

Biomineralisierung in Diatomeen durch Peptid- und Polyamin-unterstützte Kondensation von Kieselsäure

Georg Pohnert*

Diatomeen (Kieselalgen) sind einzellige Algen mit höchst ästhetischen Zellwänden, deren Formenreichtum Naturforscher schon seit der Einführung der Lichtmikroskopie fasziniert (Abbildung 1). Die aus Biomaterialien aufgebauten filigranen Zellwände bestehen vorwiegend aus hydratisiertem Siliciumdioxid (SiO_2), das mit Peptiden und Polyaminen assoziiert vorliegt. Heute wissen wir, dass die Abscheidung von diesem amorphen Material während der Zellwandbiogenese artspezifisch nanometergenau kontrolliert wird.



Abbildung 1. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Zellwand von *Cylindrotheca fusiformis*.^[10]

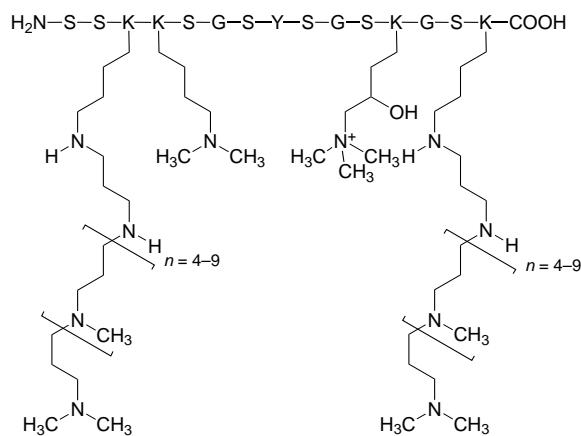
Die zentralen Schritte während des Aufbaus der Zellwände geschehen in intrazellulären Organellen, den Kieselsäure-ablagernden Vesikeln (Silica Deposition Vesicles, SDV), in die lösliche Formen des Silicats transportiert werden. Erst nach der Kieselsäure-Akkumulation in den SDVs beginnt deren gerichtete Fällung und die Bildung von hochdifferenzierten Zellwänden. Dabei werden verschiedene an der Formgebung beteiligte Vorgänge diskutiert. So könnte SiO_2 -Präzipitation durch diffusionslimitierte Kieselsäurefällung in den SDVs initiiert und gerichtet werden.^[1] Auch eine Formgebung durch räumliche Einschränkungen im zellulären Umfeld der SDVs ist möglich.^[2, 3] Ein anderer vorgeschlagener Mechanismus geht davon aus, dass (zusätzlich) eine organische Matrix in den SDVs die Kieselsäurefällung gezielt beschleunigt und kontrolliert. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden detaillierte Untersuchungen der organischen Bestandteile der Kieselschalen durchgeführt.^[4]

Die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte zum Verständnis der gerichteten Zellwandbiosynthese, geben ein

neues Bild eines offensichtlich universellen Mechanismus der Biomineralisierung in Diatomeen und sind Gegenstand dieses Beitrags. Schon früh wurde erkannt, dass die Entfernung des Mineralanteils der Zellwände von Diatomeen durch Flussäuredämpfe eine Hülle „wie einen Geist der Zelle“ zurücklässt.^[5] Selbst nach Extraktion mit Ethyldiamintetraacetat (EDTA) oder nach oxidativer Reinigung der Kieselschale mit NaOCl finden sich noch mit SiO_2 -assoziierte organische Komponenten in der Zellwand, die nur durch Flussäure vom anorganischen Material getrennt werden können. Reinigung und Charakterisierung der so gewonnenen Bestandteile aus *Cylindrotheca fusiformis* ergab zwei neuartige Proteinfamilien.^[6] Die Proteine der leichteren Fraktion im Flussäure-Extrakt mit Molekulargewichten von 4 bis 17 kD, wurden aufgrund ihrer Affinität zu SiO_2 als Silaffine bezeichnet.^[7] Kröger et al. beobachteten bei der Zugabe dieser Proteine zu einer metastabilen Kieselsäurelösung innerhalb von Sekunden die Ausfällung von hydratisiertem SiO_2 , während unbehandelte Lösungen über mehrere Stunden stabil sind. Die gebildete Menge des amorphen Materials ist dabei proportional zum zugegebenen Silaffin, was auf eine direkte Beteiligung der Peptide an dem Mineralisationsprozess schließen lässt. Besonders bemerkenswert bei diesem Vorgang ist, dass die Struktur des geformten Präzipitats von der Art des zugegebenen Peptids abhängig ist. Während die Mischung aller gereinigten Silaffine die Bildung von SiO_2 -Partikeln mit einem Durchmesser von <50 nm induziert, führt die Zugabe des leichteren Silaffin 1A zur Bildung von Präzipitaten mit Durchmessern zwischen 500 und 700 nm.^[7] N-terminale Sequenzierung von Silaffin 1B und Klonierung des korrespondierenden Gens zeigte, dass das kodierte Polypeptid eine modulare Struktur aufweist. Nach einer Signalpeptideinheit und einer negativ geladenen Domäne folgen sieben stark basische, repetitive Einheiten, die nach Endopeptidase die jeweiligen Silaffine bilden. Charakteristisch für diese Peptide sind regelmäßig angeordnete, posttranslational modifizierte Lysin-Lysin-Cluster. Strukturaufklärung mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) von Silaffin 1A₁ und Silaffin 1A₂ mit Längen von 15 bzw. 18 Aminosäuren zeigte, dass es sich bei diesen Modifizierungen jeweils um Substitutionen am ε-Lysinstickstoff, wie in Schema 1 dargestellt, handelt.^[8]

