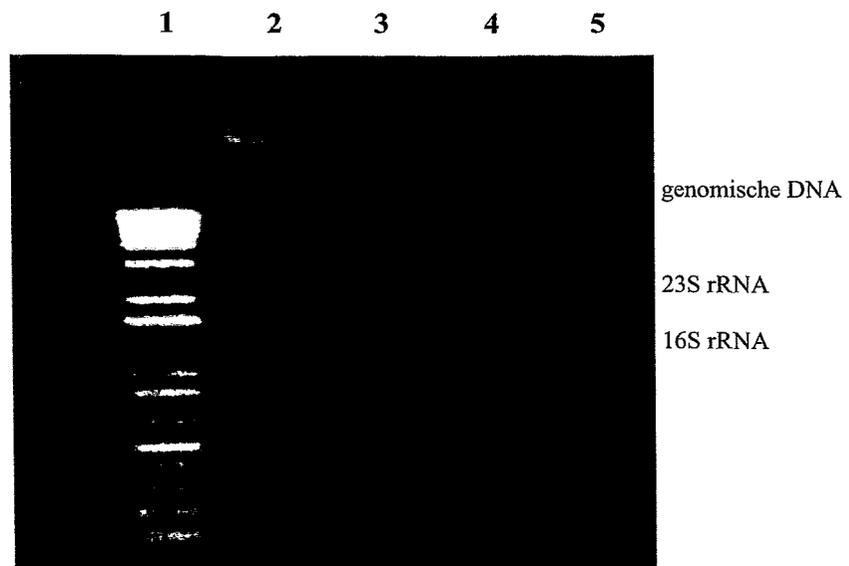


Abb. 4.8.1a.: Agarosegel der elektrophoretisch aufgetrennten DNA von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602. Neben genomischer DNA der Bakterien ist in Form niedermolekularer Banden die 23 S- (2,9 kb) und die 16 S-rRNA (1,5 kb) zu sehen.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard (KBL).

Spur 2: 2 µl der DNA-Lösung isoliert von 1 ml JG-A12 Kultur.

Spur 3: 2 µl der DNA-Lösung isoliert von 1,5 ml JG-A12 Kultur.

Spur 4: 2 µl der DNA-Lösung isoliert von 1 ml 9602 Kultur.

Spur 5: 2 µl der DNA-Lösung isoliert von 1,5 ml 9602 Kultur.

Im nächsten Schritt wurde eine PCR mit den hüllproteinspezifischen Primern durchgeführt (Kap. 3.14.2). Um zu sehen, inwieweit die entworfenen Rückwärts-Primer wirklich stamm-spezifisch sind, wurde die Amplifikation der Genteile beider *Bacillus*-Stämme jeweils mit den Primerkombinationen V3R1, V3R2, V3R3, V3R4, V4R1, V4R2, V4R3 und V4R4, und in einem zweiten Schritt mit den Primerkombinationen V3R10 und V4R10 durchgeführt und die Ergebnisse mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die erfolgreiche Amplifikation der ersten Primerkombinationen ist in Abb. 4.8b abgebildet. Unter Verwendung der zweiten Primerkombinationen konnten keine PCR-Produkte gewonnen werden.

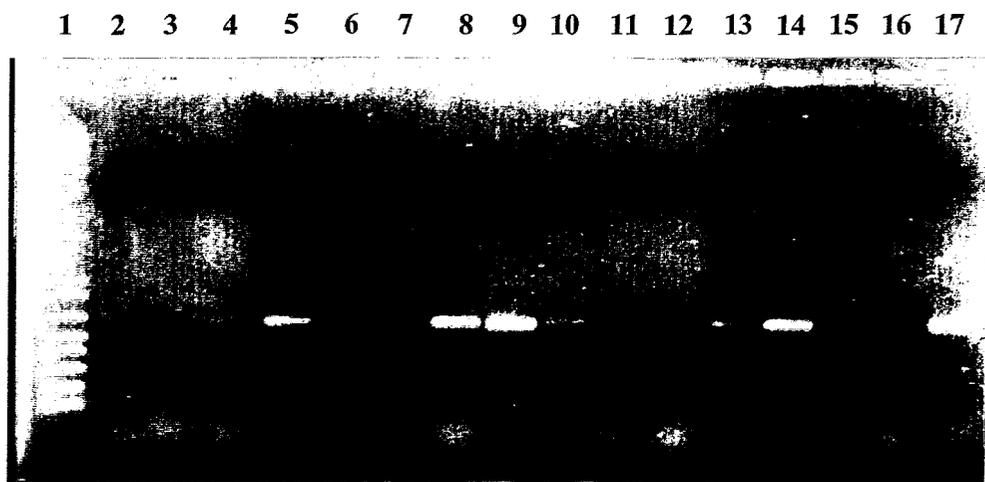


Abb. 4.8.1b.: Agarosegel der elektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate der hüllprotein-spezifischen PCR mit DNA von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602. Es wurde jeweils 1 µl des Ansatzes aufgetragen.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard (KBL).

Spur 2: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R1.

Spur 3: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R2

Spur 4: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R3.

Spur 5: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R4.

Spur 6: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R1.

Spur 7: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R2.

Spur 8: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R3.

Spur 9: Amplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R4.

Spur 10: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R1.

Spur 11: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R2.

Spur 12: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R3.

Spur 13: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R4.

Spur 14: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R1.

Spur 15: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R2.

Spur 16: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R3.

Spur 17: Amplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R4.

Die Kontrolle wurde nicht mit dargestellt, da keine unspezifischen Reaktionen detektiert wurden.

Die hüllproteinspezifische Amplifikation bei *B. sphaericus* JG-A12 war für die Primerkombinationen V3R3, V3R4 und besonders für V4R3 sowie V4R4 erfolgreich. Dies entspricht der Spezifität der Rückwärtsprimer R3 und R4 für *B. sphaericus* JG-A12.

Für die Amplifikation bei *B. sphaericus* NCTC 9602 waren die Primerkombinationen V3R1, V3R2, V3R4 und V4R1, V4R2 sowie V4R4 erfolgreich. Auch hier entspricht dies der Spezifität der Rückwärtsprimer R1 und R2. R4 konnte für beide Stämme erfolgreich verwendet werden. Die funktionierenden Primerkombinationen wurden für eine Reamplifikation der einzelnen PCR-Produkte ausgewählt. Die Ergebnisse wurden mittels Agarose-Gel-elektrophorese überprüft (Abb. 4.8c).

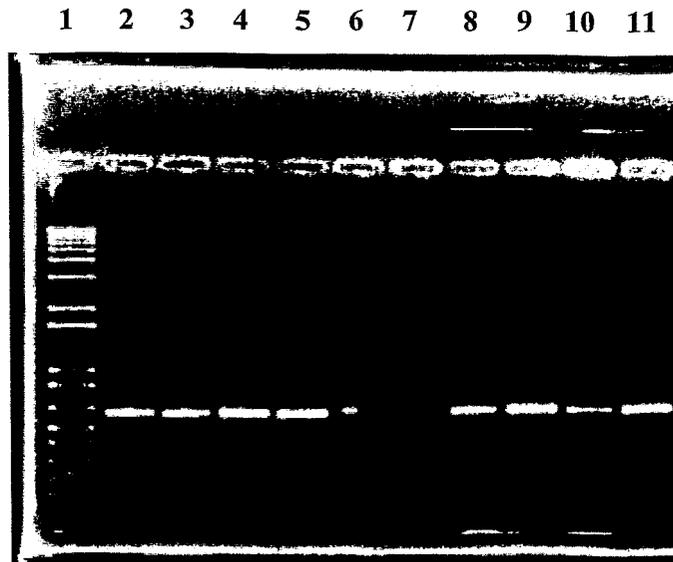


Abb. 4.8.1c.: Agarosegel der elektrophoretisch getrennten PCR-Produkte der Reamplifikation der PCR-Produkte von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602. Es wurde jeweils 1 μ l des Ansatzes aufgetragen.

Spur 1: Molekulargewichtsstandard (KBL).

Spur 2: Reamplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R3.

Spur 3: Reamplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V3R4

Spur 4: Reamplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R3.

Spur 5: Reamplifikation von JG-A 12 DNA mit den Primern V4R4.

Spur 6: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R1

Spur 7: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R2.

Spur 8: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V3R4.

Spur 9: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R1.

Spur 10: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R2.

Spur 11: Reamplifikation von 9602 DNA mit den Primern V4R4.

Die Kontrolle wurde nicht mit dargestellt, da keine unspezifischen Reaktionen detektiert wurden.

Wie in Abbildung 4.8.1c zu erkennen ist, konnten alle Fragmente erfolgreich reamplifiziert werden. Insbesondere führte die Primerkombination V3R4 zu der spezifischsten Amplifikation der strukturellen 5'-Teile der Hüllproteingene beider *Bacillus*-Stämme. Zusätzlich dazu stellt das Amplifikat, das mittels dieser Primer gewonnen wurde, das längste Teilstück dar. Die in diesen beiden PCR-Ansätzen amplifizierte DNA (Abb. 4.8.1c, Spur 3 und Spur 8) wurde einer Reinigung unterzogen (Kap. 3.14.3) und für die Sequenzierung verwendet.

Dazu wurde mit den gereinigten PCR-Produkten eine Sequenzierreaktion durchgeführt, die Kettenabbruchprodukte gereinigt und in einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser sequenziert (Kap. 3.14.4).

4.8.2 Nukleinsäuresequenz der zentralen Region des strukturellen Teils der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Aufbauend auf der gewonnenen Kenntnis des ersten Teils der Basenabfolge der Hüllproteingene beider Stämme wurde ein weiterer Primer konstruiert (SLV8: 5´-AAA GAA ATC GCA GGC GTA GAC-3´). Dazu wurde eine mittige DNA-Sequenz von Position 355-375 ausgewählt. mit der Primerkombination V8R10 konnte für *B. sphaericus* JG-A12 ein annähernd 1200 bp langes PCR-Produkt amplifiziert werden, welches anschließend gereinigt und sequenziert wurde. In der Sequenzierreaktion konnten mit dem Primer V8 erfolgreich Kettenabbruchprodukte synthetisiert werden, nicht jedoch mit dem Primer R10. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Vorwärtsprimer auf der Grundlage der mit V8 erhaltenen Sequenz konstruiert (SLV14: 5´-CTA CTA AAG TAG ATT TAG TAG-3´ an Position 830-850) und für die Sequenzierreaktion verwendet.

Außerdem wurde eine identische Strategie für die Amplifikation von Teilen des Hüllproteingens von *B. sphaericus* NCTC 9602 unter Verwendung des Vorwärts-Primer V8 und verschiedener Rückwärts-Primer angewandt. Erstaunlicherweise konnte aber in keinem Fall ein PCR-Produkt erhalten werden.

4.8.3 Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der entschlüsselten Teile der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

B. sphaericus JG-A12						
GCNNGGNTTYT CNGAYGTNGC NGGN Primer V3						
1	GCCGGGTTTT	CGGATGTTGC	GGGTAACGAC	CACGAAGTAG	CAATCAACGC	ACTTGCTGAT
61	GCAGGTATCA	TCAATGGATA	CGCTGACGGC	<u>C</u> ATTCAAAC	CAAACCAAAC	AATTAACCGC
121	GGTCAAGTGG	TTAAATTATT	AGGTCGTTAT	TTAGAAGCAC	AAGGCCAAGA	AATTCCAGCT
181	GACTGGAATT	CAAAACAACG	CTTCAACGAT	CTACCAGTAA	CAGCTGAAG <u>C</u>	AGAATTAGT <u>T</u>
241	AAATATGCTG	CACT <u>G</u> GCAA	AGATGCAGGC	GTATTCAACG	GTTCAA <u>A</u> GG	CAAC <u>T</u> TAAAC
301	GCTTCACAAA	CAATGCAACG	TCAACAAATG	GCAGTAGTTT	TAGTACGTGC	TATTTAAAGAA
AAAGAA						
ATCGCAGGCG TAGAC Primer V8						
361	ATCGC <u>A</u> GGCG	TAGACTTAGT	AGCTGAGTAC	AAAAAAGCGA	<u>A</u> TTCGTAAC	AGAAATTGGT
421	GACTTAGACA	AAGCTTACTC	TGCAGAACAA	CGCACAGCGA	TCGTTGCTTT	AGAATATGCG
481	GGTATTACAA	ATGTTGCTCA	CTTCAACCCA	GGTAACAGCG	TAACACGCGG	ACAATTGCT
541	TCAT <u>C</u> TAT	ACCG <u>C</u> ACAAT	<u>C</u> GAAAACGTT	GTAAACAACC	CAGAAGCTGG	TGTTGCGCA
Primer R4 GTN GTNAAYAAAYC CNCCNGCNGG N						
601	GTAAAAGCTA	TCAACAACAC	AACTGTTGAA	GTAACATTCG	ACGAAGAAGT	AGACAACGTA
661	CAAGCTCTTA	ACTTCTTAAT	CTCTGATCTT	GAAGTGAAAA	ACGCAGCTGT	TAAATTAACA
721	AACAAAAAAG	TTGTTGTATT	AACAACCTGCT	GCTCAAACAG	CTGACAAAGA	GTACACTGTA
781	TCTCTTGCGC	AAGAAAAAAT	CGGTACATTC	AAAGGTATCG	CAGCTGTAGT	TCCTACTAAA
CTACTAAA						
GTAGATTTAG TAG Primer V14						
841	GTAGATTTAG	TAGAAAATC	AGTTC AAGGT	AAACTTGGCC	AACAAGTAAC	ACTTAAAGCA
901	CAAGTAACTG	TTGCTGAAGG	TCAAACAAAA	GCTGGTATTC	CAGTAACTTT	CTTCATCCCA
961	GGTCTGCTA	ATGGCGTGAA	AACTCCAGTA	ACAGTTGAAG	CTGTAACAAA	CGAAGAAGGT
1021	ATCGCAACTT	ACTCTTACAC	TCGTTATGCT	GCAACAAACG	ACACTGTAAC	TGTATATGCA
1081	AACGGTGACC	GTTCTAAATT	CTCAACTGGT	TATGTATTCT	GGGCAGTTGA	CCAACTTTA
1141	GAAATCACTG	AAGTAACAAC	TGGTGCTACT	ATCAACAACG	GCGCTAACAA	AACTTACAAA
1201	GTTACTTACA	AACACCCAGA	AACTGGTAAA	CCAGTATCAG	GTAAAGTACT	TAACGTTTCA
1261	GTAAAAGAAA	ACATTGACGT	AACTGTTGAT	AAATTACAAA	ACGTTACGGT	GAATGGTATT
1321	GCTGTAGTTC	AAACAAGCGA	TAACAACACA	CGTGCTGCTC	AAATCACAAAC	TGACTCTAAA
1381	GGTGAAGCAA	CATTCACAGT	TTCAGGTTCT	AACGCTGAAG	TAACTCCAGT	GGTATTTGAA
1441	GCAACTCCAG	TACAAGTTAC	TAACACAAAT	GGTGCAGTAA	CAACAACCTAG	CTACACC
TAYACNCAR						
AARTAYACNGCN Primer R10						
B. sphaericus NCTC 9602						
GCNNGGNTTYT CNGAYGTNGC NGGN Primer V3						
1	GCCGGGTTTT	CGGATGTTGC	GGGTAACGAC	CACGAAGTAG	CAATCAACGC	ACTTGCTGAT
61	GCAGGTATCA	TCAATGGATA	CGCTGACGGC	<u>C</u> ATTCAAAC	CAAACCAAAC	AATTAACCGC
121	GGTCAAGTGG	TTAAATTATT	AGGTCGTTAT	TTAGAAGCAC	AAGGCCAAGA	AATTCCAGCT
181	GACTGGAATT	CAAAACAACG	CTTCAACGAT	CTACCAGTAA	CAGCTGAAG <u>C</u>	AGAATTAGT <u>T</u>
241	AAATATGCTG	CACT <u>G</u> GCAA	AGATGCAGGC	GTATTCAACG	GTTCAA <u>A</u> GG	CAAC <u>T</u> TAAAC
301	GCTTCACAAA	CAATGCAACG	TCAACAAATG	GCAGTAGTTT	TAGTACGTGC	TATTTAAAGAA
361	ATCGC <u>A</u> GGCG	TAGACTTAGT	AGCTGAGTAC	AAAAAAGCGA	<u>A</u> TTCGTAAC	AGAAATTGGT
421	GACTTAGACA	AAGCTTACTC	TGCAGAACAA	CGCACAGCGA	TCGTTGCTTT	AGAATATGCG
481	GGTATTACAA	ATGTTGCTCA	CTTCAACCCA	GGTAACAGCG	TAACACGCGG	ACAATTGCT
541	TCAT <u>C</u> TATAC	CGACAAT <u>G</u> A	AAACGTTGTA	AACAACCCA	579	
GTNGTN AAYAAAYCCNC CNGCNGGN Primer R4						

Abb. 4.8.3a: DNA-Sequenzen der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602. Unterstrichen dargestellt sind abgeleitete oder nicht eindeutige Basen. Schwarz unterlegt sind auf Abweichungen in der Protein- und DNA-Sequenzierung zurückzuführende Basen gekennzeichnet. Unterschiedliche Basen beider Stämme sind dunkelgrau unterlegt mit weißer Schrift.

***B. sphaericus* JG-A12**

```
1  AGFSDVAGND HEVAINALAD AGIINGYADG S█FKPNQTINR GQVVKLLGRY LEAQQQEIPA
61  DWNSKQRFND LPVTAE█ELV KYAALAKDAG VFNGSNGNLN ASQTMQRQQM AVVLVRAIKE
121 IAGVDLVAEY KKANFVTEIG DLDKAYS█AEQ RTAIVALEYA GITNVAHFNP GNSVTRGQFA
181 S█ELYRTIENV VNNPEAGVAA VKAINNTTVE VTFDEEVDNV QALNFLISDL EVKNAAVKLT
241 NKKVVVLT█TA AQTADKEYTV SLGEEKIGTF KGIAAVVPTK VDLVEKSVQG KLGQQVTLKA
301 QVTVAEGQTK AGIPVTF█FIP GSANGVKTPV TVEAVTNEEG IATYSYTRYA ATNDTVTVYA
361 NGDRSKFSTG YVFWAVDQTL EITEVTTGAT INNGANKTYK VTYKHPETGK PVS█GKVLNVS
421 VKENIDVTVD KLQNVTVNGI AVVQTS█DNNT RAAQIT█TDSK GEATFTVSGS NAEVTPV█VE
481 ATPVQVTNTN GAVTT
```

***B. sphaericus* NCTC 9602**

```
1  AGFSDVAGND HEVAINALAD AGIINGYADG S█FKPNQTINR GQVVKLLGRY LEAQQQEIPA
61  DWNSKQRFND LPVTAE█ELV KYAALAKDAG VFNGSNGNLN ASQTMQRQQM AVVLVRAIKE
121 IAGVDLVAEY KKANFVTEIG DLDKAYS█AEQ RTAIVALEYA GITNVAHFNP GNSVTRGQFA
181 S█
```

Abb. 4.8.3b: N-terminale Aminosäuresequenzen, abgeleitet aus den DNA-Sequenzen der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602. Die Basensequenzen wurden nur soweit berücksichtigt, wie die Bestimmung eindeutig erfolgen konnte. Unterschiedliche Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt mit weißer Schrift.

4.9 Alignment der N-terminalen Teile der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine der *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 mit bereits sequenzierten Hüllproteinen anderer *B. sphaericus* Stämme

Zur Analyse sowie dem Vergleich der entschlüsselten Aminosäuren der ersten Teile der Hüllproteine der *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 mit den bereits bekannten Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von *B. sphaericus* P-1, CCM 2177 und WHO 2362 wurde ein Alignment mittels dem Programm SEAVIEW (Galtier et al. 1996) unter Verwendung der CLUSTAL-Methode durchgeführt. Dabei wurden insbesondere auch die drei N-terminalen SLH-Motive (Engelhardt und Peters 1998, Beginn an Position 3, 71 und 136) berücksichtigt (Abb. 4.9). In der Abbildung sind die Farben der Aminosäuren im Einbuchstabencode entsprechen den Gruppen ähnlicher Aminosäuren (GAILPV = grün, CM = dunkelgrün, NQ = pink, ST = ocker, DE = rot, HKR = hell-/dunkelblau, YWF = schwarz) gewählt. Mit X sind unbekannte Aminosäuren bezeichnet.

Wie sich im Alignment zeigt, ist bis Position 192 eine sehr hohe Identität zwischen den Hüllproteinen von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 zu erkennen. Ebenso zeigen die Hüllproteine von *B. sphaericus* P-1, CCM 2177 und WHO 2362 zueinander hohe Identitäten. Ab Position 193-348 trifft dies für die Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12, P-1 und CCM 2177 und ab Position 349-560 nur noch für die von *B. sphaericus* JG-A12 und P-1 zu.

	10	20	30	40	50	60
konserviert
SLH	---**---*	---**---*	---**---*	---**---*	*****--*	-----
B.sph.9602	--FKDVXX-D	HWAAKYINAL	VKLGIIIVKGX	GDGXFGPKXX	ITRAEAAXII	VRAHALKLXX
B.sph.JGA12	AGFSDVAGND	HEVA--INAL	ADAGII-NGY	ADGTFKPNQT	INRGQVVKLL	GRYLEAQQQE
B.sph.P-1	AQVNDYNKIS	GYAKEAVQAL	VDQGGVI-QGD	TNGNFNPLNT	VTRAQAAEIF	TKALELEA-N
B.sph.2177	AQVNDYNKIS	GYAKEAVQSL	VDQGGVI-QGD	TNGNFNPLNT	VTRAQAAEIF	TKALELEA-D
B.sph.2362	AQLNDFNKIS	GYAKEAVQSL	VDAGVI-QGD	ANGNFNPLKT	ISRAEAATIF	TNALELEA-E
B.f.OF4	AKFSDVSS-S	HWAIDDINYL	VEKGAI-QGY	PDGTFKPNNS	ITRAEIAVVL	ANTLGLDVEDS
	70	80	90	100	110	120
konserviert
SLH	-----KX-	FKDVX--XDH	WAAKYINALV	K-LGIIIVKGX	GDGXFGPKXX	ITRAEAAXII
B.sph.9602	IPADWNSKQR	FNDLPVTAEAE	ELVKYA-ALA	KDAGVF-NG-	SNGNLNASQT	MQRQQMAVVL
B.sph.JGA12	IPADWNSKQR	FNDLPVTAEAE	ELVKYA-ALA	KDAGVF-NG-	SNGNLNASQT	MQRQQMAVVL
B.sph.P-1	G--DVN----	FKDVKAGA--	WYNSIAAVV	AN-GIF-EGV	SATEFAPNKS	LTRSEAAKIL
B.sph.2177	G--DVN----	FSDVKKGA--	WYNSIAAVV	AN-GIF-EGV	SANEFAPNKS	LTRSEAAKVL
B.sph.2362	G--DVN----	FKDVKADA--	WYDAIAATV	EN-GIF-EGV	SATEFAPNKQ	LTRSEAAKIL
B.f.OF4	EVTDDK----	FSDVPATH--	WANPYIAAIV	DQTEGVIDGY	ENGTFRPSNT	ITRQEMAKMV
	130	140	150	160	170	180
konserviert
SLH	-----***-	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
B.sph.9602	VRAHALKLXX	KXK--FKDVX	----XDHWAA	KY-----I	NALVKLGIIIV	KGXGDGXFGP
B.sph.JGA12	VRAIKEIAGV	DLVAEYKKN	FVTEIGDLDK	AYSAEQRTAI	VALEYAGITN	VAH----FNP
B.sph.P-1	VRAIKEIAGV	DLVAEYKKN	FVTEIGDLDK	AYSAEQRTAI	VALEYAGITN	VAH----FNP
B.sph.2177	VEAFGLEGEA	DLS-EFADAS	----VKPWAK	KY-LE--IAV	ANGIFEGTDA	NK----LNP
B.sph.2362	VDAFGLEGSE	SLS-QFADAS	----VKGWAK	SA-LE--TAV	ANGIFTGSEE	NGKLN--LKP
B.f.OF4	VDAFELEGEA	DLS-EFADAS	----VKPWAK	SY-LE--IAV	ANGVIKSEA	NGKTN--LNP
	190	200	210	220	230	240
konserviert
SLH	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
B.sph.9602	XXKITRAEAA	XIIVRAHALK	LXXXKX....
B.sph.JGA12	GNSVTRGQFA	SSXXXXXXXXX	XXAPEAGVA-	---AVKAVNN	TVVEVT----	-----
B.sph.P-1	GNSVTRGQFA	SFLYRTIENV	VNNPEAGVA-	---AVKAINN	TTVEVTFDEE	VDNVQALNFL
B.sph.2177	NNSITRQDFA	LVFKRTVDKV	EGETPEEAA-	---FVKAINN	TTVEVTFDEE	VTVNVQALNFK
B.sph.2362	NAAITRQDFA	VVFARTLD-L	AVETVDAS--	---VKAINN	TTVEVTFDEE	VDNVEALKFK
B.f.OF4	NAPITRQDFA	VVFSRTIENV	DATPKVVK--	----IEVVDA	KTLNVTLSDG	TKETVTLEKA
	250	260	270	280	290	300
B.sph.JGA12	ISD---LEVK	NAAVKLTNKK	VVVLTTAAQT	ADKEYTVSLG	EEKIGTFKGI	AAVVPVKVDL
B.sph.P-1	IEG---LEIK	NASVKQTNKK	VVVLTTAAQT	ADKEYVLTLD	GETIGGFKGV	AAVVPVKVEL
B.sph.2177	IEG---LEVK	NAAVKQTNKK	VVVLTTAAQT	ADKEYVVTLD	GEEIGKFKGI	EAVVPKSIVL
B.sph.2362	LEPNKETEVT	FKIKDVEYKA	KVTYVVTIAT	AVKSVSATNL	KEVVVEFDGT	VDKETAEDAA
B.f.OF4	LVANEATEVT	FEINDVEYTE	TVTWVYEELA	VA-SVNAVNG	KQLVVNFTQP	VDASSVLTSP
	310	320	330	340	350	360
B.sph.JGA12	VEKSVQGKLG	QQVTLKAQVT	VAEGQ-----	-----TKAG	IPVTFVFPGS	ANGVKTP--V
B.sph.P-1	VSSAVQGKLG	QEVKQVQAVT	VAEGQ-----	-----SKAG	IPVTFVFPGN	NNQGVVPT-L
B.sph.2177	KTTNTQGKVG	NQVTLTAVG	V-----	-----KAAG	IPVTFVNDAP	TGSLNKD--A
B.sph.2362	NYALKSGKTI	KSVSLAACNK	TA-----	-----TVTLTDLN	NNKAD--AIS	
B.f.OF4	TASTSTVKTG	VLSLNRFTD	THSNDVVVLGV	AERAVLSSDG	KTLTFTVAPTG	QFFKGNVDVT
	370	380	390	400	410	420
B.sph.JGA12	IVRAVINEEG	IATYSYTRYA	ATNDTVTV--	YANGDRSKFS	TGYVFNVAVDQ	TLSEITEVTTG
B.sph.P-1	TGKALNEEG	IATYSYTRYK	EGTDEVTA--	YATGDRSKFS	LGYVFNVAVD	ILSVEEVTTG
B.sph.2177	VVEVYINAEI	IASYSYTRYA	PDADDVTV--	YPTGAPQLRA	FGPVYVGVND	ILTIIEVTTG
B.sph.2362	NVKAGKKEIN	VKNVFTAVD	NKIPEVTE--	-VKSGLTKAV	KVTLSEPVEN	LSSTNFTLDG
B.f.OF4	VKEAKSQNT	IPSVIKTISV	DBTTAPIVNS	VVYVPAIDKF	EVTLSEPIES	LTGEVLRING

	430	440	450	460	470	480
B. sph. JGA12
	ATINNGA---	---NKTYKVT	YKHPETGKPV	SGKVLNVSVK	ENIDVTVDKL	QNVTVNG---
B. sph. P-1	ASVNNGA---	---NKTYKVT	YKNPKTGKPE	ANKTFNVGFV	ENMNVTSDKV	ANATVNG---
B. sph. 2177	NTLANGV---	---KKTYYKVT	FKDPKTGAAL	TNKKLNVSFV	ENTNVAFNAI	SKATVTPNPSS
B. sph. 2362	KAYFGNVV-M	GAGNKTVILT	PYSSSALSVD	DHKLTVSGAK	DFAGFVSLNS	THEFKVVEDK
B. f. OF4	QPVASGFDAL	TGPTNKLTF	RPSSVATGTN	ATTYIAGFSD	AAGNFVTF--	-----S
	490	500	510	520	530	540
B. sph. JGA12
	---IAVVQTS	D--NNTRAAQI	TTDSKGEATF	TVSGSNAEVT	PVVFEATP--	-----
B. sph. P-1	---VKALQLS	NGTALDAAQI	TTDSKGEATF	TVSGTNAAVT	PVVYDLHS--	-----
B. sph. 2177	GLTVTPYQTT	T--GLQEEIQV	TTDSNGQATF	VVSGTNTAVT	PYVFDGSSS	VLGVSTVTGT
B. sph. 2362	EAPTVEATA	TLETVTLTFS	EDIDMDTVKA	SNVYWKSGDS	KKEASEFERI	ADN-----
B. f. OF4	TTTVPVQDT	TALAVASLEQ	VTNQKVRITF	NKELNSASKT	ALESGETGVVV	TRPNGSTTSN
	550	560				
B. sph. JGA12				
	---VQVTNTN	-----GAVTT				
B. sph. P-1	---TNNSTSN	KKYSASALQT				
B. sph. 2177	NNVTQATTAN	KKWEATELTA				
B. sph. 2362	-----	KYKFVFKGSE				
B. f. OF4	FTVAGNLTVD	NTGKTYDITL				

Abb. 4.9: Vergleichsanalyse der nächst verwandten Hüllproteine verschiedener *B. sphaericus*-Stämme und von *B. firmus* OF4. Zusätzlich ist zum Vergleich die Konsensussequenz von SLH-Domänen mit aufgeführt. Konservierte Aminosäurereste der Konsensussequenz sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4.10 Nachweis und spezifische Diskriminierung von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 mittels PCR-RFLP der Hüllproteingene

Die Kenntnis der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene ermöglicht es, mittels einer geeigneten Endonuclease, die innerhalb dieser amplifizierbaren Teile der Fragmente beider Stämme unterschiedliche Schnittstellen besitzt, das Haldenisolat und den Referenzstamm auf genetischer Ebene zu unterscheiden. Auf Grund der Spezifität für das Hüllproteingene ist es außerdem möglich, diese beiden *Bacillus*-Stämme von anderen Bakterien zu differenzieren. Die einzige dafür geeignete Endonuclease von insgesamt 85 bei GibcoBRL Lifetechnologies verfügbaren Endonucleasen ist *Mse*I. Dieses Enzym besitzt die Schnittstelle 5'-T[↓]TAA-3'. Verdaut man die hüllproteinspezifischen PCR-Produkte der Primerkombination V3R4 mit dieser Endonuclease (Kap. 3.15), ergeben sich für das *B. sphaericus* JG-A12 Amplifikat mit 579 bp Fragmente mit 18, 108, 113, 114 und 226 bp. Für das *B. sphaericus* NCTC 9602 Amplifikat mit 578 bp ergeben sich Fragmente mit 18, 58, 113, 164 und 225 bp. Der theoretische und der reale Verdau sind in Abbildung 4.10a dargestellt.

