

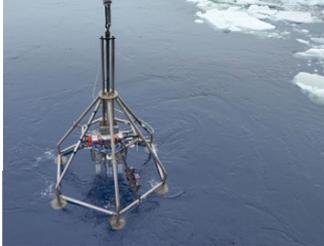
SONDERDRUCK

aus

2 | 2023

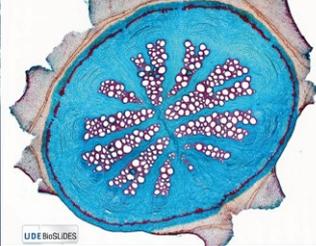
**VBio**

Verband | Biologie, Biowissenschaften  
& Biomedizin in Deutschland



ANTARKTIS-  
FORSCHUNG

Ökosystemfunktionen



VIRTUELLE  
MIKROSKOPIE

Datenbank für die Lehre



MODELLTECHNIK

3D-Druck  
in der Biologie

# BIOLOGIE

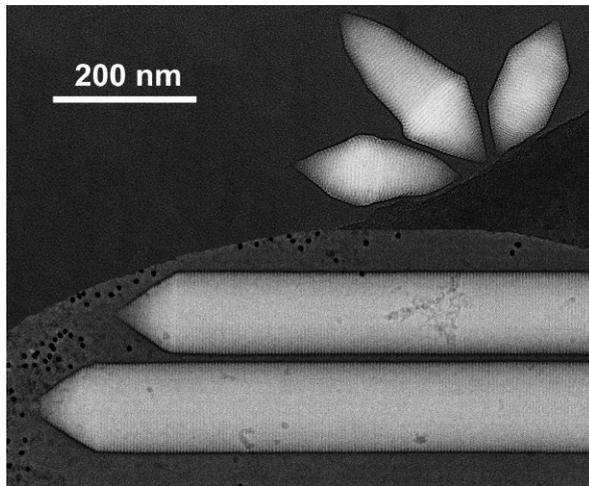
IN UNSERER ZEIT

Wenn  
Schnecken  
Chloroplasten  
rauben



# Von der Grundlagenforschung in die Anwendung Gasvesikel und ihr Einsatz in der Biomedizin

FELICITAS PFEIFER



**Isolierte Gasvesikel aus *Halobacterium salinarum*. Montage aus zwei Cryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen.**  
Aufnahme: Bollschweiler & Engelhardt, MPI für Biochemie.

*Gasvesikel werden von einigen Mikroorganismen als Schwebhilfe genutzt. Die Gasumgebende Hülle wird hauptsächlich von den beiden Proteinen GvpA und GvpC gebildet, aber zehn weitere Gvp-Proteine sind am Aufbau beteiligt. Die bis zu 1 µm langen Gasvesikel sind stabil und streuen Ultraschall; sie werden als neuartiges Kontrastmittel in der Biomedizin eingesetzt. Dekoriert mit zusätzlichen Peptiden auf der Oberfläche eignen sie sich zur Herstellung von Vakzinen.*

Gasvesikel sind intrazelluläre, gasgefüllte Nanostrukturen, die Mikroben ein vertikales Schweben bis zur Oberfläche des wässrigen Habitats erlauben. Sie wurden erstmals 1895 von H. Klebahn im Wasserblüten-bildenden Cyanobakterium *Gloeotrichia* beschrieben. Durch Druck sind sie leicht zu zerstören; sie werden im Anschluss aber erneut gebildet. Dies lässt sich auch am Archaeon

*Halobacterium salinarum* zeigen: Die vor der Behandlung als helle Partikel gut wahrnehmbaren Gasvesikel kollabieren unter Druck und sind nicht mehr sichtbar. Zwei Stunden danach sind in den Zellen wieder kleine Gasvesikel zu erkennen (Abbildung 1). Nach 20 h sind die Zellen mit Gasvesikeln prall gefüllt.

Der Besitz von Gasvesikeln verhindert ein Absinken der Zellen und erlaubt ein Schweben; etwa drei bis zehn Prozent des Zellvolumens muss von ihnen eingenommen werden, damit eine Zelle zur Oberfläche flottiert. Im Labor von Anthony Walsby (Bristol, UK) wurden Gasvesikel vor allem bei Cyanobakterien wie *Anabaena flos-aquae* und *Microcystis* ausgiebig untersucht [1]. Die während der Fotosynthese gebildeten Zuckermoleküle wirken als Ballaststoffe und lassen die ansonsten unbeweglichen Cyanobakterien sinken. Nach der Zuckerverwertung steigen sie am Morgen wieder auf, um Fotosynthese zu betreiben. Kolonien von *Microcystis* mit 2–4 mm Durchmesser steigen mit einer Geschwindigkeit von 1 mm pro Sekunde auf; bei einzelnen Bakterienzellen sind die Steigzeiten allerdings deutlich langsamer. Auch halophile Archaea wie *Hbt. salinarum*, *Haloferax mediterranei* oder das quadratische *Haloquadratum walsbyi* produzieren Gasvesikel, mit denen sie im Habitat schweben. Diese sind spindel- oder zylinderförmig mit konischen Endkappen und werden mit einem Durchmesser von bis zu 250 nm etwa doppelt so breit wie cyanobakterielle Gasvesikel [2] (Abbildung 2).

Auch *Bacillus megaterium* bildet Gasvesikel, ebenso wie *Serratia* sp. ATCC39006, das aus einem Brackwasserhabitat isoliert wurde [3, 4]. Schwimmen mit Flagellen und Schweben mit Gasvesikeln schließen sich bei *Serratia* aus, denn beide Bewegungsarten sind entgegengesetzt reguliert. Im Unterschied dazu schwimmt und flottiert *Hbt. salinarum* gleichzeitig. Wegen der Lichtstreuenden Gasvesikel sind die Kolonien dieses Archaeons milchig-trübe gefärbt (Abbildung 3). *Hbt. salinarum* lebt in Salzseen oder Salinen, wo Meersalz gewonnen wird. Bei einer Salzkonzentration über 25 % (w/v) bis hin zur Sättigung (5,2 M NaCl) sind die Kristallisationsbecken intensiv rot gefärbt. Dafür verantwortlich sind Carotinoidfarbstoffe der Archaea, aber auch der Grünalge *Dunaliella salina*. Während Haloarchaea die „salt-in“-Strategie verwenden, um sich an die hohen Salzkonzentrationen anzupassen,

