

## Meilensteine in der Biochemie des Siliciums: von der Grundlagenforschung zu biotechnologischen Anwendungen

Reinhold Tacke\*

*Professor Klaus Rühlmann zum 70. Geburtstag gewidmet*

Vor etwa zwei Jahrzehnten wurden die ersten umfassenden Bücher veröffentlicht, die sich mit biologischen Aspekten der Silicium-Chemie beschäftigen.<sup>[1-4]</sup> Seitdem wird allgemein anerkannt, daß Silicium für viele biologische Systeme ein essentielles Element ist, das für den Aufbau von strukturbildenden Materialien und/oder für metabolische Prozesse benötigt wird. Im Unterschied zur gut untersuchten Biochemie und Pharmakologie vieler unnatürlicher Organosilicium-Verbindungen (Verbindungen mit mindestens einer Si-C-Bindung)<sup>[5, 6]</sup> ist nur sehr wenig darüber bekannt, wie Silicium auf der molekularen Ebene von den Zellen transportiert, verarbeitet und genutzt wird. Für viele andere essentielle Elemente kennt man spezifische Bindungsstellen (z. B. in Enzymen), über die diese ihre jeweiligen biologischen Effekte vermitteln;<sup>[7]</sup> für Silicium ist das nicht der Fall. Dieser Sachverhalt sowie die Tatsache, daß bis heute eine Biosynthese von Si-C-Bindungen unbekannt ist und Si-O-C-Einheiten unter physiologischen Bedingungen kinetisch instabil sind, haben die Entwicklung alternativer Konzepte zum Wirkungsmechanismus des Siliciums veranlaßt. Diese – sehr kontrovers diskutierten – Konzepte beinhalten den Vorschlag, daß die Essentialität des Siliciums, in welcher chemischen Form auch immer, nichts mit seiner direkten Wirkung auf biologische Funktionen zu tun haben könnte, sondern vielmehr mit seiner Fähigkeit, die Bioverfügbarkeit anderer Elemente, z. B. Aluminium, Calcium und Eisen, zu limitieren.<sup>[8, 9]</sup> Bedenkt man dieses Dilemma, so lassen die Ergebnisse jüngster Untersuchungen in der marinen Silicium-Biochemie aufhorchen: Mit dem Studium mariner Organismen, die riesige Mengen silicifizierter Strukturen produzieren (Stichwort Biosilifizierung), haben Biochemiker und Molekularbiologen nun damit begonnen, die Proteine, Gene und molekularen Mechanismen aufzuklären, die die Bildung dieser Strukturen steuern. Diese Untersuchungen, die im Mittelpunkt dieses Beitrags stehen, können als Meilensteine in der Entwicklung der Silicium-Biochemie betrachtet werden.

Im Meerwasser gelöstes Silicium kommt hauptsächlich als undissoziierte Orthokieselsäure,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , vor. Deren Gesamtmenge in den Weltmeeren beträgt etwa  $10^{17}$  Mol (ca. 9.6 Teratonnen (Tt);  $T \triangleq 10^{12}$ ), und ihre mittlere Konzentration liegt bei etwa  $70 \mu\text{M}$ .<sup>[10]</sup> Viele marine Organismen – wie Diatomeen, Silicoflagellaten, Radiolarien und Schwämme – enthalten Kieselsäureskelette ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), die nach Aufnahme von Orthokieselsäure aus dem Meerwasser aufgebaut werden. Die Gesamtproduktion von biogener Kieselsäure im Oberflächenwasser wurde auf  $240 \pm 40$  Tmol Silicium pro Jahr geschätzt. Dies bedeutet, daß marine Biosysteme jährlich die gigantische Menge von etwa 6.7 Gigatonnen (Gt;  $G \triangleq 10^9$ ) Silicium verarbeiten.<sup>[10]</sup> Die genetisch kontrollierte Biosynthese von Kieselsäure erfolgt dabei unter milden physiologischen Bedingungen,<sup>[3]</sup> während geochemische und industrielle Kieselsäuresynthesen bezüglich Temperatur, pH-Wert und/oder Druck in der Regel extreme Bedingungen erfordern.