Die Modifizierung der Lysinreste scheint bei der Bildung von SiO_2 unter den sauren Bedingungen, die in den Zellen

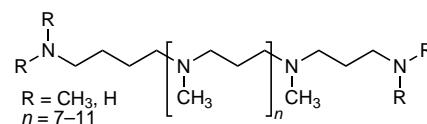
[*] Dr. G. Pohnert
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Winzerlaer Straße 10
07745 Jena (Deutschland)
Fax: (+49)3641-571-256
E-mail: pohnert@ice.mpg.de



Schema 1. Struktur von Silaffin 1A₁ aus den mit HF behandelten Zellwänden von *C. fusiformis*. Das Polypeptid ist im Einbuchstaben-Code wiedergegeben (S = Serin, K = Lysin, G = Glycin, Y = Tyrosin). Nur die posttranslatorischen Modifikationen sind als Formel gezeigt.^[8]

herrschen, eine zentrale Rolle zu spielen. Während die Präzipitation von Kieselsäure im Neutralen sowohl durch Silaffin als auch durch das korrespondierende nichtmodifizierte Peptid beschleunigt wird, beobachtet man bei pH-Werten < 6, bei denen die Biomineralisierung in den Zellen stattfindet, nur noch Ausfällung durch die modifizierten Peptide.^[7]

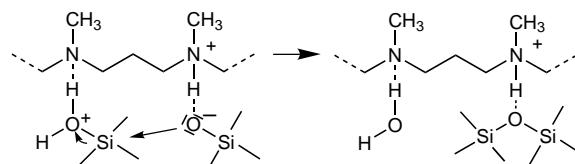
Neue Untersuchungen zeigen, dass die in *C. fusiformis* gefundenen Prinzipien der Nanopartikelabscheidung kein Sonderfall sind, sondern vielmehr mit Abwandlungen als allgemeineres Prinzip der Silicatbildung durch Kieselalgen gelten können.^[9] Ein Vergleich der organischen Bestandteile aus sechs verschiedenen Diatomeenarten zeigt, dass Silaffine und verwandte Moleküle allgemein für die komplexe Musterbildung der Diatomeenzellwände (mit)verantwortlich sein können. Ein derartiger Mechanismus erfordert artspezifische Kieselsäure-präzipitierende Moleküle. Und tatsächlich weisen die nach Flussäure-Behandlung und Reinigung gewonnenen organischen Bestandteile charakteristische Unterschiede für die sechs untersuchten Arten auf. Detaillierte Untersuchung führte nicht nur zur Identifizierung von artspezifischen Sets von Silaffinen, sondern auch zur Charakterisierung einer weiteren, nicht proteinogenen Verbindungsklasse. Hierbei handelt es sich um komplexe Gemische langkettiger Polyamine mit Molekulargewichten bis zu 1500 Da, deren Zusammensetzung je nach Diatomeenart variiert.^[9] Die genauer untersuchten Amine von *Nitzschia angularis* zeigen regelmäßige Massenverteilungen, was auf das Vorhandensein von definierten Polymeren schließen ließ. Massenspektrometrische Strukturaufklärung führte zur Identifizierung von den aus N-Methyl-propylamin-Einheiten aufgebauten Polymeren (Schema 2). Vergleich mit anderen Diatomeen zeigte, dass das Strukturprinzip dieser Polyamine mit Variationen auch in anderen Arten zu finden war. So setzen sich z.B. die Amine von *C. fusiformis* aus nichtmethylierten Propylamin-Einheiten zusammen.^[9] Diese Polymere zählen mit bis zu 20 repetitiven Einheiten zu den längsten linearen biogenen Aminen und bilden oft die Hauptmenge der organischen Substanzen in den Diatomeen-Zellwänden.