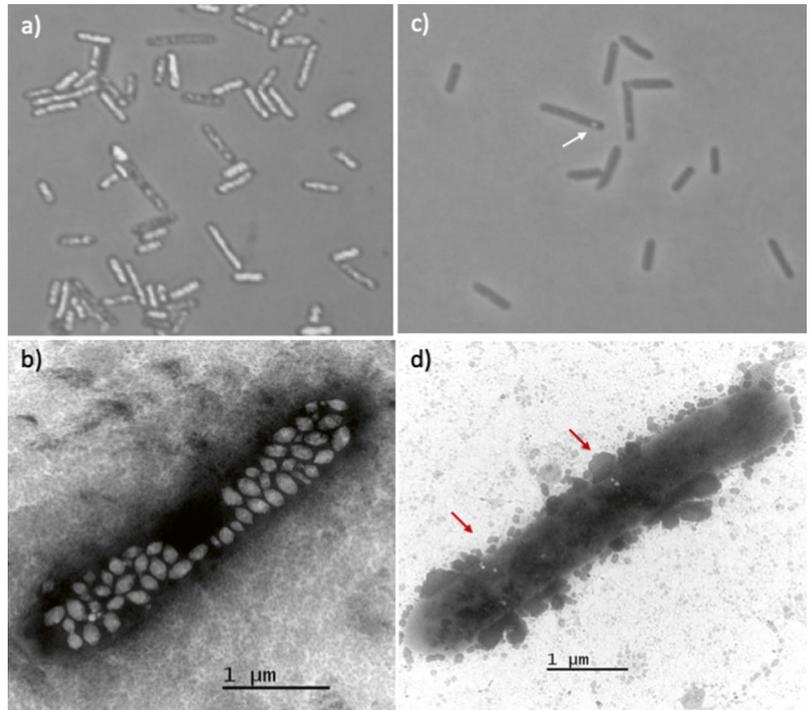
Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 153 erklärt.

und dazu im Zellinneren genauso viel K- und Cl-Ionen anreichern wie Na- und Cl-Ionen im Außenmedium vorhanden sind, synthetisiert *Dunaliella* große Mengen an Glycerin. *Hbt. salinarum* ist außerdem für die Bildung von Bakteriorhodopsin bekannt – einem Retinalprotein, das mit Hilfe von Sonnenlicht einen Protonengradienten über die Cytoplasmamembran aufbaut, der von einer ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt wird.

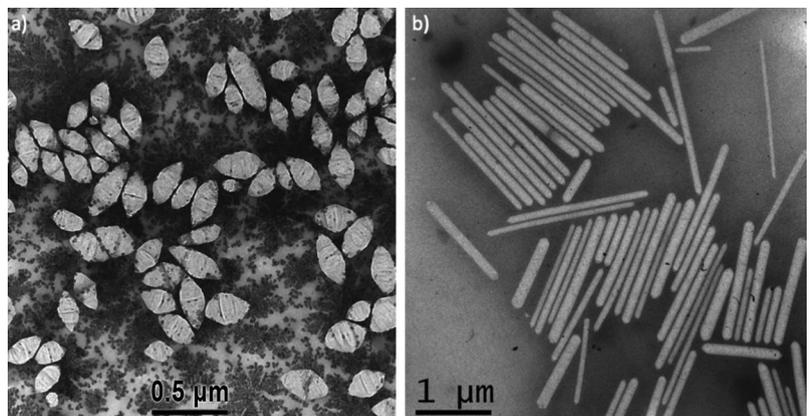
### Die Strukturproteine GvpA und GvpC

Gasvesikel von *Hbt. salinarum* können leicht durch Lysis der Zellen in Wasser freigesetzt und durch mehrfaches Zentrifugieren bei niedriger Drehzahl (60g) als an der Oberfläche flottierende, weiße Schicht gereinigt werden. Eine solche Suspension kann über Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Gasvesikelhülle besteht ausschließlich aus Protein und umschließt einen Hohlraum, der sich passiv mit den im Cytoplasma gelösten Gasen füllt. In cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind 4,6-nm breite Rippen quer zur Längsachse der Hülle zu erkennen, die von einer Helix mit niedriger Ganghöhe herrühren. Am oberen Ende jeder Rippe sind regelmäßig auftretende, kleine Löcher zu erkennen, durch die wahrscheinlich Gasmoleküle in das Innere eindringen und wieder hinausgelangen. Eine Speicherung von Gasen ist daher nicht möglich. Die Hülle ist so steif, dass isolierte Gasvesikel auch im Vakuum im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) stabil sind (Abbildung 2).

Durch N-terminales Ansequenzieren der Gasvesikel von *Anabaena flos-aquae* (Ana-GV) wurde bereits 1986 ein Großteil der Aminosäuresequenz des etwa 70-Aminosäure-großen Proteins GvpA ermittelt, das durch Aggregation die Rippen der Gasvesikel bildet. GvpA ist amphiphil und bildet auf der Gas-zugewandten Seite eine hydrophobe Oberfläche [1]. Auf der Außenseite der Hülle liegt das zweite Strukturprotein GvpC, das die Hülle stabilisiert und bei haloarchaealen Gasvesikeln (Halo-GV) mit Wasser leicht abgewaschen werden kann [5,6]. Bei Ana-GV muss dagegen 6 M Harnstoff zur Entfernung von GvpC verwendet werden [1]. Die darunter liegende Hülle bleibt bei dieser Prozedur intakt und die GV können mit neuen GvpC-Molekülen beladen werden. Die Aminosäuresequenz von GvpC zeigt Sequenzwiederholungen (*Repeats*) mit einer Länge von 32–39 Aminosäuren. Beim *Anabaena*-GvpC sind es fünf *Repeats* von jeweils 33 Aminosäuren, während das größere *Hbt. salinarum*-GvpC sieben weniger konservierte Sequenzwiederholungen einer Länge von 32–39 Aminosäuren aufweist. Die Zahl der *Repeats* korreliert mit dem Durchmesser der GV (je mehr *Repeats* desto größer) und beeinflusst invers die Stabilität, d. h. je weniger *Repeats* in GvpC vorhanden sind, desto stabiler sind die Gasvesikel. Halo-GV mit einem Durchmesser von bis zu 250 nm haben nur eine geringe Druckstabilität von 0,1 Mega-Pascal (MPa), während Ana-GV mit einem Durchmesser von 80–100 nm erst bei 0,55 MPa und GV von *Microcystis* bei 0,8 MPa kollabieren [1]. Ana-GV