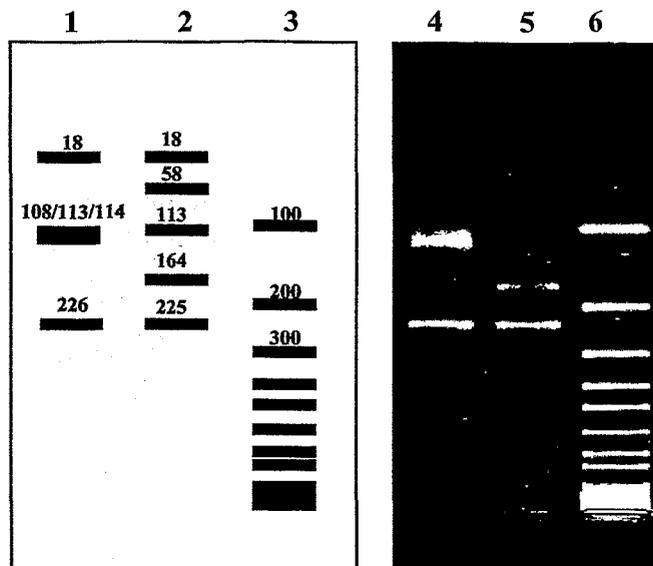


Abb. 4.10a: Theoretisches und reales Banden-Muster des Verdauers der *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 Amplifikate mit *Mse*I.

Spur 1: JG-A12 Amplifikat theoretisch verdaut mit *Mse*I.

Spur 2: 9602 Amplifikat theoretisch verdaut mit *Mse*I.

Spur 3: Molekulargewichtsstandard (KBL).

Spur 4: JG-A12 Amplifikat real verdaut mit *Mse*I.

Spur 5: 9602 Amplifikat real verdaut mit *Mse*I.

Spur 6: Molekulargewichtsstandard (KBL).

Die entstandenen Bandenmuster des Verdauers beider PCR-Produkte lassen sich im Agarosegel deutlich voneinander unterscheiden. Damit ist in beiden Fällen sowohl ein Nachweis als auch eine Diskriminierung des jeweiligen Stammes möglich. Der Verdau von Amplifikaten der gesamten Gene, was nach erfolgter Entschlüsselung der kompletten Sequenz beider Hüllproteingene möglich wird, wird ebenfalls stammspezifische Bandenmuster liefern.

4.11 Wechselwirkungen von Metallionen mit Hüllproteinen von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Werden Hüllproteine mit wässrigen Lösungen verschiedener Metallsalze inkubiert, so werden die Metallionen durch Gruppen des Proteins gebunden. Als bindungsrelevante funktionelle Gruppen von Hüllproteinen können grundsätzlich NH_2 -, NH -, OH -, CO -, COOH -, SH - und PO_4 -Gruppen in Frage kommen. Zur Identifizierung der beteiligten Gruppen des Proteins wurden Untersuchungen an Hüllproteinen mit gebundenem Uran, Palladium und Platin durchgeführt.

4.11.1 IR-Analysen von Uran-Hüllprotein-, Palladium-Hüllprotein- und Platin-Hüllprotein-Komplexen

Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie wurden das native Protein und die Protein-Metallkomplexe untersucht, um die funktionellen Gruppen des Proteins zu identifizieren, die für die Metallbindung verantwortlich sind.

4.11.1.1 IR-Analysen von Uran-Hüllprotein-Komplexen

Aufgrund der Instabilität der nativen Hüllproteinschichten bei niedrigen pH-Werten wurden die Experimente zu den Wechselwirkungen zwischen Uran und den Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 (Kap. 3.17.2) an stabilisierten Proteinschichten vorgenommen (Kap. 3.11). Die Untersuchungen wurden sowohl an Glutaraldehyd- als auch an EDC-vernetzten Hüllproteinschichten durchgeführt (Kap. 3.18.2).

Die Ergebnisse mit Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten sind in Abbildung 4.11.1.1a (Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12) und in Abbildung 4.11.1.1b (Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602) und die der EDC-vernetzten Hüllproteinschichten in Abbildung 4.11.1.1c (Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12) und in Abbildung 4.11.1.1d (Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602) dargestellt.

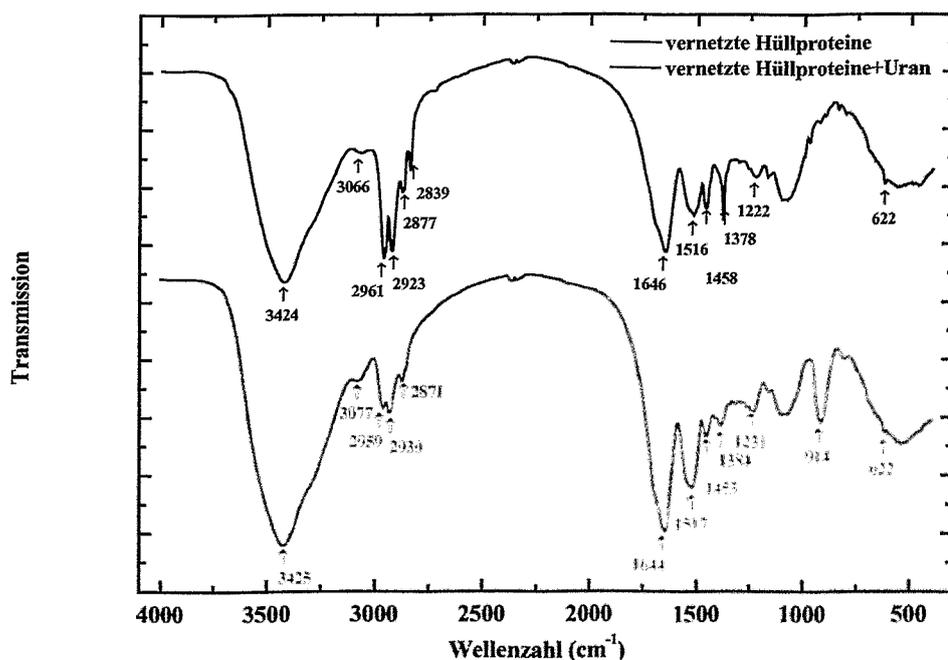


Abb. 4.11.1.1a: FT-IR-Spektrum der Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 20 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.

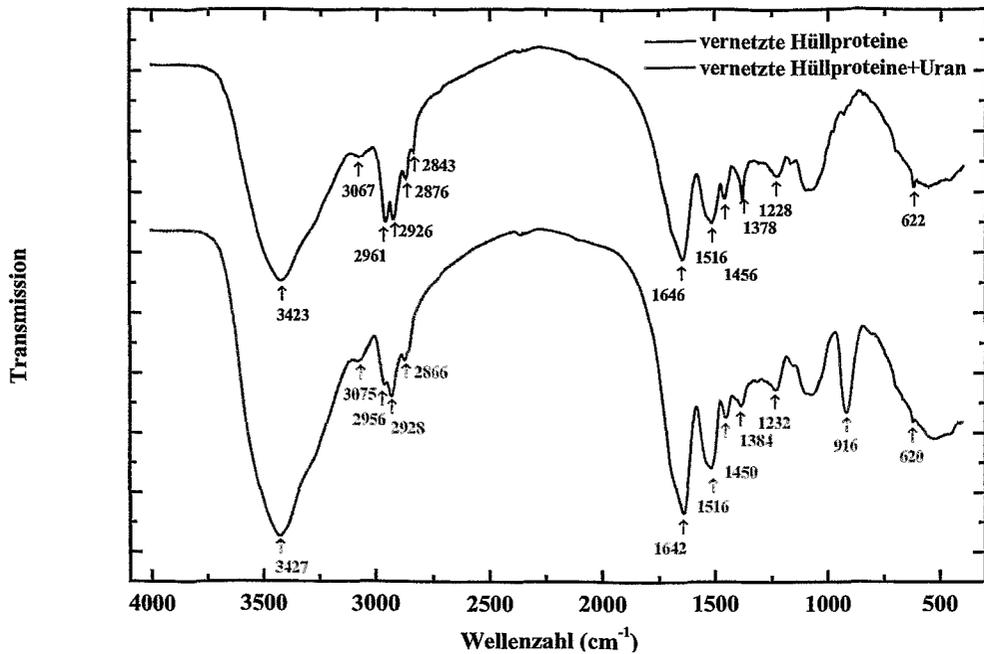


Abb. 4.11.1.1b: FT-IR-Spektrum der Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 10 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.

Beide Referenzen (Glutaraldehyd-stabilisierte Hüllproteinschichten der Stämme JG-A12 oder NCTC 9602) zeigen Absorptionsmaxima aliphatischer Streckschwingungen zwischen 2961 cm^{-1} und 2839 cm^{-1} sowie zwischen 2961 cm^{-1} und 2843 cm^{-1} und asymmetrischer C-H Streckschwingungen bei 1458 oder 1456 cm^{-1} und 1378 cm^{-1} . Außerdem können weitere Absorptionsmaxima symmetrischen Streckschwingungen von gebundenem O-H und freiem NH_2 (3424 oder 3423 cm^{-1}), asymmetrischen C=O Streckschwingungen (Amid I, 1646 cm^{-1}) und asymmetrischen N-H Streckschwingungen (Amid II, 1516 cm^{-1}) zugeordnet werden. Betrachtet man die Spektren der mit Uranylнитrat versetzten stabilisierten Hüllproteinschichten, so fallen zunächst die zusätzlichen Absorptionsmaxima bei 914 oder 916 cm^{-1} auf, die auf asymmetrische Streckschwingungen der Uranylionen zurückzuführen sind. Außerdem kommt es vor allem im Falle der aliphatischen C-H Streckschwingungen zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima.

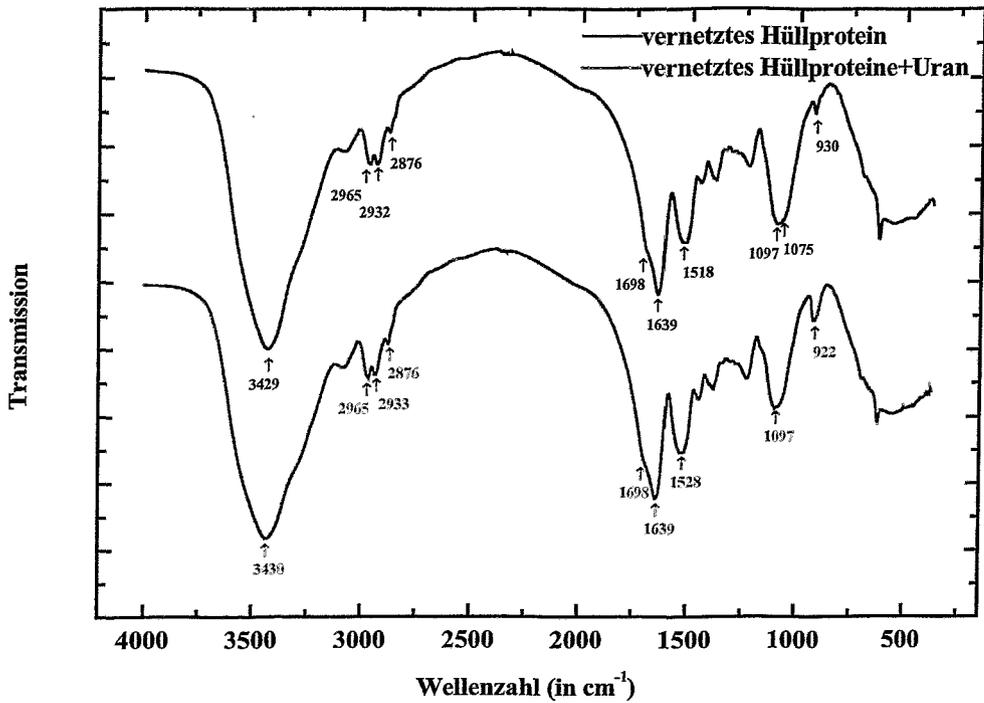


Abb. 4.11.1.1c: FT-IR-Spektrum der EDC-vernetzten Hüllproteinschichten von *B. sphaeicus* JG-A12 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 20 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.

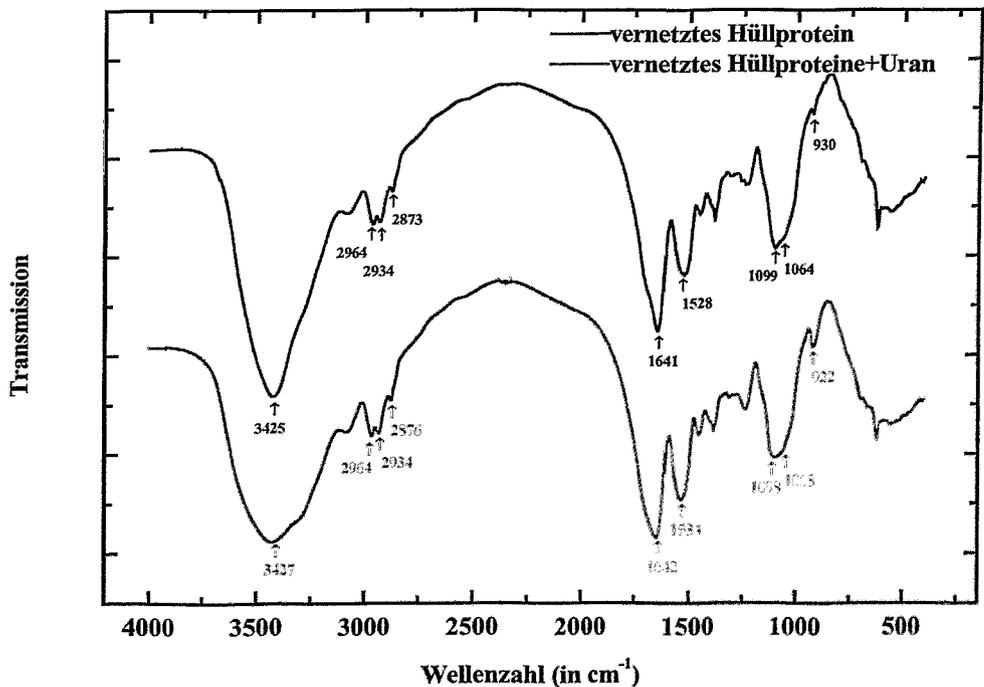


Abb. 4.11.1.1d: FT-IR-Spektrum der EDC-vernetzten Hüllproteinschichten von *B. sphaeicus* NCTC 9602 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 10 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.

Die Absorptionsmaxima beider Referenzspektren (EDC-stabilisierte Hüllproteinschichten der Stämme JG-A12 oder NCTC 9602) zeigen Absorptionsmaxima aliphatischer Streck-schwingungen zwischen 2965 und 2876 cm^{-1} sowie zwischen 2964 cm^{-1} und 2873 cm^{-1} , symmetrischer O-H und N-H Streckschwingungen (3429 oder 3425 cm^{-1}), asymmetrischer C=O Streckschwingungen (Amid I, 1639 oder 1641 cm^{-1}), asymmetrischer N-H Streck-schwingungen (Amid II, 1518 oder 1528 cm^{-1}) und asymmetrischer O-H oder asymmetrischer P-O Streckschwingungen (1097 und 1075 cm^{-1} oder 1099 und 1064 cm^{-1}). Für letzteren Fall ist die Zuordnung nicht eindeutig möglich. Betrachtet man die Spektren der mit Uranyl-nitrat versetzten stabilisierten Hüllproteinschichten, so fallen zunächst die zusätzlichen Absorp-tionsmaxima bei 922 cm^{-1} auf, die auf asymmetrische Streckschwingungen der Uranylionen zurückzuführen sind. Außerdem kommt es vor allem im Falle der asymmetrischen N-H Streckschwingungen (Amid II, 1528 oder 1534 cm^{-1}) und der asymmetrischen O-H oder asymmetrischen P-O Streckschwingungen (Wegfall des Absorptionsmaximum bei 1075 cm^{-1} oder 1098 und 1068 cm^{-1}) zu einer Änderung der Absorptionsmaxima.

4.11.1.2 IR-Analysen von Palladium-Hüllprotein- und Platin-Hüllprotein-Komplexen

Inkubiert man native bakterielle Hüllproteine mit einer K_2PdCl_4 - oder K_2PtCl_4 -Lösung, so kommt es zu einer Reduktion der Metallsalze und einer Bindung des metallischen Platins oder Palladiums in Form von Nanoclustern auf den Hüllproteinschichten (Kap. 3.15.1). Diese werden vorzugsweise in den Poren gebildet und besitzen einen mittleren Durchmesser von $1,9\text{ nm}$ (Kirsch 1998). Zur Identifizierung der für diese Bindung verantwortlichen funktionellen Gruppen im Protein wurden infrarotspektroskopische Untersuchungen durch-geführt (Kap. 3.16.2). Die FT-IR-Spektren der nativen und metallisierten Hüllprotein-schichten von *B. sphaericus* JG-A12 sind in Abbildung 4.11.1.2a und die der nativen und metallisierten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602 in Abbildung 4.11.1.2b dargestellt.

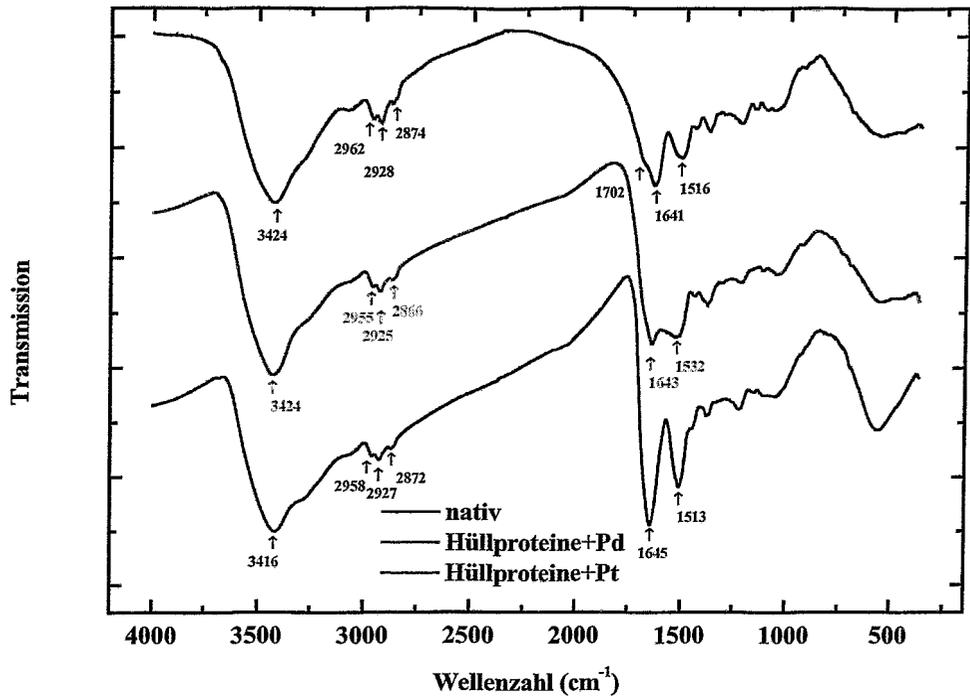


Abb. 4.11.1.2a: FT-IR-Spektren (in y-Richtung gestaffelt) der nativen und mit Palladium oder Platin metallisierten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 (Referenz: 60 mg Protein, Probe je 30 mg Protein + 10 mg Palladium oder Platin).

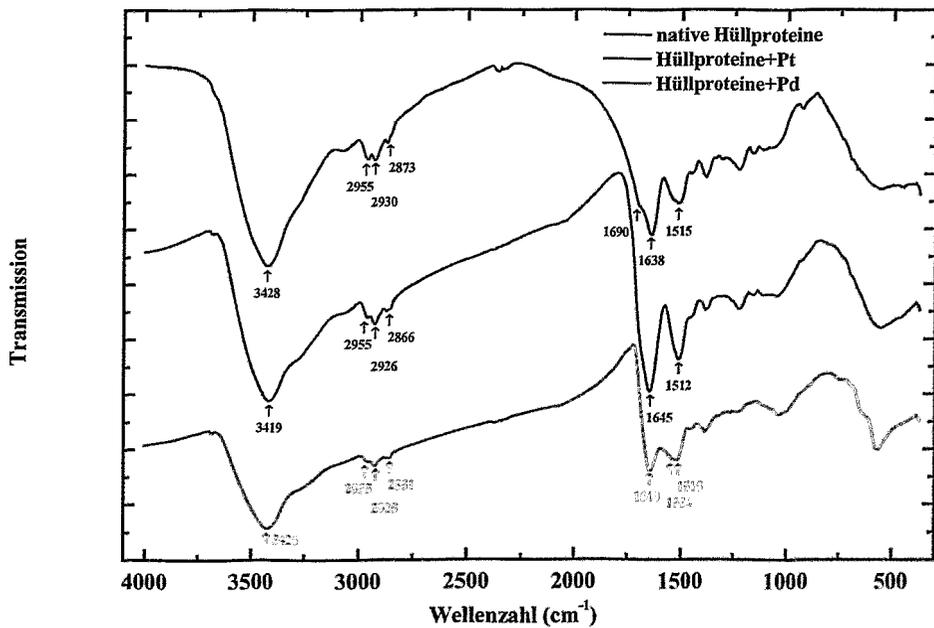


Abb. 4.11.1.2b: FT-IR-Spektren (in y-Richtung gestaffelt) der nativen und mit Palladium oder Platin metallisierten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* NCTC 9602 (Referenz: 60 mg Protein, Probe je 30 mg Protein + 10 mg Palladium oder Platin)

Die FT-IR-Spektren der nativen Hüllproteinschichten beider *Bacillus*-Stämme zeigen Absorptionsmaxima aliphatischer Streckschwingungen zwischen 2962 cm^{-1} und 2874 cm^{-1} sowie zwischen 2955 cm^{-1} und 2873 cm^{-1} , symmetrischer O-H und N-H Streckschwingungen (3424 oder 3428 cm^{-1}), asymmetrischer C=O Streckschwingungen (Amid I, 1641 oder 1638 cm^{-1}) und asymmetrischer N-H Streckschwingungen (Amid II, 1516 oder 1515 cm^{-1}). Zusätzlich zeigt sich eine Schulter, die auf asymmetrische Streckschwingungen von oberflächlichen COOH-Gruppen (1702 oder 1690 cm^{-1}) zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu zeigen alle metallisierten Proben eine deutliche Verschiebung der Absorptionsmaxima, die den symmetrischen O-H und N-H Streckschwingungen, den symmetrischen C-H Streckschwingungen, den asymmetrischen C=O Streckschwingungen und den asymmetrischen N-H Streckschwingungen zugeordnet werden können. Außerdem fehlt in diesen Proben die Absorptionsschulter der asymmetrischen Streckschwingungen der COOH-Gruppen.

4.11.2 Röntgenabsorptionsspektroskopische Analyse (EXAFS) von Uran-Hüllprotein-Komplexen

Eine weitere Methode zur Charakterisierung der chemischen Umgebung gebundener Metalle ist die Röntgenabsorptionsspektroskopie (Kap. 3.16.3). Unter Verwendung dieser Methode können aus den im Experiment beobachteten Intensitätsmodulationen (EXAFS, XANES) sowohl die Zahl der nächsten und übernächsten Nachbarn der gebundenen Metallatome als auch deren mittlere Bindungslänge berechnet werden. Auf diese Weise lassen sich die an den Bindungen beteiligten funktionellen Gruppen ableiten.

Die EXAFS-Spektren der Uran-Hüllproteinkomplexe der zwei *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 sind in Abbildung 4.11.2 (Uranylнитrat + Hüllprotein von JG-A12 und Uranylнитrat + Hüllprotein von NCTC 9602) dargestellt. Die entsprechenden Strukturparameter dieser Komplexe sind in Tabelle 4.11.2 wiedergegeben.

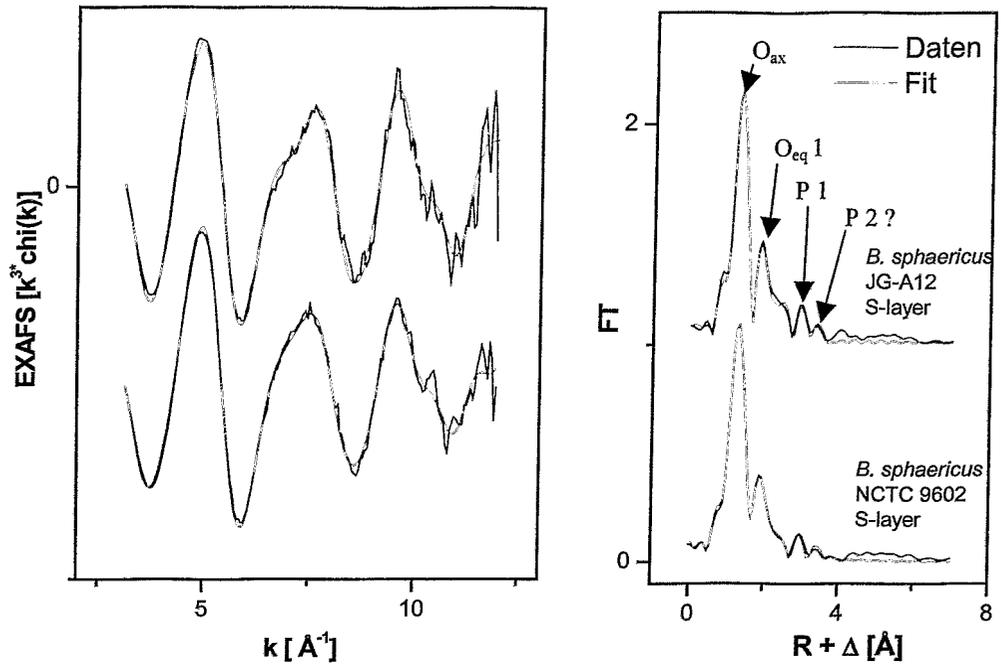


Abb. 4.11.2: EXAFS-Spektren der Uran-Hüllproteinkomplexe der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und von *B. sphaericus* NCTC 9602 an der U L_{III}-Kante bei 17185 eV (links k^3 -gewichtetes EXAFS-Spektrum, rechts fouriertransformiertes Spektrum).

Tab. 4.11.2: Bindungslängen und Koordinationszahlen aus den Wechselwirkungen von Uran mit Hüllproteinen

Proben	Schale	R [Å] ^a	N ^b	σ^2 [Å ²] ^c	ΔE [eV]	K [Å ⁻¹]	Fehler
Uran + Hüllproteine JG-A12	U-O _{ax}	1,78	2 ^d	0,0031	2,90		0,12
	U-O _{eq1}	2,33	1,2 (1)	0,005 ^d			
	U-O _{eq2}	2,47	2,5 (1)	0,005 ^e			
	U-C	2,91	1,2 (2)	0,004 ^d			
	U-P ₁	3,64	0,8 (2)	0,004 ^d			
	U-P ₂	3,87	1,0 (2)	0,004 ^e			
Uran + Hüllproteine NCTC 9602	U-O _{ax}	1,77	2 ^d	0,0038	-1,03		0,45
	U-O _{eq1}	2,24	1,9 (1)	0,005 ^d			
	U-O _{eq2}	2,42	2,8 (1)	0,005 ^e			
	U-C	2,91	1,4 (1)	0,004 ^d			
	U-P ₁	3,64	1,0 (1)	0,004 ^d			
	U-P ₂	3,85	1,0 (1)	0,004 ^e			

^a Fehler im Abstand $\pm 0,02$ Å, ^b Fehler in der Koordinationszahl ± 25 %, Standardabweichungen für N in Klammern, ^c Debye-Waller-Faktor, ^d Wert festgelegt ^e Wert variabel.

In allen Proben ist Uran koordiniert mit zwei axialen Sauerstoffatomen (O_{ax}) mit einer Bindungslänge von 1,77- 1,78 Å. Die zweite Schale ist auf äquatoriale Sauerstoffatome (O_{eq}) zurückzuführen. Die dritte Schale kann mit der erhaltenen Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden, zumal es mit EXAFS-spektroskopischen Untersuchungen nicht möglich ist, zwischen Sauerstoff und Stickstoff als Bindungspartner zu differenzieren. Auf Grund von ICP-MS Analysen (siehe Kap. 4.12) kann die vierte Schale eindeutig Phosphor mit einem hierfür typischen atomaren Bindungsabstand von 3,64 Å zugeordnet werden. Die fünfte Schale kann ebenfalls nicht eindeutig zugeordnet werden, es könnte sich jedoch um eine weiteres Phosphoratom handeln.

4.12 Phosphorgehalte ganzer Zellen, Sporen, Zellwände und isolierter Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602

Zur Einschätzung der Art und Anzahl der möglichen Bindungsplätze für Metallionen ist die Kenntnis der in der Zellwand vorhandenen funktionellen Gruppen von Bedeutung. Da neben den funktionellen Gruppen der Hüllproteine (-NH₂, >NH, >CO, -OH) vor allem die Phosphatgruppen eine wichtige Rolle spielen, wurde der Phosphatgehalt intakter Zellen, Sporen (soweit verfügbar), Zellwände und der Hüllproteinschichten in drei parallelen Proben untersucht (Kap. 3.17). Die Mittelwerte der Phosphorgehalte beider Bakterienstämme und der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 4.12a aufgeführt.

Tab. 4.12: Phosphorgehalte intakter Zellen, Sporen (soweit verfügbar), Zellwände und der Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602.

Komponente	Phosphorgehalte in $\mu\text{mol (mg TG)}^{-1}$	
	<i>B. sphaericus</i> JG-A12	<i>B. sphaericus</i> NCTC 9602
intakte Zellen	$3,04 \pm 0,10$	$6,99 \pm 0,09$
Sporen	$0,092 \pm 0,00064$	-
Zellwände	$0,46 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,01$
	Phosphorgehalte in nmol (mg TG)^{-1} *	
Hüllproteinschicht nativ	$12,59 \pm 0,13$	$6,88 \pm 0,14$
Hüllproteinschicht rekristallisiert	$4,81 \pm 0,048$	$0,78 \pm 0,033$

* 1 mg TG der Hüllproteine entsprechen bei $M_r = 135$ kDa 7,4 nmol Protein

4.13 Konstruktion biologisierter Sol-Gel-Keramiken durch die Immobilisierung intakter Zellen, Sporen oder Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 und *B. sphaericus* NCTC 9602 in einer SiO_2 -Matrix

Für eine anwendungsorientierte Nutzung der metallbindenden Eigenschaften der verschiedenen Biokomponenten ist es notwendig, diese in einer porösen Matrix zu immobilisieren. Erst dadurch wird es möglich, auf einfache Weise große Volumina schwermetallkontaminierter Wasser zu filtern und eine Sorption der Schwermetalle an den Biokomponenten zu erreichen, ohne dass gleichzeitig eine Auswaschung der Zellen, Sporen oder Hüllproteinschichten erfolgt. Des weiteren ist eine stabile Immobilisierung der Biokomponenten unerlässlich für eine Regeneration der Filtermatrix. Für optimale Voraussetzungen hinsichtlich der Bindung der Metalle an die Biokomponenten ist neben der Zugänglichkeit, die durch Zahl und Größe der Poren bestimmt wird, auch die gleichmäßige Verteilung der eingebrachten Komponenten von entscheidender Bedeutung. Auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften von Zellen, Sporen und Hüllproteinen im Hinblick auf oberflächliche funktionelle Gruppen wurden diese drei Komponenten eingebettet und miteinander verglichen.

