

# Chitin-basierte organische Netzwerke – ein integraler Bestandteil des Zellwandbiosilicates der Diatomee *Thalassiosira pseudonana*\*\*

Eike Brunner,\* Patrick Richthammer, Hermann Ehrlich, Silvia Paasch, Paul Simon, Susanne Ueberlein und Karl-Heinz van Pée

Die Zellwände der Diatomeen<sup>[1]</sup> sind besonders interessante Beispiele für natürliche Hybridmaterialien und zeichnen sich durch außergewöhnliche mechanische und optische Eigenschaften aus.<sup>[2]</sup> Struktur und Aufbau ihrer Silicat-Zellwände sind eine Inspiration für zahlreiche biomimetische Syntheseexperimente.<sup>[3]</sup> Diatomeen sind deshalb auch bevorzugte Modellorganismen zur Erforschung der Prinzipien der Silicatbiomineralisation.<sup>[4]</sup> Ihre hierarchisch aufgebauten Zellwände enthalten amorphes Silicat sowie spezielle Biomoleküle. In den vergangenen Jahren konnten drei verschiedene Klassen solcher Biomoleküle identifiziert werden: 1) die Silaffine, stark posttranslational modifizierte Peptide/Proteine;<sup>[5]</sup> 2) langkettige Polyamine (long-chain polyamines, LCPAs)<sup>[6]</sup> und 3) die stark sauren Silacidine.<sup>[7]</sup> Die zwitterionischen Silaffine bilden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen supramolekulare Aggregate. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die langkettigen Polyamine<sup>[8]</sup> in Gegenwart geeigneter Gegenionen, wie Orthophosphat, Pyrophosphat oder negativ geladener Peptide wie Silacidine, nachgewiesen. Sowohl die Aggregate aus Silaffinen als auch aus LCPAs beschleunigen die In-vitro-Präzipitation von Silicat aus kieselensäurehaltigen Lösungen. Die Isolierung und nähere Untersuchung der genannten Moleküle erforderte allerdings die Auflösung des Biosilicates in HF oder NH<sub>4</sub>F. Silaffine, LCPAs und Silacidine befanden sich dann als lösliche Bestandteile im Extrakt.

Die Diatomeenspezies *Thalassiosira pseudonana*, deren Genom bereits vollständig sequenziert ist,<sup>[9]</sup> hat sich zu einem Modellorganismus der Diatomeenforschung entwickelt.<sup>[4]</sup> Erst kürzlich konnte mit Ionen-Abrasions-Rasterelektronen- sowie Rasterkraftmikroskopie<sup>[10,11]</sup> an *T. pseudonana* das Vorhandensein nano- und mikrostrukturierter Filamente innerhalb der sich bildenden Zellwände gezeigt werden. Of-

fensichtlich handelt es sich dabei um zentrale, möglicherweise strukturgebende Filamente, die im entsprechenden Modell als „lineare Proteine“ bezeichnet wurden.<sup>[10]</sup> Das Polysaccharid Chitin (Poly-*N*-acetyl-D-glucosamin) kommt in zahlreichen Calcium-basierten Biomineralien vor.<sup>[12]</sup> Es wird davon ausgegangen, dass Chitin unlösliche, eventuell formgebende Strukturen oder Kompartimente bildet, in denen dann mit dem Chitin assoziierte Biomoleküle die Calciumbiomineralisationsprozesse kontrollieren. Eine entsprechende Funktion des Chitins für Silicatbiomineralisationsprozesse ist bisher nicht bekannt. Andererseits sind Diatomeen der Gattung *Thalassiosira* sp. in der Lage, hochkristalline externe  $\beta$ -Chitinfasern zu bilden.<sup>[13]</sup> Jüngste Genexpressionsstudien geben Anlass zu der Vermutung, dass Chitin auch an der Bildung der Silicat-haltigen Zellwände von *T. pseudonana* beteiligt ist.<sup>[14]</sup> Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen an den Zellwänden von *T. pseudonana* ergaben Signale, die charakteristisch für Polysaccharide wie Chitin sind.<sup>[15]</sup> Das Anliegen der hier vorgestellten Arbeit war es, dieses möglicherweise mit der Zellwand assoziierte Chitin bei *T. pseudonana* näher zu untersuchen, vor allem im Hinblick auf die Frage, ob es sich dabei um einen integralen Bestandteil des Biosilicates handelt.