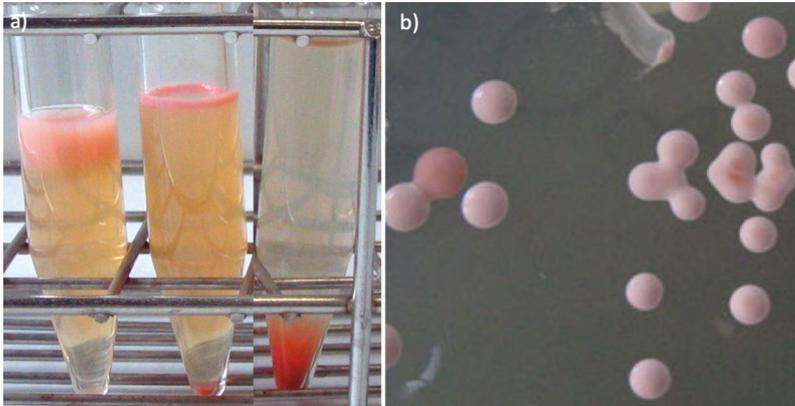
**ABB. 1** Gasvesikel von *Hbt. salinarum* vor und nach der Anwendung von hydrostatischem Druck. Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Kultur vor der Druckapplikation (a) bzw. 2 h danach (c). b), d) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM) der Zellen zu gleichen Zeitpunkten wie a), b). Pfeile in c) und d) markieren kleine Gasvesikel. Abb.: Fröls & Pfeifer, TU Darmstadt.



**ABB. 2** Isolierte Gasvesikel aus *Hbt. salinarum* im TEM. a) Spindelförmige Gasvesikel aus Wildtyp-Zellen. b) Zylindrische Gasvesikel einer Variante mit der Punktmutation I34M in GvpA. Abb.: Faist & Pfeifer, TU Darmstadt.

### IN KÜRZE

- Gasvesikel werden von Bakterien und Archaea als **Schwebhilfe** verwendet. Ihre Hülle besteht ausschließlich aus Protein.
- Aufgrund ihrer Stabilität und der leichten Manipulation ihrer Oberfläche werden sie zur Herstellung von **Vakzinen** oder als **akustische Biosensoren** verwendet.
- Zudem werden sie als **Kontrastmittel** für Ultraschall- oder MRT-Untersuchungen eingesetzt.



**ABB. 3** Haloarchaea-Kulturen in Flüssig- und auf Festmedium. a) Flüssigkultur von *Hbt. salinarum* PHH1 (links), PHH4 (Mitte) und *Haloferax volcanii* (rechts). Die Proben standen nach der Kultivierung für eine Woche am Arbeitsplatz.  $Vac^-$ -Zellen (rot) sinken auf den Boden, während  $Vac^+$ -Zellen bis zur Oberfläche schweben. b) Kolonien von *Hbt. salinarum* PHH1 auf Festmedium. Abb.: Fröls & Pfeifer, TU Darmstadt.

ohne GvpC platzen allerdings schon bei 0,19 MPa, während mit GvpC wiederbeladene Ana-GV erst bei 0,53 MPa zerstört werden. Diese Daten zeigen, wie gut GvpC diese Nanostruktur stabilisiert.

### Gasvesikelgene

Anhand der Aminosäuresequenz von GvpA wurden genetische Sonden erstellt, mit denen das *gvpA*-Gen isoliert werden konnte. Es liegt bei *Anabaena* und bei *Halobacterium* direkt neben *gvpC* [2]. Über Transformationsexperimente mit Gasvesikel-defizienten ( $Vac^-$ ) *Haloferax volcanii* konnte schnell geklärt werden, dass *gvpAC* nicht ausreichen, um diese Nanostrukturen zu bilden. Ein zufällig verwendetes und mit 12 kbp deutlich größeres DNA-Fragment mit den *gvpAC*-Genen aus *Hfx. mediterranei* führte dagegen zu gasvesikelbildenden ( $Vac^+$ ) *Hfx.*

*volcanii*-Transformanten. Die Deletion von Randbereichen dieses Fragments zeigte dann, dass fast der gesamte Bereich für deren Synthese nötig ist [2]. Schließlich wurden 14 *gvp*-Gene bei *Hbt. salinarum* (p-vac-Region) bzw. *Hfx. mediterranei* (mc-vac-Region) identifiziert, die in den umgekehrt zueinander liegenden Gengruppen *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* angeordnet sind. Die Gene *gvpD* und *gvpE* kodieren zwei Haloarchaea-spezifische Genregulatoren, welche die Aktivität des  $P_A$ - bzw.  $P_D$ -Promotors vor *gvpA* bzw. *gvpD* beeinflussen (Tabelle 1). GvpE ist ein Transkriptionsaktivator, während GvpD zur Reduktion der GvpE-Menge beiträgt und so die Gasvesikelbildung reprimiert [2]. Die anderen Gvp-Proteine werden nur in geringen Mengen produziert und sind häufig essenziell wie Deletionsexperimente einzelner *gvp*-Gene in *Hfx. volcanii*-Transformanten zeigen [7]. Ohne sichtbare Gasvesikel ( $Vac^-$ ) sind die  $\Delta A$ -,  $\Delta F$ -,  $\Delta G$ -,  $\Delta J$ -,  $\Delta K$ -,  $\Delta L$ -,  $\Delta M$ - oder  $\Delta O$ -Transformanten (Tabelle 1).  $\Delta C$ -Transformanten enthalten dagegen große Gasvesikel unregelmäßiger Form und  $\Delta H$ -Transformanten instabile Gasvesikel, während  $\Delta I$ -Transformanten sehr lange, zylindrische Gasvesikel bilden [7].  $\Delta N$ -Transformanten produzieren dagegen nur sehr kleine Gasvesikel. Die AAA-ATPase GvpN, deren hydrolytische Aktivität bei *Anabaena* gezeigt wurde, ist daher für die Vergrößerung der Gasvesikel wichtig.

