

# Nanoexpertin

**Univ.Prof.DI Dr. Margit Sára** über die Molekulare Selbstorganisation und ihr neu bewilligten EU-Projekt "NAS-SAP" Nano Arrayed Systems based on Self Assembling Proteins.



Foto: H. Roth

## Zur Person:

Prof. Margit Sára hat an der Universität für Bodenkultur Lebensmittel- und Biotechnologie studiert. Nach Beendigung des Studiums führte sie am Zentrum für Ultrastrukturforschung ihre Dissertation durch, und promovierte 1985 zum Dr. rer. nat. techn. Im Jahre 1989 habilitierte sie sich für das Fachgebiet Allgemeine Mikrobiologie, und übernahm kurz darauf die Leitung der Arbeitsgruppe "Nanoengineering" am heutigen Zentrum für NanoBiotechnologie. Frau Prof. Sára hat zahlreiche Forschungsprojekte des FWF durchgeführt, ist mit ihrer Arbeitsgruppe am K-plus Zentrum "Biomolecular Therapeutics", sowie am CD-Labor für spezifische Adsorptionstechnologien, beteiligt. Zudem hat sie die Leitung des Erwin Schrödinger-Institutes für Molekulare Nanobiotechnologie über. Frau Prof. Sára erhielt für ihre wissenschaftliche Arbeit zahlreiche Preise und Auszeichnungen. Sie ist Koautorin von 130 Publikationen, und an vier internationalen Patenten beteiligt.

## Projektskizze des neu bewilligten EU-Projektes "NAS-SAP" (Nano Arrayed Systems based on Self Assembling Proteins)

Koordinator: Dr. Simon Cutting, Royal Holloway, University of London, UK.

In diesem Projekt soll das Potential von Sporenproteinen und S-Schicht-Proteinen für Anwendungen im Bereich der Nanobiotechnologie untersucht werden. S-Schicht-Proteine stellen die äußerste Zellgrenzfläche bei vielen Prokaryoten dar und bilden kristallin geordnete monomolekulare Proteingitter aus. Als natürliches Self-Assembly System, das im Laufe der Evolution optimiert wurde, sollen S-Schicht-Proteine durch chemische Modifikation, bzw. durch gentechnische Methoden funktionalisiert werden. Auf Grund der kristallinen Struktur des Proteingitters weisen die eingebrachten Funktionen eine absolut regelmäßige Anordnung in hoher Dichte auf. Anwendungen für den Life-Science Bereich beinhalten die Entwicklung von neuartigen diagnostischen Testsystemen und selektiven Mikroadsorbentien. In Kombination mit der Bindung von Metallen oder Nanopartikeln soll aber auch der Einsatz für den Non-Life-Science Bereich bearbeitet werden.

# S-Schicht-Fusionsproteine als funktionelle Selbstorganisationssysteme in der Nanobiotechnologie

Margit Sára und Uwe B. Sleytr

Die Nanotechnologie wird als eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts gesehen. Die innovativen Aspekte liegen in der erfolgreichen Kombination von physikalischen und biologischen Prinzipien mit chemischen Prozessen, wobei das eigentliche Ziel die Entwicklung von nanoskaligen Bausteinen mit neuen Eigenschaften und spezifischen Funktionen darstellt. Nach wie vor ist aber der Aufbau von Strukturen mit einer Dimension von wenigen bis maximal 10 Nanometern eine große Herausforderung, da dieser Bereich einerseits unterhalb der herkömmlichen lithographischen Techniken, andererseits aber oberhalb des Bereichs der klassischen chemischen Synthese liegt. Die komplexesten nanoskaligen Strukturen finden sich in der Natur und werden demnach von Biomolekülen aufgebaut. Die Nanobiotechnologie zielt auf die Nutzung von biologischen Systemen zur Entwicklung von neuartigen bioinspirierten und biokompatiblen Materialien ab. Dabei stellen Biomoleküle, die nach dem Schlüssel – Schloss – Prinzip, bzw. durch molekulare Selbstorganisation (Self-Assembly) zusammen finden, die Bausteine dar. Die gezielte Veränderung der Eigenschaften im nanoskaligen Bereich wird mit dem Begriff "Nanoengineering" beschrieben. Im Falle von Proteinen steht sowohl die Vielfalt der chemischen, wie auch der genetischen Modifikation offen, wodurch spezifische Funktionen eingebracht werden können.