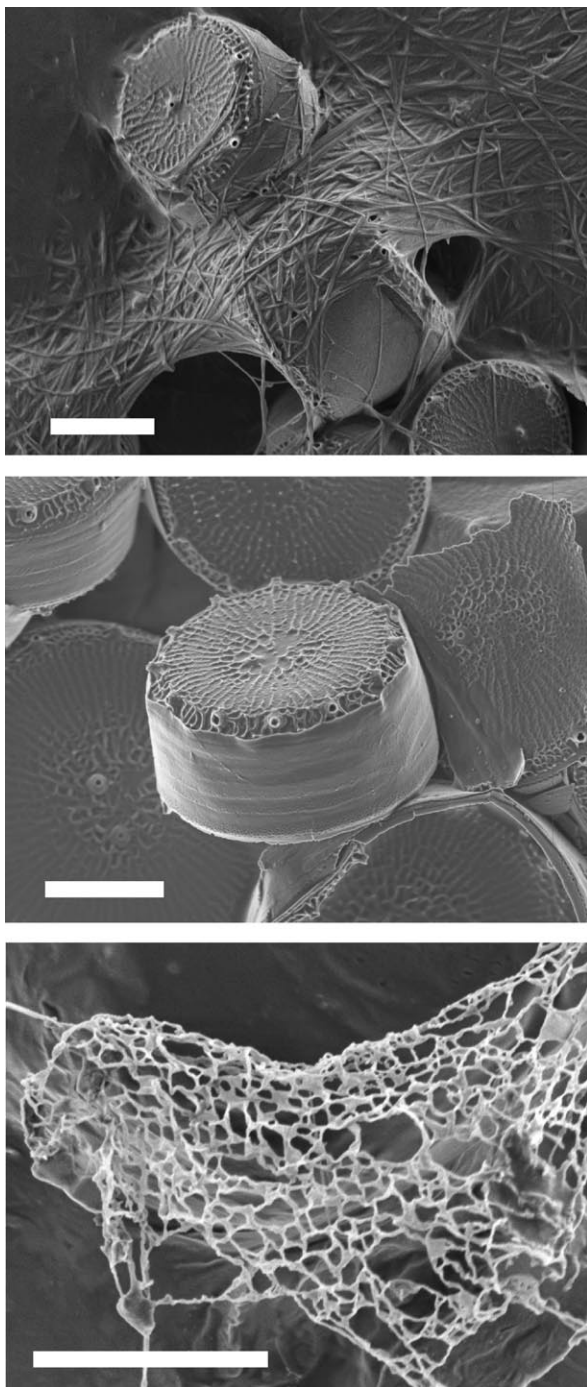
Die Abbildung 1 (oben, Mitte) zeigt typische rasterelektronenmikroskopische (REM-)Aufnahmen von Zellwänden aus *T. pseudonana*. Die Zellwände wurden mit einer Natriumdodecylsulfat(SDS)/Ethyldiamintetraacetat(EDTA)-haltigen Lösung extrahiert (siehe *Experimentelles*). Während die Zucht der Kulturen immer unter identischen Bedingungen erfolgte, kam bei der Ernte entweder eine Durchlaufzentrifuge oder ein Mikrosiebgewebe zum Einsatz (*Experimentelles*). Die filtrierte Probe enthält große Mengen der oben genannten externen Chitinfasern. Dies wird auch durch die <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektren bestätigt (Abbildung 2). So wird das Spektrum der filtrierten Probe von intensiven, schmalen Signalen dominiert, die für hochkristallines  $\beta$ -Chitin charakteristisch sind.<sup>[16]</sup> Übereinstimmend mit diesem Befund weist das filtrierte Material nach Behandlung mit dem Farbstoff Calcofluor White eine intensive Fluoreszenz auf. Dieser Farbstoff bindet vorzugsweise an  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpfte Polysaccharide. Im Unterschied dazu wird das externe Chitin in der Durchlaufzentrifuge sehr effektiv von den Zellwänden entfernt (Abbildung 1, Mitte). Das vollständige Fehlen der Fluoreszenz für diese Probe auch nach Calcofluor-White-Behandlung ist ein weiterer Beleg für diese Tatsache. Das <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektrum der mit Durchlaufzentrifuge geernteten Probe ist eine Überlagerung zahlreicher Linien. Trotzdem ist ein gut aufgelöstes Signal bei  $\delta = 104$  ppm beobachtbar, das charakteristisch für die C1-