Sehr ähnliche *gvp*-Gengruppen sind auch bei Bakterien beschrieben: So enthält *A. flos-aquae* das Operon *gvpAAAAAACNJKFGVW* mit sieben identischen *gvpA*, *Bacillus megaterium* die Gengruppe *gvpAPQBRNF-GLSKJTU* und *Serratia* die beiden hintereinander liegenden *gvpA<sub>1</sub>CNVF<sub>1</sub>GWA<sub>2</sub>KXA<sub>3</sub>Y*- und *gvrA-gvpHZF<sub>2</sub>F<sub>3</sub>gvrBC*-Operons [3, 4, 8]. In allen Fällen sind die Gene *gvpA*, *C*, *F*, *G*, *J*, *K*, *L*, *M* und *N* präsent, die bis auf *gvpC* und *gvpN* bei *Hbt. salinarum* als essenziell identifiziert wurden.

### Mögliche Funktionen der akzessorischen Gvp-Proteine

Trotz der Bedeutung der akzessorischen Gvp-Proteine für die Gasvesikelbildung sind ihre Funktionen noch nicht ganz geklärt. Die sehr rigiden Gasvesikel lassen sich in Detergenz-haltigem Puffer nicht in ihre Einzelproteine zerlegen; nur GvpC kann mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat-(SDS)-haltigen Puffern entfernt werden, während die Nanostruktur intakt bleibt. Transkriptionsstudien zeigen, dass die Gene *gvpFGHIJKLM* von *Hbt. salinarum* bereits in einer frühen Wachstumsphase transkribiert werden. Daher lässt sich vermuten, dass die Proteine bei der Initiation der Gasvesikel eine Rolle spielen. Die Aktivität des Promotors  $P_F$  liegt aber deutlich unter der Aktivität des  $P_A$ -Promotors vor *gvpACNO*, der durch GvpE etwa 10-fach hochreguliert wird, um die >10.000 GvpA-Moleküle in der Hülle eines Gasvesikels zu produzieren [2]. Pro Zelle werden etwa 30 bis 70 Gasvesikel gebildet. Interaktionsstudien zeigen, dass die Gvp-Proteine miteinander interagieren; GvpL, N oder C haben sogar fast alle anderen Gvp-Proteine als Partner [6]. Eine Interaktion von GvpA und GvpF

**TAB 1. GVP-PROTEINE AUS HBT. SALINARUM**

Gvp	Funktionen
GvpA	Hauptstrukturprotein; verwandt mit GvpJ und GvpM
GvpC	stabilisiert Außenoberfläche der GV; bedingt die Zylinderstruktur
GvpN	AAA-ATPase; essenziell für Vergrößerung der GV durch Einbau von GvpA
GvpO	essenziell für die GV-Bildung, bindet an GvpN
GvpD	Repression: Anwesenheit von GvpD führt zur Reduktion von GvpE
GvpE	Transkriptionsaktivator für den $P_A$ - und $P_D$ -Promotor
GvpF	essenziell, bindet GvpA-Monomer, GvpA-Chaperon?
GvpG	essenziell; Partner von GvpL und GvpF
GvpH	nicht-essenziell; stabilisiert die Hülle
GvpI	nicht-essenziell; Fehlen führt zu langen GV (>1 $\mu$ m)
GvpJ	essenziell, verwandt mit GvpA und GvpM
GvpK	essenziell
GvpL	Plattform für die Bindung aller Gvp-Proteine außer von GvpA
GvpM	essenziell, verwandt mit GvpA und GvpJ

(A/F) bzw. die A/N- oder A/O-Interaktionen sind gut nachweisbar. GvpF könnte als Chaperon fungieren, um das hydrophobe GvpA vor dem Einbau in Lösung zu halten und/oder GvpA für den Einbau in die Rippe zu orientieren. GvpF interagiert auch mit GvpL, das mit allen anderen Gvp außer GvpA interagiert [6]. Eine Interaktion von GvpA und GvpC konnte aber nicht gezeigt werden. Ein Grund dafür wäre, dass GvpC nur die bereits aggregierten GvpA-Moleküle der Hülle erkennt. Aufgrund seiner vielen Interaktionspartner könnte GvpL als Plattform für die kleineren Gvp dienen und so zur Bildung eines initialen Proteinkomplexes beitragen, der die GvpA-Aggregation am Start der Gasvesikelbildung unterstützt [6].

### Struktur von GvpA in der Gasvesikelhülle

Eine Kristallisation von GvpA zur Ermittlung der 3D-Struktur ist wegen der Hydrophobizität von GvpA leider nicht möglich. Bioinformatische Analysen schlagen als Sekundärstruktur eine  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Struktur vor (Abbildung 4a). *In silico* wurde für das haloarchaeale GvpA eine 3D-Struktur modelliert, die *in vivo* über die Substitution einzelner Aminosäuren und deren Auswirkung auf die Gasvesikelbildung in  $\Delta A+A_{mut}$ -Transformanten überprüft wurde [5]. Wichtig für die Struktur sind z. B. die polaren Aminosäuren der N-terminalen  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$ , der  $\beta$ -Turn zwischen den beiden antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern sowie einzelne Aminosäuren im  $\beta$ -Faltblattbereich und im ersten Teil der Helix  $\alpha 2$  (Abbildung 4a). Viele der essenziellen Aminosäuren in GvpA sind auch am Kontakt zu GvpF beteiligt. Der  $\beta$ -Faltblattbereich vernetzt GvpA-Moleküle in der Rippe und bildet die sehr hydrophobe Innenoberfläche der Gasvesikelhülle, während der  $\beta$ -Turn zur Vernetzung zweier benachbarter Rippen beiträgt.