Viele Bakterien und Archaea weisen ein monomolekulares Protein- oder Glykoproteingitter, die sogenannte S-Schicht, als die äußerste Zellgrenzfläche auf (Sleytr et al., 1999). S-Schichten bestehen aus jeweils einer einzigen Molekülspezies, wobei die Protein- oder Glykoproteinuntereinheiten im Zuge eines Selbstorganisationsprozesses in hexagonale, quadratische oder schräge Gitter kristallisieren. Um einen optimalen Stoffaustausch zwischen der Zelle und ihrer Umgebung zu ermöglichen, sind S-Schichten als hochporöse Netzwerke mit einer Dicke von 10 bis 20 nm und einer Porengröße von 2 bis 8 nm organisiert. Als Self-Assembly-Systeme, deren Eigenschaften im Laufe der Evolution auf Diffusion und Adsorption optimiert worden sind, stellen S-Schicht-Proteine ideale Bausteine für die Nanobiotechnologie dar.

Zur Funktionalisierung von S-Schicht-Gittern sind in den letzten Jahren chimäre Proteine oder S-Schicht-Fusionsproteine konstruiert worden, die neben der spezifischen Eigenschaft der S-Schicht-Proteine zur Selbstorganisation, funktionelle Fremdsequenzen tragen, deren Auswahl sich nach dem jeweiligen Anwendungsgebiet richtet. So wird etwa zur Entwicklung von antiallergischen Vakzinen das Hauptbirkenpollenallergen (Bohle et al., 2004; Breitwieser et al., 2002; Ilk et al., 2002) fusioniert, während – um eine möglichst universelle Matrix zu erhalten – Streptavidin, das biotinierte Moleküle erkennt, als Fusionspartner dient (Moll et al., 2002). Monomolekulare Proteingitter zur spezifischen Bindung von Antigenen können durch Fusion der variablen Domäne von schwerkettigen Kamelantikörpern und Kristallisation der entsprechenden Fusionsproteine erzeugt werden (Pleschberger et al., 2003; 2004). Aufgrund der hohen Stabilität der Kamelantikörper und der S-Schicht-Proteine verspricht diese Kombination vor allem Anwendungspotential im Bereich der Diagnostik. Eine kristallin geordnete Affinitätsmatrix zur Isolierung von Antikörpern lässt sich durch Fusion von Fc-bindenden Domänen herstellen (Völlenknecht et al., 2004).



Abb. : Schematische Darstellung der grampositiven Zellwand und Übertragung des Prinzips zum Aufbau von funktionellen, monomolekularen Proteingittern auf feste Träger.

Neben der Konstruktion von S-Schicht-Fusionsproteinen stellt ihre orientierte Kristallisation zum Aufbau von gerichteten supramolekularen Strukturen einen wesentlichen Faktor dar. Aus diesem Grunde wurde das natürliche Ankermolekül vieler S-Schicht-Proteine in der bakteriellen Zellwand, das sogenannte sekundäre Zellwandpolymer, das ein Heteropolysaccharid darstellt, als biomimetischer Linker genutzt. Durch chemische Modifikation des reduzierenden Endes gelang es, isoliertes Zellwandpolymer kovalent an verschiedene feste Trägermaterialien, bzw. über Schwefelbindungen an Goldoberflächen (Abb. 1) zu binden (Mader et al., 2004; Pleschberger et al., 2003; 2004). Nach dem Prinzip der Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung erkennen S-Schicht-Proteine spezifisch einen bestimmten Typ von Zellwandpolymer und kristallisieren somit in vorgegebener Orientierung. Dadurch wird gewährleistet, dass die eingebaute funktionelle Sequenz an der S-Schicht-Außenseite exponiert bleibt und für weitere Bindungs- oder Reaktionspartner zur Verfügung steht. Durch Herstellung von Lipid-Zellwandpolymer-Konjugaten soll eine orientierte Rekristallisation der S-Schicht-Fusionsproteine an Lipidfilmen, Liposomen oder Lipid-Plasmid-Partikeln erzielt werden. Zusätzlich zur Einbringung von Funktionen auf dem Wege des "genetic engineering" steht die Möglichkeit der chemischen Modifikationen offen. So kann das Proteingitter durch homobifunktionelle Crosslinker stabilisiert werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Fremdsequenzen kommt.

