

Einblick in die supramolekulare Architektur von intaktem Diatomeen-Biosilikat mithilfe DNP-verstärkter Festkörper-NMR-Spektroskopie

Anne Jantschke, Eline Koers, Deni Mance, Markus Weingarth, Eike Brunner* und Marc Baldus*

Abstract: Das Biosilikat von Diatomeen ist ein organisch-anorganisches Hybridmaterial mit interessanten Eigenschaften. Die molekulare Architektur des Materials sowohl auf der atomaren als auch auf der Nanometerskala ist bisher noch unbekannt, insbesondere im Fall des intakten Biosilikats. DNP-verstärkte Festkörper-NMR-Spektroskopie in Kombination mit Mikroskopie, MS und MD-Simulationen wurde zur Untersuchung der strukturellen Organisation des intakten Biosilikats angewendet. Damit gelang es erstmals, die Sekundärstrukturelemente von stark Biosilikat-assoziierten nativen Proteinen im Biosilikat *in situ* zu charakterisieren. Anhand der Festkörper-NMR-Daten wurde eine Mischung von Random-Coil- und β -Faltblatt-Konformation nachgewiesen. Außerdem wurden mit dem Biosilikat assoziierte, langketige Polyamine und Kohlenhydrate untersucht, woraus ein neues Modell für die supramolekulare Organisation des intakten Biosilikats abgeleitet wurde.

Unter Biomineralisierung versteht man die Bildung anorganischer Materialien durch biologische Prozesse. Beispiele für Calcium-Biomineralisierung sind Calciumphosphate wie Knochen sowie Calciumcarbonate wie Perlmutter oder Coccolithophoriden. Der häufigste Silikat-Biomineralisationsprozess tritt in Diatomeen auf, die eine bedeutende Rolle im Ökosystem der Erde spielen. Das Biosilikat von Diatomeen zeigt außerdem als organisch-anorganisches Hybridmaterial ein enormes Potenzial für neuartige Anwendungen in den (Bio)materialwissenschaften.^[1] Charakteristisches Merkmal der Silikatzellwand von Diatomeen ist ihre speziesspezifische Mikro- und Nanostrukturierung. Typischerweise enthält das Biosilikat 1–15 Gew.-%^[2] stark assoziierte organische Moleküle.^[3] Die chemische Struktur und die Zusammensetzung dieser Silikat-assoziierten Bestandteile sind zumindest teilweise bekannt; allerdings konnte die strukturelle Organisation auf atomarer Ebene sowie der Nanometerskala bisher nicht aufgeklärt werden, insbesondere im Fall von intaktem

Biosilikat. Bisher war die Strukturbestimmung von Proteinen aus Biomineralien auf In-vitro-Proben beschränkt.^[4] Grund dafür sind spektroskopische Schwierigkeiten bei der Untersuchung von intakten Biomineralien, besonders hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit. Daher wird von uns DNP (Dynamic Nuclear Polarization) zur Verstärkung der Festkörper-NMR-Spektroskopie (solid-state NMR spectroscopy, ssNMR-Spektroskopie) genutzt und mit Mikroskopie, Massenspektrometrie (MS) und Moleküldynamik(MD)-Simulationen kombiniert. Damit gelang erstmals die In-situ-Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente von stark Biosilikat-assoziierten nativen Proteinen im vollständig [¹³C, ¹⁵N, ²⁹Si]-isotopenmarkierten Biosilikat der Diatomee *Stephanopyxis turris*. Weiterhin konnten verschiedene Biosilikat-assoziierte langketige Polyamine (long-chain polyamines, LCPAs) und Kohlenhydrate charakterisiert werden. Die Experimente ergaben ein neues Modell für die supramolekulare Organisation und Architektur des intakten Biosilikats.