Die Diatomeen leben im Meerwasser, Brackwasser und Süßwasser und bilden mit mehr als 10000 rezenten Arten die größte Klasse der Protisten. Bezogen auf jene Planktonorganismen, für die Kieselsäure eine wichtige strukturelle Komponente darstellt, sind die Diatomeen die dominierende Quelle für biogene Kieselsäure im Oberflächenwasser der Weltmeere. Diese Organismen produzieren formkontrollierte Strukturen aus Kieselsäure von atemberaubender Schönheit (Abbildung 1). Das faszinierende artenspezifische Design und die Ornamentierung der aus Kieselsäure aufgebauten Zellwände stellen die Basis für die Systematik der Diatomeen dar und weisen deutlich auf eine genetische Determinanz hin.

Die Zellwand von Diatomeen (Frustulum) ist aus nanostrukturierter amorpher Kieselsäure aufgebaut, die mit Polysacchariden und Proteinen assoziiert ist.<sup>[3]</sup> Das Frustulum besteht aus zwei Teilen, der Epitheca und der Hypotheca, die beide aus einer sogenannten Valva („Schalendeckel“) und mehreren Kieselsäurestreifen (Gürtelbänder) aufgebaut sind. Im Bereich der Gürtelbandregion überlappen sich Epitheca und Hypotheca. Neue Zellwände werden in einer spezialisierten Vesikel gebildet (silica deposition vesicle, SDV): Gelöstes Silicium wird aus der Umgebung aufgenommen und in der SDV konzentriert, in der dann die unlösliche Kieselsäure gebildet und ausgeschieden wird. Kürzlich wurden erste Daten vorgestellt, die bestimmte Kieselsäure-Bau-

[\*] Prof. Dr. R. Tacke  
Institut für Anorganische Chemie der Universität  
Am Hubland, D-97074 Würzburg  
Fax: (+49) 931-888-4609  
E-mail: r.tacke@mail.uni-wuerzburg.de

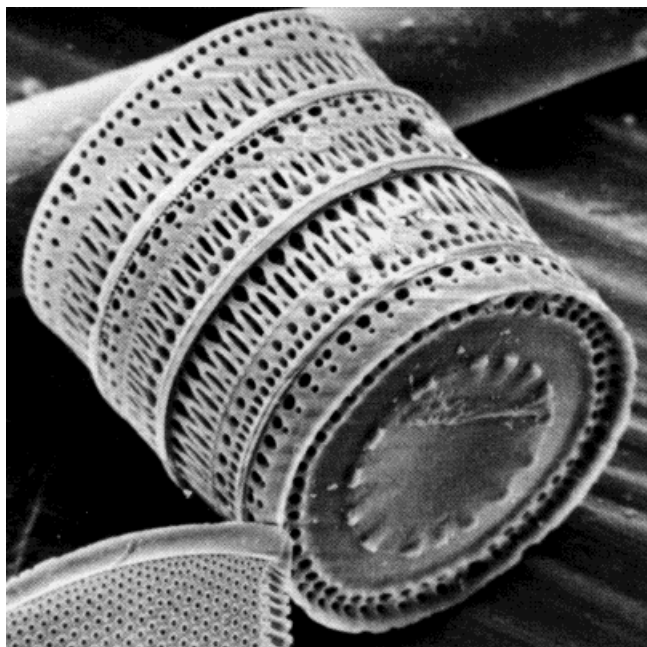
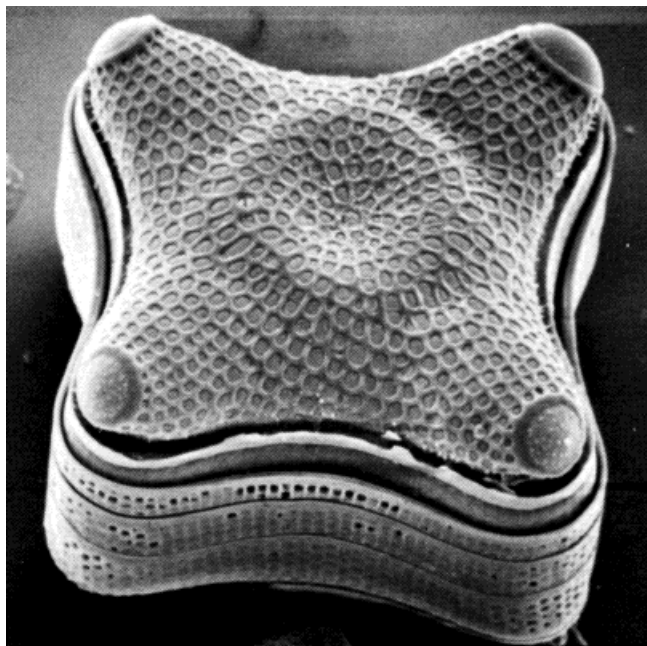


Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen der Diatomeen *Amphitetras antediluviana* (einzelne Zelle; oben) und *Paralia sulcata* (miteinander verknüpfte Zellen, fossil; unten). Wiedergabe der REM-Aufnahmen mit freundlicher Genehmigung.<sup>[11]</sup> ©1990 Cambridge University Press.

elemente mit spezifischen Proteinen in der Diatomeenzellwand korrelieren.<sup>[12–14]</sup> Eine neue Familie von calciumbindenden Glycoproteinen, die sogenannten EDTA-extrahierbaren Frustuline, wurden als Bestandteile der Zellwand der marinen Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* identifiziert (EDTA = Ethylendiamintetraacetat).<sup>[12, 13]</sup> Außerdem gibt es eine weitere Familie von Glycoproteinen in der Zellwand, die gegen eine Behandlung mit EDTA resistent sind und fester mit dem Kieselsäurerüst assoziiert zu sein scheinen.<sup>[14]</sup> Diese Proteine können nach vollständigem Auflösen der Zellwand mit

wasserfreiem Fluorwasserstoff isoliert werden, weshalb sie HF-extrahierbare Proteine (HF-extractable proteins, HEPs) genannt werden. Umfangreiche Untersuchungen mit einem dieser Proteine, dem 200-kDa-Protein HEP200, haben gezeigt, daß dieses spezifisch innerhalb der Gürtelbandregion der Zellwand lokalisiert ist. Wie durch Immunolokalisierungsexperimente mit Antikörpern gegen Frustuline und HEP200 gezeigt werden konnte, bilden die Frustuline die äußere Hülle der Zellwand und zeigen eine ubiquitäre Verteilung, während HEP200 auf einer Untereinheit aus etwa sechs von insgesamt etwa dreißig Kieselsäurestreifen lokalisiert ist, welche die Gürtelbandregion der Zellwand aufbauen.<sup>[14]</sup> Diese Ergebnisse stützen die These, daß die speziesspezifische Architektur der Diatomeenzellwand aus Unterschieden in der Struktur speziesspezifischer Proteine resultieren könnte, die mit dem Kieselsäurerüst assoziiert sind.

Diatomeen wurden auch hinsichtlich des Mechanismus des Siliciumtransports untersucht, der ein integraler Bestandteil des Silicifizierungsprozesses ist.<sup>[15, 16]</sup> Da die Konzentrationen von gelöstem Silicium in der Umwelt ziemlich niedrig sind (siehe oben), müssen Diatomeen über ein effizientes Transportsystem verfügen. Silicium (als Orthokieselsäure oder Silicat) muß nicht nur in die Zelle, sondern auch intrazellulär in die SDV transportiert werden, wo die Kieselsäurebildung erfolgt. Die Zellen halten Pools von gelöstem Silicium (in welcher chemischen Form auch immer) mit relativ hohen Siliciumkonzentrationen aufrecht. Silicium wird nur während einer ganz bestimmten Zeit im Zellzyklus (unmittelbar vor der Zellwandsynthese) aufgenommen, und die kinetischen Parameter des Siliciumtransports verändern sich während der Aufnahmeperiode. Kürzlich wurde ein Protein der Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* charakterisiert, das Silicium aus der Lösung (Seewasser) in die Zelle transportiert.<sup>[15, 16]</sup> Diese Entdeckung basiert auf der Klonierung und Charakterisierung der DNA, die dieses Protein codiert. Um direkt zu testen, ob die isolierte DNA einen Siliciumtransporter codiert, wurde die mRNA (aus der klonierten DNA in vitro hergestellt) in *Xenopus laevis*-Eier injiziert, die dann hinsichtlich der Siliciumaufnahme (Germaniumaufnahme) untersucht wurden, indem man <sup>68</sup>Ge als einen Silicium-analogen Tracer verwendete.<sup>[15]</sup> Tatsächlich wurde für die RNA-injizierten Froschzellen die Synthese des Transporterproteins und eine signifikante Siliciumaufnahme (Germaniumaufnahme) beobachtet, wobei diese Aufnahme natriumabhängig ist. Siliciumtransporterproteine dieses Typs müssen allerdings nicht notwendigerweise auch in dem intrazellulären Transport involviert sein.