Vor kurzem wurden Gasvesikel von *B. megaterium* und *A. flos-aquae* mittels Cryo-EM bzw. Cryo-Elektronentomographie hochaufgelöst dargestellt und die 3D-Struktur von GvpA in der Hülle ermittelt [9, 10]. Auch die exakte Lage von GvpC auf der GV-Oberfläche wurde bestimmt. Das Protein bindet mit jedem der 33-Aminosäure-Repeats vier GvpA-Moleküle einer Rippe und folgt als durchgängig  $\alpha$ -helikales Protein der Rippe wie ein Seil, das das Gasvesikel umschlingt. Punktuelle Kontakte von GvpC bestehen zur Helix  $\alpha 2$  von GvpA. Beide Hälften der Gasvesikelhülle werden von GvpA-Molekülen in umgekehrter Orientierung gebildet (Abbildung 4b, c). Etwa in der Mitte jedes GV ist daher ein „Saum“ erkennbar, wo die Interaktion zwischen den beiden benachbarten Rippen anders verläuft als bei weiter entfernt liegenden Rippen (Abbildung 4c). Hier treffen die  $\beta$ -Turns benachbarter GvpA-Moleküle aufeinander, während der Kontakt der GvpA-Moleküle in den Rippen der beiden Hälften über die N-terminalen Aminosäuren vor der Helix  $\alpha 1$  erfolgt, die von außen auf dem  $\beta$ -Faltblattbereich des benachbarten GvpA-Moleküls aufliegen [9]. Die dahinter liegende Helix  $\alpha 1$  bildet den „Steg“ zwischen den kleinen Löchern, durch die Gase frei diffundieren. Die Assemblierung eines Gasvesikels beginnt an

den Spitzen der beiden Kappen, und der zunächst gebildete Bikonus wird durch den Einbau weiterer GvpA-Moleküle in der „Saumregion“ in der Mitte der Nanostruktur vergrößert. Hier könnten auch GvpN (und GvpO?) lokalisiert sein, die beide mit GvpA interagieren und zum Einbau von GvpA benötigt werden [6]. An der Spitze der beiden Kappen bleibt eine kleine Öffnung, die von akzessorischen Gvp-Proteinen geschlossen werden könnte. Die hier lokalisierten  $\alpha 1$ -Helices von GvpA binden auch GvpF und GvpJ [6]. Dies ist ein erstes Modell, um die Selbstassemblierung (*self-assembly*) der Nanostruktur zu erklären.

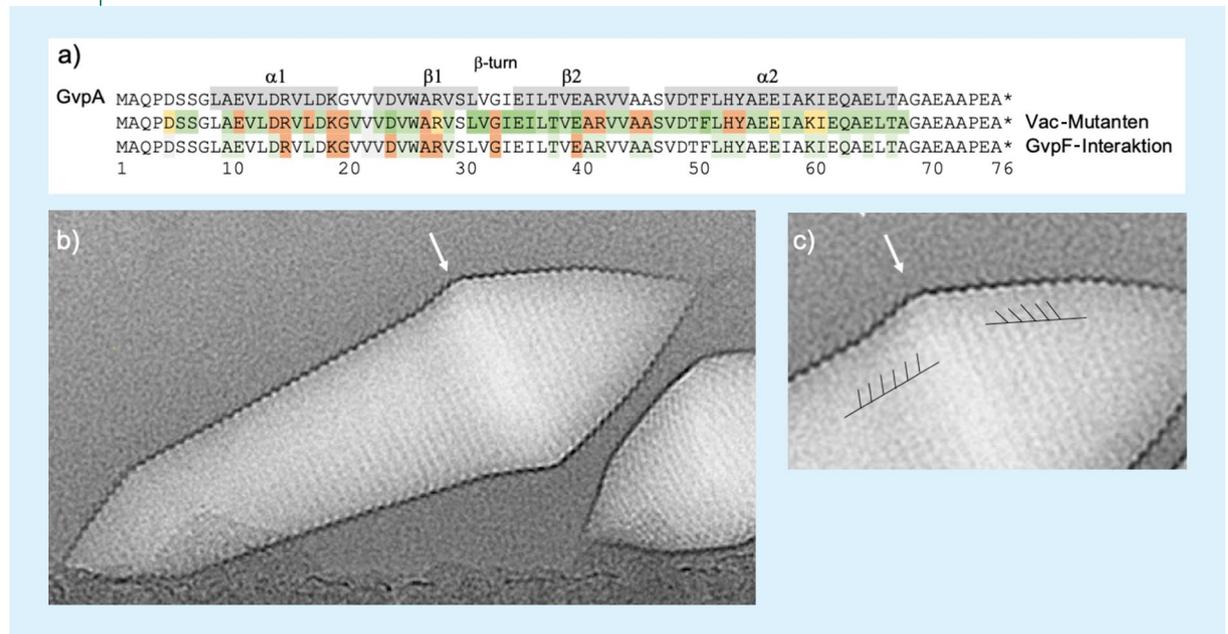
### Einsatz von Gasvesikeln in der biomedizinischen Forschung

Die Stabilität der Gasvesikel und ihre große Oberfläche, die leicht über eine Fusion von GvpC mit Fremdproteinen oder -peptiden „dekoriert“ werden kann, eröffnet die Möglichkeit, Gasvesikel für (bio)medizinische Fragestellungen zu nutzen. Zwei Richtungen werden hier verfolgt: (1) die Dekoration der GV mit Peptiden pathogener Bakterien oder Viren zum Einsatz für die Antikörperproduktion (Antigen-Display-System) und (2) die Verwendung von GV als neuartiges Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen oder in der Magnetresonanztomographie (MRT).

Für die Antigenpräsentation wurden bakterielle oder virale Peptide an den C-Terminus des haloarchaealen GvpC fusioniert und entsprechend modifizierte GV in *Hbt. salinarum* hergestellt [11]. Diese Halo-GV können leicht isoliert und gereinigt werden. In Kaninchen oder Mäusen ist eine Immunisierung mit den Halo-GV ohne Zusatz von einem Adjuvans sehr effektiv. Gegen Gasvesikel - dekoriert mit Peptiden des *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) oder einem äußeren Membranprotein von *Chlamydia trachomatis* - wurden bereits langlebige Immunantworten erhalten. Gasvesikel sind in *Hbt. salinarum* stabil und die Kühlung der Zellen ist nicht erforderlich. Da Archaea kein Lipopolysaccharid enthalten, besteht auch keine Gefahr einer Verunreinigung mit toxischem ▶ Lipoid A.