4.13.1 Verteilung der immobilisierten Bakterien, Sporen oder Hüllproteinschichten in der SiO₂-Matrix

Zur Beurteilung der Beschaffenheit der Verbundkomponenten aus Zellen, Sporen oder Hüllproteinen, eingebettet in die SiO₂-Matrix, wurden diese rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Nachfolgend sind in Abb. 4.13.1 Biocere mit Zellen, Sporen und Hüllproteinschichten dargestellt.

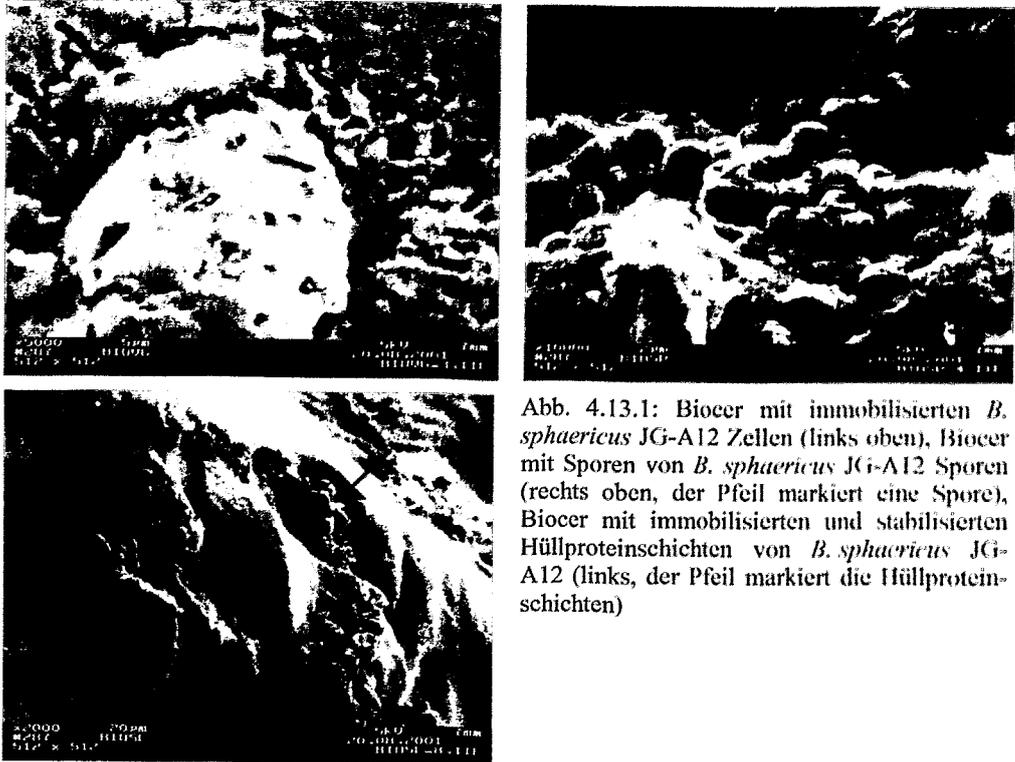


Abb. 4.13.1: Biocer mit immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen (links oben), Biocer mit Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 Sporen (rechts oben, der Pfeil markiert eine Spore), Biocer mit immobilisierten und stabilisierten Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 (links, der Pfeil markiert die Hüllproteinschichten)

4.13.2 Struktur unterschiedlich hergestellter Biocere

In Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren unterscheiden sich die Biocere deutlich hinsichtlich der Zahl und der Größe der Kanäle und Poren. Zur Beurteilung dieses Aspekts wurden die verschiedenen Komponenten und Bioceren im REM begutachtet. In den Abbildungen 4.13.2 a-e sind nacheinander die freien Bakterien, das Xerogel, das Biocer, das Biocer mit Sorbit und das gefriergetrocknete Biocer der mit Uranylnitrat oder Kupferchlorid inkubierten Proben dargestellt.

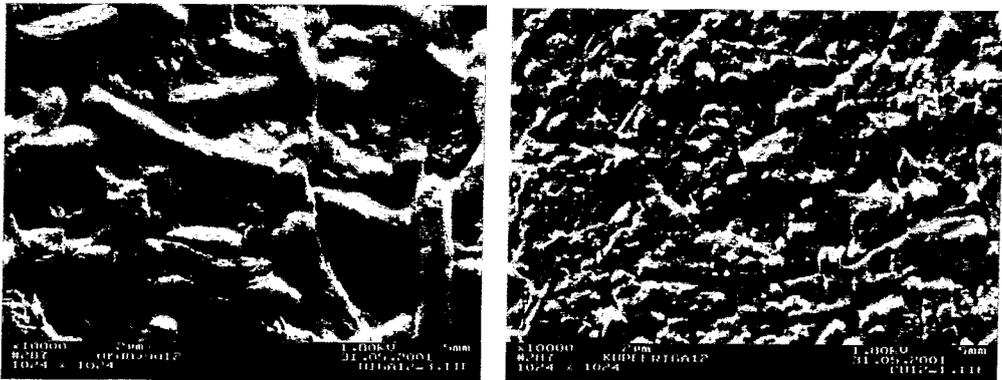


Abb. 4.13.2a: Freie *B. sphaericus* JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 (rechts).

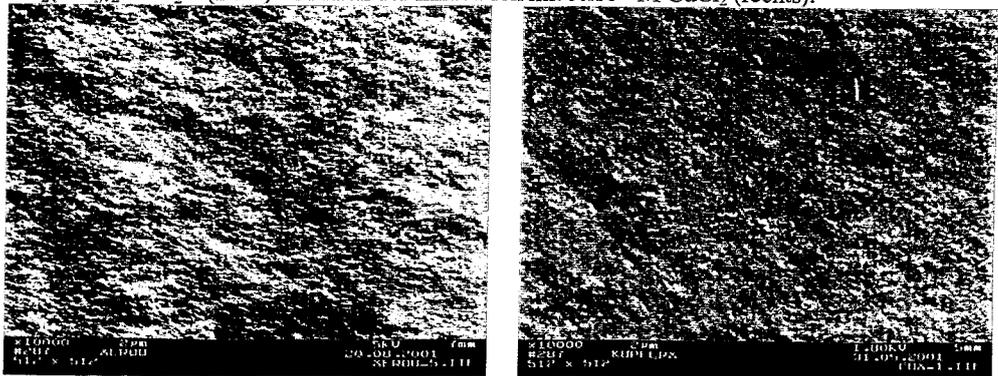


Abb. 4.13.2b: Xerogel nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 (rechts).

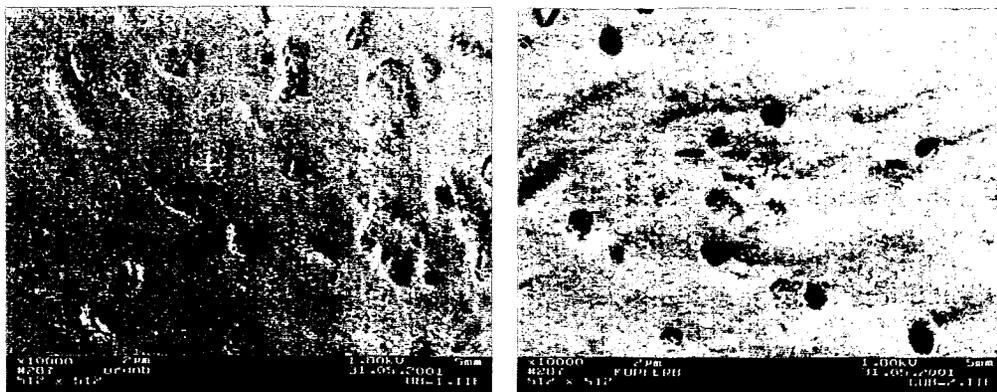


Abb. 4.13.2c: Biocer mit immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 (rechts).

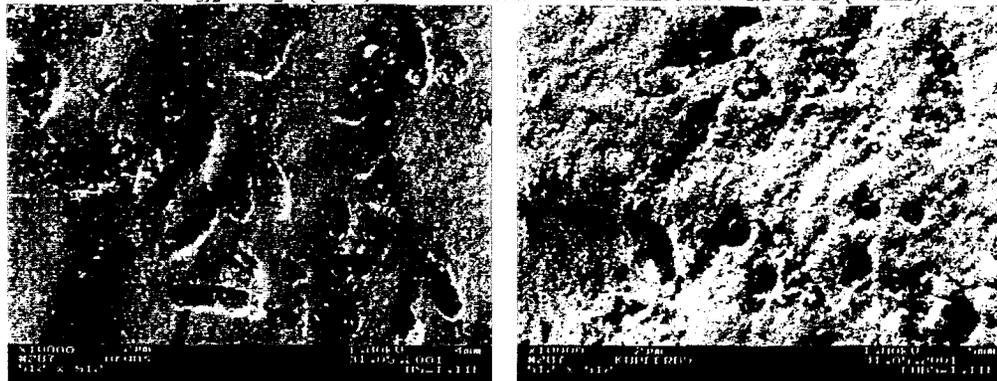


Abb. 4.13.2d: Biocer mit immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen, hergestellt unter Verwendung des Penetrationsmittels Sorbit nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 (rechts).

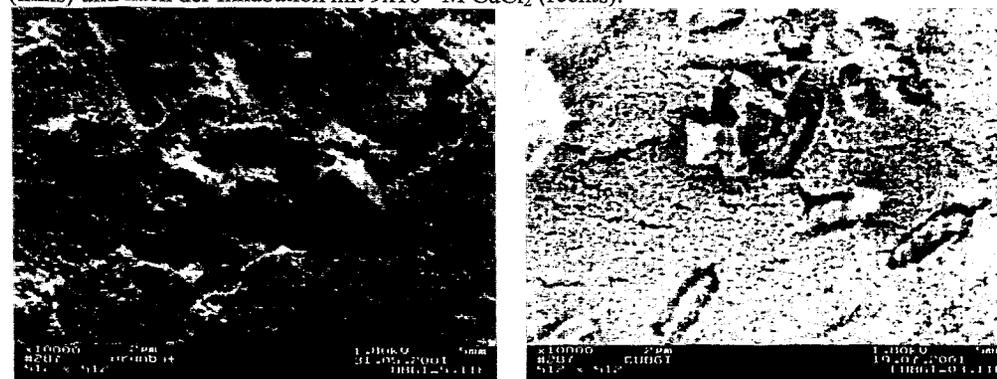


Abb. 4.13.2e: gefriergetrocknetes Biocer mit immobilisierten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 (rechts).

Es zeigte sich, dass in der Reihenfolge Xerogel, Biocer, Biocer mit Sorbit und gefriergetrocknetes Biocer die Zahl der Poren und anderer Feinstrukturen, wie Kanäle oder Hohlräume, deutlich zunimmt. Dies bewirkt eine ansteigende Zugänglichkeit der inneren Regionen der SiO_2 -Partikel, womit gleichzeitig günstigere Bedingungen für eine Metallbindung einher gehen.

4.13.3 Metallbindung der Xerogele, der nativen Biokomponenten und der Biocere

4.13.3.1 Lokalisation der gebundenen Metallionen mittels EDX-Analysen

Aufgrund der chemischen Unterschiede hinsichtlich der verfügbaren funktionellen Gruppen der SiO_2 -Matrix und der einzelnen Biokomponenten war zu erwarten, dass Uran und Kupfer sich hinsichtlich der Bindung an beide Komponenten unterschiedlich verhalten. Zur Untersuchung der bevorzugten Bindungsorte von Uran und Kupfer wurden im REM EDX-Analysen durchgeführt (Kap. 3.14.1). In den Abbildungen 4.13.3.1a und 4.13.3.1b sind jeweils EDX-Analysen der intakten Bakterien und der SiO_2 -Matrix nach der Inkubation mit Metallsalzlösungen des Urans und des Kupfers dargestellt.

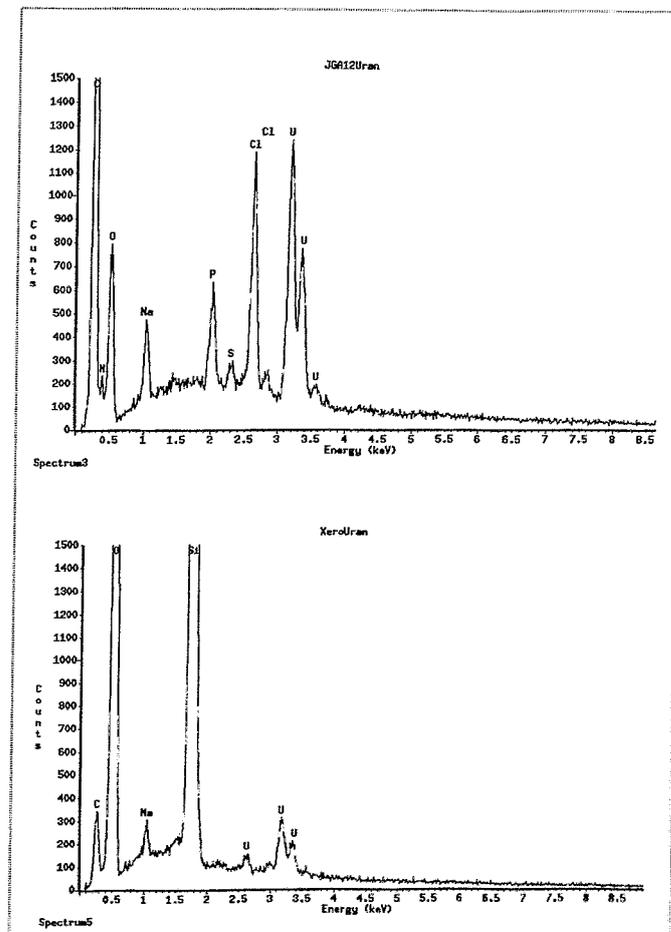


Abb. 4.13.3.1a: EDX-Analyse der intakten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen (oben) und des Xerogels (unten) nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

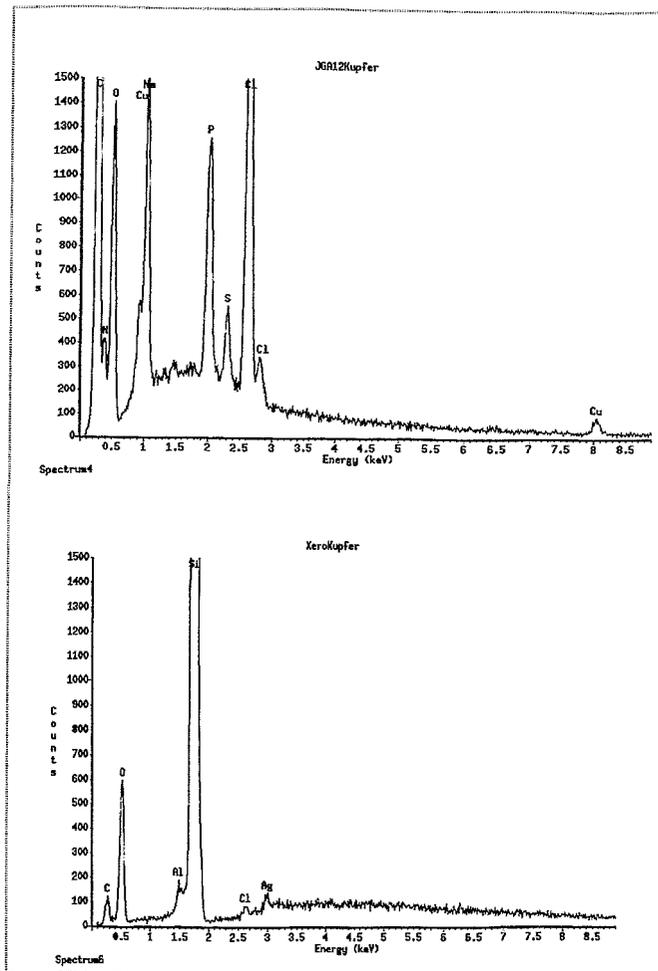


Abb. 4.13.3.1b: EDX-Analyse der intakten *B. sphaericus* JG-A12 Zellen (oben) und des Xerogels (unten) nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 .

Die EDX-Analysen zeigen, dass sowohl die intakten Zellen als auch die reine SiO_2 -Matrix Uran binden. Quantitativ binden die intakten Zellen jedoch mehr Uran im Vergleich zu dem Xerogel. Betrachtet man demgegenüber die Kupferbindung, so binden lediglich intakte Zellen nachweisbare Mengen. Im Xerogel konnte kein Kupfer nachgewiesen werden.

4.13.3.2 Metallbindung der Xerogele, der nativen Biokomponenten und der Biocere

Die Beurteilung der metallbindenden Eigenschaften (Kinetik und Kapazität) erfolgte durch Inkubation der verschiedenen Biokomponenten, des Xerogels und der verschiedenen Biocere mit Uranylнитrat- oder Kupferchloridlösungen für 48 h (Kap. 3.18.4). Über die Zeit wurden Proben aus der überstehenden Lösung entnommen und mittels ICP-MS der Metallgehalt bestimmt.

Die Ergebnisse der Biocere mit intakten Zellen sind in den Abbildungen 4.13.3.2a und b dargestellt. Bei Xerogelen und Bioceren wurden jeweils 200 mg und im Falle der freien Zellen 36,4 mg Trockensubstanz eingesetzt. Die Biocere setzen sich aus 163,6 mg SiO₂ und 36,4 mg Bakterien zusammen. Da bei der Inkubation der mit Sorbit hergestellten Biocere (140,6 mg SiO₂, 28,1 mg Sorbit, 31,3 mg Zellen) das Sorbit herausgelöst wurde, mussten die Werte des gebundenen Metalls auf ein Trockengewicht von 200 mg normiert werden.

Zeit (in h)	Gebundenes Uran (in mg)						Kontrolle (verfügbares Uran in mg)
	Xerogel	JG-A12	Biocer 9602	Biocer JG-A12	Biocer JG-A12 + Sorbit	Biocer gefrierge- trocknet	
0,5	2,590	1,575	1,400	1,575	1,507	4,193	7,560
1	2,105	1,380	1,898	1,484	1,525	3,771	7,004
2	2,482	1,258	2,210	2,278	2,492	3,747	6,970
4	2,613	1,173	2,647	2,714	3,002	3,779	6,868
7	2,772	1,650	3,168	3,168	3,916	4,042	7,128
24	2,828	2,015	3,543	3,640	4,046	4,060	7,118
48	2,720	2,336	3,488	3,712	4,244	4,026	7,008

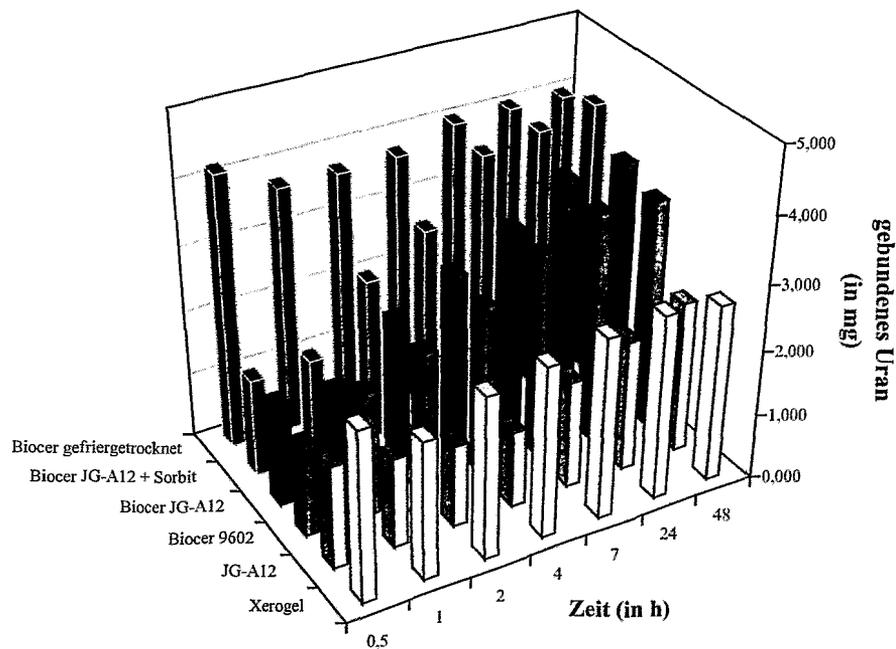


Abb. 4.13.3.2a: Uran-Metallbindungskinetik des Xerogels, der freien Zellen und der verschiedenen Biocere bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $UO_2(NO_3)_2 \times 6H_2O$.

Die Bestimmung des gebundenen Urans über die Abnahme der Metallkonzentration der überstehenden Flüssigkeit zeigt, dass das Xerogel, die freien intakten Zellen und die einzelnen Biocere Uran binden. Die höchste Uranbindung erfolgt durch die Biocere als Verbundwerkstoff aus SiO_2 -Matrix und intakten Zellen, insbesondere durch das Biocer mit Sorbit. Demgegenüber findet die Bindung bei gefriergetrockneten Bioceren am schnellsten statt. Betrachtet man die Bindungskapazitäten der einzelnen Komponenten mit den entsprechenden Anteilen des Xerogels (163,6 mg SiO_2) und der Bakterien (36,4 mg) am Biocer, so müsste die Verbundkomponente eine theoretische Bindungskapazität von $2,225 \text{ mg} + 2,336 \text{ mg} = 4,561 \text{ mg}$ besitzen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Menge an gebundenem Uran am Biocer mit Sorbit, das 93,5 % des theoretisch möglichen Wertes erreicht. Die Werte für das gefriergetrocknete Biocer, das Biocer JG-A12 und das Biocer 9602 liegen mit 88 %, 81 % und 77 % des theoretischen Wertes etwas darunter. Es zeigt sich, dass die Zellen bei guter Zugänglichkeit annähernd gleiche Mengen Uran binden, unabhängig davon, ob diese frei oder immobilisiert vorliegen. Das Xerogel selbst liefert zusätzlich einen Beitrag zur maximalen Kapazität. Legt man die sorbierte Uranmenge nach 48 h zu Grunde, so besitzt das reine Xerogel eine Kapazität von $14 \mu\text{g U}$ pro mg TG und die freien Zellen von $64 \mu\text{g U}$ pro mg TG.

Im Vergleich zu der Bindung des Urans wird Kupfer fast ausschließlich an die Biokomponente gebunden (Abb. 4.13.3.2b). Das Xerogel ist in der Lage, nur sehr geringe Mengen Kupfer zu sorbieren, während die freien Zellen und die verschiedenen Biocere innerhalb der Schwankungen gleiche Mengen binden. Auch hier zeigt sich, dass die Bindung bei gefriergetrockneten Bioceren wesentlich schneller abgeschlossen ist. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass gleiche Mengen Kupfer durch das gefriergetrocknete Biocer schneller sorbiert werden, als es für die freien Zellen der Fall ist. Aufgeschlüsselt könnte das Xerogel einen Beitrag von $0,018 \text{ mg}$ und die Zellen von $0,224 \text{ mg}$ gebundenem Kupfer leisten, was in Summe einen Wert von $0,242 \text{ mg}$ ergeben würde. Darauf bezogen kann an dem Biocer mit Sorbit zusätzlich 22 %, am gefriergetrockneten Biocer 95 %, am Biocer JG-A12 zusätzlich 8 % und am Biocer 9602 94 % des theoretischen Wertes nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Kupferbindung nach 48 h zeigt das Xerogel eine Kapazität von $0,1 \mu\text{g Cu}$ pro mg TG und die freien Zellen von $6,2 \mu\text{g Cu}$ pro mg TG.

Zeit (in h)	Gebundenes Kupfer (in mg)						Kontrolle (verfügbares Kupfer in mg)
	Xerogel	JG-A12	Biocer 9602	Biocer JG-A12	Biocer JG-A12 + Sorbit	Biocer gefriergetrocknet	
0,5	0,052	0,164	0,122	0,147	0,183	0,252	2,023
1	0,007	0,197	0,090	0,083	0,180	0,207	1,984
2	0,051	0,242	0,123	0,184	0,226	0,259	1,986
4	0,027	0,248	0,158	0,201	0,242	0,248	1,977
7	0,000	0,231	0,171	0,188	0,230	0,231	1,940
24	0,023	0,247	0,205	0,234	0,280	0,267	1,944
48	0,022	0,224	0,227	0,262	0,294	0,230	1,907

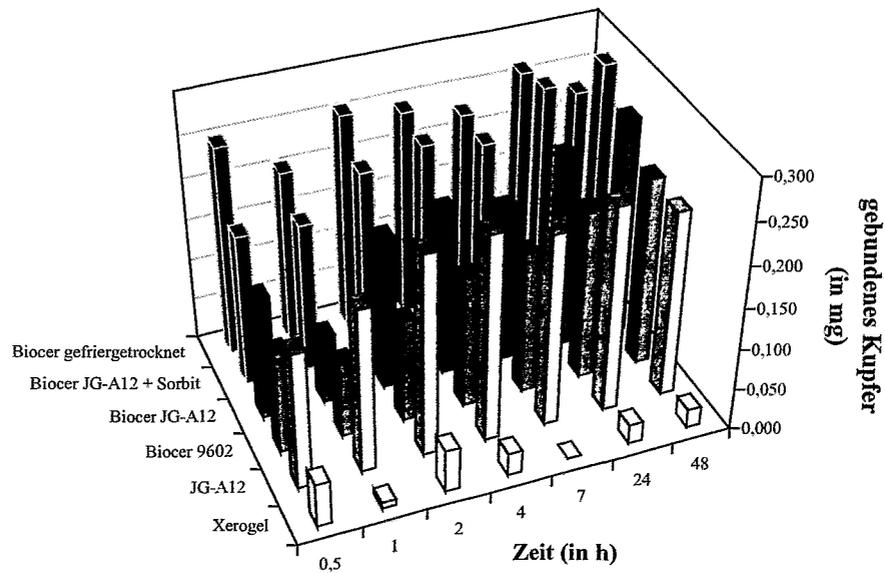


Abb. 4.13.3.2b: Kupfer-Metallbindungskinetik des Xerogels, der freien Zellen und verschiedener Biocere bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 .

Werden anstelle der intakten Zellen Sporen in das Biocer eingebunden, so setzt sich 200 mg Trockengewicht des Biocers aus 182,76 mg SiO₂ und 17,23 mg Sporen zusammen. Entsprechend der Menge der Sporen im Biocer wurden für die Versuche mit freier Biokomponente ebenfalls 17,23 mg Trockengewicht der Sporen eingesetzt. Letzteres entspricht einer Zahl von $2,82 \times 10^{10}$ Sporen. Die Zahl der intakten Zellen im Biocer betrug im Vergleich $2,56 \times 10^{10}$ Zellen pro 200 mg Trockengewicht Biocer. Hierbei muss beachtet werden, dass weder das Trockengewicht noch die Partikelzahl eine ideale Basis für einen direkten Vergleich der Bindungskinetiken und -kapazitäten liefern kann. Der Bezug auf das selbe Trockengewicht bedeutet für die Sporen eine deutlich höhere Partikelzahl und damit eine größere, für die Bindung zur Verfügung stehende Oberfläche. Erfolgt der Bezug auf die Partikelzahl, so besitzen die Sporen auf Grund ihrer geringeren Größe (Sporen: Ø 1,4-1,6 µm, Zellen: 0,4-1,0 x 5-8 µm, jeweils eigene Messungen) eine deutlich geringere Oberfläche. Die Bindungskinetik und die -kapazität der freien Sporen und des Biocers sind in Abbildungen 4.12.3.2c und d dargestellt.

Zeit (in h)	Gebundenes Uran (in mg)		Kontrolle (verfügbares Uran in mg)
	freie Sporen von JG-A12	Biocer mit Sporen von JG-A12	
0,5	1,260	0,420	7,350
1	1,155	0,595	7,350
2	1,435	1,085	7,420
4	1,365	1,470	7,350
8	1,435	1,925	7,420
12	1,260	1,890	7,210
24	1,540	2,625	7,490
48	1,890	2,555	7,560

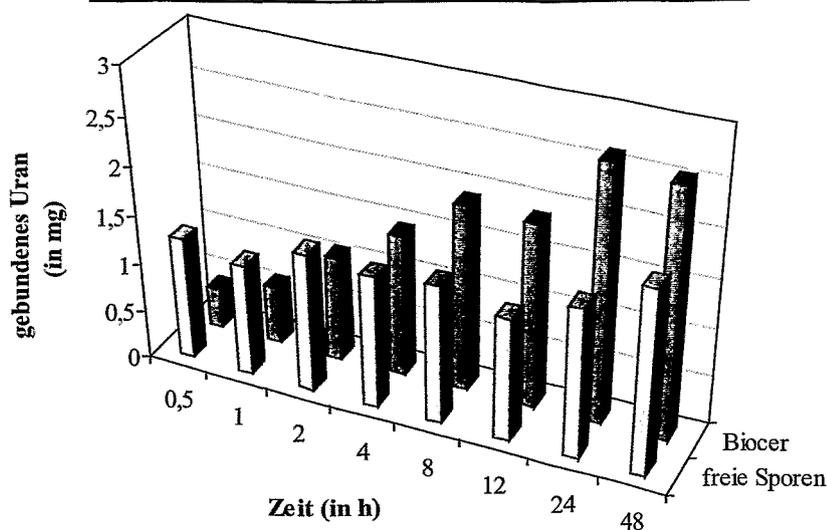


Abb. 4.13.3.2c: Uran-Metallbindungskinetik der freien Sporen von JG-A12 und des Biocers mit Sporen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO₂(NO₃)₂ x 6 H₂O.

Die Quantifizierung des sorbierten Urans zeigt auch hier eine höhere Kapazität für das Biocer. Die freien Sporen zeigen allerdings eine schnellere Bindungskinetik. Berechnet man die theoretische Bindungskapazität für 200 mg Trockengewicht Biocer, so könnte das Xerogel (182,76 mg SiO₂) 2,486 mg und die Sporen (17,23 mg TG) 1,890 mg binden. Damit beträgt die theoretische maximale Bindungskapazität 4,376 mg. Das Biocer mit Sporen bindet auf dieser Grundlage nur 58 % (= 2,555 mg) des theoretischen Wertes. Die Bindungskapazitäten der freien Sporen bezogen auf deren Trockengewicht beträgt 110 µg U pro mg TG.