Ein weiterer wesentlicher Durchbruch in der Silicium-Biochemie resultiert aus jüngsten Untersuchungen mit dem gemeinen marinen Schwamm *Tethya aurantia*.<sup>[17–21]</sup> Kieselsäure-haltige Schwämme lagern die Kieselsäure in Form von Skelettnadeln ab, die diese Organismen stützen und vor Fraß schützen. Etwa 75 % der Trockenmasse von *Tethya aurantia* besteht aus Kieselsäureskelettnadeln (Länge 1–2 mm; Durchmesser 30 µm), wobei eine jede dieser Nadeln ein axiales zentrales Proteinfilament enthält (Länge 1–2 mm; Durchmesser 1–2 µm), das vollständig von Kieselsäure umhüllt ist.<sup>[17, 18]</sup> Nach deren Auflösen mit gepufferter Flußsäure

können diese Filamente isoliert, gereinigt und in drei sehr ähnliche siliciumfreie Untereinheiten aufgetrennt werden, die man Silicatein (*silica protein*)  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  benannt hat.<sup>[17]</sup> Aminosäureanalysen haben gezeigt, daß die Zusammensetzungen von Silicatein  $\alpha$  (29 kDa),  $\beta$  (28 kDa) und  $\gamma$  (27 kDa) sehr ähnlich sind, wobei das relative Verhältnis in den Filamenten  $\alpha:\beta:\gamma = 12:6:1$  beträgt. Durch Kleinwinkel-Röntgenbeugung konnte eine regelmäßige, sich wiederholende Struktur innerhalb der Filamente nachgewiesen werden (Periodizität 17,245 nm), wie zu erwarten wäre, wenn den makroskopischen Filamenten eine einfache sich wiederholende Substruktur zugrunde liegt.<sup>[17]</sup> Die Analyse der DNA-Sequenz für Silicatein  $\alpha$ , das als Hauptuntereinheit etwa 70 % der Filamentmasse ausmacht, ergab, daß dieses Protein den Proteasen der Cathepsin-L- und Papain-Familie sehr ähnlich ist.<sup>[17]</sup> Die enge Verwandtschaft von Silicatein  $\alpha$  und Cathepsin L impliziert große Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen, ihren dreidimensionalen Strukturen und ihrer membraneingeschlossenen intrazellulären Lokalisierung. Diese und weitere Befunde legen eine gemeinsame evolutionäre Herkunft dieser Proteine nahe.<sup>[17]</sup> Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß beide Proteine innerhalb von membranlokalisierten Vesikeln gefunden werden, die für ihre Funktion essentiell sind (Silicatein in der SDV; Cathepsin L im Lysosom).

Diese Befunde haben zu der faszinierenden Vorstellung geführt, daß Silicateine enzymartige Aktivität aufweisen und die Hydrolyse von Kieselsäureestern katalysieren könnten.<sup>[18]</sup> Da die homologen Proteasen katalytisch als Hydrolasen fungieren (Spaltung von Peptid- und Esterbindungen unter neutralen Bedingungen), wurden verwandte Silicatein-katalysierte Reaktionen mit Substraten des Formeltyps  $\text{RSi}(\text{OEt})_3$  ( $\text{R} = \text{OEt}, \text{Me}, \text{Ph}$ ) untersucht. Die Hydrolyse derartiger Verbindungen und anschließende Kondensation sollte zu Kieselsäure ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{R} = \text{OEt}$ ) oder organisch substituierten Silsesquioxanen ( $(\text{RSiO}_{1.5})_n$ ;  $\text{R} = \text{Me}, \text{Ph}$ ) führen. Die chemische (nichtenzymatische) Synthese solcher Produkte erfordert typischerweise eine Säure- oder Basenkatalyse, wobei die hydrolytische Spaltung der Si-O(C)-Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dagegen wurde gefunden, daß die intakten Silicateinfilamente in vitro die Bildung von Kieselsäure (aus  $\text{Si}(\text{OEt})_4$ ) und Silsesquioxanen (aus  $\text{RSi}(\text{OEt})_3$ ;  $\text{R} = \text{Me}, \text{Ph}$ ) bei neutralem pH-Wert beschleunigen.<sup>[18]</sup> Außerdem zeigte sich, daß die aufgetrennten Silicateinuntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und die gereinigte und rekonstruierte Untereinheit Silicatein  $\alpha$  (aus klonierten DNA-Templaten in Bakterien hergestellt) die Kieselsäurebildung aus  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  unter neutralen Bedingungen ebenfalls beschleunigen.<sup>[18]</sup> Bei Abwesenheit der Silicateinfilamente und -untereinheiten wurde nur eine geringfügige oder gar keine Produktbildung beobachtet. Außerdem führte die thermische Denaturierung der Silicateinfilamente und -untereinheiten zu deren Aktivitätsverlust, und die verwandten proteolytischen Enzyme Papain und Trypsin waren ohne Effekt. Dies belegt klar die katalytische Funktion der Silicateine (in ihrer nativen dreidimensionalen Struktur) bei der Kieselsäure- und Silsesquioxanbildung.<sup>[18]</sup>