Die vollständig [¹³C, ¹⁵N, ²⁹Si]-isotopenmarkierte Diatomeenspezies *S. turris* wurde vor und nach Extraktion mit Natriumdodecylsulfat (SDS)/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) mithilfe von Hellfeldmikroskopie und Helium-Ionen-Mikroskopie untersucht. Abbildung 1a zeigt ein Hellfeldmikroskopiebild lebender Zellen von *S. turris*. Eine Silikatwand umgibt die Algenzelle. Während dieses Biosilikat nach der Behandlung mit SDS/EDTA intakt bleibt (Abbildung 1b,c), werden alle anderen Zellbestandteile entfernt. Diatomeen-Biosilikat hat eine vergleichsweise geringe spezifische Oberfläche. Die BET-Oberfläche des Biosilikats von *S. turris* beträgt ungefähr $20\text{--}30\text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (BET: Brunauer-Emmett-Teller, Abschnitt S1 der Hintergrundinformationen), wobei das Material noch einen erheblichen Anteil von stark Silikat-assoziierten Biomolekülen enthält (ca. 15 Gew.-%).^[2] Die aufwändige und filigrane Strukturierung des Biosilikats erinnert dabei an Leichtbauweise. Die charakteristischen Dimensionen der Strukturelemente sind in Abbildung 1d gezeigt. Die Dicke der einzelnen Silikatschichten, welche diese Strukturen bilden, beträgt typischerweise ca. 50 nm.

Innerhalb der letzten 15 Jahre führten umfangreiche Untersuchungen zur Identifizierung verschiedener stark Biosilikat-assozierter Biomoleküle. Durch Auflösen des Silikats und nachfolgende Fraktionierung konnten lösliche und unlösliche organische Bestandteile isoliert und charakterisiert werden. Dazu zählen unter anderem langketige Polyamine (LCPAs)^[3a] sowie spezielle Proteinfamilien wie Silaffine,^[3b] Silacidine^[3c] und Cinguline.^[3d] Diese Biomoleküle sind wahrscheinlich am Prozess der Silikatbildung beteiligt.^[3a-d,g,h] Es konnte gezeigt werden, dass auch Kohlenhydrate eng mit dem Biosilikat assoziiert sind.^[3e-h] Möglicherweise sind letz-

[*] Dr. A. Jantschke,^[+] Prof. E. Brunner
Bioanalytische Chemie, TU Dresden
Bergstraße 66, 01069 Dresden (Deutschland)
E-Mail: eike.brunner@tu-dresden.de

Dr. E. Koers,^[+] D. Mance, Dr. M. Weingarth, Prof. M. Baldus
NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research
Utrecht University
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)
E-Mail: M.Baldus@uu.nl

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen (experimentelle Details und Methoden sowie damit verbundene Zitate) und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507327> zu finden.

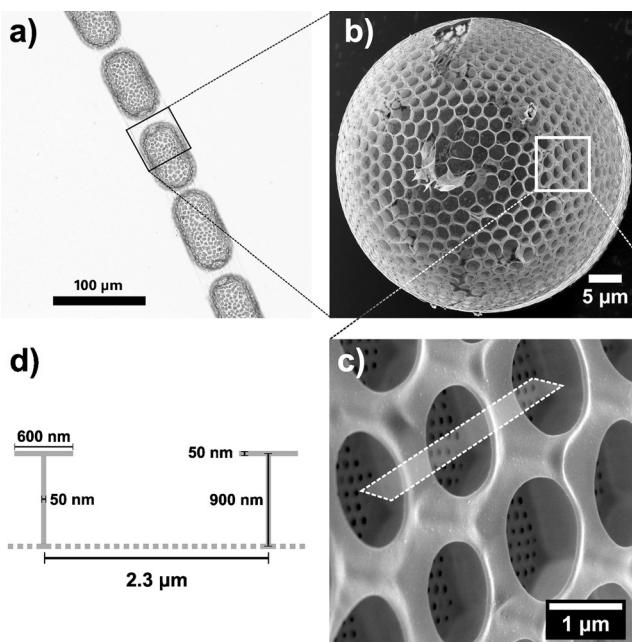


Abbildung 1. Biosilikat – ein mikro- und nanostrukturiertes Hybridmaterial. a) Hellfeldbild von *S. turris* (lebende Zellen); b) und c) Helium-Ionen-Mikroskopie des Biosilikats von *S. turris* nach Extraktion mit SDS/EDTA. Ein Schnitt durch die Zellwand in der Region des grauen Rechtecks in (c) würde die charakteristischen Profilstrukturen, die schematisch in (d) dargestellt sind, erzeugen.

tere auch an Silikat-assoziierte Proteine gebunden und bilden Glykoproteine.