Der Einsatz der Gasvesikel als akustische Reporter in der Sonographie wurde vor allem von Mikhail Shapiro (Pasadena, USA) forciert [12]. Bei der Ultraschalldiagnostik werden normalerweise chemisch synthetisierte Luftbläschen mit über 1  $\mu$ m Durchmesser verwendet, die von einer Lipid-, Protein- oder DNA-Hülle umgeben sind. Diese Mikron-Luftbläschen sind relativ instabil, und wegen ihrer Größe ist ihr Eindringen in Gewebe begrenzt [13]. Im Gegensatz dazu sind Gasvesikel deutlich kleinere, stäbchenförmige Strukturen, die in Agarblöckchen eingebettet im Ultraschall gut nachweisbar sind. Auch in Mäusen injiziert sind ihre Echosignale gut zu erkennen. Wegen ihres kleinen Durchmessers können GV die Wand des Blutgefäßsystems passieren und in das extravaskuläre Gewebe eindringen. Vorteilhaft gegenüber den Mikron-Luftbläschen ist ihre Stabilität, und gefüllt mit ▶ hyperpolarisiertem  $^{129}\text{Xenon}$  sind sie sogar in picomolarer Konzentration mit-

**ABB. 4 | GVPA-SEQUENZ UND ISOLIERTE GASVESIKEL IM CRYO-EM.**



**a) Aminosäuresequenz von GvpA und Markierung der  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ -Struktur (grau unterlegt). In der zweiten Zeile sind Aminosäuren in rot unterlegt, deren Substitution  $Vac^- \Delta A+A_{mut}$ -Transformanten ergibt [5]. Aminosäuren, die bei Substitution zu kleinen Gasvesikel führen, sind gelb markiert, und in grün Positionen, die  $Vac^+$ -Transformanten ergeben. Für die A/F-Interaktion (3. Zeile) sind die wichtigen Aminosäuren rot markiert; die hellgrün markierten sind nicht relevant für die Gasvesikelbildung. b) Isolierte Halo-GV im Cryo-EM. c) Ausschnitt aus b) mit Hervorhebung der Richtung einer am Rand sichtbaren Struktur von GvpA. GvpA-Moleküle liegen in beiden Hälften daher in umgekehrter Orientierung. Der Pfeil in b) und c) markiert den „Saum“. Aufnahme: Bollschweiler & Engelhardt, MPI für Biochemie.**

tels Magnetresonanztomographie (MRT) nachweisbar [12]. Konventionelle MRT-Kontrastmittel werden erst im  $\mu$ M-Bereich detektiert; hier werden ► superparamagnetische Eisenoxide oder ► paramagnetische Lanthanoide wie das Seltenerdmetall Gadolinium eingesetzt, die in hoher Konzentration potenziell toxisch sind.

Gasvesikel kollabieren bei akustischem Druck, der bis zu 9-fach über dem kritischen hydrostatischen Druck liegt, und werden kontrastlos, was in den Ultraschallaufnahmen vor und nach der akustischen Druckapplikation gut erkennbar ist. Wie beim hydrostatischen Druck ist auch die akustische Drucktoleranz von GV aus verschiedenen Spezies unterschiedlich. Gasvesikel aus *Bacillus megaterium* (Mega-GV) sind vom Durchmesser her etwa 7-fach kleiner als die großen Halo-GV, und die Ana-GV von *A. flos-aquae* liegen mit etwa 100-nm-Durchmesser dazwischen. Diese Unterschiede erlauben ► Multiplex-Imaging-Analysen. Die Drucksensitivität der GV-Hülle wird zudem durch GvpC auf der Oberfläche beeinflusst, und so kommen auch GV mit modifiziertem GvpC zum Einsatz.

Ana-GV dekoriert mit GvpC plus Arginyl-Glycyl-Asparatyl-Rest (RGD) am C-Terminus reichern sich z. B. spezifisch auf einer Integrin-überproduzierenden humanen Glioblastom-Zelllinie an, da RGD effizient an Integrin bindet [14]. Auf diese Weise erlauben GvpC-Modifikationen ein zelluläres Targeting. Aber auch proteolytische Enzymaktivitäten wurden mit GV als akustischem Reporter stu-

dirt [15]. Getestet wurde z. B. die Endopeptidase TEV, deren spezifische Erkennungssequenz in den *Repeat 2* von GvpC eingebaut wurde. Werden solche Ana-GV *in vitro* der Protease ausgesetzt, fragmentiert diese GvpC, aber die darunter liegende Hülle bleibt intakt. Die Stabilität der GV wird dadurch signifikant erniedrigt, was über den kritischen akustischen Druck messbar ist [15]. In lebenden Bakterienzellen wurde dies anhand von ClpXP getestet. ClpX ist ein ATP-abhängiges Entfaltungsprotein, das ein Zielprotein mit entsprechender Erkennungssequenz (Degron) entfaltet und an ClpP zum Abbau übergibt. GvpC mit dem ClpXP-Degron am C-Terminus wird durch ClpXP degradiert – auch hier bleibt die Gasvesikelhülle intakt, kollabiert aber bei einem erheblich geringeren akustischen Druck. Steht die Expression der *clpXP*-Gene in *E. coli* unter einem Arabinose-induzierbaren Promoter, kann der Abbau von GvpC durch Arabinosegabe gesteuert und über Ultraschallanalysen beobachtet werden. Ana-GV eignen sich daher als akustische Biosensoren zur direkten Messung der Genexpression [15].

Die Fähigkeit der GV, spezifische Zelltypen in Säugtieren zu erkennen, sich hier anzureichern und diese im Ultraschall besser sichtbar zu machen, wird auch dazu verwendet, Tumoren in Säugern aufzuspüren. Zum Beispiel wurden Halo-GV in Mäuse gespritzt, die Tumoren in der Leber enthalten [13]. Die im Tumor angereicherten GV waren gut zu erkennen, und ein kurzes, akustisches

Drucksignal eliminierte ihr Echo sofort. Die GV waren sogar in den inneren Bereich des Tumors vorgedrungen, was konventionelle Kontrastmittel aufgrund ihrer Größe nicht können. In ähnlicher Weise wurden auch Gasvesikel von *Microcystis* getestet [16]. Sie reichert sich im Tumor in großen Mengen an. Die GV sind für Säuger nicht toxisch und eignen sich daher für das *in-vivo*-Imaging. Sie könnten aber auch als Vehikel verwendet werden, um Medikamente im Tumor gezielt zu platzieren [13,16]. Die Entwicklungen gehen auf diesem Gebiet sehr stürmisch voran – neben der Shapiro-Gruppe sind hier vor allem chinesische Arbeitsgruppen aktiv.