Zusätzlich zu ihrer katalytischen Aktivität zeigen die makroskopischen Silicateinfilamente auch eine strukturebe-

stimmende Aktivität: Es wurde gefunden, daß die makroskopischen Filamente als Gerüste dienen, die die Abscheidung der resultierenden Kieselsäure- und Silsesquioxanprodukte steuern; d.h., sie verhalten sich als Template, die das Wachstum der Produktschichten auf der Oberfläche der Proteinfilamente kontrollieren.<sup>[18]</sup>

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Silicateine die Bildung von Kieselsäure und organisch substituierten Silsesquioxanen aus den entsprechenden Kieselsäureestern  $\text{RSi}(\text{OEt})_3$  ( $\text{R} = \text{OEt}, \text{Me}, \text{Ph}$ ) bei neutralem pH-Wert und Raumtemperatur katalysieren und die Strukturen der resultierenden Produkte steuern können. Es ist jedoch noch eine offene Frage, ob die in vitro beobachtete katalytische Aktivität irgendeine physiologische Bedeutung für den Silicifizierungsprozeß in vivo hat. Die Natur des biologischen Substrats (freie Orthokieselsäure oder organische Konjugate?) für die Silicifizierung in dem Schwamm gilt es noch aufzuklären.<sup>[18]</sup>

Da die vollständige Aminosäuresequenz und die dreidimensionale Struktur von Silicatein  $\alpha$  und Cathepsin L eine sehr hohe Homologie aufweisen, können Parallelen zwischen der Silicatein- $\alpha$ -vermittelten Katalyse und dem bekannten Wirkungsmechanismus der Proteasen angenommen werden. Es ist deshalb vorgeschlagen worden, daß Silicatein  $\alpha$  die Hydrolyse von  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  bei neutralem pH-Wert durch die Aktivität der Serin- und Histidinreste vermittelt, die Positionen entsprechend den katalytisch aktiven und funktionell verwandten Resten in den proteolytischen Enzymen des Cathepsin-L-Typs (Cystein-Histidin) und des Trypsin/Chymotrypsin-Typs (Serin-Histidin) einnehmen.<sup>[19]</sup> Ein direkter experimenteller Nachweis für die vorgeschlagene Rolle des spezifischen Serin-26- und Histidin-165-Restes erfolgte durch ortsspezifische Mutagenese, bei der die klonierte rekombinante DNA, die Silicatein  $\alpha$  codiert, in vitro modifiziert wurde und die DNA-Mutanten sodann als Template zur Steuerung der Synthese der entsprechenden Proteine in Bakterien verwendet wurden.<sup>[19]</sup> In diesen Studien wurden zwei strukturelle Varianten des Silicatein- $\alpha$ -Proteins hergestellt, in denen der Serin-26- bzw. Histidin-165-Rest spezifisch durch eine Alanineinheit ersetzt wurden. Der quantitative Vergleich der katalytischen Aktivitäten der resultierenden Proteinprodukte mit der Aktivität des ursprünglichen Proteins stützt die Annahme, daß der Serin-26- und Histidin-165-Rest von Silicatein  $\alpha$  tatsächlich für die effiziente Katalyse der Kieselsäurebildung aus  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  bei neutralem pH-Wert erforderlich sind.<sup>[19]</sup> Aus diesen Befunden wurde ein detailliertes mechanistisches Modell für die durch Silicatein  $\alpha$  vermittelte Katalyse abgeleitet.<sup>[19]</sup>