Im Vergleich dazu zeigt sich für Kupfer teilweise ein ähnliches Bild wie bereits bei den Bio-ceren mit intakten Zellen. Dort konnte gezeigt werden, dass das Xerogel nur geringe Mengen Kupfer bindet. Demzufolge kann die Kupferbindung hauptsächlich auf Wechselwirkungen der Sporen mit den Metallionen zurückgeführt werden. Allerdings binden die immobilisierten Sporen weniger Kupfer als freie (Abb. 4.13.3.2d). Unter Berücksichtigung der einzelnen Bestandteile müsste die SiO₂-Matrix 0,020 mg und die immobilisierten Sporen 0,137 mg binden, insgesamt also 0,157 mg. Legt man die Bindung nach 48 h zu Grunde wurden real lediglich 47 % davon gebunden. Somit zeigt sich eine deutlich niedrigere Bindungskapazität als zu erwarten war. Dies entspricht jedoch den bei Uran gemachten Beobachtungen. Errechnet man aus den gebundenen Kupfermengen von 0,5-48 h einen Mittelwert der Bindungskapazität, so ergibt sich für die freien Sporen $6,76 \pm 2,2$ µg gebundenes Kupfer pro mg Trockengewicht.

Zeit (in h)	Gebundenes Kupfer (in mg)		Kontrolle (verfügbares Kupfer in mg)
	freie Sporen von JG-A12	Biocer mit Sporen von JG-A12	
0,5	0,112	0,105	1,978
1	0,095	0,004	1,995
2	0,112	0,074	2,044
4	0,060	0,077	2,030
8	0,095	0,067	2,027
12	0,186	0,088	2,041
24	0,109	0,049	2,016
48	0,137	0,074	2,013

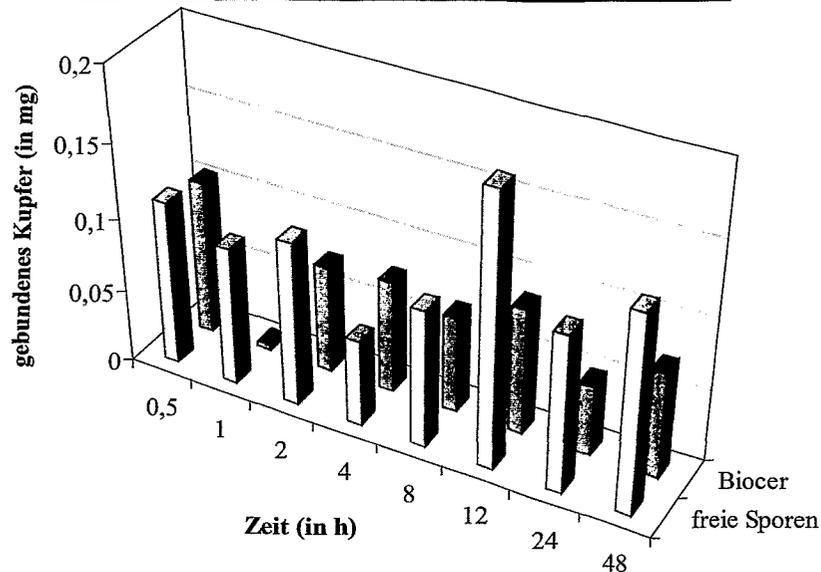


Abb. 4.13.3.2d: Kupfer-Metallbindungskinetik der freien Sporen von JG-A12 und des Biocers mit Sporen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 .

Abschließend wurde die Bindung von Uran und Kupfer an freie und immobilisierte Hüllproteine untersucht. Angesichts der Instabilität der nativen Hüllproteine gegenüber pH-Werten < 5 (Kap. 4.4), wurden für die Experimente und die Herstellung der Biocere EDC-vernetzte Hüllproteine verwendet. 200 mg Trockengewicht dieser Biocere setzten sich aus 163,6 mg SiO_2 und 36,4 mg TG EDC-vernetztem Hüllprotein zusammen. Dem entsprechend wurde als freie Biokomponente ebenfalls 36,4 mg TG EDC-vernetztes Hüllprotein eingesetzt. Die Vergleichbarkeit dieser Biocer mit immobilisierten intakten Zellen oder Sporen ist nur bedingt möglich, da der Bezug auf das Trockengewicht nur eine scheinbare Normierung darstellt. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 4.13.3.2e dargestellt.

Zeit (in h)	Gebundenes Uran (in mg)		Kontrolle (verfügbares Uran in mg)
	Hüllproteine von JG-A12	Biocer mit Hüllproteinen von JG-A12	
1	0,805	1,505	7,7
2	0,455	1,54	7,385
4	0,595	1,82	7,49
8	0,735	2,03	7,56
12	0,665	2,1	7,385
24	0,98	2,59	7,42
48	0,7	2,835	7,28

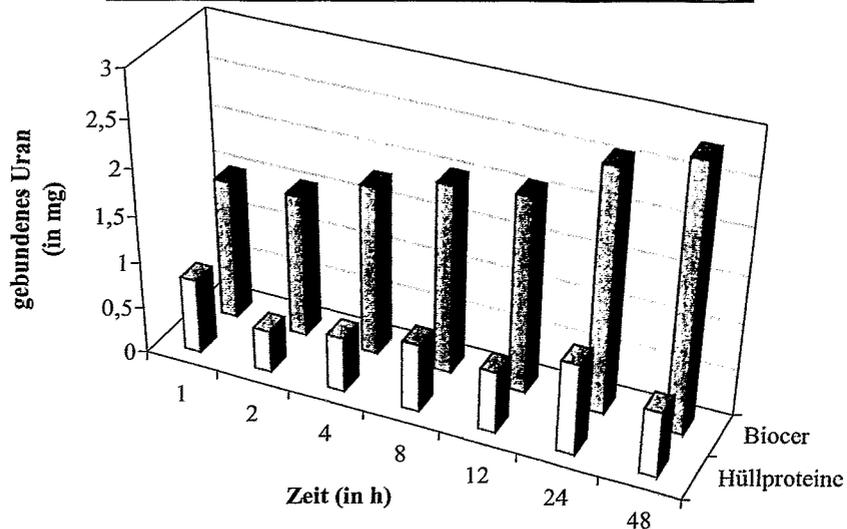


Abb. 4.13.3.2e: Uran-Metallbindungskinetik der Hüllproteine von JG-A12 und des Biocers mit Hüllproteinen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$.

Immobilisierte Hüllproteine zeigen eine ähnliche Metallbindungskapazität wie immobilisierte Sporen. Während bei Bioceren mit Sporen die Biokomponente hauptsächlich zur Bindungskapazität beiträgt, ist es bei Bioceren mit Hüllproteinen das Xerogel selbst.

Die theoretische Bindungskapazität kann aus der Kapazität des Xerogels (2,225 mg Uran) und der der Hüllproteine (0,705 mg Uran, Mittelwert) mit einem Wert von 2,930 mg Uran bestimmt werden. Das Biocers bindet mit 2,835 mg 97 % dieses theoretischen Wertes. Somit bindet, wie im Falle der intakten Zellen, die freie Biokomponente vergleichbare Mengen zu der eingebetteten Biokomponente. Berechnet man die Bindungskapazität der EDC-vernetzten Hüllproteine mit Hilfe des Mittelwertes der Bindungskapazitäten von 1-48 h, so ergibt sich ein Wert von $19,4 \pm 4,2 \mu\text{g}$ Uran gebunden pro mg TG.

Bei der Betrachtung der Bindung des Kupfers an freie und eingebettete Hüllproteine fallen zunächst die Werte nach 8 und 12 h auf (Abb. 4.13.3.2f). Insbesondere bei 8 h wird die Unterbestimmung auch in der Kontrolle bestätigt. Erfolgt die weitere Auswertung ohne diesen Wert, so zeigt sich tendenziell ein Bild wie bei der Bindung des Kupfers durch intakte Zellen oder Sporen.

Zeit (in h)	Gebundenes Kupfer (in mg)		Kontrolle (verfügbares Kupfer in mg)
	Hüllproteine von JG-A12	Biocer mit Hüllproteinen von JG-A12	
1	-0,007	-0,0175	2,002
2	0,035	0,035	2,0405
4	0,049	0,049	2,0405
8	-0,042	-0,112	1,883
12	0,0175	0,112	2,044
24	0,056	0,07	2,051
48	0,0735	0,07	2,058

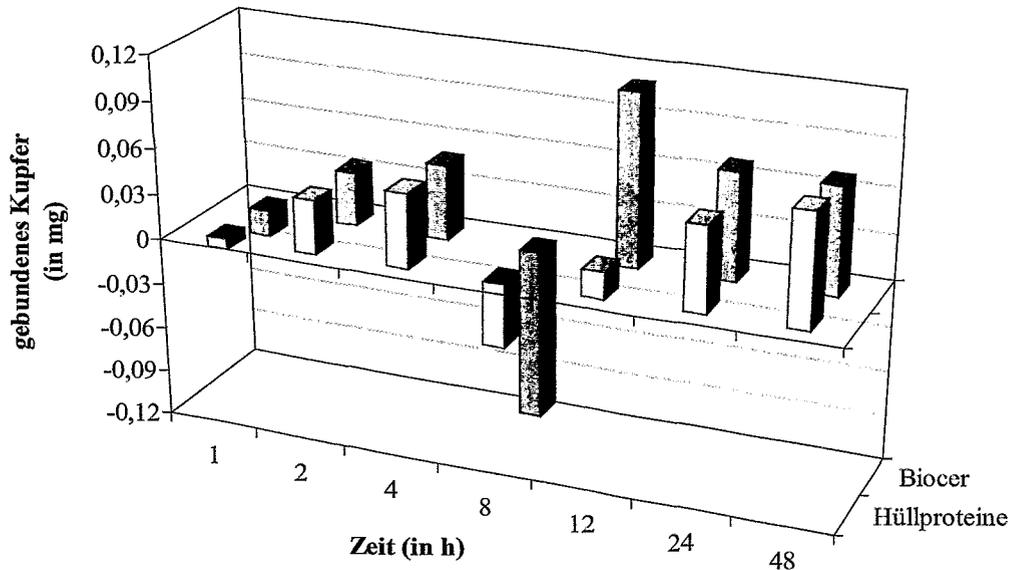


Abb. 4.13.3.2f: Kupfer-Metallbindungskinetik der freien Hüllproteine von JG-A12 und des Biocers mit Hüllproteinen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl_2 .

Hier, wie auch im vorliegenden Versuch bindet vorwiegend die Biokomponente das Kupfer, wobei durch die freien Hüllproteine und das Biocer vergleichbare Mengen sorbiert werden. Die Einzelkomponenten tragen mit 0,021 mg Cu (Bindungskapazität von 163,6 mg SiO_2) und mit 0,074 mg Cu (Bindungskapazität von 36,4 mg TG EDC-vernetzten Hüllproteinen) zu einer theoretisch möglichen Sorbtion von 0,095 mg Cu bei. Legt man diesen Wert zu Grunde, so bindet das Biocer nach 48 h 74 % der maximal möglichen Menge. Die Bindungskapazität der Hüllproteine beträgt für Kupfer 2,02 μg pro mg Trockengewicht.

4.13.3.3 Desorption der gebundenen Metalle von Xerogelen, den nativen Biokomponenten und den Bioceren

Neben der Bindung der Metalle an das Xerogel, die freien Biokomponenten und die Biocere wurden im Hinblick auf eine Anwendung als metallbindendes Filtermaterial auch erste Versuche zur Desorption der gebundenen Metalle durchgeführt (Kap. 3.18.4).

Es wurden dazu die in Kap. 4.12.3.2 beladenen Komponenten im Falle des Urans erneut viermalig mit 35 ml einer 9×10^{-4} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung in 0,9% NaClO_4 , pH 4,5 inkubiert. Die mit Kupfer versetzten Proben wurden in je 35 ml einer 9×10^{-4} M CuCl_2 - und einer $1,8 \times 10^{-3}$ M CuCl_2 -Lösung jeweils in 0,9% NaClO_4 , pH 4,5 für 24 h geschüttelt. Die so vorbereiteten Ansätze wurden danach für die Desorptionsexperimente verwendet. In den Abbildungen sind die einzelnen Schritte wie folgt bezeichnet: zweimaliges Schwenken der Ansätze mit 5 ml 0,9 %iger NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 (Spülen), Inkubation mit 35 ml 0,9 %iger NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 für 24 h (Waschen), zweimalige Inkubation der Ansätze mit 35 ml 0,5 M Tri-Natriumcitrat Dihydrat-HCl-Puffer, pH 4,5 für je 24 h (Desorption 1 und 2). Die Ergebnisse der Desorption sind in den Abbildungen 4.12.3.3a und b dargestellt.

Schritte	abgelöstes Uran in mg				
	Xerogel (5,573)	JG-A12 (2,336)	Biocer JG-A12 (8,857)	Biocer JG-A12 + Sorbit (7,964)	Biocer gefriergetrocknet (10,158)
Spülen	0,342	0,542	0,294	0,279	1,273
Waschen	0,602	0,389	0,795	0,798	0,931
Desorption 1	5,600	2,265	8,820	8,260	9,100
Desorption 2	0,102	0,065	0,182	0,208	0,364
Summe abgelöst	6,646	3,260	10,091	9,545	11,668

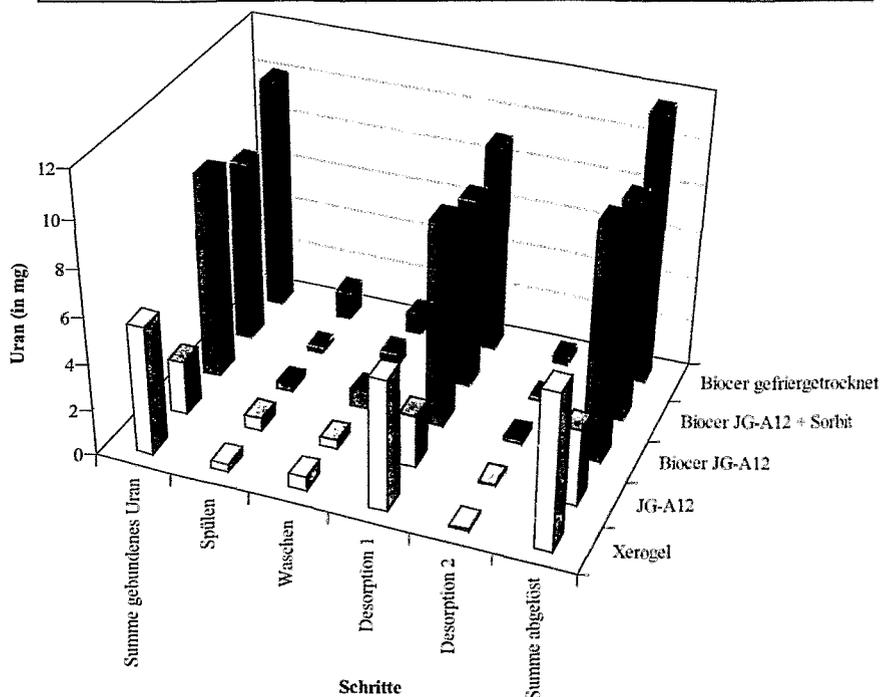


Abb. 4.13.3.3a: Uran-Desorption vom Xerogel, intakten JG-A12-Zellen und Bioceren mit intakten JG-A12 Zellen. Ausgangswerte an gebundenem Uran in Klammern.

Zunächst zeigt sich, dass mit der Ausnahme der freien Zellen die Kapazität aller Komponenten mit der ersten Inkubation (Kap. 4.13.3.2) noch nicht erreicht war und zusätzliches Uran gebunden wurde. Während der einzelnen Waschschriffe lösten sich maximal 29 % im Falle der freien Zellen wieder ab. Die Werte des Xerogels und der Biocere liegen mit maximal 19 % abgelöstem Uran in den Waschschriffen deutlich darunter. Da letzteres für das gefriergetrocknete Biocer zutriff und alle anderen Werte nochmals niedriger liegen, spielt die Feinstruktur offensichtlich nicht nur für die Bindungskinetik, sondern auch für die Desorption eine wichtige Rolle. Die Inkubation der Ansätze mit einem starken Komplexbildner wie Citrat führte demgegenüber bei allen Ansätzen zum Ablösen von mindestens 69 % des gebundenen Urans im ersten Desorptionsschritt. Die Tatsache, dass gemäß den Messwerten mehr Uran abgelöst wurde als gebunden war, lässt sich nicht erklären. In beiden Fällen wurde das gelöste Uran bestimmt, so dass Quencheffekte oder ein unvollständiger Aufschluss keine Rolle spielen können. Während der Versuche zeigte sich jedoch, dass dieser Effekt regelmäßig zu beobachten war. In Abbildung 4.13.3.3b ist die Desorption von Kupfer dargestellt. Nach der erneuten Inkubation der Ansätze mit einer CuCl_2 -Lösung doppelter Konzentration bindet auch das Xerogel signifikante Mengen an Kupfer. Da jedoch selbst bei erneutem CuCl_2 -Angebot die Werte des gebundenen Kupfers bei allen Bioceren und den freien Zellen im Vergleich zur ersten Bindung (Kap. 4.13.3.2) wieder abnehmen und bei jedem Waschschriff vergleichbare Mengen des Kupfers wieder abgelöst wurden, ist die Bindung des Kupfers offensichtlich weniger stabil als bei Uran. Dies trifft insbesondere für die freien Zellen und das gefriergetrocknete Biocer zu. Neben den starken Schwankungen der Messwerte fällt auch beim Kupfernachweis auf, dass gemäß der Messung mehr abgelöst wurde, als anfänglich gebunden war.

Schritte	Kupfer (in mg)				
	Xerogel (0,109)	JG-A12 (0,179)	Biocer JG-A12 (0,224)	Biocer JG-A12 +Sorbit (0,095)	Biocer gefriergetrocknet (0,189)
Spülen	0,056	0,132	0,096	0,094	0,158
Waschen	0	0,079	0,090	0,092	0,076
Desorption 1	0	0,131	0,108	0,130	0,118
Desorption 2	0	0,000	0,019	0,022	0,008
Summe abgelöst	0,056	0,342	0,312	0,338	0,359

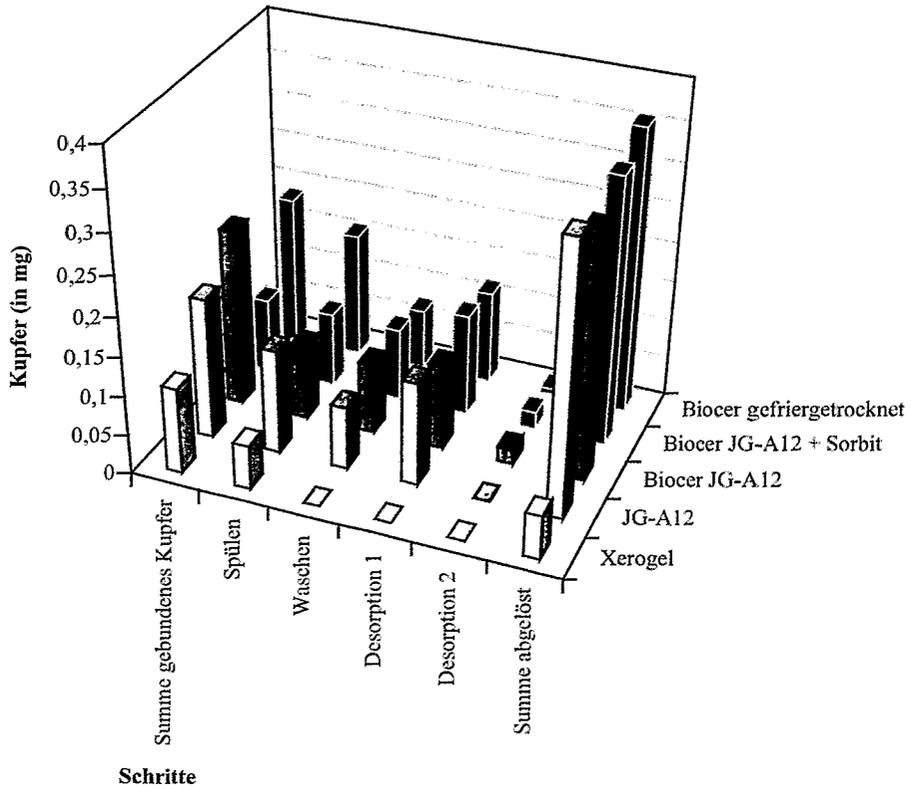


Abb. 4.13.3.3b: Kupfer-Desorption vom Xerogel, freien, intakten JG-A12-Zellen und Bioceren mit intakten JG-A12 Zellen. Ausgangswerte an gebundenem Kupfer in Klammern.

5 Diskussion

5.1 Die Hüllproteine der *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602

Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.1.2) angesprochen, besitzen die Hüllproteinschichten als hochgeordnete parakristalline Proteinschichten mit regelmäßig angeordneten funktionellen Gruppen und morphologisch identischen Poren interessante Eigenschaften. Diese finden insbesondere als Template in der Nanostrukturtechnik, als Ultrafiltrationsmembran, als Immobilisierungsmatrix für Enzyme, Antikörper oder Antigene, zur Funktionalisierung verschiedenster Oberflächen oder zur Abscheidung und Bindung von Metallen eine Anwendung. Da bei vielen dieser Einsatzgebiete die Anwendung erweitert werden kann, wenn Hüllproteinschichten mit unterschiedlichen Gittersymmetrien, verschiedener Größe der Poren oder zusätzlichen funktionellen Gruppen auf den Oberflächen zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung von schnellen Methoden zum Hüllprotein-Screening von entscheidender Bedeutung. Dabei ist es besonders günstig, wenn neben einer Prüfung der Existenz von Hüllproteinen gleichzeitig die Gitterstruktur bestimmt werden kann. Neben arbeits- und zeitaufwendigen Methoden wie der Gefrierbruchtechnik (Sleytr 1970, Sleytr und Messner 1983) oder der direkten Isolierung der Hüllproteine von Bakterien, erfolgte die Beurteilung häufig über die Existenz prädominanter Banden im Proteinprofil der Rohextrakte der zu untersuchenden Bakterien. Bei der zuerst genannten Methode ist die aufwendige Präparation von Nachteil. Die zweite Methode ist ebenfalls zeitaufwendig und erfordert die Kultivierung der Bakterien und damit bereits umfassende Kenntnisse bezüglich der Organismen sowie einen hohen apparativen Aufwand. Das letztgenannte Verfahren liefert zum einen keine Information zur Gitterstruktur, sondern nur das apparente Molekulargewicht der Hüllproteine. Zum anderen ist die Existenz prädominanter Banden kein hinreichender Beweis, wie in Kap. 4.1.2 am Beispiel der Existenz anderer dominanter Banden im Gel elektrophoretisch getrennter Proteine der Rohextrakte von *Bacillus cereus* und *B. thuringiensis*-Stämmen zu sehen ist. Insbesondere im Hinblick auf Gram-positive Gattungen wurde eine neue Methode zum Hüllprotein-Screening entwickelt (Kap. 4.2). Der Vorteil sind die geringen Mengen an Bakterien, die für die Analyse notwendig sind, sowie die schnelle und einfache Durchführbarkeit. Nachteilig sind die Notwendigkeit eines TEM oder AFM, die Beschränkung der Analyse auf Gram-positive Bakterien und der Umstand, dass nur ein positiver Befund als eindeutig gewertet werden kann.

Werden keine Gitterstrukturen von Hüllproteinen gefunden, so ist der Umkehrschluss, dass die untersuchten Bakterien keine Hüllproteinschichten besitzen, nicht möglich. Dennoch konnten bei nachfolgend genannten Stämmen die jeweiligen positiven oder negativen Befunde mit dieser Methode bestätigt werden. Es wurde für das Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 und die Referenzstämme *B. sphaericus* NCTC 9602, *B. sphaericus* CCM 2177, *B. sphaericus* WHO 2362 sowie *Sporosarcina ureae* DSM 320 die Existenz von Hüllproteinen nachgewiesen. Zusätzlich wurde für *B. cereus* JG-A30 und *B. thuringiensis* JG-B10 das Fehlen von Hüllproteinschichten bestätigt.

In phylogenetischen und genomischen Untersuchungen verschiedener *B. sphaericus*-Stämme wurde als nächstverwandter Stamm des Haldenisolats *B. sphaericus* JG-A12 der Stamm *B. sphaericus* NCTC 9602 identifiziert (Selenska-Pobell et al. 1999). *B. sphaericus* NCTC 9602 gehört zur serologischen Gruppe I (Miteva et al. 1999). Die anderen *B. sphaericus*-Stämme, bei denen die Existenz von Hüllproteinschichten bereits nachgewiesen wurde, gehören dagegen zu anderen serologischen Gruppen: *B. sphaericus* WHO 2362 zur Gruppe IIA, *B. sphaericus* CCM 2177 und *B. sphaericus* P-1 zur Gruppe III. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt in allen weiteren Analysen auf die *B. sphaericus*-Stämme JG-A12 und NCTC 9602 gelegt.

Die Isolierung der Hüllproteinschichten beider Stämme erfolgte als native Schichten und nicht als gelöstes und wieder rekristallisiertes Protein, um jede Art der Modifikation so gering wie möglich zu halten. In Kap. 4.3.1 konnte gezeigt werden, dass nach einer Änderung der Isolierungsmethode für das Haldenisolat *B. sphaericus* JG-A12 die Hüllproteine beider Stämme bis zur Homogenität und mit Ausbeuten von bis zu 100 % gereinigt werden konnten. Die Analyse beider Hüllproteine ergab strukturell einige Übereinstimmungen. Neben einem identischen Molekulargewicht von (135 ± 5) kDa besitzen beide Hüllproteingitter eine tetragonale Struktur (Abb. 5.1a) mit Gitterkonstanten von 12,5 und 12,9 nm für das Proteingitter von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602. Die tetragonale Symmetrie der Gitter und das Molekulargewicht des Hüllproteins von *B. sphaericus* NCTC 9602 stimmen mit den Literaturangaben innerhalb der Fehlergrenzen überein (Hastie und Brinton 1979b).

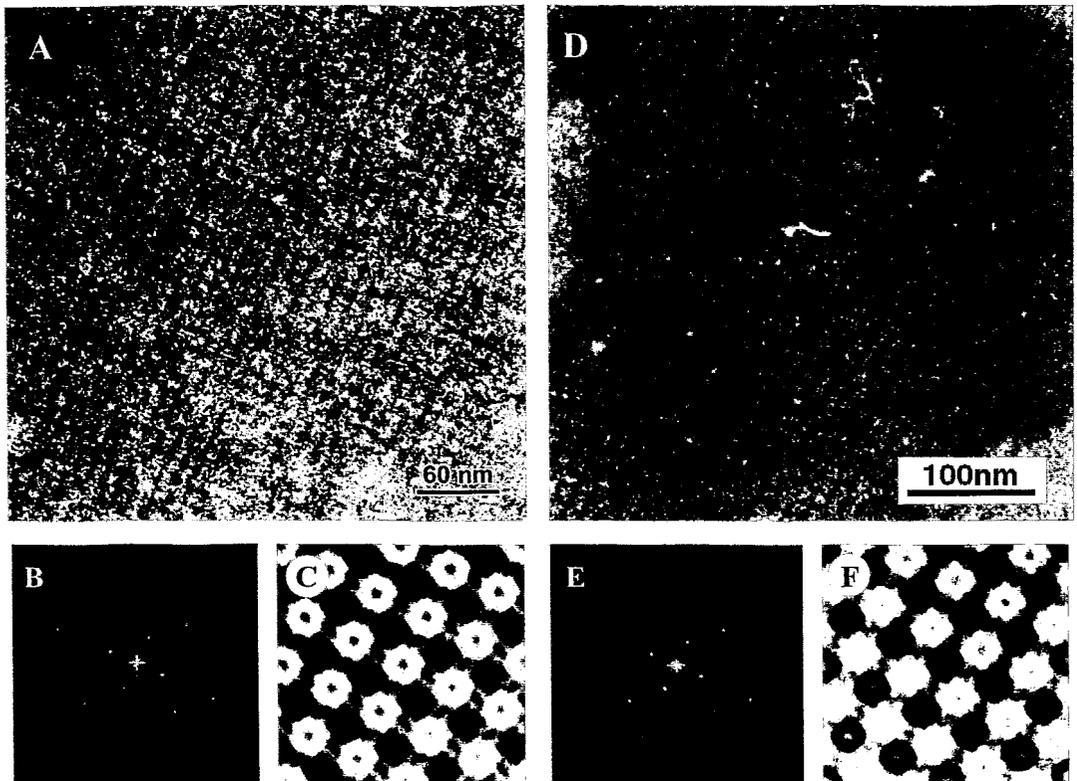


Abb. 5.1a: TEM-Aufnahmen Uranylacetat-kontrastierter, nativer Hüllproteinschichten von *B. sphaericus* JG-A12 (links, A,B,C) und von *B. sphaericus* NCTC 9602 (rechts, D,E,F). Jeweils darunter sind die Powerspektren (B,E) und die daraus errechneten Rekonstruktionen (C,F) der Gitterstrukturen dargestellt.

Ein weiteres Charakteristikum vieler Hüllproteine ist die Glykosylierung der Proteinuntereinheiten (Messner et al. 1997, Moens und Vanderleyden 1997, Schäffer und Messner 2001). Diesbezüglich konnte für keines der untersuchten Hüllproteine eine Glykosylierung nachgewiesen werden (Kap. 4.3.3), was im Falle von *B. sphaericus* NCTC 9602 (Hastie und Brinton 1979a) und von *B. sphaericus* WHO 2362 (Lewis et al. 1987) den in der Literatur vorhandenen Angaben widerspricht. Da unter Verwendung der in Kap. 3.8.5 beschriebenen Methode eine Glykosylierung für *B. sphaericus* NCTC 9602 bereits erfolgreich nachgewiesen werden konnte (Hastie und Brinton 1979a), stellt sich die Frage, ob der Befund auf ein Artefakt der hier verwendeten Isolierungsmethode zurückzuführen ist, oder ob die in der Stammsammlung des Forschungszentrums Rossendorf vorhandenen Stämme nicht glykosylierte Hüllproteine besitzen. Ersteres erscheint wesentlich wahrscheinlicher, da in der vorliegenden Arbeit die Hüllproteine in anderer Weise isoliert wurden.

So erfolgte die Reinigung der Hüllproteine unter Verwendung der in Kap. 3.4.3 beschriebenen Methode (mechanischer Zellaufschluss, Inkubation mit Triton X-100 und Lysozym), während die Hüllproteine in oben genannten Arbeiten nach mechanischem Zellaufschluss (Ultraschall) mittels 6 M Harnstoff direkt von Zellwandbruchstücken gelöst, gegen TRIS-HCl-Puffer dialysiert und durch eine Ammoniumsulfatfällung erneut gereinigt wurden. Eine genaue Klärung wäre durch Vergleich der Ergebnisse nach Verwendung verschiedener Isolierungsmethoden möglich.