[\*] Prof. Dr. E. Brunner, P. Richthammer, Dr. H. Ehrlich, Dr. S. Paasch, S. Ueberlein, Prof. Dr. K.-H. v. Pée  
FR Chemie und Lebensmittelchemie, TU Dresden  
01069 Dresden (Deutschland)  
Fax: (+49) 351-4633-7188  
E-Mail: eike.brunner@tu-dresden.de

Dr. P. Simon  
MPI für chemische Physik fester Stoffe  
Nöthnitzer Straße 40, 01187 Dresden (Deutschland)

[\*\*] Wir danken für finanzielle Unterstützung seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Br 1278/12-3). Unser Dank gilt außerdem N. Eichner, R. Hett, G. Lehmann und Dr. S. Wenzl (Regensburg) sowie M. Kammer (Dresden) für exzellente experimentelle Hilfe.

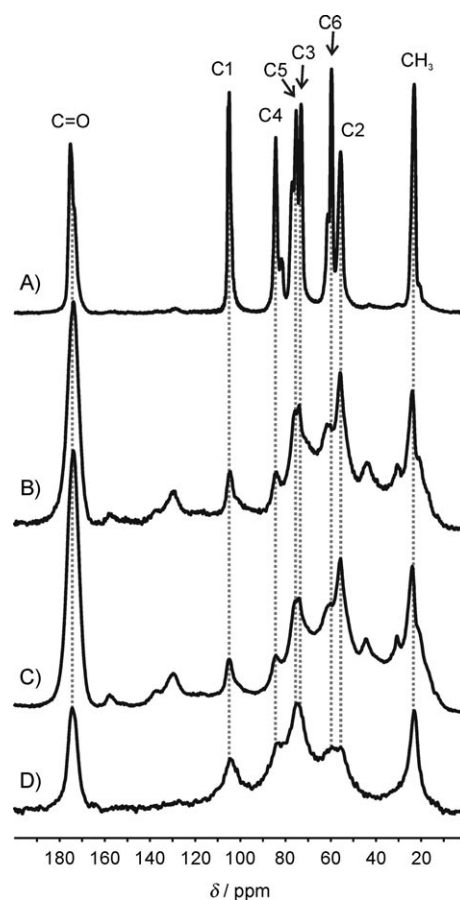
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905028> zu finden.



**Abbildung 1.** REM-Aufnahmen SDS/EDTA-extrahierter *T. pseudonana*-Zellwände nach Ernte mithilfe von Siebgewebe (oben) und einer Durchlaufzentrifuge (Mitte). Die Mehrzahl der Zellwände widersteht beiden Erntemethoden ebenso wie der nachfolgenden Behandlung mit SDS/EDTA. Das untere Bild zeigt ein mithilfe von  $\text{NH}_4\text{F}$  aus einer mit SDS/EDTA gereinigten Zellwand extrahiertes organisches Netzwerk. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

Position von Polysacchariden wie Poly-*N*-acetyl-D-glucosamin ist.<sup>[17]</sup> Beim Vorliegen von Zuckermolekülen, wie *N*-Acetyl-D-glucosamin, würde dieses Signal bei ca.  $\delta = 93$  ppm auftreten.<sup>[17]</sup> Es ist deshalb davon auszugehen, dass ein erheblicher Anteil von Polysacchariden Bestandteil des Biosi-

licates ist. Das Signal der C1-Kohlenstoffatome weist eine Halbwertsbreite von ca. 240 Hz auf. Bei den externen Chitinfasern aus *T. pseudonana* (Abbildung 2 A) beträgt sie 110 Hz. Dies spricht für eine vergleichsweise weniger geordnete Struktur des im Biosilicat gebundenen Polysaccharides.



**Abbildung 2.**  $^{13}\text{C}$  Festkörper-NMR-Spektren von SDS/EDTA-behandelten *T. pseudonana*-Proben nach Ernte mithilfe von Siebgewebe (A) sowie einer Durchlaufzentrifuge (B). Das Spektrum (C) wurde nach  $\text{NH}_4\text{F}$ -Behandlung (Desilicifizierung) des Materials aus (B) erhalten und repräsentiert das organische Netzwerk aus Abbildung 1 (unten). Das untere Spektrum (D) wurde nach NaOH-Behandlung der Netzwerke aufgenommen.