Lipidmoleküle, Zellwandpolymere und S-Schicht-Fusionsproteine stellen demnach die Bausteine eines molekularen Bausatzes dar, mit dem gezielt gerichtete, funktionelle monomolekulare Proteingitter aufgebaut werden können, deren Oberflächeneigenschaften bis in den Subnanometerbereich definiert sind. Die Dichte der eingebauten Funktionen kann über die Zahl der fusionierten Sequenzen pro S-Schicht-Subeinheit kontrolliert gesteuert werden. Darüber hinaus ist die Korekristallisation von S-Schicht-Fusionsproteinen mit unterschiedlichen Funktionen möglich, was besonders im Falle von fusionierten Enzymen, die in Reaktionsketten arbeiten, neue Lösungsansätze bringen könnte. Die auf festen Trägern aufgebauten monomolekularen Proteingitter werden für Anwendungen im Bereich der Affinitätstrenntechnik, der Biokatalyse, bzw. für markierungsfreie Detektionsverfahren und Biochips entwickelt. Mit S-Schicht-Fusionsproteinen belegte Liposomen stellen als biomimetische Virushüllen vielseitige Transportvesikel zur gezielten Abgabe von Pharmazeutika dar (Ilk et al., 2004). Neben den oben angeführten Anwendungen können in S-Schicht-Proteinen attraktive Systeme für den Non Life Science Bereich gesehen werden, wie etwa für die Entwicklung von bioinspirierten Nanomaterialien.

In der Nanobiotechnologie sind die Grenzen zwischen Bio- und Materialwissenschaften nicht mehr streng getrennt, sodass insbesondere an den transdisziplinären Schnittstellen große Fortschritte erwartet werden. Gerade die Universität für Bodenkultur, an der traditionell eine harmonische Vernetzung zwischen Biologie, Chemie und Technik gegeben ist, stellt auf Grund ihrer Vielseitigkeit das ideale Umfeld für die Nanobiotechnologie dar.

#### Literatur:

1. Bohle, B., A. Breitwieser, B. Zwölfer, B. Jahn-Schmid, M. Sára, U. B. Sleytr and C. Ebner (2004) *J. Immunol.* 172(11): 6642-6648.
2. Breitwieser, A., E. M. Egelseer, N. Ilk, D. Moll, C. Hotzy, B. Bohle, C. Ebner, U. B. Sleytr, and M. Sára (2002) *Protein Eng.* 15(3): 243-249.
3. Ilk, N., C. Völlenkne, E. M. Egelseer, A. Breitwieser, U. B. Sleytr and M. Sára (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3251-3260.
4. Ilk, N., S. Küpcü, G. Moncayo, S. Klimt, R. Ecker, R. Hofer-Warbinek, E. M. Egelseer, U. B. Sleytr and M. Sára (2004) *Biochem. J.* 370: 441-448.
5. Mader, C., C. Huber, D. Moll, U. B. Sleytr and M. Sára (2004) *J. Bacteriol.* 186: 1758-1768.
6. Moll, D., C. Huber, B. Schlegel, D. Pum, U. B. Sleytr and M. Sára (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(23): 14646-14651.
7. Pleschberger, M., A. Neubauer, E. M. Egelseer, S. Weigert, B. Lindner, U. B. Sleytr, S. Muyldermans and M. Sára (2003) *Bioconj. Chem.* 14: 440-448.
8. Pleschberger, M., D. Saerens, S. Weigert, U. B. Sleytr, S. Muyldermans, M. Sára and E. M. Egelseer (2004) *Bioconj. Chem.* 15(3): 664-671.
9. Sleytr, U. B., P. Messner, D. Pum and M. Sára (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 1034-1054.
10. Völlenkne, C., S. Weigert, N. Ilk, E. M. Egelseer, V. Weber, F. Loth, D. Falkenhagen, U. B. Sleytr and M. Sára (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1514-1521. Highlighted in *Nature Reviews Microbiology* 2(5), 353.

#### Kontakt:

Univ. Prof. DI Dr. Margit Sára, Department für Biotechnologie, Zentrum für NanoBiotechnologie, Universität für Bodenkultur Wien, Gregor Mendel-Straße 33, A-1180 Wien, Tel.: +43 1 47654-2208, Fax: +43 1 4789112, [margit.sara@boku.ac.at](mailto:margit.sara@boku.ac.at), <http://www.biotech.boku.ac.at/332.html>