Im Zuge der IR- und EXAFS-Untersuchungen, auf die in Kap. 5.2 näher eingegangen wird, zeigte sich mehrfach das Vorhandensein von Phosphat in Hüllproteinen von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602, weniger deutlich in den IR-Spektren in Abb. 4.11.1.1c,d., Absorptionsmaximum bei 1097 und 1075 cm^{-1} oder 1099 und 1064 cm^{-1} , dafür eindeutig in den EXAFS-Spektren in Abb. 4.11.2 und Tab. 4.11.2. Die Bestimmung des Phosphorgehalts in nativen und durch Dialyse sowie Rekristallisation gereinigter Hüllproteine ergab Werte von 1,7 Atome Phosphor pro Hüllproteinmonomer nativ und 0,7 Atome Phosphor pro Hüllproteinmonomer rekristallisiert für das Haldenisolat JG-A12. Der Phosphorgehalt des Hüllproteins des Referenzstamms NCTC 9602 weist mit 0,9 Phosphor pro Hüllproteinmonomer nativ und 0,1 Phosphor pro Hüllproteinmonomer rekristallisiert deutlich niedrigere Werte auf. Es existieren demnach zwei verschieden fest an die Hüllproteine gebundene Phosphorspezies. Die Phosphorylierung oder die Anwesenheit von Phosphor konnte nur bei Hüllproteinen von *Aeromonas hydrophila* (Thomas und Trust 1995) und *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 (Mozes und Lortal 1995) nachgewiesen werden. Im ersten Fall enthält das Protein Phosphotyrosin als post-translationale Modifikation an mindestens zwei von sieben Tyrosinresten, wobei die restlichen fünf Tyrosine diesbezüglich nicht untersucht wurden. Im zweiten Fall ist der Ursprung des Phosphors unklar, scheint aber weder auf eine Phosphorylierung des Proteins noch auf Kontaminationen mit Resten der Zellwand (Teichonsäuren) zurückzuführen zu sein. Vielmehr wird die Bindung von Lipoteichonsäuren vermutet. In der vorliegenden Arbeit kann auf Grund des auffallend niedrigen Phosphor : Proteinmonomer Verhältnisses und bereits 15 identifizierten Tyrosinresten in 495 von ungefähr 1200 Aminosäuren für den Stamm JG-A12 die Phosphorylierung aller Tyrosinreste ausgeschlossen werden. Die Phosphorylierung einzelner Aminosäurereste scheint hingegen wahrscheinlich, da diese Annahme durch den Befund einer fest gebundenen Phosphatspezies gestützt wird. Eine Phosphorylierung von Aminosäuren kann an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten erfolgen (Thomas und Trust 1995).

Bei der zweiten Phosphorspezies, die sich durch Solubilisierung der Hüllproteine mittels Guanidinium-HCl, Zentrifugation, Dialyse des Überstandes und Rekristallisation abtrennen lässt, handelt es sich wahrscheinlich um phosphorhaltige Reste der bakteriellen Zellwand oder anorganisches, an die Hüllproteine gebundenes Phosphat. Hinsichtlich der Funktion herrscht in der Literatur keine Klarheit (Mozes und Lortal 1995, Thomas und Trust 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion.

Im Hinblick auf die Anwendung der nativen, stabilisierten oder modifizierten Hüllproteinschichten zur Reinigung von häufig sauren oder neutralen Wässern wurde die Stabilität der Proteingitter in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen pH 2 und 9 untersucht. Es zeigte sich, dass die Hüllproteinmonomere des Haldenisolats JG-A12 im pH-Bereich von 4,5-9 als Polymer und damit als Gitter vorliegen. Der vollständige Zerfall in Monomere ist erst bei einem pH-Wert von 3 und niedriger zu verzeichnen. Da der Boden, aus dem der Stamm JG-A12 isoliert wurde, einen pH-Wert von 5 aufweist, ist dies nicht überraschend. Die Hüllproteinpolymere des Referenzstammes sind bereits bei einem pH-Wert von 4,5 vollständig in Monomere dissoziiert. Das entspricht den Erwartungen, da der Referenzstamm ein Wachstumsoptimum im pH-neutralen Bereich besitzt. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass das Hüllproteingitter als Grenzfläche zwischen Zellinnerem und umgebendem Medium auch in diesem pH-Bereich die höchste Stabilität besitzt. Beide Ergebnisse stimmen gut mit Untersuchungen an *B. sphaericus* CCM 2120 überein, dessen Hüllproteingitter im pH-Bereich 4,75-8,5 stabil sind (Weigert 1993). Der Zerfall der Gitter kann auch über eine Rücktitrierung des pH-Wertes nicht umgekehrt werden, was auf die Existenz einer weiteren, für die Ausbildung der Gitter relevanten Komponente hinweist. Es handelt sich dabei vermutlich wie bei Hüllproteingittern anderer Bakterien um zweiwertige Ionen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} (Faraldo et al. 1988, Koval und Murray 1984, Sleytr 1978, 1983, Word et al. 1983, Beveridge und Murray 1976). Eine Stabilisierung der Gitterstrukturen konnte mittels Glutaraldehyd oder EDC erreicht werden, wodurch Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Hüllprotein und Uran oder Kupfer möglich wurden. Ein entscheidender Aspekt der Stabilisierung der Hüllproteine mit Glutaraldehyd oder EDC ist die dadurch bedingte Veränderung der Eigenschaften der Hüllproteinschichten. Die Vernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd führt zu einer Anlagerung von Glutaraldehydpolymeren an das Protein. Dies ist an IR-Spektren der Referenzproben beider Proteine deutlich zu erkennen. Hier sind die aliphatischen Streckschwingungen und asymmetrischen C-H Streckschwingungen gegenüber nativen Hüllproteinen deutlich dominierend.

Zusätzlich kommt es durch die Glutaraldehydvernetzung zu einer Verringerung freier Amino-
gruppen von bis zu 75 % und damit zu einem Verlust positiver Ladungen (Weigert 1993). Die
Stabilisierung der Gitter mittels EDC führt ebenfalls zu einer Veränderung des Proteins durch
Umsetzung einer freien Amino- und Carboxylgruppe zu einer Peptidbindung pro Reaktion.
Bei dieser Vernetzung wird das Protein jedoch nicht zusätzlich durch die Bindung eines
„Fremdmoleküls“ modifiziert, da EDC nur zur Aktivierung benötigt wird und abschließend
als 1-Ethyl-3-(N,N'-dimethylaminopropyl)harnstoff wieder ausgewaschen werden kann. Der
Verlust jeweils einer Carboxyl- und Aminogruppe und die Bildung einer Peptidbindung ist für
die Metallbindung jedoch nicht von Nachteil, da IR-Untersuchungen (Kap. 4.11.1) gezeigt
haben, dass die Metallbindung hauptsächlich an der Carbonylgruppe und am Amid der
Peptidbindung erfolgt. Aus diesem Grund sind die Modifikationen insbesondere im
Zusammenhang mit der Bindung von Uran, Kupfer, Palladium und Platin von entscheidender
Bedeutung und werden in diesem Zusammenhang gesondert diskutiert (Kap. 5.2). Es muss
jedoch erwähnt werden, dass die Modifikation bis zu 90 % der verfügbaren Carboxylgruppen
betreffen kann (Weigert 1993). Der Vergleich der IR-Spektren stabilisierter Hüllproteine
(Abb. 4.11.1.1c und d) mit Spektren nicht stabilisierter (Abb. 4.11.1.2a und b) zeigt ein
zusätzliches Absorptionsmaximum im Bereich $1099-1064\text{ cm}^{-1}$, das auf freie OH-Gruppen
hinweist. Grundsätzliche Änderungen der Proteinstruktur sind nicht erkennbar.

Betrachtet man die Stabilität der Hüllproteine der *B. sphaericus*-Stämme JG-A12 und NCTC
9602 gegenüber den Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin zeigt
sich ein unterschiedliches Bild. Im direkten Vergleich beider Hüllproteine fällt auf, dass das
Protein des Referenzstammes in der Regel eine höhere Stabilität gegenüber den genannten
Proteasen besitzt. Diese Tatsache wurde nicht näher untersucht, da dies nicht Ziel der Arbeit
war. Es erscheint jedoch denkbar, dass eine geringere Stabilität eine Rolle bei der Entgiftung
spielt. So könnten sich die Zellen des Haldenisolats vor negativen Effekten durch
Radionuklide und Schwermetalle schützen, indem die Metalle an den Hüllproteinschichten
gebunden werden, wodurch die Zelle selbst geschützt ist. Die Proteinschicht könnte dann bei
vollständiger Beladung abgeworfen und neu gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit diente die Gewinnung proteolytischer Fragmente und Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren vorrangig der Konstruktion von geeigneten Primern. Diese Strategie beruhte auf der Überlegung, dass auf Grund der zu den Primärstrukturen anderer Hüllproteine gänzlich verschiedenen Aminosäuresequenzen der N-terminalen Domäne der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 eine Konstruktion von Primern auf der Basis der konservativen Bereiche der Hüllproteine von *B. sphaericus* P-1, CCM 2177 und WHO 2362 (Kap. 4.9, Abb. 4.9) wenig erfolgversprechend ist.

Nach Kenntnis von Teilen der Aminosäuresequenz der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und von *B. sphaericus* NCTC 9602 auf DNA-Ebene (Abb. 4.8.3a) lässt sich eine Identität von 98 % bei einer Überlappung von 579 Nukleotiden berechnen (Programm Blast, Tatusova und Madden 1999). Dies entspricht 13 unterschiedlichen Nukleotiden. Werden die Aminosäuresequenzen miteinander verglichen, so ergeben sich Unterschiede in drei Aminosäuren, was einer Identität von 98 % bei einer Überlappung in 182 Aminosäuren entspricht. Die Analyse wurde ebenfalls mit dem Programm Blast durchgeführt. Betrachtet man die N-terminalen Domänen der Hüllproteine der untersuchten *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 (Position 0-192 in Abb. 4.9) und die bereits bekannter Hüllproteine von *B. sphaericus* P-1, CCM 2177, WHO 2362, sowie *B. firmus* OF4, so ist die außergewöhnlich hohe Identität der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 überraschend. Im Vergleich dazu sind die Identitäten zu den nächst verwandten N-terminalen Domänen (Position 0-192) der Hüllproteinen von *B. firmus* OF4 (29 % Identität) und *B. sphaericus* WHO 2362 (29 %) oder gar zu denen der anderen *B. sphaericus*-Stämmen (P1: 27 % und 2177: 27 %) sehr niedrig (Abb. 5.1b).

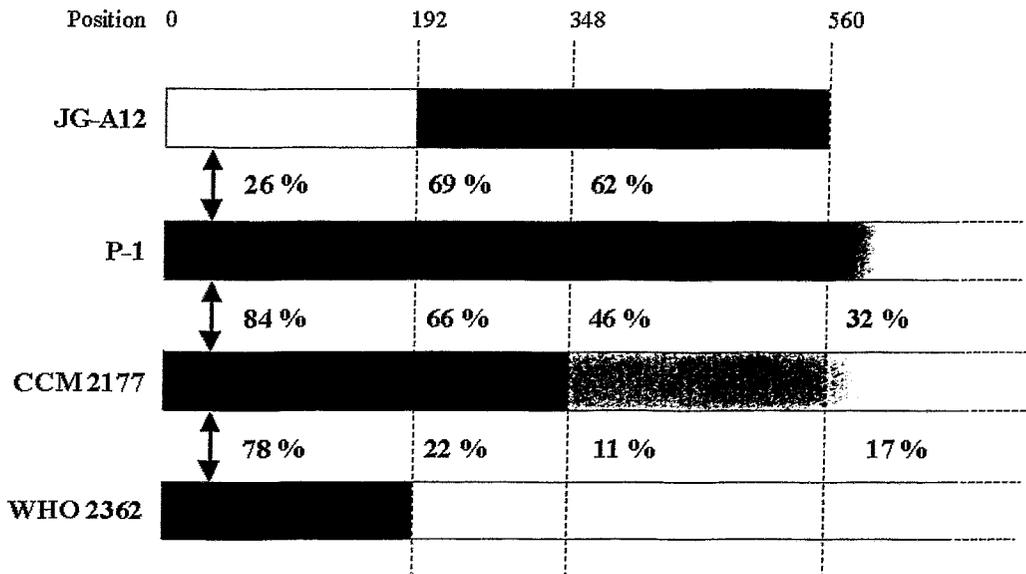


Abb. 5.1b: Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12, *B. sphaericus* P-1, *B. sphaericus* CCM 2177 (ATCC 4525) und *B. sphaericus* WHO 2362. Die Identitäten sind in Prozent dargestellt, errechnet mit dem Programm Blast (Tatusova und Madden 1999).

Demgegenüber besitzen die *B. sphaericus*-Stämme P-1, CCM 2177 und WHO 2362, ausgehend von 100 % für den Stamm P-1, eine zueinander sehr hohe Identitäten von 84 % für den Stamm CCM 2177 und von 80 % für den Stamm WHO 2362, obwohl diese zu unterschiedlichen serologischen Gruppen gehören. Die Stämme CCM 2177 zu WHO 2362 besitzen eine Identität von 78 %. Im weiteren Vergleich fallen außerdem charakteristische Einschübe von jeweils insgesamt sieben Aminosäuren, beginnend an Position 59 und an Position 141 (siehe Abb. 4.9, S. 85) für die Hüllproteine der Stämme JG-A12 und NCTC 9602 auf. Die Zahl der Aminosäuren lässt vermuten, dass es sich bei den Einschüben um genau eine zusätzliche Windung einer α -Helix handelt. In allen betrachteten Fällen lassen sich drei N-terminale SLH-Domänen beginnend an den Positionen 3, 71 und 136 erkennen, was darauf schließen lässt, dass die N-terminale Domäne der Hüllproteine auch bei *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 für die Bindung der Hüllproteinschicht an das darunter liegende Peptidoglycan (Sára et al. 1998) oder ein sekundäres Zellwandpolymer (Ries et al. 1997, Sára et al. 1998, Ilk et al. 1999, Jarosch et al. 2001) verantwortlich ist.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen lässt sich allerdings schon jetzt sagen, dass die N-terminalen Domänen (Position 0-192) der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 eine auffallend andere Aminosäuresequenz im Vergleich zu anderen Stämmen dieser Art besitzen (Abb. 5.1b). Weitergehende Vergleiche beider N-terminalen Domänen mit anderen Proteinen in den verfügbaren Protein-Datenbanken unter Verwendung des Blast-Programms ergaben keine signifikanten Übereinstimmungen. Im Bereich 193-348 zeigt sich jedoch ein gänzlich anderes Bild, da es hier zu einer abrupten Erhöhung der Identitäten kommt. So zeigen insbesondere die Hüllproteine von JG-A12, P1 und CCM 2177 hohe Identitäten von 69 % für JG-A12 zu P1, 65 % für JG-A12 zu CCM 2177 und 66 % für P-1 zu CCM 2177. Dies lässt einen horizontalen Transfer dieses Bereiches zwischen *B. sphaericus* JG-A12 und einem anderen Bakterium vermuten. Allerdings konnte ein möglicher Ursprung nicht ermittelt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits bei der Analyse der Hüllproteine EA1 und Sap von *B. anthracis* erhalten. Diese zeigen eine besonders hohe Identität von 66 % im Bereich der Aminosäurereste 1-200 und einen abrupten Abfall der Identität auf 22 % im Bereich 201-Ende (Bahl et al. 1997). Interessanterweise gibt es im Bereich 193-348 des Hüllproteins von WHO 2362 keine signifikanten Identitäten zu den Hüllproteinen der anderen *B. sphaericus* Stämme. Um eine Erklärung dafür zu finden, wurde überprüft, ob bestimmte Eigenschaften der Hüllproteine mit diesen Ergebnissen korrelieren. Auffallend war, dass es in der Literatur widersprüchliche Angaben zur Symmetrie des Hüllproteingitters von *B. sphaericus* WHO 2362 gibt (Sidhu und Olsen 1997: p2, Sleytr et al. 1996: p4). Aus diesem Grund wurden zusätzlich seine Hüllproteine auf herkömmliche Art isoliert (Kap. 3.4.2.1) und im TEM analysiert (Abb. 4.2b). Es konnte für die Hüllproteinschicht von *B. sphaericus* WHO 2362 eine schräge Gittersymmetrie (p2) nachgewiesen werden (Abb. 5.1c).

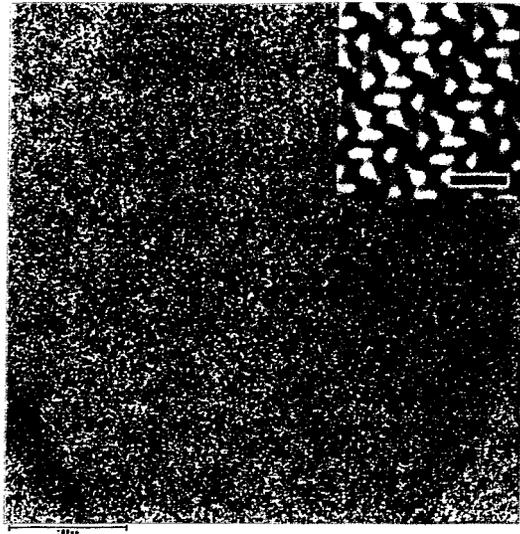


Abb. 5.1c.: In der Abbildung ist eine TEM-Aufnahme des Hüllproteingitters von *B. sphaericus* WHO 2362 dargestellt (der Balken am linken unteren Bildrand entspricht 100 nm). In der rechten oberen Ecke ist eine korrelationsgemittelte, symmetrisierte Bildrekonstruktion der TEM-Aufnahme zu sehen (der Balken entspricht 9 nm). Die Gitterkonstante beträgt demnach 9,4 und 12,8 nm bei einem Winkel von 71 Grad. (Mit freundlicher Genehmigung von R. Wahl)

Blast-Analysen im Bereich 193-348 des Hüllproteins von *B. sphaericus* WHO 2362 ergaben signifikante Identitäten zu dem Hüllprotein von *B. firmus* OF4. Vergleicht man den Abschnitt 193-348 der Hüllproteine von *B. sphaericus* WHO 2362 und *B. firmus* OF4, die beide eine schräge Symmetrie aufweisen, so zeigt sich hier eine deutlich höhere Identität, sie beträgt 46 % (Abb. 5.1d), verglichen mit den Identitäten zu den anderen *B. sphaericus* Hüllproteinen.

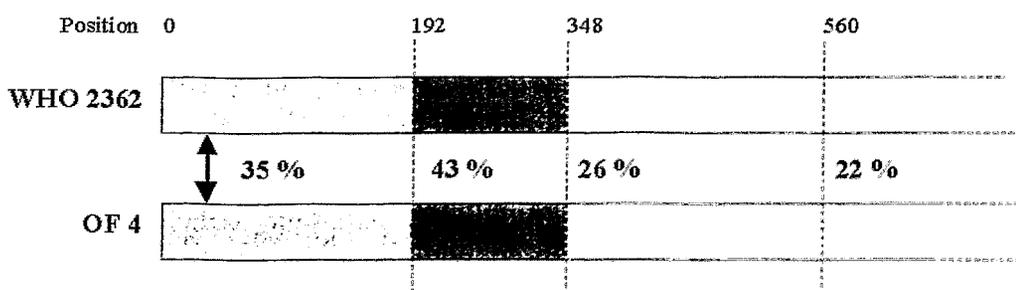


Abb. 5.1d: Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von *B. sphaericus* WHO 2362 und *B. firmus* OF4. Die Identitäten sind in Prozent dargestellt, errechnet mit dem Programm Blast (Tatusova und Madden 1999).

Im gesamten Bereich 193-560 weist das Hüllprotein von *B. firmus* OF 4 jedoch keine signifikanten Identitäten zu den entsprechenden Bereichen der Hüllproteine der anderen *B. sphaericus* Stämme auf.

Die plötzlichen Änderungen der Identitäten in der Aminosäuresequenz des Hüllproteins von *B. sphaericus* WHO 2362 im Vergleich zu denen anderen *B. sphaericus* Hüllproteine deuten auch hier auf ein horizontalen Transfer hin. Es könnte entweder der erste Genabschnitt (Position 0-192) oder der zweite Genabschnitt (Position 193-Ende) übertragen worden sein. Die Beobachtung, dass die Aminosäureabfolge des zweiten Abschnitts (hier Position 193-348, N-terminal naher Bereich der zentralen Domäne) in Hüllproteinen in direktem Zusammenhang mit der Gittersymmetrie steht, ist in guter Übereinstimmung mit der von Jarosch et al. (2001) gemachten Beobachtung, dass N-terminal geschnittene Fragmente des Hüllproteins von *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 die Fähigkeit zur Selbstassemblierung und damit zur Ausbildung eines symmetrischen Gitters verlieren. Dabei wurde nachgewiesen, dass nicht die Aminosäuren der N-terminalen Domäne (Aminosäure 0-226) des Hüllproteins für diesen Effekt verantwortlich sind, sondern die nachfolgenden Aminosäuren (Aminosäure 227-313). Außerdem deuten die Ergebnisse von Jarosch et al. (2001) darauf hin, dass eine zusätzliche C-terminale Region (Aminosäure 829-1099) mit gleicher Bedeutung existiert. Die dritten und vierten Teile der Hüllproteinsequenzen (Position 349-560 und Position 561-Ende) zeigen im Verlauf abnehmende Identitätswerte. Wie bereits angedeutet, fallen auch hier die sehr niedrigen Werte des Hüllproteins von *B. sphaericus* WHO 2362 auf. BLAST-Analysen zeigen die signifikant höheren Identitätswerte an Position 193-348 von 43 % mit der Aminosäuresequenz des Hüllproteins von *B. firmus* OF4, gefolgt von 38 % mit der Aminosäuresequenz des Hüllproteins (owp) von *Brevibacillus brevis* 47. Bei Analysen des Sequenzbereichs 349-560 zeigt sich lediglich eine 31 %ige Identität mit der Aminosäuresequenz von owp von *Brevibacillus brevis* 47. Weitere signifikante Identitäten konnten nicht nachgewiesen werden. Eventuell lässt die Klärung der kompletten Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 auf Grund hoher Identitäten und Ähnlichkeiten, aber vorhandener biochemischer Unterschiede im Hinblick auf Symmetrie, Stabilität und Metallbindung die Zuordnung einzelner Sequenzteile zu bestimmten Eigenschaften zu.

Aufbauend auf der Kenntnis der Basensequenzen der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene (Aminosäurereste 0-182) ist es außerdem möglich geworden, beide Bakterienstämme an Hand des *MseI*-RFLP-Musters nach spezifischer Amplifikation dieser Teile zu identifizieren und zu unterscheiden. Dies ist insbesondere bei häufiger Kultivierung und für Pilotversuche zum Einsatz der Bakterien in Filtern (siehe Kap. 5.3) von entscheidender Bedeutung für eine kontinuierliche Überwachung der Kultur und damit für eine Qualitätssicherung.

5.2 Metallbindung an Hüllproteinen und intakten bakteriellen Zellen

Es wurden die Wechselwirkungen der Hüllproteine mit den Edelmetallen Palladium und Platin untersucht. Der Grund hierfür war zum einen die Zielstellung, metallisierte Hüllproteine zur Entwicklung von Nanostrukturen und metallischen Schichten für Biosensoren einzusetzen. Zum anderen sollte an diesem bereits untersuchten Beispiel (Kirsch 1998, Mertig et al. 1999) geklärt werden, ob es sich bei der Metallclusterbildung um eine passive Ablagerung oder um eine kovalente Bindung der Metalle handelt. Zusätzlich wurde in anderen Arbeiten (Lloyd et al. 1998, L. Macaskie persönliche Mitteilung) gezeigt, dass zum Beispiel Palladiumcluster zur Reduktion von Uran verwendet werden können. Dies würde eine weitere Möglichkeit zur Anwendung der immobilisierten Hüllproteine im Hinblick auf Bioremediationsprozesse eröffnen.

Infrarotspektroskopische Untersuchungen von Proteinen können von vielen Umgebungsparametern beeinflusst werden. So sind der Wassergehalt, das Verhältnis von eingesetzter Menge an Metallionen zu Protein, die Präparation sowie apparatetechnische Gegebenheiten von Bedeutung und machen Interpretationen gelegentlich schwierig. Eine sehr gute Reproduzierbarkeit, Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Metallsatzkonzentrationen mit gleichen Resultaten und die Messung der Proben als KBr-Presslinge unter wasserfreien Bedingungen gewährleisteten in der vorliegenden Arbeit die Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Die Spektren zeigen übereinstimmend für beide Hüllproteine Wechselwirkungen der Metalle mit den Hüllproteinen über die Elemente Sauerstoff und Stickstoff. Beteiligt sind CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen sowie exponierte COOH-, OH- und NH-Gruppen. Betrachtet man die Bindung des Palladiums, so zeigt sich für das Hüllprotein des Haldenisolats hauptsächlich eine Wechselwirkung mit den NH-Gruppen der Peptidbindung, zusätzlich scheinen CO-Gruppen der Peptidbindung und exponierte COOH-Gruppen involviert zu sein. Außerdem erfolgt eine Veränderung des Schwingungsverhaltens aliphatischer CH-Ketten. Das Hüllprotein des Referenzstamms bindet Palladium offensichtlich unter Beteiligung der CO-Gruppen der Peptidbindung sowie exponierter OH-, NH- und COOH-Gruppen. Zusätzlich nehmen die Absorptionsmaxima, die Schwingungen aliphatischer CH-Ketten zugeordnet werden können, deutlich ab.

Die Bindung von Platin erfolgt bei beiden Hüllproteinen ähnlich und besonders deutlich an den OH-Gruppen der Proteine. Ebenfalls an der Bindung beteiligt scheinen exponierte COOH-Gruppen, sowie die CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen. Zusätzlich führt die Bindung zu einem veränderten Schwingungsverhalten der CH-Ketten. Zusammengefasst, es wurden Unterschiede im Bindungsverhalten beider Hüllproteine bei Palladium aber nicht bei Platin beobachtet. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Funktionen dieser Proteinschichten beim Naturisolat und beim Referenzstamm sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Metallionen nicht unspezifisch auf dem Hüllprotein ablagern sondern direkt mit diesem in Wechselwirkung treten. Die Komplexierung des Palladiums erfolgt beim JG-A12 Hüllprotein eher an funktionelle Gruppen, die Stickstoff enthalten, beim Hüllprotein des Referenzstamms eher an sauerstoffhaltige Gruppen. Platin komplexiert in beiden Fällen bevorzugt mit sauerstoffhaltigen Gruppen. Im Zusammenhang mit der Bindung von Palladium und Platin an Peptide ist die Komplexierung mit dem Stickstoffatom des Amids der Peptidbindung und mit aromatischen Stickstoffverbindungen (Histidin) beschrieben (Pettit et al. 1991). Dies trifft insbesondere für Palladium und das JG-A12 Hüllprotein zu. Außerdem können beide Metalle Komplexe mit Sauerstoffverbindungen bilden, diese sind jedoch schwächer.

Die Untersuchung der Bindung von Uran an Hüllproteine wurde auf Grund der Instabilität der nativen Proteingitter bei pH-Werten unter 5 im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Panak et al. 2000) mit Glutaraldehyd- und EDC-stabilisierten Proteinschichten durchgeführt. Im ersten Fall findet die Komplexierung des Urans hauptsächlich über Glutaraldehydpolymere statt und nur in geringem Maße über Gruppen der Proteine. Werden EDC-stabilisierte Hüllproteine verwendet, so zeigt sich ein völlig anderes Bild. Hier erfolgt die Komplexierung des Urans sowohl beim Haldenisolat als auch beim Referenzstamm über die NH-Gruppen der Peptidbindungen sowie an OH- und PO₄-Gruppen, wobei hier die Zuordnung auf Grund der Überlagerung beider Absorptionsmaxima nicht eindeutig erfolgen kann. Mittels EXAFS-Untersuchungen konnte jedoch eindeutig eine Wechselwirkung zwischen Phosphatgruppen (Kap. 4.11.2) und Uran nachgewiesen werden. Dies ist in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Phosphorbestimmung. Hier konnte sowohl eine leicht gebundene Phosphorspezies (Differenz des Phosphorgehalts der nativen und rekristallisierten Hüllproteine) als auch eine fest gebundene Phosphorspezies (Phosphorgehalt der rekristallisierten Hüllproteine) nachgewiesen werden. Weniger informativ sind die EXAFS-spektroskopischen Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung anderer Gruppen für die Wechselwirkungen mit Uran.

Die Untersuchungen zeigen deutlich eine primäre Bindung des Urans an die NH-Gruppe der Peptidbindung und eine untergeordnete Bindung des Urans an OH- und PO₄-Gruppen. Das heißt, die Bindung des Urans erfolgt auch bei intakten Zellen höchstwahrscheinlich zuerst an die exponierten Hüllproteine und erst anschließend an die darunter liegenden stark phosphorhaltigen Zellwandschichten. Bei hohen Urankonzentrationen dominiert jedoch bei intakten Zellen die Wechselwirkung zwischen Uran und Phosphor (Hennig et al. 2001, Panak et al. 2000). Im Falle von Plutonium (VI) wurde ebenfalls eine oberflächliche Bindung an Phosphatgruppen der Zellwand bei *B. sphaericus* ATCC 14577 nachgewiesen (Panak und Nitsche 2001). Insgesamt zeigen die Hüllproteine beider *B. sphaericus* Stämme bei der Bindung von Uran keine Unterschiede.

5.3 Nutzung der Hüllproteine, Sporen oder intakten Zellen für Bioremediationsprozesse

Neben den isolierten Hüllproteinen besitzen auch intakte Zellen oder Sporen die Eigenschaft, verschiedenste Metalle zu binden (Selenska-Pobell et al. 1999). Im Rahmen früherer Untersuchungen wurde die Metallbindung freier Zellen und freier Sporen unter Verwendung der Sickerwasserprobe MP 5 der Haberlandhalde/Johanngeorgenstadt untersucht. Dabei wurden bei intakten Zellen von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 U, Cu, Pb, Al, Cd und in geringerem Maße auch Ga, Zn, Ni, Co, Mn und Ba gebunden. Die Sporen binden vor allem U, Cu, Pb, Al, Ga, Ba, Cd und in geringeren Mengen Zn sowie Ni. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Metalle zur näheren Untersuchung ausgewählt: 1.) Uran, auf Grund seiner vollständigen Bindung durch Zellen und Sporen sowie seiner Relevanz als kontaminierende Komponente in den Sickerwässern verschiedener Halden und 2.) Kupfer, da dieses in den erwähnten Versuchen ebenfalls vollständig gebunden wurde.

Es kommen grundsätzlich für die Metallbindung an Biokomponenten folgende funktionelle Gruppen in Frage: NH₂-, NH-, OH-, CO-, COOH-, SH- und PO₄-Gruppen (Beveridge und Murray 1980, Doyle et al. 1980, Doyle 1989, Morgan 1985, Collins und Stotzky 1992). Während freie Sulfhydrylgruppen auf der Oberfläche aerob wachsender Bakterien eine untergeordnete Rolle spielen, da sie unter diesen Bedingungen meist als Disulfidbrücken vorliegen, sind alle sonst genannten funktionellen Gruppen in großem Überschuss auf und in der Zellwand zu finden.

Eine Sonderrolle spielen Phosphatgruppen, die insbesondere bei vielen Bazillen als Bestandteil sekundärer Zellwandpolymere in großer Zahl in den Zellwänden zu finden sind (Hungerer und Tipper 1969, Doyle et al. 1980, Beveridge und Murray 1980, Pooley und Karamata 1994). Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, wie viele Phosphatgruppen auf der Oberfläche von Bakterien verfügbar sind, wurde der Gehalt an Phosphor intakter Zellen, Sporen, Zellwände und Hüllproteine von dem Haldenisolat und dem Referenzstamm bestimmt (Kap. 4.12).