Um rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der desilicifizierten organischen Matrix zu erhalten, wurden Diatomeenzellwände auf entsprechende Probehalter aufgebracht und dort mit  $\text{NH}_4\text{F}$  behandelt. So wurde die mechanische Zerstörung der Proben – vor allem durch Zentrifugationschritte – minimiert (*Experimentelles*). Nach dieser Behandlung wurde ein  $\text{NH}_4\text{F}$ -beständiges organisches Gerüst sichtbar (Abbildung 1, unten).

Diese netzwerkartig aufgebaute „Gerüstsubstanz“ hat äußerlich die Form und Größe der Diatomeenzellwände und besteht aus vernetzten Fasern von durchschnittlich etwa 25 nm Durchmesser. Der Durchmesser der Fasern variiert allerdings zwischen 5 und 50 nm. Das  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektrum dieses Materials ist in Abbildung 2 C gezeigt. Es ist nahezu identisch mit dem Spektrum der zentrifugierten

ganzen Zellwände aus Abbildung 2 B, allerdings ist die Linienbreite etwas größer. So steigt die Halbwertsbreite des C1-Signals nach der  $\text{NH}_4\text{F}$ -Behandlung auf 260 Hz. Die demineralisierten organischen Netzwerke entsprechen 8–10 Gew.-% des SDS/EDTA-gereinigten Biosilicates. Sowohl GC/MS- als auch HPLC-Analysen (Dionex; siehe Hintergrundinformationen) bestätigten das Vorhandensein von Glucosamin als einem Hauptbestandteil dieses Materials. Aus der Tatsache, dass die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen Hinweise auf größere Mengen an Polysacchariden ergaben, lässt sich schließen, dass Chitin oder Chitosan als integraler Bestandteil innerhalb des Biosilicates vorliegt.

Das  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektrum zeigt jedoch auch, dass die organischen Netzwerke außer aus Chitin/Chitosan noch aus weiteren organischen Komponenten bestehen. Chitin-Protein-Komposite ebenso wie durch organische Verbindungen vernetzte Chitinverbindungen sind bereits aus verschiedenen anderen Organismen gut bekannt.<sup>[18]</sup> Es sei an dieser Stelle auch erwähnt, dass ein Chitin bindendes Protein in der Gürtelbandregion von *T. pseudonana* bereits identifiziert wurde.<sup>[19]</sup> Um derartige organische Komponenten zu entfernen, wurden die Proben in einem weiteren Schritt mit 2.5 M NaOH behandelt, was zur Hydrolyse von Proteinen (d.h. ihrer Entfernung) führt.<sup>[20,21]</sup> Im Gegensatz dazu widersteht das Chitin dieser Behandlung. Das  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektrum des zurückbleibenden Materials ist in Abbildung 2 D zu sehen. Der Vergleich mit dem Spektrum aus Abbildung 2 C macht deutlich, dass die NaOH-Behandlung unter anderem zum Verschwinden der Signale der aromatischen Kohlenstoffatome bei  $\delta = 120\text{--}140$  ppm sowie aliphatischer Kohlenstoffatome zwischen  $\delta = 30$  und 50 ppm führt. Die entsprechenden Signale stammen wahrscheinlich von Aminosäuren mit aromatischen oder aliphatischen Seitenketten. Auch das C=O-Signal enthält neben dem Beitrag der *N*-Acetylgruppe des Chitins Signalbeiträge der Amidgruppen der Peptide/Proteine. Die basische Hydrolyse dieser Komponenten mit NaOH resultiert somit zwangsläufig in einer relativen Abnahme der C=O-Signalintensität, wie aus Abbildung 2 C, D ersichtlich ist.