Schema 2. Polyamine aus der Diatomee *N. angularis*. Durch Variation des Methylierungsgrades und der Kettenlänge kann eine Strukturfamilie von 25 Aminen generiert werden. Zusätzliche Variation kann durch Austauschen der Butylamin-Einheit (links) gegen eine Propylamin-Einheit erreicht werden.

Werden die gereinigten Amine von *N. angularis* zu Kieselsäurelösungen gegeben, so induzieren sie die schnelle Präzipitation von SiO₂, wobei sie in das Biomineral inkorporiert werden.^[9] Die Durchmesser der dabei gebildeten sphärischen Partikel hängen von der Art der Amine ab. Werden Mischungen von Silaffinen und Aminen zu Kieselsäurelösungen gegeben, so bilden sich Präzipitate, in denen die Partikel in SiO₂-Blöcken angeordnet sind.

Ein mechanistischer Vorschlag für diese Polymerisierungsreaktion basiert auf der Annahme, dass in der Polyaminkette protonierte und unprotonierte tertiäre Aminogruppen, die an Kieselsäure binden, alternieren und damit die Si-O-Bindungsbildung, wie in Schema 3 gezeigt, erleichtern.^[10] Die gebildeten Materialien haben eine gewichtsbezogene Zusammensetzung von 1.25:1 (SiO₂:Polyamin), was zumindest auf eine teilweise direkte Interaktion zwischen den Aminogruppen und den Silanolgruppen des hydratisierten SiO₂ schließen lässt.^[9]



Schema 3. Vorgeschlagener Mechanismus der Amin-unterstützten Kieselsäurekondensation.

Dass die oben beschriebenen Polyamine und Peptide nicht nur als Mediatoren der Silica-Ausfällung dienen, sondern auch für die Formgebung der wachsenden Diatomeenzellwand verantwortlich sein könnten, wurde kürzlich in einem eleganten Modell postuliert.^[11] Der amphiphile Charakter der methylierten Polyamine könnte im SDV die Bildung von Emulsionen aus Mikrotropfen unterstützen. Werden diese Tropfen in einer dichtesten Packung als Monoschicht angeordnet, so könnte sich wie in Abbildung 2A gezeigt in den Zwischenräumen Silicat in wabenförmiger Anordnung abscheiden. Da bei der Mineralisierung auch Polyamine inkorporiert werden, verarmen die Originalmikrotropfen an Aminen, was eine erneute Phasentrennung unterstützt. Die so gebildete neue Matrix könnte wiederum die gerichtete Präzipitation und Musterbildung lenken (Abbildung 2B–D). Durch Wiederholungen dieses einfachen Mechanismus könnte iterativ das Nanomuster geformt werden, das während der Bildung der Zellwand von *Coscinodiscus wailesii* elektronenmikroskopisch beobachtet wird (Abbildung 2E–H).^[11]