### Fazit

Aus einer ursprünglich zum Flottieren von Mikroben entwickelten Nanostruktur, die über 50 Jahre nur wenige Arbeitsgruppen interessierte, wurde eine stabile Nanostruktur entwickelt, die für Ultraschallanalysen oder für die Präsentation von Fremdproteinen im Säuger verwendet werden kann. Die grundlegenden Forschungen an GV fanden lange in einer Nische statt. Gasvesikel waren für biochemische Analysen zu stabil, und das Hauptstrukturprotein GvpA konnte aufgrund seiner hohen Hydrophobizität nicht kristallisiert werden. Mittels moderner Cryo-EM-Techniken wurde das Rätsel ihres Aufbaus aber vor kurzem gelöst. Großen Schub erhielt das Forschungsgebiet durch das Interesse von Medizinern an stabilen, proteinumhüllten Luftbläschen zur Anwendung in der Ultraschall- oder MRT-Diagnostik. In Zukunft wird sicher noch einiges über den Einsatz der Gasvesikel zu lesen sein.

### Zusammenfassung

Gasvesikel sind gasgefüllte, intrazelluläre Nanostrukturen, die von einigen Mikroben als Schwebhilfe im wässrigen Milieu gebildet werden. Fotosynthetische Cyanobakterien und das extrem salzliebende Archaeon *Halobacterium salinarum* flottieren damit energiesparend bis zur Wasseroberfläche. Obwohl die Gas-umgebende Hülle aus nur zwei Gvp-Proteinen besteht, sind über zehn weitere Gvp-Proteine am Aufbau dieser spindel- oder zylinderförmigen Nanostrukturen beteiligt. Gasvesikel sind leicht isolierbar und streuen Wellen wie Licht oder Ultraschall. Sie werden als neuartige Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen oder in der Magnetresonanztomographie verwendet und sind als akustische Biosensoren einsetzbar. Über das Oberflächenprotein GvpC sind ihre Eigenschaften und ihre Stabilität modulierbar. Eine Fusion von GvpC mit Peptiden bakterieller oder viraler Krankheitserreger erzeugt zudem dekorierte Gasvesikel, die zur Herstellung von Vakzinen eingesetzt werden.

### Summary

#### Gas vesicles and their application in biomedicine

Gas vesicles are gas-filled, intracellular nanostructures produced by several microbes as flotation device in their watery

### GLOSSAR

**Lipoid A:** Synonym: Lipid A; Lipidbestandteil von Lipopolysaccharid in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.

**hyperpolarisiertes <sup>129</sup>Xenon:** Eine Probe, in der ein Zustand des Elektronenspins gegenüber dem anderen deutlich mehr überwiegt als die Energiedifferenz über die Boltzmann-Statistik vorhersagt, nennt man hyperpolarisiert. Hyperpolarisiertes <sup>129</sup>Xenon wird über den Umweg der Polarisierung von Elektronenspins von Alkalimetallgas erreicht, deren Hüllenelektronen durch optische Pumpen ausgerichtet wurden. Bei der Mischung beider Gase richten die ausgerichteten Elektronenspins der Alkalimetallgase die Kernspins der Edelgase aus. Hyperpolarisiertes <sup>129</sup>Xe wird in der Kernspinresonanz (NMR) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT) angewandt und ist als Kontrastmittel sehr gut zu erkennen.

**Paramagnetische Lanthanoide:** Gadolinium-haltige Verbindungen; Paramagnetismus tritt nur in Stoffen auf, deren Atome oder Moleküle ungepaarte Elektronen besitzen und ein magnetisches Moment haben. Paramagnetische Materialien zeigen ohne äußeres Magnetfeld keine magnetische Ordnung. Gadolinium-haltige Verbindungen werden als MRT-Kontrastmittel verwendet; sie verkürzen die T<sub>1</sub>-Relaxationszeit (d. h. die Zeit zur Wiederausrichtung des Kernspins der Atome entlang des angelegten Magnetfeldes nach dem Hochfrequenzimpuls), indem sie dem angeregten Spin die Energie schneller entziehen.

**Superparamagnetische Eisenoxide:** SPIO: superparamagnetic iron oxide; kleine Eisenoxidpartikel in der Größenordnung von wenigen Nanometern weisen ohne Magnetfeld keine Magnetisierung auf, lassen sich im Magnetfeld aber stark magnetisieren (= Superparamagnetismus). Sie können polykristalline Partikel mit bis zu 100 nm Durchmesser bilden. Mit organischem Hüllmaterial (Stärke, Dextran, PEG, aber auch Proteine, DNA) versehen werden solche Nanopartikel als MRT-Kontrastmittel verwendet. Sie verkürzen die T<sub>1</sub>- und T<sub>2</sub>-Relaxationszeit.

**Multiplex Imaging:** Simultane Verwendung von zwei oder mehreren Techniken, um Dinge sichtbar zu machen, z. B. verschiedene Kontrastmittel oder MRT, CT und Ultraschall als Untersuchungsmethoden.

environment. Gas-vesiculate photosynthetic cyanobacteria, or the extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*, float with gas vesicles towards the surface. The gas vesicle shell consists of two Gvp proteins only, but ten additional Gvp proteins are required to form these spindle- or cylinder-shaped nanostructures. Gas vesicles scatter waves like light or ultrasound. They can easily be isolated and applied as novel contrast agent for ultrasound imaging or used as acoustic biosensors. The properties of gas vesicles can be modulated by altering the surface protein GvpC. A fusion of GvpC with peptides of bacterial or viral pathogens results in decorated gas vesicles that are used as effective antigen display system for vaccination.

### Danksagung

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen Mitarbeitern für ihre engagierte Arbeit an Gasvesikeln, und D. Bollschweiler und H. Engelhardt, MPI für Biochemie, für ihre Analysen von GV über Cryo-Elektronentomographie. Die Arbeiten wurden von der DFG gefördert (PF 165/15-1).