Das Spektrum des zurückbleibenden Materials weist stark verbreiterte Linien bei den für Chitin charakteristischen chemischen Verschiebungen auf. Die C=O- und  $\text{CH}_3$ -Signale im Spektrum belegen zudem, dass das in den organischen Netzwerken bei *T. pseudonana* vorliegende Polysaccharid acetyliert vorliegt. Es kann somit eindeutig als Poly-*N*-acetyl-D-glucosamin identifiziert werden. Dies wurde außerdem durch Raman-spektroskopische Untersuchungen bestätigt (siehe Hintergrundinformationen). Die gravimetrische Analyse des nach der  $\text{NH}_4\text{F}$ - und NaOH-Behandlung erhaltenen Chitins lässt auf einen Chitingehalt von 2–3 Gew.-% bezogen auf die SDS/EDTA-behandelten Zellwände schließen. Dies entspricht 25–40 Gew.-% der mithilfe von  $\text{NH}_4\text{F}$  extrahierten organischen Netzwerksubstanz. Die Halbwertsbreite des bereits oben erwähnten C1-Signals beträgt bei der NaOH-behandelten Probe ca. 500 Hz. Die Entfernung der organischen Komponenten aus den Netzwerken resultiert somit in einer noch weniger geordneten Form von Poly-*N*-acetyl-D-glucosamin. Es ist darauf hinzuweisen, dass sowohl das aus Kalmar-Gladien isolierte  $\beta$ -Chitin als auch das aus marinen

Schwämmen isolierte  $\alpha$ -Chitin ebenfalls  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren mit verbreiterten Signalen aufweisen.<sup>[16,20a]</sup> Dieses aus der Literatur bekannte Verhalten wird mit einem hohen Anteil an Poly-*N*-acetyl-D-glucosaminmolekülen an Oberflächen erklärt. Elektronenbeugungsaufnahmen der extrahierten, in Abbildung 1 (unten) gezeigten organischen Netzwerke weisen nicht die für kristallines Chitin typischen, scharfen Reflexe auf (siehe Hintergrundinformationen). Dieses Verhalten bestätigt den amorphen Charakter der extrahierten organischen Netzwerke in Übereinstimmung mit der starken Linienverbreiterung der  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Signale. Röntgenbeugungsexperimente an den Chitin-basierten Fibrillen aus Kalmar-Gladien,<sup>[16]</sup> aus der Alge *Potriochromonas stipitata*<sup>[22]</sup> sowie aus dem Chitin-basierten Skelett des marinen Schwammes *I. basta*<sup>[20a]</sup> lieferten bereits früher analoge Beobachtungen.

Wir haben damit erstmals nachgewiesen, dass die Zellwand der Diatomee *T. pseudonana* ein auf Chitin basierendes Netzwerk enthält. Dieses gleicht der Form und Größe der Zellwand und besteht aus miteinander vernetzten Fasern mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 25 nm. Diese Fasern enthalten außer Chitin noch andere, bisher unbekannte Biomoleküle. Dies lässt darauf schließen, dass die Chitin-basierte netzwerkartige Struktur als Grundgerüst für die Silicatabscheidung dient, während andere Biomoleküle – wie die Silaffine – aktiv die Präzipitation der Kieselsäure beeinflussen. Dieser Mechanismus wäre dem der Calciumcarbonat-Biomineralisation analog (siehe oben). Es ist weiterhin möglich, dass die Netzwerke im Inneren der Zellwand eine mechanische Stabilisierungsfunktion haben.

Weiterführende Arbeiten sollen folgende Fragen klären: Woraus setzen sich die anderen organischen Komponenten in den neu entdeckten Chitin-haltigen Netzwerken zusammen, und was ist ihre genaue Funktion? Weisen die Zellwände anderer Diatomeen-Spezies ähnliche organische Netzwerke auf? In jedem Falle kann aber festgestellt werden, dass das Polysaccharid Poly-*N*-acetyl-D-glucosamin (Chitin) an der Bildung des Diatomeen-Biosilicates von *T. pseudonana* direkt beteiligt ist.

## Experimentelles

*T. pseudonana* (Klon CCMP1335) wurde in einem 20-L-Plastikkolben in künstlichem Meerwasser gezüchtet, das nach dem Rezept der North East Pacific Culture Collection hergestellt wurde.<sup>[23]</sup> Um ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis der  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren zu erhalten, wurden die Diatomeen durch Zugabe von  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  zum Kulturmedium  $^{13}\text{C}$ -markiert.

Ernteverfahren: Filtrierte Zellwände: Die ganzen Zellen wurden durch aufeinander folgendes Filtrieren des Kulturmediums durch ein 1- $\mu\text{m}$ -Nylonsiebgewebe (Stockhausen Sieb- und Filtererzeugnisse) und einen 0.2- $\mu\text{m}$ -ZAPCAP-Nylonfilter (Whatman) angereichert. Zentrifugierte Zellwände: Die Zellen wurden durch kontinuierliche Zentrifugation des Kulturmediums durch einen Westfalia-Separator bei maximaler Geschwindigkeit angereichert.