Für Uran konnte bereits mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie gezeigt werden, dass die Sorption auf der Oberfläche der Zelle (Zellwand) stattfindet, und es an Phosphatgruppen gebunden wird (Panak et al. 2000, Hennig et al. 1999, 2001). Kupfer hingegen wird entweder intrazellulär akkumuliert (Gadd et al. 1984, Zahn und DiSpirito 1996), mittels Chelatoren, wie zum Beispiel Siderophoren, gebunden (Hider 1984), oder durch extrazelluläre Polymere oder Bestandteile der Zellwand an NH- (Morgan 1985), COOH- oder PO₄-Gruppen gebunden (Mullen et al. 1989). In den Bindungsexperimenten (Kap. 4.12.3.2) wurde nachgewiesen, dass intakte JG-A12-Zellen nach Inkubation mit einer 9x10⁻⁴ M Uranylнитratlösung 64,2 µg U pro mg TG (Trockengewicht) binden. Dies liegt innerhalb des Wertebereichs der bereits publizierten Bindungskapazitäten anderer Bakterien von 38 µg pro mg TG für *Bacillus* sp. und 440 µg pro mg TG für *Streptomyces longwoodensis* (Friis und Myers-Keith 1986, Volesky und Holan 1995). Gemäß der Speziationsverteilung des Urans bei einem verwendeten pH-Wert von 4,5 und der angegebenen Ionenstärke können bereits bis zu 32 % des Urans als (UO₂)₂(OH)₂²⁺ und 19 % in Form anderer Spezies (unter anderem (UO₂)₃(OH)₅⁺ mit circa 9 % als dominierende Spezies) (Kap. 3.17.2) vorliegen und deshalb eventuell nur bedingt für die Bindung zur Verfügung stehen. Auf Grund von Bindungsexperimenten mit 3x10⁻⁴ M Uranylнитratlösung, bei den bei einem pH-Wert von 4,5 immerhin noch 68 % des Urans als freies Uranylion vorliegt, und identischen Bindungskapazitäten, scheint in den durchgeführten Experimenten eine Limitierung freier Uranylionen nicht vorgelegen zu haben. Um Fehlbestimmungen zu vermeiden, wurde neben der Abnahme des Urans in Lösung auch die Menge desorbierten Urans bestimmt. Auch hier stimmen die Werte gut überein. Unter der Annahme, dass das Uran bevorzugt an Phosphatgruppen bindet, bedeutet dieser Wert ein stöchiometrisches Verhältnis von verfügbarem Phosphat zu Uran bei intakten Zellen von 11 : 1, bei Sporen von 1 : 5 und bei den Zellwänden (intakte Zellwand aus Plasmamembran, Peptidoglycan, möglichen sekundären Zellwandpolymeren und Hüllprotein) von 1 : 4. An nativen Hüllproteinen konnte ein stöchiometrisches Verhältnis von Phosphat zu Uran von 1 : 6,5 nachgewiesen werden.

Anzumerken ist, dass für den Bezug auf die Zellwand das an freie Zellen gebundene Uran (Kap. 4.13.3.2) zu Grunde gelegt und der Anteil der Zellwand mit 15 % am Gesamtrockengewicht vorausgesetzt wurde. Da die Experimente mit toten Zellen durchgeführt wurden und eine vollständige Desorption des gebundenen Urans möglich ist (Kap. 4.13.3.3), was bei einer Aufnahme nicht der Fall wäre, ist davon auszugehen, dass es sich um eine Sorption auf der Oberfläche handelt. Dies wurde in ähnlicher Weise auch bei Wechselwirkungen zwischen Plutonium und lebenden *B. sphaericus* ATCC 17588 Zellen und Sporen beobachtet (Panak und Nitsche 2001). Es gibt auch Beispiele für die Aufnahme von Uran in lebende Zellen von *Streptomyces longwoodensis* (Friis und Myers-Keith 1986), *Pseudomonas* sp. EPS-5028 (Marques et al. 1991) oder anderen Pseudomonaden (McLean und Beveridge 2001). Im vorliegenden Fall stehen für die Uranbindung nur die Phosphatgruppen der intakten Zellwand zur Verfügung. Der deutliche Überschuss an gebundenem Uran bezogen auf den Phosphatgehalt der Zellwand und der Hüllproteine, kann nun zwei Ursachen haben 1.) Uran wird grundsätzlich von verschiedenen funktionellen Gruppen gebunden oder 2.) das Uran wird zuerst als einzelnes Ion an funktionelle Gruppen der Proteine oder an Phosphatgruppen gebunden, und es kommt nach dieser Initiierung im Weiteren zu einer kontrollierten Oberflächenausfällung des Urans. Im Hinblick auf bisherige Ergebnisse der infrarot- und röntgenabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen (eigene Arbeiten, Panak et al. 1999, Hennig et al. 1999, 2001) ist davon auszugehen, dass beide Möglichkeiten eine Rolle spielen. Mit dem unter 2.) genannten Aspekt geht eine weit höhere maximale Bindungskapazität bei mehrfacher Inkubation mit Uran oder bei Uranylösungen höherer Konzentration einher. Oben genannte Betrachtungen zum Bindungsort des Urans, oberflächliche Bindung oder intrazelluläre Akkumulation, gelten in dieser Weise auch für Kupfer. Insgesamt binden intakte Zellen 6,2 µg Cu pro mg TG. Auch hier liegt der Wert im Bereich der bereits veröffentlichten Bindungskapazitäten für Kupfer von je 5,0 µg Cu pro mg TG bei *Bacillus* sp. und *Streptomyces noursei* (Volesky und Holan 1995). Dies bedeutet ein stöchiometrisches Verhältnis von verfügbarem Phosphat zu Kupfer bei intakten Zellen von 31 : 1 und bei den Zellwänden von 1 : 1,4. Die Annahmen entsprechen denen bei Uran. Es zeigt sich auch für Kupfer, dass ein Überschuss des Metallions gegenüber den verfügbaren Phosphatgruppen auf der Zelloberfläche zu verzeichnen ist. Auf Grund der relativ geringen Mengen an gebundenem Kupfer ist diesbezüglich nur die erste Überlegung für seine Bindung von Bedeutung, da es im Falle von Kupfer nur zu geringen Ausfällungen auf der Zelloberfläche kommt (Mullen et al. 1989).

Werden die Biokomponenten wie intakte Zellen, Sporen oder Hüllproteine in einer geeigneten Matrix immobilisiert, so können sie als Filtermaterial genutzt werden. Um hierfür optimale Bedingungen zu erreichen, wurden die Biokomponenten homogen in einer SiO_2 -Matrix über einen Sol-Gel-Prozess eingebunden (Kap. 4.13). Von besonderer Bedeutung ist dabei die Zugänglichkeit der Biokomponenten, die in Abhängigkeit von der Feinstruktur der SiO_2 -Matrix optimiert werden kann. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Porosität und einer vermehrten Bildung kleiner Kanäle in den Bioceren bietet die Verwendung eines Penetrationsmittels wie Sorbit. Dieses wird bei der Äquilibration der Biocere in Puffer wieder herausgewaschen und gibt somit zusätzliche Poren und Kanäle frei. Eine zweite Möglichkeit ist die Anwendung einer alternativen Trocknungsmethode. Herkömmlich erfolgt die Trocknung an Luft. Eine Verbesserung der Feinstruktur im oben genannten Sinne kann durch Gefriertrocknung erreicht werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen dies besonders deutlich (Kap. 4.13.2). Außerdem zeigt sich, dass die Schrumpfung der Zellen während der Trocknung zur Bildung zusätzlicher Hohlräume führt, wodurch aber die Zellen auf der Oberfläche nur unvollständig immobilisiert sind. Dies führt zu einem Herauswaschen der exponierten, geschrumpften Zellen während der Inkubation in verschiedenen Lösungen (Kap. 4.13.1, Abb. 4.13.1).

Anders verhält es sich bei der Immobilisierung von Sporen. Hier zeigen die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass selbst aufliegende Sporen fest auf der Oberfläche gebunden sind (Kap. 4.13.1 Abb. 4.13.1). Die Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass bei der Trocknung des Zell-Biocers sowohl die SiO_2 -Matrix als auch die hauptsächlich aus Flüssigkeit bestehenden Zellen schrumpfen, während beim Sporen-Biocer nur die keramische Matrix schrumpft, nicht aber die nahezu vollständig entwässerten Sporen (siehe Schema Abb. 5.3a).

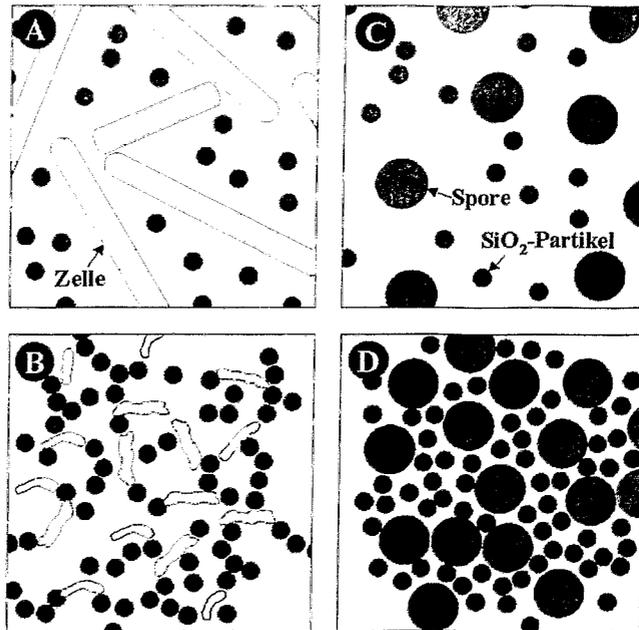


Abb. 5.3a: Schema des Schrumpfungsverhaltens von Zell-Biocer (A vor und B nach der Trocknung) und von Sporen-Biocer (C vor und D nach der Trocknung). Die Größenverhältnisse der intakten Zellen, getrockneten Zellen und der Sporen entsprechen denen der rasterelektronenmikroskopischen und atomkraftmikroskopischen Aufnahmen dieser Komponenten.

Diese Beobachtungen führten zu nachfolgender Hypothese: die Biocere mit Zellen besitzen wesentlich mehr sowie größere Poren und Kanäle als das Sporen-Biocer, das während der Trocknung durch eine Verdichtung der SiO_2 -Matrix um die nicht schrumpfenden Sporen herum Poren und Kanäle verliert. Bei dem Hüllprotein-Biocer tritt wie beim Zell-Biocer keine Verdichtung auf, sondern es kommt bei beiden Komponenten durch Trocknung auch zur Schrumpfung. Allerdings bleiben die Hüllproteinschichten auf Grund der räumlichen Ausdehnung gut im Biocer immobilisiert und werden nicht herausgelöst. Diese Überlegungen spielen ebenfalls für die Uran- und Kupferbindung an Biocere eine wichtige Rolle und werden dort nochmals aufgegriffen.

Nach der Inkubation der Zell-Biocere mit einer Uranylнитrat- oder einer Kupferchloridlösung wurde mittels qualitativer EDX-Analysen im Rasterelektronenmikroskop gezeigt, dass die Bindung des Urans bevorzugt an den Zellen aber auch an der reinen SiO_2 -Matrix erfolgt. Für Proben, die mit Kupfer versetzt wurden, konnte der Nachweis der ausschließlichen Bindung des Kupfers an die Zellen erbracht werden. Diese Ergebnisse konnten in den anschließend diskutierten Experimenten zu Bindungskapazitäten und Bindungskinetiken bestätigt werden.

Das Xerogel, freie Zellen und Zell-Biocere zeigen bei der Inkubation mit einer Uranyl-nitratlösung schon hinsichtlich der Kinetik deutliche Unterschiede. Insbesondere das gefriergetrocknete Zell-Biocer aber auch das reine Xerogel binden bereits nach 30 min das Maximum an Uran, während sowohl die freien Zellen als auch die übrigen Zell-Biocere erst nach 24 h den Maximalwert erreichen. Insgesamt besitzen die Verbundkomponenten eine deutlich höhere Bindungskapazität im Vergleich zum Xerogel, insbesondere das Zell-Biocer mit Sorbit und das gefriergetrocknete Zell-Biocer. Legt man eine theoretische Bindungskapazität (100 %) zu Grunde, die aus der Bindung der Einzelkomponenten entsprechend ihrer Anteile errechnet werden kann, so besitzen die Zell-Biocere mit Sorbit 93,5 % oder nach Gefriertrocknung 88 % dieser theoretischen Bindungskapazität. Dabei wurden 56,5 % und 53,7 % des angebotenen Urans gebunden. Demgegenüber sind die Mengen an gebundenem Kupfer um den Faktor 10-17 niedriger als bei Uran. Es zeigt sich auch, dass die freien Zellen gleiche Mengen Kupfer binden wie die immobilisierten. Auch hier besitzt die gefriergetrocknete Verbundkomponente die schnellste Bindungskinetik. Im Vergleich zur theoretischen Bindungskapazität, binden die Zell-Biocere mit Sorbit zusätzlich 22 % oder nach Gefriertrocknung 95 % des errechneten Wertes, was einer Bindung von 14,7 % und 11,5 % des angebotenen Kupfers entspricht.

Aus diesen beiden Versuchen kann gefolgert werden, dass die Immobilisierung der Biokomponenten mit nachfolgender Gefriertrocknung oder unter Verwendung von Sorbit die Bindungskinetik günstig beeinflusst. Im Falle des Kupfers führte dies sogar zu einer Erhöhung der Kapazität. Die Schwankungen der quantitativen Bestimmungen sind auf apparatetechnische Gründe zurückzuführen, die durch die mitgeführte Kontrolle auch belegbar sind. Eingesetzt wurden 7,5 mg Uran oder 2 mg Kupfer pro 35 ml.

Legt man die Metallgehalte der Sickerwasserprobe MP 5 der Uranabfallhalde „Haberland“ bei Johanngeorgenstadt mit einem Urangehalt von $72,1 \mu\text{g l}^{-1}$ und einem Kupfergehalt von $124 \mu\text{g l}^{-1}$ Kupfer zu Grunde, so könnten mit einem Kilogramm des gefriergetrockneten Zell-Biocers (gemäß der Ergebnisse aus Kap. 4.13.3.3 nach mehrfacher Inkubation) mindestens 50,8 g Uran oder 1 g Kupfer gebunden werden, was einer Reinigung von 705 m^3 oder 8 m^3 Sickerwasser gleichkommt. Andere ausgewählte aber noch in Erprobung befindliche Materialien zur Reinigung kontaminierter Sickerwässer weisen deutlich geringere Bindungskapazitäten auf: Eisenschwamm (circa 2 bis 10 mm) unter anaeroben Bedingungen 19 mg U pro g Material oder granulierter Industrietorf 1,2 mg U pro g Material (Wismut 2000).

Die gefriergetrockneten Biocere besitzen demgegenüber eine Bindungskapazität von 50,8 mg pro g Material (10,16 mg Uran pro 200 mg Biocer). Alternativ zu intakten Zellen wurden im Hinblick auf eine bessere Lagerfähigkeit und höhere Stabilität gegenüber Sickerwässern mit wechselnden pH-Werten auch stabilisierte Hüllproteine und Sporen von *B. sphaericus* JG-A12 immobilisiert sowie Bindungskinetiken und Bindungskapazitäten bestimmt. Betrachtet man zunächst die einzelnen Komponenten, so besitzen die Sporen für die beiden untersuchten Metalle die höchste Bindungskapazität (21,9 mg U und 1,6 mg Cu pro 200 mg TG), gefolgt von intakten Zellen (12,8 mg U und 1,2 mg Cu pro 200 mg TG), Hüllproteinen (3,9 mg U und 0,4 mg Cu pro 200 mg TG) und dem Xerogel (2,7 mg U und 0,02 mg Cu pro 200 mg TG). Die Ergebnisse aus Kap. 4.13.3.2 sind in Abb. 5.3b und c zusammenfassend dargestellt. Aus den Ergebnissen der Uranbindung an Hüllproteine ergibt sich außerdem ein molares Verhältnis von Hüllproteinmonomer zu Phosphor zu Uran von 1: 1,7 : 10,9, was nochmals die in Kap. 5.2 dargestellten Ausführungen zur primären Bindung des Urans an den Stickstoff der Peptidbindung und die untergeordnete Bindung des Urans an Phosphatgruppen sowie die Oberflächenpräzipitation des Urans bestätigt.

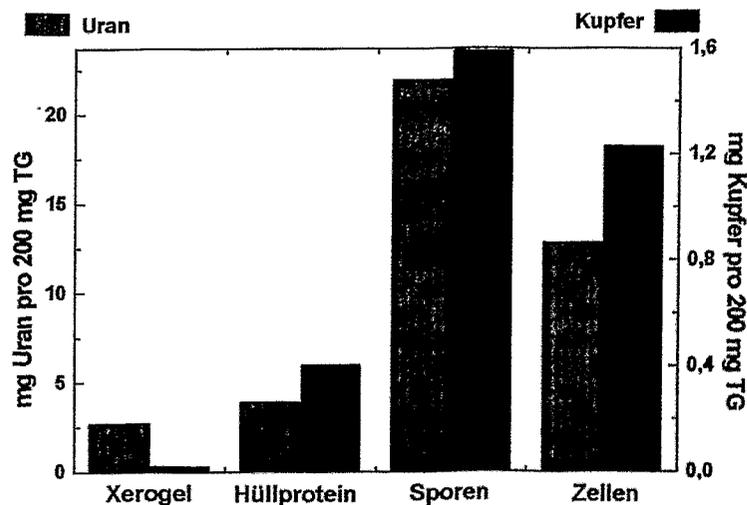


Abb. 5.3b: Zusammenstellung der Bindungskapazitäten bei einmaliger Inkubation von jeweils 200 mg der einzelnen Komponenten mit 35 ml einer 9×10^{-4} M Uranylнитrat- oder Kupferchloridlösung in 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 für 48 h.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Bindungskapazität der Verbundkomponente, so zeigt sich, dass das Zell-Biocer in beiden Fällen die höchste Metallbindungskapazität aufweist, gefolgt von dem Hüllprotein-Biocer und mit nahezu gleichen Werten das Sporen-Biocer (Abb. 5.4c). Dies steht in deutlichem Widerspruch zur Bindungskapazität der Einzelkomponenten.

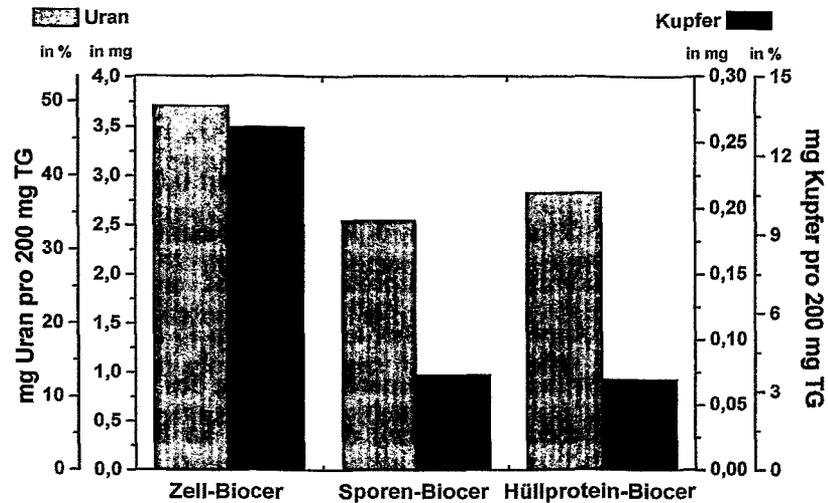


Abb. 5.3c: Zusammenstellung der Bindungskapazitäten bei einmaliger Inkubation von jeweils 200 mg der Biocere mit 35 ml einer 9×10^{-4} M Uranylнитrat- oder Kupferchloridlösung in 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 für 48 h. Der Anteil an gebundenem Metall im Verhältnis zu den angebotenen Mengen ist in Prozent angegeben.

Zusätzlich weisen die realen Bindungskapazitäten im Verhältnis zu den entsprechenden Anteilen theoretisch errechneter Kapazitäten bei den Sporen Werte von 58 % für Uran und 47 % für Kupfer und bei den Hüllproteinen 97 % für Uran und 74 % für Kupfer auf. Für identisch hergestellte, das heißt luftgetrocknete Zell-Biocere betragen diese Werte 77 % für Uran und bei Kupfer zusätzlich 8 %. Es ist offensichtlich, dass im Falle des Sporen-Biocers diese Werte signifikant niedriger sind. Dies bedeutet, dass eine oder beide Komponenten im Sporen-Biocer deutlich weniger binden als die Summe der freien Einzelkomponenten. Die Ursache für diese Diskrepanz kann mit der oben erläuterten Hypothese (Abb. 5.3a und zugehöriger Abschnitt) schlüssig erklärt werden. Dabei wird eine Verdichtung des Biocers durch die alleinige Schrumpfung der umgebenden SiO_2 -Matrix um die entwässerten Sporen angenommen. Da sowohl die Zellen als auch die Hüllproteinschichten analog zur Matrix schrumpfen, tritt der Effekt bei diesen Bioceren nicht auf.

Die Bindungskinetik der Metallbindung an Sporen zeigt im Gegensatz zu der freier Zellen eine schnellere Sorption der Metalle an die freie Biokomponente. So ist die maximale Menge bereits nach 0,5 h gebunden. Der zeitliche Verlauf der Bindung an stabilisierte Hüllproteine entspricht im Falle des Urans dem der Sporen, im Falle des Kupfers erfolgt eine maximale Bindung erst nach 48 h, wobei die Bindungskapazitäten der freien Hüllproteinschichten im Vergleich zu allen anderen Komponenten relativ gering sind und die quantifizierten Mengen an Kupfer bereits im Bereich der Messschwankungen liegen.

Die Unterschiede in der Bindungskinetik lassen die Vermutung zu, dass die Bindung der Metalle durch die drei Biokomponenten entweder an unterschiedlichen funktionellen Gruppen erfolgt oder die funktionellen Gruppen in verschieden hoher Anzahl zur Verfügung stehen. Als Grundlage für einen Erklärungsversuch am Beispiel des Urans sind mehrere Fakten von Bedeutung: 1) Es erfolgt eine Bindung von Uran bei niedrigen Konzentrationen sowohl an die Biokomponente als auch an die Biocere zu 100 % (Panak 1999 et al., eigene Arbeiten). 2) Die maximale Bindung kann auch nach 11facher Inkubation mit Uranylнитratlösungen nicht endgültig erreicht werden, sondern erhöht sich selbst nach mehrfacher Inkubation mit 35 ml 3×10^{-4} M Uranylнитratlösung. 3) In Abhängigkeit von der Konzentration binden intakte Zellen von *B. sphaericus* zunächst bei niedrigen Urankonzentrationen das Metall selektiv an das Hüllprotein der Zellwand und erst bei höheren Konzentrationen an die Phosphatgruppen der sekundären Zellwandpolymere wie Teichonsäuren (IR-spektroskopische Untersuchungen, Beveridge und Murray 1980).

Die Bindung des Urans an die Sporen erfolgt am Exosporium und eventuell der Sporenhülle, die beide hauptsächlich aus Polypeptiden bestehen (Holt et al. 1975). Die Hüllproteine hingegen besitzen neben den proteintypischen funktionellen Gruppen (ausgenommen sind Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten, die bei Hüllproteinen von Bakterien selten sind) nur einige wenige Phosphatgruppen als weitere Bindungsstellen. Desweiteren scheint es sich um einen mehrstufigen Prozess zu handeln. Die Bindung geringer Metallkonzentrationen erfolgt durch Sorptionsprozesse, die sehr schnell verlaufen und zu festen Bindungen des Metalls führen, während es bei höheren Konzentrationen im Falle des Urans zu einer Oberflächenpräzipitation kommt, die durch die vorausgehende Bindung erst initiiert wurde. Dies wird auch durch die Bindungskinetiken und die unter 2.) im letzten Abschnitt ausgeführten Beobachtungen gestützt.

Für eine Anwendung ist zusätzlich von Interesse, inwieweit eine Regeneration des beladenen Filtermaterials möglich ist. Zu diesem Zweck wurde die Desorption der gebundenen Metalle untersucht.

Für diese Versuche wurden verschieden hergestellte Zell-Biocere eingesetzt, da diese die höchsten Bindungskapazitäten aufweisen und dort auch verschieden poröse Biocere (luft- und gefriergetrocknet sowie mit Sorbit) verfügbar waren. Sowohl für Uran als auch für Kupfer konnte gezeigt werden, dass die gebundenen Metallionen von den Xerogelen, den freien Zellen und den Bioceren mittels Citrat-Puffer komplett wieder abgelöst werden konnten. Deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch bei der Uran- und Kupfersorption hinsichtlich der Stabilität der Bindung. Während nur geringe Mengen Uran durch Spül- und Waschschriffe abgelöst werden und der größte Anteil des gebundenen Urans erst mit einem starken Komplexbildner wie Citrat vollständig desorbiert werden kann, wird Kupfer bereits bei den ersten Schritten mit ausgewaschen. Es lässt sich somit feststellen, dass die Biocere im Falle beider untersuchter Metalle bereits mit einem Desorptionsschritt vollständig regenerieren und für eine erneute Beladung verwendet werden können. Durch die Ergebnisse der Sorptions- und Desorptionsversuche wurde die Eignung der Biocere als Ausgangsmaterial zur Entwicklung von Bioremediationsprozessen zur Reinigung wässriger radionuklid- und schwermetall-belasteter Flüssigkeiten nachgewiesen.

5.4 Ausblick

Voraussetzung für die vollständige Entschlüsselung der Hüllproteinsequenzen beider *B. sphaericus*-Stämme auf DNA und Proteinebene wären zunächst die N-terminale Sequenzierungen weiterer proteolytisch gewonnener Fragmente und die C-terminale Sequenzierungen der nativen Proteine. Darauf aufbauend und auf der Basis konservierter Bereiche anderer Hüllproteine könnten weitere Primer entworfen werden, die durch eine spezifische Amplifikation von Teilstücken des strukturokodierenden Teils der Hüllproteingene mittels PCR und der Sequenzierung auf DNA-Ebene schließlich die Klärung der kompletten Primärstrukturen beider Hüllproteine ermöglichen würden. Sollte sich die hohe Übereinstimmung der Primärstruktur der Hüllproteine beider *B. sphaericus*-Stämme fortsetzen, eröffnet dies die bereits erwähnte Möglichkeit, die wenigen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen den unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften zuordnen zu können. Die Kenntnis der Primärstruktur wäre außerdem die Voraussetzung für eventuelle röntgenkristallographische Untersuchungen an diesen Proteinen. Es gibt allerdings noch keine Strukturdaten zu Hüllproteinen. Vor kurzem wurden jedoch erstmals erfolgreich dreidimensionale Kristalle von Hüllproteinen durch die Arbeitsgruppe von Prof. H. König, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz während eines Spaceshuttle-Fluges erhalten.

Die metallbindenden Eigenschaften der Hüllproteinschichten könnten durch gezielte Modifikationen sicherlich deutlich gesteigert und ihre Spezifität erhöht werden. Dies wäre im einfachsten Fall durch die chemische Anbindung von metallbindenden Peptiden wie zum Beispiel Gly-His-His-Pro-His-Gly, Gly-Cys-Gly-Cys-Pro-Cys-Gly-Cys-Gly (Kotrba et al. 1996, 1999, Gadd 2000), (Cys-Gly-Cys-Cys-Gly)₃ (Pazirandeh et al. 1998) oder Polyhistidyl-Reste (Morgan 1985, Samuelson et al. 2000) an EDC-aktivierte Hüllproteinschichten denkbar. Eine andere Möglichkeit eröffnet sich durch die molekularbiologische Konstruktion von Fusionsproteinen aus den Hüllproteinen und den zuvor genannten Peptiden. Die so modifizierten Hüllproteinschichten könnten dann ebenfalls in Form von Bioceren immobilisiert und als Säulenmaterial für Bioremediationsprozesse verwendet werden. Etwas anders verhält es sich bei den Sporen-Bioceren. Hier müsste zunächst mittels einer Oberflächenbestimmung nach Brunauer-Emmett-Teller (BET) die in Kap. 5.4 (Abb. 5.4a) aufgestellte Hypothese überprüft werden. Bei Verifizierung könnten die Bindungskapazität der Sporen-Biocere durch Verwendung von Penetrationsmitteln wie Sorbit zur Herstellung oder durch Gefriertrocknung der Biocere deutlich gesteigert werden. Einer der nächsten Schritte zur Evaluierung der Remediationstauglichkeit der Biocere mit verschiedenen immobilisierten Biokomponenten wäre die Untersuchung der Bindungskapazitäten und -kinetiken unter Verwendung von Metallsalzmischungen und realen Sickerwässern mit ihrer Vielzahl gelöster Metallionen, da hier entsprechend den pH-Werten der Sickerwässer verschiedene Speziationsverteilungen des Urans vorliegen.

6 **Schlußfolgerungen**

- 1) Das Uranabfallhalden-Isolat *Bacillus sphaericus* JG-A12 besitzt eine Hüllproteinschicht mit tetragonaler Gittersymmetrie und einer Gitterkonstante von 12,5 nm. Die Hüllproteinmonomere weisen ein Molekulargewicht von (135±5) kDa auf, sind nicht glykosyliert und enthalten zwei verschieden fest gebundene Phosphorspezies. Das molare Verhältnis von Phosphor zu Monomer beträgt 1,7 : 1. In diesen Eigenschaften zeigt sich eine hohe Übereinstimmung zu dem Hüllprotein des Referenzstammes *B. sphaericus* NCTC 9602. Dieses Hüllprotein bildet ebenfalls ein Gitter mit tetragonaler Symmetrie und mit einer Gitterkonstante von 12,9 nm aus. Es ist nicht glykosyliert und enthält zwei verschiedene Phosphorspezies im Phosphor zu Protein Verhältnis 0,9 : 1.
- 2) Eine neue Methode zum schnellen Nachweis von Hüllproteinen auf Gram-positiven Bakterien wurde entwickelt und für alle verwendeten Bakterien erfolgreich eingesetzt. Diese beruht auf einem Lysozymverdau und der Visualisierung abgelöster Hüllproteinschichten im AFM oder TEM. Besonderer Vorteil ist die geringe Menge an dazu notwendiger Biomasse.
- 3) Das Hüllproteingitter des Haldenisolats weist verglichen mit dem des Referenzstamms eine höhere Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten auf, ist aber weniger stabil in Gegenwart von Proteasen.
- 4) Die Sequenzanalysen der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 und der entsprechenden Gene zeigen, dass deren N-Termini je drei SLH-Domänen besitzen, sich jedoch die N-terminalen Domänen (Aminosäure 0-182) insgesamt völlig von denen der bereits bekannten Hüllproteine von *B. sphaericus* P-1, CCM 2177 und WHO 2362 unterscheiden. Vergleiche der weiteren Proteinabschnitte vom entschlüsselten Teil des Hüllproteins von *B. sphaericus* JG-A12 (Aminosäure 183-495 von geschätzten 1200) weisen demgegenüber hohe Identitäten insbesondere zu dem Hüllprotein von *B. sphaericus* P-1 aber auch zu dem von *B. sphaericus* CCM 2177 auf. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die N-terminale Domäne (Aminosäure 0-182) der Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 von einem Genabschnitt codiert wird, der durch einen horizontalen Transfer ursprünglich von einem anderen Bakterium übertragen wurde. Besonders hohe Identitäten der nachfolgenden Aminosäuresequenzen (Position 193-348) bei Hüllproteinschichten mit gleicher Symmetrie sind ein konkreter Hinweis für deren Bedeutung bei der Ausbildung einer bestimmten Symmetrie.