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine bereits etablierte Charakterisierungsmethode für verschiedenartige Materialien und komplexe Biomoleküle einschließlich organisch-anorganischer Hybridmaterialien wie Biomineralien.^[4,5] Spektroskopische Empfindlichkeit und adäquate spektrale Auflösung sind entscheidend für die Charakterisierung von Oberflächenfunktionalitäten und die organisch/anorganische Grenzfläche. Um Einblick in die strukturelle Organisation des Biosilikats von *S. turris* zu erlangen, haben wir DNP-Festkörper-NMR-Spektroskopie angewendet. DNP hat sich zu einer leistungsfähigen Methode zur Steigerung der Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie in hohen Magnetfeldern entwickelt.^[6] Mit DNP gelangen bereits eine selektive Verstärkung von Oberflächenspezies in Hybridmaterialien^[7] sowie eine Untersuchung der Lösungsmittelexposition von Membranproteinen.^[8]

Zunächst wurden eindimensionale (1D) ¹³C- und ¹⁵N-ssNMR-Experimente unter Zuhilfenahme von Kreuzpolarisation (cross polarization, CP; Abbildung 2a,c) und Direktanregung (direct excitation, DE; Abbildung 2b,d) mit (schwarz) und ohne DNP (grau) durchgeführt. Mithilfe dieser Spektren wurden die Signalverstärkungsfaktoren für ¹³C, ¹⁵N und ²⁹Si (Abschnitt S2.1) bestimmt. 1D-ssNMR ermöglicht es, die verschiedenen molekularen Spezies wie Kohlenhydrate, Proteine und LCPAs zu unterscheiden (Tabelle S4). Das DNP-verstärkte ¹⁵N-CP-ssNMR-Spektrum (Abbildung 2a) zeigt zwei Signale, die einerseits den Stickstoffatomen des Polypeptidrückgrats ($\delta = 120$ ppm) und zum anderen den

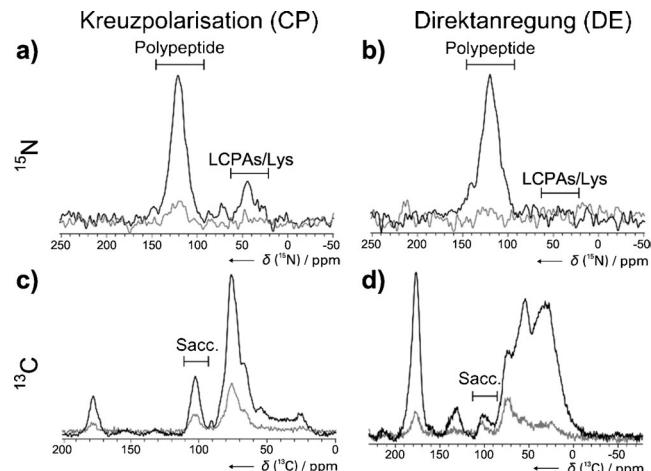


Abbildung 2. Tieftemperatur-ssNMR-Spektren des Biosilikats von *S. turris*. a) ¹H-¹⁵N-CP, $\varepsilon = 2\text{--}7$; b) ¹⁵N-DE, $\varepsilon = 20$; c) ¹H-¹³C-CP, $\varepsilon = 3.5\text{--}4.4$; d) ¹³C-DE, $\varepsilon = 1\text{--}15$. Die Spektren wurden bei 400 MHz mit (Mikrowelle an, schwarz) und ohne DNP-Verstärkung (Mikrowelle aus, grau) aufgenommen. Sacc. = (Poly)saccharide.

Stickstoffatomen der LCPAs oder der C₆-Position der Lysin-Seitenketten ($\delta = 45$ ppm) zuzuordnen sind. Letztere erscheinen deutlich weniger intensiv ohne DNP-Verstärkung (Abbildung 2a, grau). Die ¹⁵N-Signale des direkt angeregten Spektrums ohne DNP-Verstärkung sind sehr schwach (Abbildung 2b, grau). Die DNP-Verstärkung führt dabei zu einer selektiven Verstärkung des Peptid-Stickstoff-Signals bei $\delta = 120$ ppm (Abbildung 2b), wogegen die Signale der Polyamine und Lysin-Seitenketten bei $\delta = 45$ ppm weiterhin unter der Nachweisgrenze liegen. Alle ¹³C-ssNMR-Spektren (CP und DE) des Biosilikats von *S. turris* bestätigen die Gegenwart der beschriebenen organischen Komponenten (Abbildung 2c,d).^[2] Die CP- und DE-Spektren ohne DNP-Verstärkung zeigen markante Signale bei $\delta \approx 76$ (C2-C6) und 101 ppm (C1), die das Vorhandensein von Polysacchariden als einer Hauptkomponente der organischen Matrix belegen.