Isolierung der Chitin-basierten organischen Netzwerke: Schritt 1: Die geernteten Zellen wurden zweimal kurz in einem Puffer mit 0.1 M EDTA und 2 % SDS aufgeköcht. Die Suspension wurde zentrifugiert und mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der Überstand farblos blieb. Die gereinigten Zellwände wurden über Nacht lyophilisiert. Schritt 2: Das Diatomeen-Biosilicat wurde unter relativ milden Be-



dingungen in einer sauren Ammoniumfluoridlösung aufgelöst (Raumtemperatur, 8 M  $\text{NH}_4\text{F}$ /2 M  $\text{HF}$ , pH 4–5, 20 min). Die Proben wurden zentrifugiert, viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Schritt 3: Die Proben wurden zwei Stunden mit 2.5 M  $\text{NaOH}$  bei 37 °C behandelt. Sie wurden zentrifugiert, viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Die gravimetrischen Analysen wurden auf einer Mikroanalysenwaage (Kern) durchgeführt.

REM: Um zerstörungsfreie Aufnahmen mechanisch wenig beanspruchter organischer Netzwerke zu erhalten, wurden die Experimente unmittelbar auf den Probehaltern (Plano GMBH) durchgeführt. Die  $\text{NH}_4\text{F}$ - und  $\text{NaOH}$ -Behandlung wurde dabei ansonsten wie oben beschrieben durchgeführt.

NMR-Spektroskopie: Die  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Experimente wurden an einem Bruker-Avance-300-Spektrometer bei 75.47 MHz für  $^{13}\text{C}$  mit einem 2.5 mm Doppelresonanz-MAS-NMR-Probenkopf durchgeführt. Aufgenommen wurden  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Ramped-Amplitude-Cross-Polarization(CP)-Spektren<sup>[24]</sup> (Kontaktzeit 4 ms) bei einer Probenrotationsfrequenz von 14 kHz unter SPINAL- $^1\text{H}$ -Entkoppung.<sup>[25]</sup>