- 5) Aufbauend auf der Kenntnis der Gensequenz der N-terminalen Domänen der Hüllproteine können die *B. sphaericus* Stämme JG-A12 und NCTC 9602 mittels PCR-RFLP unter Verwendung von *MseI* identifiziert und voneinander unterschieden werden. Zum einen ermöglicht dies eine schnelle und einfache Kontrolle im Hinblick auf die Reinheit der Kultur und zum anderen können damit mögliche Veränderungen im Hüllproteingen erkannt werden. Beides ist von besonderer Bedeutung für die Qualitätssicherung bei der Herstellung von Biokeramiken.
- 6) Die Hüllproteine von *B. sphaericus* JG-A12 und NCTC 9602 binden Platin und Palladium. Platin wird in beiden Fällen über die CO- und NH-Gruppen der Peptidbindungen sowie exponierte COOH- und vor allem OH-Gruppen gebunden. Die Palladiumbindung erfolgt beim Hüllprotein von *B. sphaericus* JG-A12 bevorzugt an die NH-Gruppe der Peptidbindung sowie die COOH-Gruppen und beim Hüllprotein von *B. sphaericus* NCTC 9602 sowohl an die CO-Gruppen der Peptidbindungen, als auch an die OH- und COOH-Gruppen. Stabilisierte Hüllproteine binden außerdem Uran. Es konnte primär eine Wechselwirkung zwischen Uran und der NH-Gruppe der Peptidbindung und sekundär zwischen Uran und OH- sowie zwei verschiedenen PO₄-Gruppen nachgewiesen werden. Die Wechselwirkungen der Hüllproteine mit Metallen entsprechen denen bereits beschriebener Proteine. Die Selbstassemblierungseigenschaft der Hüllproteine erlaubt jedoch eine einfache Funktionalisierung von Oberflächen. Durch eine molekularbiologische oder chemische Modifikation der Hüllproteine könnten zusätzliche Histidin- und Cysteinreste eingebracht und so die Metallbindungskapazität und -spezifität gesteuert werden.
- 7) Der erste Schritt zu einer großtechnischen Umsetzung der Verwendung von Biokomponenten zur Reinigung kontaminierter Abwässer konnte erfolgreich durch die Immobilisierung verschiedener Komponenten wie intakte Zellen, Sporen und Hüllproteine in einer stabilen SiO₂-Matrix mittels Sol-Gel-Technik realisiert werden. Die daraus erhaltenen biologisierten Keramiken = Biocere binden Uran hauptsächlich und Kupfer ausschließlich an den eingebetteten Biokomponenten. Die Bindungskapazitäten sind für Uran 10-17fach höher als für Kupfer und liegen für die Biocere mindestens 2,7-42fach über denen bereits verwendeter Materialien. Die Biocere können unter Verwendung von Citrat vollständig regeneriert werden.
- 8) Durch Optimierungen des Herstellungsprozesses wie Gefriertrocknung der Biocere oder Zusatz von Penetrationsmitteln kann die Porosität der Biokeramiken günstig beeinflusst und damit eine schnellere Bindungskinetik erreicht werden.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1.1.1a:	Lokalisation von Hüllproteinen auf Zellwänden von Archaea und Eubakterien (Sleytr et al. 1993)	1
Abb. 1.1.1b:	Mögliche Symmetrien bakterieller Hüllproteine (Sleytr et al. 1993)	2
Abb. 3.6:	Eichkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Eichkurve wurde mit 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 und 400 µg Rinderserumalbumin pro 1 ml 0,1 M NaCl erstellt.	24
Abb. 3.11.1a:	Polymerisation von Glutaraldehyd (Aldolkondensation)	34
Abb. 3.11.1b:	Reaktionsschema von Glutaraldehyd mit primären Aminogruppen	35
Abb. 3.11.2:	Amidierung von Carboxylgruppen mittels EDC	36
Abb. 3.17.2:	Speziationskurve von 9×10^{-4} M Uranylнитrat in 0,9 % NaClO ₄ -Lösung, pH 4,5 an Luft, erstellt mit dem Programmpaket "EQ3/6" und der NEA Datenbasis (Wolery 1992, Grenthe et al. 1992).	46
Abb. 3.20.1:	Silizium Sol-Gel-Reaktion	50
Abb. 4.1.1a.:	Wachstumskurve von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (A) und NCTC 9602 (B). Die Anzucht erfolgte unter Begasung mit Luft mit einer Durchflussrate von 3 l min ⁻¹ . Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt.	53
Abb. 4.1.1b:	AFM-Aufnahme (Amplitudenbilder) des Haldenisolats JGA-12 (links) und des Referenzstamms NCTC 9602 (rechts)	54
Abb. 4.1.2a:	Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte von <i>B. sphaericus</i> JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362 und CCM2177 im 10 %igen silbergefärbten SDS-Gel	55
Abb. 4.1.2b:	Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte verschiedener <i>Bacillus</i> -Stämme im 10 %igen silbergefärbten SDS-Gel.	55
Abb. 4.2.:	Im linken Bild ist eine AFM-Aufnahme (Höhenbild) von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 mit freier Hüllproteinschicht (siehe Pfeil) gezeigt, rechts eine AFM-Aufnahme (Amplitudenbild) freier Hüllproteinschichten des selben Ansatzes mit eingeblendetem Powerspektrum. 57	
Abb. 4.3.1a:	Proteinprofile der zellfreien Rohextrakte und der isolierten Hüllproteine beider <i>B. sphaericus</i> -Stämme JGA-12 und NCTC 9602 im 10 %igen Coomassie Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gel	58
Abb. 4.3.1b:	TEM-Aufnahmen der isolierten Hüllproteinschichten des Haldenisolats JG-A12 (links, der Pfeil kennzeichnet ein mögliches Geißelfragment) und des Referenzstamms NCTC 9602 (rechts)	59
Abb. 4.3.1c.:	SDS-PAGE (im 7,5 %igen Coomassie Brilliant Blau-gefärbten Gel) der einzelnen Fraktionen während der Hüllproteinisolierung (<i>B. sphaericus</i> JG-A12)	60
Abb. 4.3.3a.:	SDS-PAGE (im 10 %igen Coomassie Brilliant Blau-gefärbten Gel) verschiedener Hüllproteine und eines Glykoproteins	62

Abb. 4.3.3b.:	SDS-PAGE (im 10 %igen Gel) verschiedener Hüllproteine und eines Glykoproteins nach spezifischer Färbung (Rotfärbung) zum Nachweis von Glykoproteinen. Die Spurbelegung entspricht der von Abb. 4.3.3a, es wurden lediglich von jeder Probe 30 µg Protein aufgetragen.	62
Abb. 4.4a:	pH-abhängige Dissoziation der Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12	63
Abb. 4.4b:	pH-abhängige Dissoziation der Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	64
Abb. 4.4c:	pH-abhängige Dissoziation der Glutaraldehyd-vernetzten (G) Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12	64
Abb. 4.4d:	pH-abhängige Dissoziation der Glutaraldehyd-vernetzten (G) Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	65
Abb. 4.4e:	pH-abhängige Dissoziation der EDC-vernetzten (E) Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12	65
Abb. 4.4f:	pH-abhängige Dissoziation der EDC-vernetzten (E) Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602	66
Abb. 4.4g:	AFM-Aufnahmen vernetzter Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (links, Vernetzung mit EDC) und von NCTC 9602 (rechts, Vernetzung mit Glutaraldehyd)	66
Abb. 4.5a.:	N-terminale Aminosäuresequenzen der isolierten Proteine	67
Abb. 4.5b.:	N-terminale Aminosäuresequenzen verschiedener Flagelline	68
Abb. 4.6.1a.:	SDS-PAGE (im 10 %igen silbergefärbten Gel) der proteolytischen Ansätze (Ansatz 1, Kap 3.8.2) der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602, verdaut mit Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K.	70
Abb. 4.6.1b.:	SDS-PAGE (im 10 %igen silbergefärbten Gel) der proteolytischen Ansätze (Ansatz 3, Kap 3.8.2) der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12, <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602, <i>B. sphaericus</i> WHO 2362 und <i>B. sphaericus</i> CCM 2177 mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin. Alle Verdauungsansätze wurden für zwei Tage bei 4°C inkubiert	71
Abb. 4.6.1c.:	SDS-PAGE aus Abb. 4.6.1b mit Markierungen der übereinstimmenden proteolytischen Fragmente und den enthaltenen Proteasen.	72
Abb. 4.6.2a.:	PVDF-Membran gefärbt mit Ponceau S (Ansatz 4, Kap 3.10.2): Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602, verdaut mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin. Alle Verdauungsansätze wurden für zwei Tage bei 4°C inkubiert	74
Abb. 4.6.2b.:	N-terminale Aminosäuresequenzen der isolierten Fragmente	74
Abb. 4.6.2c.:	PVDF-Membran gefärbt mit Ponceau S (Ansatz 5, Kap 3.10.2): Hüllprotein von <i>B. sphaericus</i> JG-A12, verdaut mit Thermolysin. Alle Verdauungsansätze wurden für zwei Tage bei 4°C inkubiert	75
Abb. 4.6.2d.:	N-terminale Aminosäuresequenzen der isolierten Fragmente	75

Abb. 4.8.1a.:	Agarosegel der elektrophoretisch aufgetrennten DNA von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602. Neben genomischer DNA der Bakterien ist in Form niedermolekularer Banden die 23 S- (2,9 kb) und die 16 S-rRNA (1,5 kb) zu sehen.	78
Abb. 4.8.1b.:	Agarosegel der elektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate der hüllproteinspezifischen PCR mit DNA von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602. Es wurde jeweils 1 µl des Ansatzes aufgetragen.	79
Abb. 4.8.1c.:	Agarosegel der elektrophoretisch getrennten PCR-Produkte der Reamplifikation der PCR-Produkte von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602. Es wurde jeweils 1 µl des Ansatzes aufgetragen.	80
Abb. 4.8.3a:	DNA-Sequenzen der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602. Unterstrichen dargestellt sind abgeleitete oder nicht eindeutige Basen. Schwarz unterlegt sind auf Abweichungen in der Protein- und DNA-Sequenzierung zurückzuführende Basen gekennzeichnet. Unterschiedliche Basen beider Stämme sind dunkelgrau unterlegt mit weißer Schrift.	82
Abb. 4.8.3b:	N-terminale Aminosäuresequenzen, abgeleitet aus den DNA-Sequenzen der 5'-Enden der strukturellen Teile der Hüllproteingene von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602. Die Basensequenzen wurden nur soweit berücksichtigt, wie die Bestimmung eindeutig erfolgen konnte. Unterschiedliche Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt mit weißer Schrift.	83
Abb. 4.9:	Vergleichsanalyse der nächst verwandten Hüllproteine verschiedener <i>B. sphaericus</i> -Stämme und von <i>B. firmus</i> OF4. Zusätzlich ist zum Vergleich die Konsensussequenz von SLH-Domänen mit aufgeführt. Konservierte Aminosäurereste der Konsensussequenz sind mit einem Stern gekennzeichnet.	84-85
Abb. 4.10a:	Theoretisches und reales Banden-Muster des Verdaus der <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 Amplifikate mit MseI.	86
Abb. 4.11.1.1a:	FT-IR-Spektrum der Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 20 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.	87
Abb. 4.11.1.1b:	FT-IR-Spektrum der Glutaraldehyd-vernetzten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 10 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.	88
Abb. 4.11.1.1c:	FT-IR-Spektrum der EDC-vernetzten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 20 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.	89
Abb. 4.11.1.1d:	FT-IR-Spektrum der EDC-vernetzten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 inkubiert mit Uranylнитrat (Referenz: 20 mg Protein, Probe 20 mg Protein + 10 mg Uran). Die Spektren sind in y-Richtung versetzt dargestellt.	89

Abb. 4.11.1.2a:	FT-IR-Spektren (in y-Richtung gestaffelt) der nativen und mit Palladium oder Platin metallisierten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (Referenz: 60 mg Protein, Probe je 30 mg Protein + 10 mg Palladium oder Platin).	91
Abb. 4.11.1.2b:	FT-IR-Spektren (in y-Richtung gestaffelt) der nativen und mit Palladium oder Platin metallisierten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 (Referenz: 60 mg Protein, Probe je 30 mg Protein + 10 mg Palladium oder Platin)	91
Abb. 4.11.2:	EXAFS-Spektrum der Uran-Hüllproteinkomplexe der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 an der U _{LIII} -Kante bei 17185 eV (links k ₃ -gewichtetes EXAFS-Spektrum, rechts fouriertransformiertes Spektrum).	93
Abb. 4.13.1:	Biocer mit immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen (links oben), Biocer mit Sporen von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Sporen (rechts oben, der Pfeil markiert eine Spore), Biocer mit immobilisierten und stabilisierten Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (links, der Pfeil markiert die Hüllproteinschichten)	96
Abb. 4.13.2a:	Freie <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ (rechts).	97
Abb. 4.13.2b:	Xerogel nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ (rechts).	97
Abb. 4.13.2c:	Biocer mit immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ (rechts).	98
Abb. 4.13.2d:	Biocer mit immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen, hergestellt unter Verwendung des Penetrationsmittels Sorbit nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ (rechts).	98
Abb. 4.13.2e:	Gefriergetrocknetes Biocer mit immobilisierten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O (links) und nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ (rechts).	98
Abb. 4.13.3.1a:	EDX-Analyse der intakten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen (oben) und des Xerogels (unten) nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O.	99
Abb. 4.13.3.1b:	EDX-Analyse der intakten <i>B. sphaericus</i> JG-A12 Zellen (oben) und des Xerogels (unten) nach der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ .	100
Abb. 4.13.3.2a:	Uran-Metallbindungskinetik des Xerogels, der freien Zellen und der verschiedenen Biocere bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M UO ₂ (NO ₃) ₂ x 6H ₂ O.	101
Abb. 4.13.3.2b:	Kupfer-Metallbindungskinetik des Xerogels, der freien Zellen und verschiedener Biocere bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M CuCl ₂ .	103

Abb. 4.13.3.2c:	Uran-Metallbindungskinetik der freien Sporen von JG-A12 und des Biocers mit Sporen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $UO_2(NO_3)_2 \times 6 H_2O$.	104
Abb. 4.13.3.2d:	Kupfer-Metallbindungskinetik der freien Sporen von JG-A12 und des Biocers mit Sporen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $CuCl_2$.	106
Abb. 4.13.3.2e:	Uran-Metallbindungskinetik der Hüllproteine von JG-A12 und des Biocers mit Hüllproteinen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $UO_2(NO_3)_2 \times 6 H_2O$.	107
Abb. 4.13.3.2f:	Kupfer-Metallbindungskinetik der freien Hüllproteine von JG-A12 und des Biocers mit Hüllproteinen von JG-A12 bei der Inkubation mit 9×10^{-4} M $CuCl_2$.	108
Abb. 4.13.3.3a:	Uran-Desorption vom Xerogel, intakten JG-A12-Zellen und Bioceren mit intakten JG-A12 Zellen. Ausgangswerte an gebundenem Uran in Klammern.	109
Abb. 4.13.3.3b:	Kupfer-Desorption vom Xerogel, freien, intakten JG-A12-Zellen und Bioceren mit intakten JG-A12 Zellen. Ausgangswerte an gebundenem Kupfer in Klammern.	111
Abb. 5.1a:	TEM-Aufnahmen Uranylacetat-kontrastierter, nativer Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (links, A,B,C) und von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602 (rechts, D,E,F). Jeweils darunter sind die Powerspektren (B,E) und die daraus errechneten Rekonstruktionen (C,F) der Gitterstrukturen dargestellt.	114
Abb. 5.1b:	Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602, <i>B. sphaericus</i> JG-A12, <i>B. sphaericus</i> P-1, <i>B. sphaericus</i> CCM 2177 (ATCC 4525) und <i>B. sphaericus</i> WHO 2362. Die Identitäten sind in Prozent dargestellt, errechnet mit dem Programm Blast (Tatusova und Madden 1999). Mit „-“ sind nicht signifikante Identitäten, das heißt unter 20 %, gekennzeichnet.	119
Abb. 5.1c.:	In der Abbildung ist eine TEM-Aufnahme des Hüllproteingitters von <i>B. sphaericus</i> WHO 2362 dargestellt (der Balken am linken unteren Bildrand entspricht 100 nm). In der rechten oberen Ecke ist eine korrelationsgemittelte, symmetrisierte Bildrekonstruktion der TEM-Aufnahme zu sehen (der Balken entspricht 9 nm). Die Gitterkonstante beträgt demnach 9,4 und 12,8 nm bei einem Winkel von 71 Grad. (Mit freundlicher Genehmigung von R. Wahl)	121
Abb. 5.1d:	Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine von <i>B. sphaericus</i> WHO 2362 und <i>B. firmus</i> OF4. Die Identitäten sind in Prozent dargestellt, errechnet mit dem Programm Blast (Tatusova und Madden 1999).	121
Abb. 5.3a:	Schema des Schrumpfungsverhaltens von Zell-Biocer (A vor und B nach der Trocknung) und von Sporen-Biocer (C vor und D nach der Trocknung). Die Größenverhältnisse der intakten Zellen, getrockneten Zellen und der Sporen entsprechen denen der rasterelektronenmikroskopischen und atomkraftmikroskopischen Aufnahmen dieser Komponenten.	129
Abb. 5.3b:	Zusammenstellung der Bindungskapazitäten bei einmaliger Inkubation von jeweils 200 mg der einzelnen Komponenten mit 35 ml einer 9×10^{-4} M Uranylнитrat- oder Kupferchloridlösung in 0,9 % $NaClO_4$ -Lösung, pH 4,5 für 48 h.	131

Abb. 5.3c:

Zusammenstellung der Bindungskapazitäten bei einmaliger Inkubation von jeweils 200 mg der Biocere mit 35 ml einer 9×10^{-4} M Uranylнитrat- oder Kupferchloridlösung in 0,9 % NaClO_4 -Lösung, pH 4,5 für 48 h. Der Anteil an gebundenem Metall im Verhältnis zu den angebotenen Mengen ist in Prozent angegeben.

132

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.1:	Bakterien mit bekannter Hüllprotein-Sequenz (komplette Sequenz, Teile davon oder Precursor)	4
Tab. 3.8.1:	Pipettierschema zur Herstellung von Gelen: Die Angaben sind in ml pro zwei Gele in der Mini-PROTEAN® II Kammer und in ml pro Gel für das DCode®-System (Mengen in Klammern)	26
Tab. 3.10.2:	Pipettierschema zur Herstellung von Proteolyseansätzen	34
Tab. 3.14.2:	Temperatur-Programm zur Amplifikation von DNA mittels PCR	41
Tab. 3.14.4:	Temperatur-Programm für die Sequenzierungsreaktion	42
Tab. 4.6.1:	Entstehende Fragmente mit identischem Molekulargewicht nach einem proteolytischen Verdau der Hüllproteine der <i>B. sphaericus</i> -Stämme JG-A12, NCTC 9602, WHO 2362 und CCM 2177 mit Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K und Thermolysin.	72
Tab. 4.11.2:	Bindungslängen und Koordinationszahlen aus den Wechselwirkungen von Uran mit Hüllproteinen	94
Tab. 4.12:	Phosphorgehalte intakter Zellen, Sporen (soweit verfügbar), Zellwände und der Hüllproteinschichten von <i>B. sphaericus</i> JG-A12 und <i>B. sphaericus</i> NCTC 9602.	95

8 Literatur

- Adachi, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. und Udaka, S. (1989): Multiple and Tandemly Arranged Promoters of the Cell Wall Protein Gene Operon in *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 171 (2): 1010-1016
- Al-Saraj, M., Abdel-Latif, M.S., El-Nahal, I. und Baraka R. (1999): Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. *J. Non-Cryst. Solids* 248: 137-140
- Ankudinov, A.L., Ravel, B., Rehr, J.J. und S.D. Conradson (1998): Real Space Multiple Scattering Calculation of XANES. *Phys. Rev. B*, 7565
- Apitz, A., van Pée, K.-H. (2001): Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch. Microbiol.* 175: 405-412
- Armon, R., Starosvetzky J. und Saad, I. (2000): Sol-Gel as Reaction Matrix for Bacterial Enzymatic Activity. *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 19: 289-292
- Austin, J.W. und Murray, R.G.E. (1990): Isolation and In Vitro Assembly of the Components of the Outer S Layer of *Lamprospira hyalina*. *J. Bacteriol.* 172 (7): 3681-3689
- Bahl, H., Scholz, H., Bayan, N., Chami, M., Leblon, G., Gulik-Krzywicki, T., Shechter, E., Fouet, A., Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., Conway de Macario, E., Macario, A.J.L., Fernández-Herrero, L.A., Olabarria, G., Berenguer, J., Blaser, M.J., Kuen, B., Lubitz, W., Sára, M., Pouwels, P.H., Kolen, C.P.A.M., Boot, H.J., Palva, A., Truppe, M., Howarka, S., Schroll, G., Lechleitner, S. und Resch, S. (1997); IV. Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 47-98
- Baumeister, W., Karrenberg, F., Rachel, R., Engel, A., Ten Heggeler, B. und Saxton, W.O. (1982): The Major Cell Envelope Protein of *Micrococcus radiodurans* (R1). Structural and Chemical Characterization. *Eur. J. Biochem.* 125: 535-544
- Baumeister, W. und Hegerl, R. (1986): Can S-layers make bacterial connexons? *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 119-125
- Baumeister, W. und Engelhardt, H. (1987): Three-dimensional structure of bacterial surface layers. In: Harris, J.R. und Horne R.W., London: Acad. Press 109-154
- Baumeister, W., Wildhaber, I. und Phipps B.M. (1989): Principles of organization in eubacterial and archaeobacterial surface proteins. *Can J Microbiol* 35: 215-227
- Bertagnolli H. und Ertel T.S. (1994): Röntgenabsorptionsspektroskopie an amorphen Festkörpern, Flüssigkeiten, katalytischen und biochemischen Systemen – möglichkeiten und Grenzen. *Angew. Chem.* 106: 15-37
- Beveidge, T.J. und Murray, R.G.E. (1976): Dependence of the superficial layers of *Spirillum putridiconchylum* on Ca^{2+} or Sr^{2+} . *Can J Microbiol* 22: 1233-1244
- Beveridge, T.J. (1979): Surface Arrays on the wall of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.* 139 (3): 1039-1048
- Beveridge, T. J. und Murray, R. G. E. (1980): Sites of Metal Deposition in the Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141 (2): 876-887
- Beveridge, T. J. (1994): Bacterial S-layer. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 204-212
- Beynon, R.J. und Bond J.S. (1989): *Proteolytical Enzymes – a practical approach*. 3.Aufl. Oxford: IRL Press, Oxford University Press
- Blaser, M.J. und Pei, Z. (1993a): Pathogenesis of *Campylobacter fetus* Infections: Critical Role of High-Molecular-Weight S-layer Proteins in Virulence. *J. Infect. Dis.* 167:372-377
- Blaser, M.J. (1993b): Role of the S-layer Proteins of *Campylobacter fetus* in Serum-Resistance and Antigenic Variation: a Model of Bacterial Pathogenesis. *Am. J. med. Sci.* 306 (5):325-329

- Blaser, M.J., Wang, E., Tummuru, M.K.R., Washburn, R., Fujimoto, S. und Labigne, A. (1994): High frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by *sapA* mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 14: 521-532
- Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M., und Pouwels, P. H. (1995): Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species. *J. Bacteriol.* 177: 7222-7230
- Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M., Pot, B., Kerstens, K. und Pouwels, P. H. (1996a): The presence of two S-layer-protein-encoding genes is conserved among species related to *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 142: 2375-2384
- Boot, H. J. und Pouwels, P. H. (1996b): MicroReview: Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Molecular Microbiology* 21 (6): 1117-1123
- Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M. und Pouwels, P. H. (1996c): Interchange of the active and silent S-layer protein genes of *Lactobacillus acidophilus* by inversion of the chromosomal *slp* segment. *Molecular Microbiology* 21 (4): 799-809
- Boot, H. J., Kolen, C. P. A. M., Andreadaki, F. J., Leer, R. J. und Pouwels, P. H. (1996d): The *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequences, one of which directs transcription of stable m RNA. *J Bacteriol* 178: 5388-5394
- Böttcher, H. (2000): Bioactive Sol-Gel Coatings. *J. Prakt. Chem.* 342, 427-436
- Bowditch, R.D., Baumann, P. und Yousten, A.A (1989): Cloning and sequencing of the gene encoding a 125-kilodalton surface-layer protein from *Bacillus sphaericus* 2362 and of a related cryptic gene. *J. Bacteriol* 171 (8): 4178-4188
- Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D. und Ottolenghi M. (1990): Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Mat. Lett.* 10 (1,2):1-5
- Breitweiser, A., Küpcü, S., Howorka, S., Weigert, S., Langer, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Sleytr, U.B. und Sára, M. (1996): 2-D protein crystals as an immobilization matrix for producing reaction zones in dipstick-style immunoassays. *Biotech.* 21 (5): 918-925
- Breitweiser, A., Mader, C., Schocher, I., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Aberer, W., Sleytr, U.B. und Sára, M. (1998): A novel dipstick developed for rapid Bet v 1-specific IgE detection: recombinant allergen immobilized via a monoclonal antibody to crystalline bacterial cell-surface layers. *Allergy* 53: 786-793.
- Callegari, M. L., Riboli, B., Sanders, J.W., Cocconcelli, P.S., Kok, J., Venema, G. und Morelli, L. (1998): The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiol.* 144: 719-726
- Carl, M., Dobson, ME., Ching, W.-M. und Dasch, G.A. (1990): Characterization of the gene encoding the protective paracrystalline-surface-layer protein of *Rickettsia prowazekii*: Presence of a truncated identical homolog in *Rickettsia typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8237-8241
- Carrey, E.A. (1990): Peptide Mapping. In: Creighton, T.E. *Protein structure - a practical approach*. Oxford: IRL Press, Oxford University Press, 117-144
- Castón, J.R., Berenguer, J., de Pedro, M.A. und Carrascosa, J.L. (1993): The S-layer Protein from *Thermus thermophilus* HB8 assembles into porin-like structures. *Mol. Microbiol.* 9 (1): 65-75
- Caturan, G., Campostrini, R. und Dirè S. (1989): Inorganic Gels for Immobilization of Biocatalysts: Inclusion of invertase-active whole Cells of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into Thin Layers of SiO₂ Gel Deposites on Glass Sheets. *J. Mol. Catal.* 57: L13-L16
- Chami, M., Bayan, N., Dedieu, J.-C., Leblon, G., Shechter, E. und Gulik-Krzywicki, T. (1995): Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Biol. Cell.* 83: 219-229

- Collins, Y. E., Stotzky, G. (1992): Heavy Metals Alter the Electrokinetic Properties of Bacteria, Yeasts, and Clay Minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5): 1592-1600
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H. und Jones, K.M. (1998): *Data for biochemical Research*. 3.Aufl. Oxford: Clarendon Press
- Dieluweit, S., Pum D. und Sleytr U.B. (1998): Formation of a gold superlattice on an S-layer with square lattice symmetry. *Supramolecular Science* 5: 15-19
- Dieluweit, S., (1999): *Zwei-Dimensionale Proteinkristalle (S-Schichten) als Matrix zur biomineralisation und biomimetischen Membranen*. Naturwissenschaftliche Dissertation. Wien
- Dooley, J.S.G., Engelhardt, H., Baumeister, W., Kay, W.W. und Trust, T.J. (1989): Three-Dimensional Structure of an Open Form of the Surface Layer from the fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* 171 (1): 190-197
- Doyle, R. J., Matthews, T. H. und Streips, U. N. (1980): Chemical Basis for Selectivity of Metals Ions by the *Bacillus subtilis*. *Cell Wall. J. Bacteriol.* 143 (1):471-480
- Doyle, R.J. (1989): How Cell Walls of Gram-Positive Bacteria Interact with Metal Ions. In T.J. Beveridge, R.J. Doyle (eds) *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley&Sons 275-293
- Dufrêne Y.F. (2001): Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32: 153-165
- Dworkin, J., Tummuru, M.K.R. und Blaser, M.J. (1995a): Segmental conservation of sapA Sequences in type B *Campylobacter fetus* Cells. *J. Biol.Chem.* 270 (25): 15093-15101
- Dworkin, J., Tummuru, M.K.R. und Blaser, M.J. (1995b): The Lipopolysaccharide-Binding Domain of the *Campylobacter fetus* S-Layer Protein Resides within the Conserved N Terminus of a Family of Silent and Divergent Homologes. *J. Bacteriol.* 177 (7): 1734-1741
- Dworkin, J. und Blaser, M.J. (1996): Generation of *Campylobacter fetus* S-layer protein diversity utilizes a single promoter on an invertible DNA segment. *Mol. Microbiol.* 19 (6): 1241-1253
- Ebisu, S., Tsuboi, A., Takagi, H., Naruse, Y., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. und Udaka S. (1990): Conserved structure of cell wall protein genes among protein-producing *Bacillus brevis* strains. *J. Bacteriol.* 172 (3): 1312-1320
- Egelseer, E., Schocher, I., Sára, M. und Sleytr U.B. (1995): The S-layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high-molecular-weight amylase. *J. Bacteriol.* 177 (6): 1444-1451
- Egelseer, E.M., Leitner, K., Jarosch, M., Hotzy, C., Zayni, S., Sleytr, U.B. und Sára, M. (1998): The S-layer proteins of two *Bacillus stearothermophilus* wild type strains are bound via their N-terminal region to a secondary cell wall polymer of identical chemical composition. *J. Bacteriol.* 180 (6) 1488-1495
- Engelhardt, H., Saxton, W.O. und Baumeister, W. (1986): Three dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.* 168 (1): 309-317
- Engelhardt, H. (1988): Bakterielle Surface-Layer. *Naturwissenschaftliche Mikrobiologie* 3: 64-73
- Engelhardt, H. und Peters, J. (1998): Structural Research on Surface Layers: A Focus on Stability, Surface Layer Homology Domains, and Surface Layer-Cell Wall Interactions. *J. Struct. Biol.* 124: 276-302
- Etienne-Toumelin, I., Sirard, J.-C., Duflot, E., Mock, M. und Fouet, A. (1995): Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: cloning and sequencing of the structural gene. *J. Bacteriol.* 177 (3): 614-620
- Faraldo, M.L.M., de Pedro, M.A. und Berenguer, J. (1988): Purification, composition and Ca²⁺-binding properties of the monomeric protein of the S-layer of *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* 235 (1,2): 117-121