Insgesamt ermöglichen die 1D-Experimente die Identifizierung verschiedener molekularer Spezies (Kohlenhydrate, Proteine, LCPAs), die signifikant unterschiedliche DNP-Verstärkungsfaktoren aufweisen (normiert auf die DNP-Verstärkung des Polypeptidsignals). Die Verstärkungsfaktoren wurden dabei aus dem Verhältnis der ssNMR-Signalintensitäten mit und ohne DNP-Verstärkung bestimmt (Abbildung 3a). Die Peptidsignale wiesen die größten Verstärkungsfaktoren auf, gefolgt von Kohlenhydraten ($\varepsilon_N = 0.5$), Polyaminen ($\varepsilon_N = 0.36$) und Silikat ($\varepsilon_N = 0.23$). Es konnte gezeigt werden, dass DNP-Verstärkungsfaktoren zur Abschätzung molekularer Dimensionen auf der Nanometer-skala genutzt werden können.^[9] Das gesamte organische Material würde einer Oberflächenschicht von nur etwa 3 nm Dicke entsprechen (Abschnitt S2.2). Die größten Verstärkungsfaktoren treten für Proteine auf; daher kann man annehmen, dass sich diese an der für das Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche befinden. Die vergleichsweise geringen Signalverstärkungen der Kohlenhydrate könnten darauf zurückzuführen sein, dass Radikale wie TOTAPOL (1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)propan-2-ol) bevor-

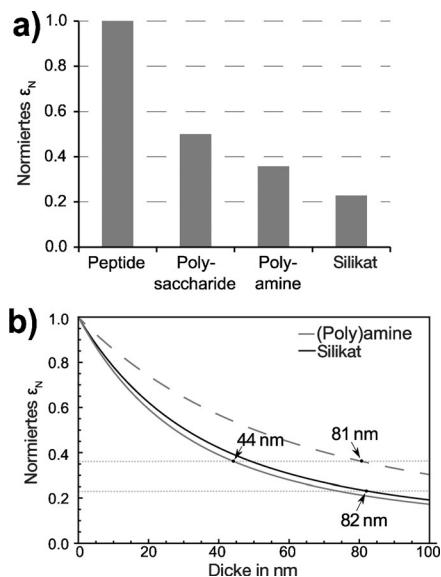


Abbildung 3. Strukturelle Analyse der DNP-Verstärkungsfaktoren.

a) Gemessene Signalverstärkungsfaktoren für Biosilikat-assoziierte Biomoleküle normiert auf den Protein-DNP-Verstärkungsfaktor (experimentelle Werte, siehe Tabelle S4). b) Simulierte DNP-Verstärkungsfaktoren als Funktion der Schichtdicke von Polyaminen und Silikat. Graue Kurven zeigen die normierten Verstärkungen für eine theoretisch angenommene LCPA-Schicht, bestimmt unter Verwendung eines Literaturwertes für die Diffusionskonstante von $300 \text{ nm}^2 \text{s}^{-1}$ ^[11] (durchgezogene Linie) und $1000 \text{ nm}^2 \text{s}^{-1}$ (gestrichelte Linie).^[9] Die schwarze Kurve zeigt die normierten Verstärkungen für Silikat unter Zuhilfenahme einer berechneten Diffusionskonstante von $62 \text{ nm}^2 \text{s}^{-1}$, die auf einem Proton-Proton-Abstand von 5.5 Å beruht.