Eingegangen am 8. September 2009

Online veröffentlicht am 18. November 2009

**Stichwörter:** Chitin · Diatomeen · NMR-Spektroskopie · Organisch-anorganische Hybridverbindungen · Silicate

- [1] a) F. Round, R. Crawford, D. Mann, *The diatoms*, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**; b) E. V. Armbrust, *Nature* **2009**, 459, 185–192.
- [2] a) C. E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkojc, C. Maier, K. Prechtel, V. Smetacek, *Nature* **2003**, 421, 841–843; b) T. Fuhrmann, S. Landwehr, M. El Rharbi-Kucki, M. Sumper, *Appl. Phys. B* **2004**, 78, 257–260.
- [3] a) M. Sumper, E. Brunner, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 17–26; b) R. Gordon, D. Losic, M. A. Tiffany, S. S. Nagy, F. A. S. Sterrenburg, *Trends Biotechnol.* **2009**, 27, 116–127.
- [4] a) M. Sumper, E. Brunner, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1187–1194; b) M. Hildebrand, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4855–4874; c) N. Kröger, N. Poulsen, *Annu. Rev. Genet.* **2008**, 42, 83–107.
- [5] a) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, 286, 1129–1132; b) N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper, *Science* **2002**, 298, 584–586; c) M. Sumper, R. Hett, G. Lehmann, S. Wenzl, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8557–8560; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8405–8408.
- [6] a) N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14133–14138; b) M. Sumper, E. Brunner, G. Lehmann, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 3765–3769.
- [7] S. Wenzl, R. Hett, P. Richthammer, M. Sumper, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1753–1756; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1729–1732.
- [8] M. Sumper, S. Lorenz, E. Brunner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5350–5353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5192–5195.
- [9] E. V. Armbrust, J. A. Berges, C. Bowler, B. R. Green, D. Martinez, N. H. Putnam, S. Zhou, A. E. Allen, K. E. Apt, M. Bechner, M. A. Brzezinski, B. K. Chaal, A. Chiovitti, A. K. Davis, M. S. Demarest, J. C. Detter, T. Glavina, D. Goodstein, M. Z. Hadi, U. Hellsten, M. Hildebrand, B. D. Jenkins, J. Jurka, V. V. Kapitonov, N. Kröger, W. W. Lau, T. W. Lane, F. W. Larimer, J. C. Lippmeier, S. Lucas, M. Medina, A. Montsant, M. Obornik, M. S. Parker, B. Palenik, G. J. Pazour, P. M. Richardson, T. A. Rynearson, M. A. Saito, D. C. Schwartz, K. Thamatrakoln, K. Valentin, A. Vardi, F. P. Wilkerson, D. S. Rokhsar, *Science* **2004**, 306, 79–86.
- [10] M. Hildebrand, S. Kim, D. Shi, K. Scott, S. Subramaniam, *J. Struct. Biol.* **2009**, 166, 316–328.
- [11] M. Hildebrand, G. Holton, D. C. Joy, M. J. Doktycz, D. P. Allison, *J. Microsc.* **2009**, 235, 172–187.
- [12] a) J. L. Arias, M. S. Fernández, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4475–4482, zit. Lit.; b) I. M. Weiss, V. Schönitzer, *J. Struct. Biol.* **2006**, 153, 264–277.
- [13] a) J. McLachlan, A. G. McInnes, M. Falk, *Can. J. Botany* **1965**, 43, 707–713; b) M. Falk, D. G. Smith, J. McLachlan, A. G. McInnes, *Can. J. Chem.* **1966**, 44, 2269–2281; c) J. Blackwell, K. D. Parker, K. M. Rudall, *J. Mol. Biol.* **1967**, 28, 383–385; d) W. Herth, W. Barthlott, *J. Ultrastruct. Res.* **1979**, 68, 6–15.
- [14] C. A. Durkin, T. Mock, E. V. Armbrust, *Eukaryotic Cell* **2009**, 8, 1038–1050.
- [15] a) B. Tesson, S. Masse, G. Laurent, J. Maquet, J. Livage, V. Martin-Jézéquel, T. Coradin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 1889–1898; b) E. Brunner, K. Lutz in *Handbook of Biomineralisation* (Hrsg.: P. Behrens, E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 19–38.
- [16] S. F. Tanner, H. Chanzy, M. Vincendon, J. C. Roux, F. Gaill, *Macromolecules* **1990**, 23, 3576–3583.
- [17] A. Webster, P. O. Osifo, H. W. J. P. Neomagus, D. M. Grant, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2006**, 30, 150–161.
- [18] a) K. M. Rudall, W. Kenchington, *Biol. Rev.* **1973**, 49, 597–636; b) J. Schaefer, K. J. Kramer, J. R. Garbow, G. S. Jacob, E. O. Stejskal, T. L. Hopkins, R. D. Speirs, *Science* **1987**, 235, 1200–1204; c) J. F. V. Vincent, U. G. K. Wegst, *Arthropod Struct. Dev.* **2004**, 33, 187–199; d) V. A. Iconomidou, J. H. Willis, S. J. Hamodrakas, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 35, 553–560; e) I. M. Weiss, S. Kaufmann, B. Heiland, M. Tanaka, *J. Struct. Biol.* **2009**, 167, 68–75.
- [19] L. G. Frigeri, T. R. Radabaugh, P. A. Haynes, M. Hildebrand, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5, 182–193.
- [20] a) E. Brunner, H. Ehrlich, P. Schupp, R. Hedrich, S. Hunoldt, M. Kammer, S. Machill, S. Paasch, V. V. Bazhenov, D. V. Kurek, T. Arnold, S. Brockmann, M. Ruhnnow, R. Born, *J. Struct. Biol.* **2009**, 168, 539–547; b) H. Ehrlich, M. Krautter, T. Hanke, P. Simon, C. Knieb, S. Heinemann, H. Worch, *J. Exp. Zool. Part B* **2007**, 308, 473–483.
- [21] L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbières, M.-F. Versali, M. Rinaudo, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 746–751.
- [22] W. Herth, A. Kuppel, E. Schnepf, *J. Cell Biol.* **1977**, 73, 311–321.
- [23] P. J. Harrison, R. E. Waters, F. J. R. Taylor, *J. Phycol.* **1980**, 16, 28–35. (<http://www3.botany.ubc.ca/cccm/NEPCC/esaw.html>).
- [24] a) A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **1973**, 59, 569–590; b) G. Metz, X. Wu, S. O. Smith, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, 110, 219–227.
- [25] B. M. Fung, A. K. Khitrin, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 97–101.