Zusätzlich zur ortsspezifischen Mutagenese könnten weitere Methoden der Gentechnologie (z. B. die kombinatorische Mutagenese) genutzt werden, um die katalytische und strukturdirektierende Aktivität der Silicateine zu identifizieren und zu optimieren.<sup>[20, 21]</sup> Die Gentechnologie – in Kombination mit biotechnologischen Methoden – bietet die Aussicht auf die Entwicklung neuer und umweltfreundlicher Wege zur Synthese organisch substituierter Siloxane.<sup>[20, 21]</sup> Es ist vorgeschlagen worden, die aus Untersuchungen zur Polysiloxansynthese mit mutationsveränderten Proteinen erhaltenen Ergebnisse zu nutzen, um synthetische Katalysatoren auf Peptidbasis zu

entwickeln und Wege zur Entwicklung nichtpeptidischer Katalysatoren und strukturiert gerüsteter Gerüste aufzuzeigen, die kostengünstiger und robuster sind als die natürlichen und gentechnisch erzeugten Proteine.<sup>[21]</sup>

Die aufregenden in diesem Beitrag beschriebenen Ergebnisse zeigen deutlich, daß ganz wesentliche Fortschritte in der Silicium-Biochemie gemacht worden sind. Man darf erwarten, daß weitere Untersuchungen der Proteine, Gene und molekularen Mechanismen, die den Silicium-Metabolismus in Diatomeen und Schwämmen steuern, auch bei der Aufklärung jener Mechanismen helfen könnten, die für die Essentialität des Siliciums für die optimale Entwicklung und das Wachstum vieler Pflanzen und Tiere verantwortlich sind. Außerdem könnten diese Studien die Entwicklung neuer technischer Methoden zur formkontrollierten Herstellung neuer musterbildender Materialien auf Siliconbasis initiieren.

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3015–3018

**Stichwörter:** Bioanorganische Chemie • Enzymkatalyse • Kieselsäure • Proteine • Silicium

- [1] M. G. Voronkov, G. I. Zelchan, E. Lukevitz, *Silizium und Leben* (Hrsg.: K. Rühlmann), Akademie, Berlin, **1975**.
- [2] *Biochemistry of Silicon and Related Problems* (Hrsg.: G. Bendz, I. Lindqvist), Plenum, New York, **1978**.
- [3] *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Hrsg.: T. L. Simpson, B. E. Volcani), Springer, New York, **1981**.
- [4] *Silicon Biochemistry* (Hrsg.: D. Evered, M. O'Connor), Wiley, Chichester, **1986**.

- [5] R. Tacke, H. Linoh in *The Chemistry of Organic Silicon Compounds, Part 2* (Hrsg.: S. Patai, Z. Rappoport), Wiley, Chichester, **1989**, S. 1143–1206.
- [6] R. Tacke, S. A. Wagner in *The Chemistry of Organic Silicon Compounds, Part 3, Vol. 2* (Hrsg.: Z. Rappoport, Y. Apeloig), Wiley, Chichester, **1998**, S. 2363–2400.
- [7] J. J. R. Fraústo da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon, Oxford, **1991**.
- [8] C. Exley, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 69, 139–144.
- [9] C. C. Perry, T. Keeling-Tucker, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 69, 181–191.
- [10] P. Tréguer, D. M. Nelson, A. J. Van Bennekom, D. J. DeMaster, A. Leynaert, B. Quéguiner, *Science* **1995**, 268, 375–379.
- [11] F. E. Round, R. M. Crawford, D. G. Mann, *The Diatoms: Biology & Morphology of the Genera*, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**.
- [12] N. Kröger, C. Bergsdorf, M. Sumper, *EMBO J.* **1994**, 13, 4676–4683.
- [13] N. Kröger, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 259–264.
- [14] N. Kröger, G. Lehmann, R. Rachel, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 99–105.
- [15] M. Hildebrand, B. E. Volcani, W. Gassmann, J. I. Schroeder, *Nature* **1997**, 385, 688–689.
- [16] M. Hildebrand, K. Dahlin, B. E. Volcani, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, 260, 480–486.
- [17] K. Shimizu, J. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6234–6238.
- [18] J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 361–365.
- [19] Y. Zhou, K. Shimizu, J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 826–828; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 780–782.
- [20] D. E. Morse, *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 230–232.
- [21] D. E. Morse in *Organosilicon Chemistry IV – From Molecules to Materials* (Hrsg.: N. Auner, J. Weis), WILEY-VCH, im Druck.