- Fennouh, S., Guyon, S., Jourdat, C., Livage, J. und Roux, C. (1999): Encapsulation of bacteria in silica gels. C.R. Acad. Sci. Paris, t.2, Série IIc 625-630
- Fennouh, S., Guyon, S., Livage, J. und Roux, C. (2000): Sol-Gel Entrapment of *Eschericia coli*. J. Sol-Gel Sci. Techn. 19:647-649
- Finnie, K.S., Bartlett, J.R und Woolfrey, J.L. (2000): Encapsulation of sulfate-reducing bacteria in a silica host. J. Mater. Chem. 10: 1099-1101
- Flannery, A.V., Beynon, R.J. und Bond, J.S. (1989): Proteolysis of proteins for sequence analysis and peptid mapping. In: Beynon, R.J. und Bond, J.S. Proteolytical enzymes – a practical approach. Oxford: Irl Press 145-161
- Friis, N. und Myers-Keith, P. (1986): Biosorption of uranium and Lead by *Streptomyces longwoodensis*. Biotech. Bioeng. 18: 21-28
- Galtier, N., Gouy, M. und Gautier, C. (1996): SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput. Appl. Biosci. 12: 543-548
- Gadd, G.M., Stewart, A., White, C. und Mowll, J.L. (1984): Copper uptake by whole cells and protoplasts of a wild-type and copper-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 24:231-234
- Gadd, G.M. (2000): Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 271-279
- Gilmour, R., Messner, P., Guffanti, A.A., Kent, R., Scheberl, A., Kendrick, N. und Krulwich T.A. (2000): Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analyses of pH-Dependent Expression in Facultatively Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 Lead to Characterization of an S-Layer Protein with a Role in Alkaliphily. J. Bacteriol. 182: 21, 5969-5981
- Goundry, J., Davison, A.L., Archibald, A.R. und Baddiley, J. (1967): Short Communications: The Structure of the cell Wall of *Bacillus polymyxa* (N.C.I.B. 4747). Biochem. J. 104: 1c-2c
- Grenthe, I., Fuger, J., Konings, R.J.M., Lemire, R.J., Muller, A.B., Nguyen-Trung, C. und Wanner, H. (1992): Chemical Thermodynamics of Uranium. Amsterdam: Elsevier
- Hastie, A.T. und Brinton, C.C. Jr (1979a): Isolation, characterization, and in vitro assembly of the tetragonally arrayed layer of *Bacillus sphaericus*. J. Bacteriol. 138 (3): 999-1009
- Hastie, A.T. und Brinton, C.C. Jr (1979b): Specific interaction of the tetragonally arrayed protein layer of *Bacillus sphaericus* with its peptidoglycan sacculus. J. Bacteriol. 138 (3): 1010-1021
- Henning, C., Panak, P., Reich, T., Roßberg, A., Selenska-Pobell, S., Bernhard, G., Nitsche, H. (1999): EXAFS Investigation of U(VI) Complexes with *Bacillus* Strains. Report FZR-285:70
- Hennig, C., Panak, P. J., Reich, T., Roßberg, A., Raff, J., Selenska-Pobell, Matz, W., Bucher, J. J., Bernhard, G., Nitsche, H. (2001): EXAFS investigation of uranium(VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces. Radiochim. Acta. 89: 625-632
- Hider, R.C. (1984): Siderophore mediated Absorption of Iron. Struct. Bonding. 58: 25-87
- Hoare, D.G. und Koshland Jr., D.E. (1967): A method for quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. J. Biol. Chem. 242 (10):2447-2453
- Hoefler Scientific Instruments (1994): Protein electrophoresis – application guide. San Fransisco, Hoefler Scientific Instruments, 39-43
- Holt, S. C., Gauthier, J. J. und Tipper, D. J.(1975): Ultrastructural Studies of Sporulation in *Bacillus sphaericus*. J. Bacteriol. 122 (3): 1322-1338

- Houwink, A.L. (1953): A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum* spec. *Biochim. Biophys. Acta* 10: 360-366
- Hungerer, K. D. und Tipper, D. J. (1969): Cell Wall Polymers of *Bacillus sphaericus* 9602. I. Structure of the Vegetative Cell Wall Peptidoglycan. *Biochem. J.* 8 (9): 3577- 3587
- Hunkapiller, M.W., Lujan, W., Ostrander, F. und Hood, L.E. (1983): Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamid gels for amino acid sequence analysis. In: Hirs, C.H.W. und Timasheff, S.N. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press 91: 227-236
- Ilk, N., Kosma, P., Puchberger, M., Egelseer, E.M., Mayer, H.F., Sleytr, U.B. und Sára, M. (1999): Structural and Functional Analyses of the Secondary Cell Wall Polymer of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 That Serves as an S-Layer-Specific Anchor. *J. Bacteriol.* 181 (24): 7634-7646
- Inama, I., Dirè, S. und Caturan, G. (1993): Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol-gel layers on glass surfaces: Trapping, catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotech.* 30: 197-210
- Ishiguro, E.E., Kay, W.W., Ainsworth, T., Chamberlain, J.B., Austen, R.A., Buckley, J.T. und Trust, T.J. (1981): Loss of Virulence During Culture of *Aeromonas salmonicida* at High Temperature. *J. Bacteriol.* 148 (1): 333-340
- Jarosch, M., Egelseer, E.M., Mattanovich, D., Sleytr, U.B. und Sára, M. (2000): S-layer gene *sbsC* of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 146: 273-281
- Jarosch, M., Egelseer, E.M., Huber, C., Moll, D., Mattanovich, D., Sleytr, U.B. und Sára, M. (2001): Analysis of the structure-function relationship of the S-layer protein SbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 by producing truncated forms. *Microbiol.* 147: 1353-1363
- Kawata, T. und Masuda, K. (1972): Extracellular Crystalline Lattice Material of *Corynebacterium diphtheriae* Revealed by Electron Microscopy. *Japan. J. Microbiol.* 16 (6): 515-523
- Kay, W.W., Buckley, J.T., Ishiguro, E.E., Phipps, B.M., Monette, J.P.L. und Trust, T.J. (1981): Purification and Disposition of a Surface Protein Associated with Virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* 147 (3): 1077-1084
- Kirsch, R. (1998): Metallische Nanostrukturen auf biomolekularen Templaten. Naturwissenschaftliche Dissertation. Dresden
- König, H. (1988) Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.* 34: 395-406
- Koch, A.L. (1994): Growth Measurement. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. und Krieg, N.R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. 4. Aufl. Washington: American Society for Microbiology, 248-277
- Kotiranta, A.K., Ito, H., Haapasalo M.P.P. und Lounatmaa, K. (1999): Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 275-280
- Kotrba, P., Doleková, L., Pavlík, M. und Ruml, T. (1996): Rapid screening of peptides for heavy metal binding. *Biotech. Tech.* 10 (10): 773-778
- Kotrba, P., Dolecková, L., De Lorenzo, V. und Ruml, T. (1999): Enhanced Bioaccumulation of heavy metal ions by Bacterial Cells Due to Surface Display of Short Metal binding peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3): 1092-1098
- Koval, S.F. und Murray, R.G.E. (1984): The isolation of surface array proteins from bacteria. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62:1181-1189
- Koval, S.F. und Murray, R.G.E. (1986): The superficial protein arrays on bacteria. *Microbiol. Sci.* 3 (12): 357-361

- Koval, S.F. und Hynes, S.H. (1991): Effect of Paracrystalline Protein Surface Layers on Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J. Bacteriol. 173 (7):2244-2249
- Kuen, B. und Lubiz, W. (1996a): Analysis of S-layer proteins and genes In: Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D. und Sára, M. Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins, London: Academic Press 77-102
- Kuen, B., Sára, M. und Lubiz, W. (1996b): Heterologous expression and self-assembly of the S-layer protein SbsA of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 19: 495-503
- Kuen, B., Koch, A., Asenbauer, E., Sára M. und Lubitz W. (1997): Molecular characterization of the *Bacillus stearothermophilus* PV72 S-Layer Gene *sbsB* induced by oxidative stress. J Bacteriol. 179 (5): 1664-1670
- Küpçü, S., Mader, C. und Sára, M. (1995a): The crystalline cell surface layer from *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 as an immobilization matrix: influence of the matrix on loss of activity of covalently bound enzymes. Biotechnol. Appl. Biochem.21: 275-286
- Küpçü, S., Sára, M. und Sleytr, U.B. (1995b): Liposomes coated with crystalline bacterial cell surface protein (S-layer) as immobilization structures for macromolecules. Biochim. Biophys. Acta 1235:263-269
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Lasa, I., de Grada, M., de Pedro, M.A. und Berenguer, J., (1992): Development of *Thermus-Escherichia* Shuttle Vectors and Their Use of the Expression of the *Clostridium thermocellum* *celA* Gene in *Thermus thermophilus*. J. Bacteriol. 174 (20): 6424-6431
- Lechner, J. und Sumper, M. (1987): The Primary Structure of a Prokaryotic Glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of *Halobacteria*. J. Biol. Chem. 262 (20): 9724-9729
- Lewis, L.O., Yousten, A.A. and Murray, R.G.E. (1987) Characterization of the Surface Protein Layer of the Mosquito-Pathogenic Strains of *Bacillus sphaericus*. J. Bacteriol. 169 (1): 72-79
- Livage, J. (1996): Bioactivity in sol-gel glasses. C.R. Acad. Sci. Paris., 322, IIb: 417-427
- Lloyd, J.R., Yong, P. und Macaskie, L.E. (1998): Enzymatic Recovery of elemental palladium by Using Sulfate-Reducing Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11): 4607-4609
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998): Proteinbestimmungen. In: Lottspeich F. und Zorbas. H. Bioanalytik. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 35-48
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Luckevich, M.D. und Beveridge, T.J. (1989): Characterization of a Dynamic S layer on *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol 171(12):6656-6667
- Madsudaira, P. (1990): Limited N-terminal sequence analysis. In Deutscher, M.P. Methods in Enzymology. New York Academic Press 182: 1443-1445
- Malcolm, A.J., Best, M.W., Szarka, R.J., Mosleh, Z., Unger, F.M., Messner, P. und Sleytr U.B. (1993): Surface layers from *Bacillus alvei* as a carrier for a *Streptococcus pneumoniae* conjugate vaccine. In: Beveridge, T.J. und Koval, S. F. Advances in bacterial paracrystalline surface layers. New York: NATO ASI Series A, Plenum Press, Vol. 252: 219-233
- Marques A.M., Roca X., Simon-Pujol M.D., Fuste C., und Congregado F. (1991): uranium accumulation by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:406-410
- Masuda, K. und Kawata, T. (1983): Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*. FEMS Microbiol. Lett. 20:145-150

- McLean J. und Beveridge T.J. (2001): Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (3): 1076-1084
- McGuckin, W.F. und McKenzie, B.F. (1958): An Improved Periodic Acid Fuchsin Sulfite Staining Methode for Evaluation of Glycoproteins. *Clinical Chemistry* 4 (6): 476-483
- Mertig, M., Kirsch, R., Pompe, W. und Engelhardt, H. (1999): Fabrication of Highly Oriented Nanocluster Arrays by Biomolecular Templating. *Europ. Physic. J. D* 9: 45-48
- Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Mock, E., Gounon, P. und Fouet, A. (1997): Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell associated antigen. *Mol. Microbiol.* 23 (6): 1147-1155
- Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., und Fouet, A. (1998): The Capsule and S-Layer: Two Independent and Yet Compatible Macromolecular Structures in *Bacillus anthracis*. *J. bacteriol.* 180 (1): 52-58
- Mesnage, S., Fontaine T., Mignot T., Delepierre M., Mock, M., und Fouet, A. (2000): Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMCO J.* 19 (17): 4473-4484
- Mesnage, S., Haustant, M. und Fouet, A. (2001): a general strategy for identification of S-layer genes in the *Bacillus cereus* group: molecular characterization of such a gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* NRRL 4045. *Microbiol.* 147: 1343-1351
- Messner, P. und Sleytr, U.B. (1988): Isolation and purification of surface proteins. In: Hancock, I.C. und Poxton, I.R. *Bacterial Cell Surface Techniques*. 3.Aufl. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 97-101
- Messner, P. und Sleytr, U.B. (1992): Crystalline Bacterial Cell-Surface Layers. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 213-275
- Messner, P., Allmaier, G., Schäffer, C., Wugeditsch, T., Lortal, S., König, H., Niemetz, R., und Dorner M. (1997) III. Biochemistry of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 25-46
- Miteva, V., Selenska-Pobell, S. und Mitev, V. (1999): Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 928-936
- Moens, S. und Vanderleyden, J. (1997) Glycoproteins in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 168: 169-175
- Morgan, W.T. (1985): The Histidine-Rich Glycoprotein of Serum Has a Domain Rich in Histidine, Proline, and Glycine That Binds Heme and Metals. *Biochem.* 24: 1496-1501
- Morelli, L., und Callegari, M.-L. (1997): Surface layer of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 118-121
- Morrissey, J. (1981): Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117:307-310
- Moyses, N. und Lortal, S. (1995): X-ray photoelectron spectroscopy and biochemical analysis of the surface of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *Microbiol.* 141: 11-19
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Flemming, C.A. und Bailey, G.W. (1989): Bacterial Sorption of Heavy Metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (12): 3143-3149
- Müller D.J., Baumeister W. und Engel A. (1996): Conformational Changes of the Hexagonally Packed intermediate Layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by Atomic Force microscopy. *J. bacteriol.* 178 (11):3025-3030
- Murrell, W.G. (1969): The Chemical composition of spores and spore structure. In: Gould, G.W. and Hurst, A. *The bacterial spore*. London: Academic Press 215-274

- Noonan, B. und Trust, T. J. (1997): The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. FEMS Microbiol Lett 154: 1-7
- North, M.J. (1989): Prevention of unwanted proteolysis. In: Beynon, R.J. und Bond, J.S. Proteolytical enzymes – a practical approach. Oxford: Irl Press 105-123
- Olabarria, G., Carrascosa, J.L., de Pedro, M.A. und Berenguer J. (1996): A conserved motif in S-layer proteins is involved in peptidoglycan binding in *Thermus thermophilus*. J. Bacteriol. 178 (16): 4765-4772
- Panak, P.J. Selenska-Pobell, S. Kutschke S., Geipel, G., Bernhard, G. und Nitsche H. (1999): Complexation of U(VI) with Cells of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiomonas cuprina* of Different Geological Origin. Radiochim. Acta 84: 183-190
- Panak, P.J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G. und Nitsche H. (2000): Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile. Radiochim. Acta 88: 71-76
- Panak, P.J. und Nitsche, H. (2001): Interaction of aerobic soil bacteria with plutonium (VI). Radiochim. Acta 89: 499-504.
- Pazirandeh, M, Wells B.M. und Ryan R.L. (1998): Development of Bacterium-based Heavy Metal Biosorbents: Enhanced Uptake of Cadmium and Mercury by *Escherichia coli* Expressing a metal Binding Motif. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10): 4068-4072
- Pettit, L.D., Gregor, J.E., und Kozlowski, H. (1991): Complex formation between metal ions and peptides. In Hay, R.W., Dillworth, J.R. und Nolan K.B. Perspectives on Bioinorganic Chemistry Vol. 1, JAI Press, Greenwich, 1-41
- Pompe, W., Mertig, M., Kirsch, R., Wahl, R., Ciacchi, L.C., Richter, J., Seidel, R. und Vinzelberg. H. (1999): Formation of Metallic Nanostructures on Biomolecular Templates. Z. Metallkd. 90 (12):1085-1091
- Pooley, H.M. und Karamata, D. (1994): Teichoic acid synthesis in *Bacillus subtilis*: genetic organization and biological roles. In: Ghuyssen, J.M. und Hakenbeck, R. Bacterial Cell Wall. Amsterdam: Elsevier Science 187-197
- Pum, D., Weinhandl, M., Hödl, C. und Sleytr, U.B. (1993): Large-scale recrystallization of the S-layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films. J. Bacteriol. 175 (9):2762-2766
- Pum, D. und Sleytr, U.B. (1994): Large-scale reconstitution of crystalline bacterial surface layer proteins at the air-water interface and on lipid films. Thin Solid Films 244: 882-886
- Pum, D., Stangl, G., Sponer, C., Riedling, K., Hudek, P., Fallmann, W. und Sleytr, U.B. (1997): Patterning of monolayers of crystalline S-layer proteins on a silicon surface by deep ultraviolet radiation. Microelectronic Engineering 35:297-300
- Reich, T., Bernhard, G., Geipel, G., Funke, H., Hennig, C., Rossberg, A., Matz, W., Schell, N. und Nitsche, H. (2000): The Rossendorf Beam Line ROBL – a dedicated experimental station for XAFS measurements of actinides and other radionuclides. Radiochim. Acta 88: 633-637
- Remsen, C.C., Valois, F.W. und Watson, S.W. (1967): Fine structure of the cytomembranes of *Nitrosocystis oceanus*. J. Bacteriol. 94(2):422-33
- Ries, W., Hotzy, C., Schocher, I., Sleytr, U. B. und Sára, M. (1997): Evidence that the N-terminal part of the S-layer protein from *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2 recognizes a secondary cell wall polymer J. Bacteriol. 179: 3892-3898
- Salvesen, G. und Nagase, H. (1989): Inhibition of proteolytical enzymes. In: Beynon, R.J. und Bond J.S. Proteolytical enzymes – a practical approach. 3.Aufl. Oxford: IRL Press, Oxford University Press 83-104
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor.

- Samuelson, P., Wernérus H., Svedberg, M. und Ståhl S. (2000): Staphylococcal Surface Display of Metal-binding Polyhistidyl Peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3): 1243-1248
- Sára, M. und Sleytr, U.B. (1987a): Charge distribution on the S-layer of *Bacillus stearothermophilus* NRS 1536/3c and importance of charged groups for morphogenesis and function. *J. Bacteriol.* 169 (6):2804-2809
- Sára, M. und Sleytr, U.B. (1987b): Molecular Sieving through S Layer of *Bacillus stearothermophilus* Strains. *J. Bacteriol.* 169 (9):4092-4098
- Sára, M. und Sleytr, U.B. (1989): Use of regularly structured bacterial cell surface layers as matrix for immobilizing macromolecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 184-189
- Sára, M., Pum, D. und Sleytr, U.B. (1992): Permeability and charge-dependent adsorption properties of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *J. Bacteriol.* 174 (11): 3487-3493
- Sára, M. und Sleytr, U.B. (1994): Comparative Studies of S-Layer Proteins from *Bacillus stearothermophilus* Strains Expressed during Growth in Continuous Culture under Oxygen-Limited and non-Oxygen-limited Conditions. *J. Bacteriol.* 176 (23): 7182-7189
- Sára, M., Kuen, B., Mayer, H., Mandl, F., Schuster, K.C. und Sleytr, U.B. (1996): Dynamics in Oxygen-Induced Changes in S-Layer Protein Synthesis from *Bacillus stearothermophilus* PV72 and the S-Layer-Deficient Variant T5 in Continuous Culture and Studies of the cell Wall Composition. *J. Bacteriol.* 178 (7): 2108-2117
- Sára, M., Egelseer, E.M., Dekitsch, C. und Sleytr, U.B. (1998): Identification of Two Binding Domains, One for Peptidoglycan and Another for a Secondary Cell Wall Polymer, on the N-Terminal Part of the S-Layer Protein SbsB from *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2. *J. Bacteriol.* 180 (24): 6780-6783
- Sára M. und Sleytr U.B. (2000): MINIREVIEW - S-Layer Proteins. *J. Bacteriol.* 182 (4): 859-868
- Schäfer, C. und Messner, P. (2001): Glycobiology of surface layer proteins. *Biochimie* 83: 591-599
- Schultze-Lam, S., Harauz, G. und Beveridge, T.J. (1992): Participation of a Cyanobacterial S-layer in Fine-Grain mineral Formation. *J. Bacteriol.* 174 (24): 7971-7981
- Schütte, H. und Kula M.-R. (1988): Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 552- 558
- Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G. und Nitsche H. (1999): Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 59-67
- Shenton, W., Pum, D., Sleytr, U. B. und Mann, S.(1997) Synthesis of cadmium sulphide superlattices using self-assembled bacterial S-layers. *Nature* 389: 585-587
- Sidhu, M. S. und Olsen, I. (1997): S-layer of *Bacillus* species. *Microbiol.* 143: 1039-1052
- Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wiksröm, B., Pouwels, P.H. und Korhonen, t.K. (2000): Characterization of the Collagen-binding S-Layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.* 182 (22): 6440-6450
- Simon, B., Nomellini, J., Chiou, P., Bingle, W., Thornton, J., Smit, J. und Leong, J.A. (2001): Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials. *Dis. Aquat. Organ.* 44(1):17-27
- Sleytr, U.B. (1970): Gefrierätzung verschiedener Stämme von *Bacillus sphaericus*. *Arch. Microbiol.* 72: 238-251
- Sleytr, U.B. und Thornley, M.J. (1973): Freeze-etching of the cell envelope of an *Acinetobacter* species which carries a regular array of surface subunits. *J. Bacteriol.* 116: 1383-1397
- Sleytr, U.B. (1976): Self-Assembly of the Hexagonally and Tetragonally Arranged Subunits of Bacterial Surface Layers and Their Reattachment to Cell Walls. *J. Ultrastruc. Res.* 55: 360-377

- Sleytr, U.B. (1978): Regular Array of Macromolecules on Bacterial Cell Walls: Structure, Chemistry, Assemble, and Function. *Int. Rev. Cytol.* 53: 1-64
- Sleytr, U.B. und Messner, P. (1983): Crystalline surface layers on bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 311-339
- Sleytr, U.B. und Messner, P. (1988): Crystalline Surface Layers in Procaryotes. *J. Bacteriol.* 170 (7): 2891-2897
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum D. und Sára, M. (1993): Crystalline bacterial cell surface layers. *Mol. Microbiol.* 10 (5): 911-916
- Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D. und Sára, M. (1996): Crystalline Bacterial Cell surface Proteins. London: R.G. Landes Company, Academic Press
- Sleytr, U.B. und Sára, M. (1997a): Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationship and their biotechnological applications. *REVIEW TIBTECH* 15: 20-26
- Sleytr, U.B. (1997b) I. Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 5-12
- Sleytr, U.B. (1997c) VI. Applications of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 151-175
- Sleytr, U.B. und Beveridge, T.J. (1999a): Bacterial S-layer. *Trends Microbiol.* 7 (6): 253-260
- Sleytr, U.B. messner, P., pum, D. und Sára, M. (1999b): Kristalline Zelloberflächen-Schichten prokaryotischer Organismen (S-Schichten): von der supramolekularen Zellstruktur zur biomimetik und Nanotechnologie. *Angew. Chem.* 111: 1098-1120
- Smit E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B. und Pouwels, P.H. (2001) The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J. Mol. Biol.* 305(2):245-57
- Sprott, G. D., Koval, S.F. und Schnaitman, C.A. (1994): Cell Fractionation. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. und Krieg, N.R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. 4. Aufl. Washington: American Society for Microbiology, 72-103
- Stewart, M. und Murray, R.G.E. (1982): Structure of the Regular Surface Layer of *Aquaspirillum serpens* MW5. *J. Bacteriol.* 150 (1): 348-357
- Stoschek, C.M. (1990): Quantification of protein. In: Deutscher, P.M. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press 182: 62-63
- Sumper, M., Berg, E., Mengele, R. und Strobel, I. (1990): Primary Structure and Glycosylation of the S-Layer Protein of *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.* 172 (12): 7111-7118
- Tatusova, T.A. und Madden, T.L. (1999): Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250
- Thomas, S.R., Austin, J.W., McCubbin, W.D., Kay, C.M. und Trust, T.J. (1992): Roles of Structural Domains in the Morphology and Surface Anchoring of the Tetragonal Paracrystalline Array of *Aeromonas hydrophila*. Biochemical Charaterization of the Major Structural Domain. *J. Mol. Biol.* 228: 652-661
- Thomas, S.R. und Trust, T.J. (1995): Tyrosine Phosphorylation of the Tetragonal Paracrystalline Array of *Aeromonas hydrophila*: Molecular Cloning and High-level Expression of the S-layer Protein Gene. *J. Mol. Biol.* 245: 568-581
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanapää, J., Vartio, T., Kalkkinen, N. und Korhonen, T.K. (1995): A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2467-2471
- Tummuru, M.K.R. und Blaser, M.J. (1992): Characteristics of the *campylobacter fetus sapA* promotor: evidence that the *sapA* promotor is deleted in spontaneous mutant strains. *J. Bacteriol.* 174: 5916-5922

- Vidgrén, G., Palva, I., Pakkanen, R., Lounatmaa, K. und Palva, A. (1992): S-Layer Gene of *Lactobacillus brevis*: Cloning by Polymerase Chain Reaction and Determination of the Nucleotide Sequence. *J. Bacteriol.* 174 (22): 7419-7427
- Volesky, B. und Holan Z.R. (1995): Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnol. Prog.* 11: 235-250.
- Wahl, R., Mertig, M., Raff, J., Selenska-Pobell, S. und Pompe, W. (2001a): Electron-Beam Induced Formation of Highly Ordered Palladium and Platinum Nanoparticle Arrays on the S layer of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602. *Adv. Materials* 13 (10): 736-740
- Wahl, R., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Mertig, M. und Pompe, W. (2001b): A fast screening method for surface layers on Gram-positive bacteria. *Biotech. Lett.* 23: 1485-1490
- Walker, S.G., Smith, S.H. und Smit, J. (1992) Isolation and Comparison of the Paracrystalline Surface Layer Proteins of Freshwater Caulobacters. *Journal of Bacteriology* 174 (6): 1783-1792
- Walker, S.G., Karunaratne, D.N., Ravenscroft, N. und Smit, J. (1994): Characterization of Mutants of *Caulobacter crescentus* Defective in Surface Attachment of the Paracrystalline Surface Layer. *J. bacteriol.* 176 (20): 6312-6323
- Weber, V., Weigert, S., Sára, M., Sleytr, U.B. und Falkenhagen D. (2001): Development of Affinity Microparticles for Extracorporeal Blood Purification Based on Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins. *Ther. Apher.* 5 (5): 433-438
- Weigert, S. (1993): Chemische Modifikation von zwei-dimensionalen Proteinkristallen (S-Schichten) für die Herstellung biomimetischer Membranen. Naturwissenschaftliche Dissertation, Wien
- Westermeier, R., Gronau, S. und Schickele, H. (1988): Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-polyacrylamidgelen. Freiberg: Sonderdruck RE-072, Pharmacia Biotech.
- Wildhaber, I. und Baumeister, W. (1987): The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance. *EMBO J.* 6 (5): 1475-1480
- Wismut GmbH (1999): Chronik der Wismut. Chemnitz: Wismut GmbH
- Wismut GmbH (2000): Entwicklung von verfahrenstechnischen Lösungen zur Sanierung von Grundwasserschäden im Abstrom von Absetzbecken der Uranerzaufbereitung mittels permeabler reaktiver Wände. Abschlussbericht, BMFT-Förderprojekt 02WB9891/8
- Wolery, T. (1992): EQ3/6: A software Package for Geochemical Modelling of Aqueous Systems: Package Overview and Installation Guide. Technical Report UCRL-MA-110662 PT I ed., Lawrence Livermore National Laboratory
- Word, N. S., Yousten, A.A. und Howard, L. (1983): Regularly structured and non-regularly structured surface layers of *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 277-282
- Yamada, H., Tsukagoshi, N. und Udaka, S. (1981): Morphological Alterations of Cell Wall Concomitant with Protein Release in a Protein-Producing Bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 148 (1): 322-332
- Yamanaka, S.A., Nishida, F., Ellerby, L.M., Nishida, C.R., Dunn, B., Selverstone Valentine, J. und Zink J.I. (1992): Enzymatic Activity of Glucose Oxidase Encapsulated in Transparent Glass by the Sol-Gel Method. *Chem. Mater.* 4 (3): 495-500
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H. und Woodlock, J.J. (1969): Glycoprotein Staining following Electrophoresis on Acrylamide Gels. *Anal Biochem* 30: 148-152
- Zahn, J.A. und DiSpirito, A.A. (1996): Membrane-Associated Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)[†]. *J. bacteriol.* 178 (4): 1018-1029

Hiermit erkläre ich:

Die Dissertation mit dem Titel „Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien aus Uranabfallhalden mit Schwermetallen“ habe ich ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Dr. Sonja Selenska-Pobell
Frau Katrin Flemming
Frau Michaela Schnorpfeil
Herr Dr. Mohamed Merroun
Frau Dr. Gudrun Kampf
Frau Roswita Nicolai
Herr Prof. Dr. Gert Bernhard
Herr Dr. Christoph Hennig
Herr Ulrich Soltmann
Frau Sabine Matys
Herr Dr. Jörg Bär

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich auch nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorgelegte Arbeit habe ich noch nie im Inland oder Ausland, weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Promotionsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht.

Ich habe mich bislang noch keiner mündlichen Prüfung im Rahmen eines Promotionsverfahrens unterzogen.

Dresden, 22. März 2002

Johannes Raff

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Johannes Raff
Anschrift	Radeberger Straße 20e 01328 Dresden
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	23.07.1969 in Aalen, Ostalbkreis

Schulausbildung

1976 - 1980	Grundschule: Tiersteinschule Oberkochen
08/1980 - 05/1989	Gymnasium: Gymnasium Oberkochen Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Mai 1989

Hochschulausbildung

10/1990 - 03/1997	Universität Bayreuth
10/1990 - 03/1991	Fachrichtung: LA für Gymnasien Biologie/Chemie
04/1991 - 03/1997	Fachrichtung: Biologie-Diplom
04/1993	Diplomvorprüfung
09/1995	Diplomhauptprüfung
12/1996	Abschluß: Diplom-Biologe Univ. Thema der Diplomarbeit: Analyse proteolytisch gewonnener Molekülvarianten des Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Multi-enzymkomplexes aus <i>Oligotropha carboxidovorans</i>

Promotion

12/1997 - 09/2000	Forschungszentrum Rossendorf, Dresden Institut für Radiochemie Abteilung Entsorgungs- und Ökoradiochemie Arbeitsgruppe Molekulare Mikrobiologie Angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft mit abgeschlossener Hochschulausbildung (Doktorand) Thema der Promotionsarbeit: Wechselwirkungen der Hüllproteine von Bakterien aus Uranhalden mit Schwermetallen
09/2000 - 09/2002	Angestellt als wissenschaftlicher Mitarbeiter

Praktikum

08/1994 - 10/1994	Regierung von Oberfranken, Bayreuth Gewässergüterreferat des Sachgebiets Wasserbau und Wasserwirtschaft Berufsbezogenes Praktikum
-------------------	---

Studienbegleitende Tätigkeit

05/1994	Universität Bayreuth
12/1995	Lehrstuhl für Mikrobiologie Prof.Dr.O.Meyer
11/1996	Studentische Hilfskraft: Praktikumsbetreuung, Laborarbeiten, Vorlesungsassistent

Ferienarbeit

07/1987
05/1990
07/1990
07/1988
09/1992

Carl Zeiss, Oberkochen
Mechanikzwischenlager, Luftlagerfertigung

Röchling Kaltwalzwerk KG, Oberkochen
Bonderanlage, Schlosserei

Wehrdienst

06/1989 - 01/1990

Reinhardt-Kaserne, Ellwangen
Panzerjägerkompanie 300
Vorzeitig entlassen aufgrund der „Dritte-Söhne-Regelung“ gemäß § 29 Abs. 4 Nr. 1 des Wehrpflichtgesetzes

Sprachkenntnisse

Englisch: gut in Sprache und Schrift (9 Jahre)
Latein: befriedigend (5 Jahre, Latinum)

Dresden, den 22. März 2002