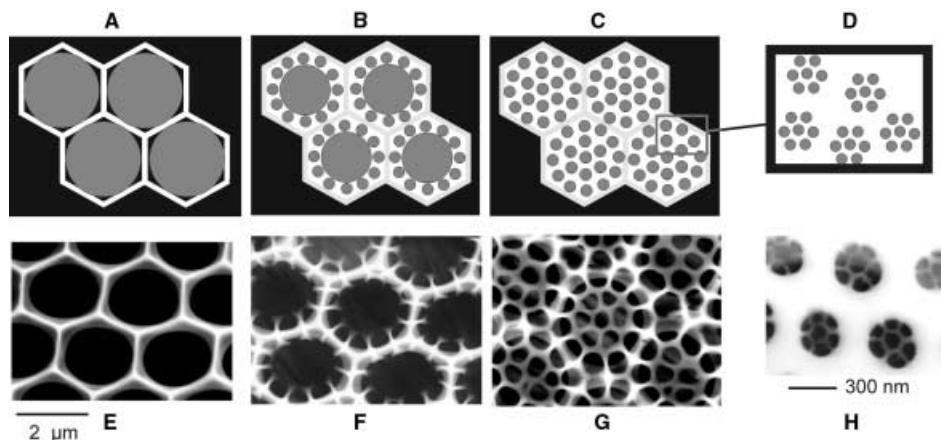


Abbildung 2. Schematische Darstellung des durch Phasentrennungsprozesse medierten Templat-Mechanismus (A–D) im Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen der sich bildenden Zellwand von *C. wailesii* (E–H). Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [11], Copyright (2002), American Association for the Advancement of Science.

Konzepte der Diatomeen-Biomineralisierung dienen auch als inspirierende Quelle für die gerichtete bio- und nanotechnologische Silicatproduktion.^[3] Während Diatomeen eine kontrollierte Fällung von SiO₂ bei physiologischen Bedingungen mit bemerkenswerter Feinauflösung erreichen, erfordern Labormethoden meist drastisch basische Bedingungen oder hohe Temperaturen mit langen Reaktionszeiten. Es ist somit nicht verwunderlich, dass auf der Suche nach Möglichkeiten, die es erlauben, empfindliche Materialien mit Silicatmineralien zu modifizieren, auf Konzepte aus der Diatomeenbiochemie zurückgegriffen wird. So wurde schon im Jahr nach der Identifizierung der Silaffine eine erste technische Anwendung entwickelt, die es erlaubt, Peptid-unterstützt sphärische SiO₂-Nanopartikel auf einem Hologramm abzuscheiden.^[12] Dazu wurde ein Polymer hergestellt, auf dessen Oberfläche in geordneten Strukturen Silaffinpeptide angereichert waren. Nach nur zehnminütiger Behandlung dieser holographischen Polymere mit Kieselsäurelösungen haben sich definierte sphärische Silicatstrukturen auf der Polymeroberfläche abgeschieden. Diese Technik, die die leichte

Zugänglichkeit eines geordneten organischen Polymers mit der gerichteten Biomineralisierung von Kieselsäure kombiniert, führt zu Strukturen, die neben höherer mechanischer Stabilität auch eine nahezu 50-fache Zunahme der Lichtbrechung an der Hologrammoberfläche zeigen.^[12]

Erst in den letzten Jahren beginnen wir zu verstehen, wie der Aufbau von komplexen Silicatstrukturen in Kieselalgen gesteuert wird. Doch selbst die Identifizierung der ersten Matrizen für die Silicapräzipitation lassen in Zukunft noch viel Raum für neue In-vivo-Metho-

den, um zu klären, welche Wechselwirkungen in den Zellen zu den differenziert ausgeprägten Strukturen führen.

- [1] R. Gordon, R. W. Drum, *Int. Rev. Cytol.* **1994**, *150*, 243–372.
- [2] A.-M. M. Schmidt, D. Schulz, *Protoplasma* **1979**, *100*, 267–288.
- [3] S. Mann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3532–3548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3393–3406.
- [4] D. M. Swift, A. P. Wheeler, *J. Phycol.* **1992**, *28*, 202–209.
- [5] B. E. Volcani in *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Hrsg.: T. L. Simpson, B. E. Volcani), Springer, New York, **1981**, S. 157–200.
- [6] N. Kröger, R. Wetherbee, *Protist* **2000**, *151*, 263–273.
- [7] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, *286*, 1129–1132.
- [8] N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *J. Biochem.* **2001**, *276*, 26066–26070.
- [9] N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 14133–14138.
- [10] N. Kröger, M. Sumper, in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 151–170.
- [11] M. Sumper, *Science* **2002**, *295*, 2430–2433.
- [12] L. L. Brott, R. R. Naik, D. J. Pikas, S. M. Kirkpatrick, D. W. Tomlin, P. W. Whitlock, S. J. Clarkson, M. O. Stone, *Nature* **2001**, *413*, 291–293.