### Schlagworte

*Halobacterium*, *Microcystis*, Gasvesikelaufbau, Kontrastmittel, Ultraschall, Antigen-Display-System

## Literatur

- [1] A. E. Walsby (1994). Gas vesicles. *Microbiol. Reviews* 58, 94–144.
- [2] F. Pfeifer (2012). Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 705–715, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2834>.
- [3] N. Li, M. C. Cannon (1998). Gas vesicle genes identified in *Bacillus megaterium* and functional expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 2450–2458.
- [4] Y. Tashiro et al. (2016). Molecular genetic and physical analysis of gas vesicles in buoyant enterobacteria. *Environ. Microbiol.* 18, 1264–1276, doi: 10.1111/1462-2920.13203.
- [5] R. Knitsch et al. (2017). Mutations in the major gas vesicle protein GvpA and impacts on gas vesicle formation in *Haloflex volcanii*. *Mol. Microbiol.* 106, 530–542, doi: 10.1111/mmi.13833.
- [6] F. Pfeifer (2022). Recent advances in the study of gas vesicle proteins and application of gas vesicles in biomedical research. *Life* 12, 1455, <https://doi.org/10.3390/life12091455>.
- [7] S. Offner et al. (2000). Eight of fourteen *gvp* genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *J. Bacteriol.* 182, 4328–4336.
- [8] R. Kinsman, P. K. Hayes (1997). Genes encoding proteins homologous to halobacterial Gvps N, J, K, F & L are located downstream of *gvpC* in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *DNA Seq.* 7, 97–106.
- [9] S. T. Huber et al. (2022). Cryo-EM structure of gas vesicles for buoyancy-controlled motility. *bioRxiv preprint* <https://doi.org/10.1101/2022.05.08.489936>.
- [10] P. Dutka et al. (2022). Structure of *Anabaena flos-aquae* gas vesicles revealed by cryo-ET. *bioRxiv preprint* <https://doi.org/10.1101/2022.06.21.496981>.
- [11] S. DasSarma, P. DasSarma (2015). Gas vesicle nanoparticles for antigen display. *Vaccines* 3, 686–702, <https://doi.org/10.3390/vaccines3030686>.
- [12] M. G. Shapiro et al. (2014). Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters. *Nat. Nanotech.* 9, 311–316.
- [13] M. Wei et al. (2022). Biosynthetic gas vesicles from Halobacteria NRC-1: A potential ultrasound contrast agent from tumor imaging. *Pharmaceutics* 14, 1198, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061198>.
- [14] A. Lakshmanan et al. (2016). Molecular engineering of acoustic protein nanostructures. *ACS Nano* 10, 7314–7322, doi: 10.1021/acsnano.6b03364.
- [15] A. Lakshmanan et al. (2020). Acoustic biosensors for ultrasound imaging of enzyme activity. *Nat. Chem. Biol.* 16, 988–996, <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0591-0>.
- [16] H. Long et al. (2021). Non-modified ultrasound-responsive gas vesicles from *Microcystis* with targeted tumor accumulation. *Int. J. Nanomed.* 16, 8405–8416.

## Verfasst von:



Felicitas Pfeifer studierte Biologie und promovierte an der Universität Würzburg. Postdoc-Aufenthalte in San Francisco und am MPI für Biochemie in Martinsried; Habilitation an der LMU München im Fach Mikrobiologie. 1994–2020 Professorin für Mikrobiologie an der TU Darmstadt, wo sie sich derzeit noch als Forschungsmentorin engagiert. Sie ist Mitglied des Editorial Boards der *BiUZ* und seit 2014 Sprecherin der biowissenschaftlichen Fachgesellschaften im VBIO.

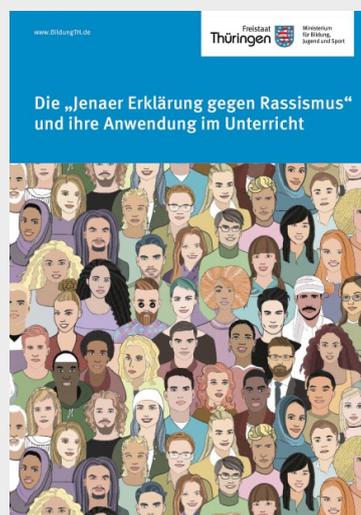
## Korrespondenz

Prof. Dr. Felicitas Pfeifer  
Microbiology and Archaea  
TU Darmstadt  
Schnittspahnstrasse 10, 64287 Darmstadt  
Email: [pfeifer@bio.tu-darmstadt.de](mailto:pfeifer@bio.tu-darmstadt.de)

## HANDREICHUNG FÜR RASSISMUSKRITISCHE BILDUNGSARBEIT

Anlässlich des Internationalen Tags gegen Rassismus am 21. März 2023 veröffentlichte das Thüringer Ministerium für Bildung, Jugend und Sport (TMBJS) eine Handreichung für Thüringer Schulen zur Anwendung der Jenaer Erklärung im Unterricht. Die Publikation der Autoren Karl Porges und Uwe Hoßfeld von der AG Biologiedidaktik der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist ein konkretes inhaltliches Angebot für rassismuskritische Bildungsarbeit an Thüringer Schulen. Sie steht ab sofort als Download zur Verfügung und kann beim TMBJS auch als Druckwerk bestellt werden. Zentraler Inhalt der Jenaer Erklärung von 2019 ist, dass es für die Verwendung des Begriffs der „Rasse“ im Zusammenhang mit menschlichen Gruppen keine biologische Begründung gibt: „Das Konzept der Rasse ist das Ergebnis von Rassismus und nicht dessen Voraussetzung“ (Jenaer Erklärung). Auf dem Klappentext der Handreichung

heißt es: „Das Konzept der „Rasse“, auf den Menschen übertragen, gilt seit langem als wissenschaftlich überholt. Dennoch ist Rassismus ein alltägliches



Problem. Rassentheorien wurden noch bis Anfang des 21. Jahrhunderts in den Köpfen vieler Menschen verwurzelt. Aktiv gegen jegliche Form des Rassismus und Diskriminierung in den Schulen zu wirken, ist daher eine Verpflichtung für alle an Bildung Beteiligte. Schließlich finden sich auch in den Beschlüssen und Veröffentlichungen der Kultusministerkonferenz Elemente, die eine rassismuskritische Bildungsarbeit fordern. Die vorliegende Broschüre mit dem Titel „Die Jenaer Erklärung gegen Rassismus“ und ihre Anwendung im Unterricht“ knüpft daran an, greift den wissenschaftlichen Kenntnisstand auf und bietet Hilfestellungen für Lehrkräfte, das Konzept „menschliche Rassen“ sachrichtig zu widerlegen.“ Weitere Informationen zur Handreichung unter <https://bildung.thueringen.de/aktuell/rasse-ist-kein-wissenschaftlicher-begriff-handreichung-fuer-thueringer-schulen>



Verband | Biologie, Biowissenschaften  
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM  
FÜR DIE**

**BIEWISSENSCHAFTEN**

### **Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:**

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie



[www.vbio.de](http://www.vbio.de)

**Jetzt beitreten!**