zugt an Saccharide binden und es zu paramagnetischem Quenching kommt. LCPAs stehen in engem Kontakt mit dem Silikat^[10] und liegen daher entfernt von der Lösungsmittelzugänglichen Oberfläche vor, was eine strukturelle Analyse der DNP-Parameter rechtfertigt. Hierfür haben wir eine klassische Spindiffusionsnäherung durchgeführt und die relativen DNP-Verstärkungen ε_N der LCPAs und des Silikats mit den experimentell beobachteten longitudinalen Kernspin-Relaxationszeiten korreliert (Tabellen S4 und S5). Unter Verwendung von Spindiffusionskonstanten, die bereits für protonierte Biomoleküle^[9,11] bestimmt wurden (Abschnitt S1.6), ergab sich eine Schichtdicke von ungefähr 40–80 nm für das Silikat-LCPA-Hybridmaterial (Abbildung 3b). Diese abgeschätzten Werte stimmen sehr gut mit der Dicke der Silikatstrukturen überein, die in mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 1c,d) zu beobachten sind. Dazu wurde angenommen, dass die LCPAs über die gesamte Silikatphase verteilt vorliegen. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da LCPAs dafür bekannt sind, an der Silikatpräzipitation^[3a] beteiligt zu sein und Diatomeen-Biosilikat ein vergleichsweise poröses und weniger kondensiertes Silikatmaterial darstellt.^[12]

Die selektiven DNP-Verstärkungen, die in Abbildung 2 beobachtet wurden, konnten bei der Verwendung von AMUPol^[13] bestätigt werden. Mit AMUPol^[13] treten allgemein größere Signalverstärkungsfaktoren als für TOT-APOL^[14] auf (Abbildung S1 und Tabelle S6), was auch DNP-

verstärkte 2D-ssNMR-Experimente ermöglichte (Abbildung 4 und Abbildungen S2–S6). Abbildung 4a–c gibt Ausschnitte eines ^{13}C - ^{15}N -Korrelationsspektrums und eines ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperiments wieder. In einem NCA-Korrelationsexperiment (Abbildung 4a) erscheinen intensive Aminsignale bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 40$ –60 ppm (^{13}C) und ca. 45 ppm (^{15}N), die charakteristisch für tertiäre Amine sind. Zusätzlich beobachtet man Alkylkorrelationen bei $\delta = 24$ ppm (^{13}C) und primäre Amine bei $\delta = 33$ ppm (^{15}N). Die beobachteten chemischen Verschiebungen stimmen mit der von Sumper et al.^[3a] vorgeschlagenen LCPA-Struktur überein. Zusätzlich zu den Aminen wurden verschiedene Signale in der Region des Polypeptidrückgrats (N-CA) im ^{13}C - ^{15}N -Korrelationsspektrum (Abbildung 4b), dem ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperiment (Abbildung 4c) und den NCACX-Daten (Abbildung 4d) gefunden. Gut aufgelöste Signale erscheinen insbesondere in der ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Korrelation und dem NCACX-Experiment. Diese experimentell beobachteten 2D-Korrelationen wurden mit Standardvorhersagen der chemischen Verschiebung für alle 20 Aminosäuren in unterschiedlichen Sekundärstrukturen verglichen.^[15] Die zuvor definerten Fehlerbereiche für die Vorhersage der Proteinsekundärstruktur^[16] sind in Abbildung 4c,d als farbige Kästen dargestellt. Auf diese Weise konnten Asparagin- (D) und Glutaminsäure (E), Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) als charakteristische Bestandteile identifiziert werden (siehe Abbildungen S3 und S4 für das vollständige Spektrum). Be merkenswerterweise wurden diese ssNMR-Daten durch LC-MS/MS- und GC-MS-Analysen der Aminosäurezusammensetzung vollständig bestätigt. Die fünf häufigsten Aminosäuren sind dabei Asparagin- (D) und Glutaminsäure (E), Glycin (G), Serin (S) und Alanin (A) (Abbildung 4e und Tabellen S7 und S8). Während in Abbildung 4b die Alaninkorrelationen deutlich zu finden sind, fehlen diese in den Spektren von Abbildung 4c,d aufgrund der niedrigen Messtemperatur, wie bereits gezeigt wurde.^[7b]

Weiterhin wurden die 2D-ssNMR-Daten in Bezug auf die Proteinsekundärstruktur analysiert. Prolinsignale mit $\delta \approx 62$ ppm (Ca) erscheinen vorrangig in Random-Coil- oder β -Faltblatt-Konformation (Abbildung 4b). Das Vorhandensein eines Serin-C β ($\delta = 66$ ppm; Abbildung 4b) in β -Faltblatt-Konformation ist ebenso wahrscheinlich. Das ^{13}C -Signal um $\delta = 66$ ppm könnte aber alternativ auch durch ein α -helikales Threonin-Ca-Atom erklärt werden. Allerdings befindet sich dies in geringerer Übereinstimmung mit den beobachteten ^{15}N -chemischen Verschiebungen. Das markante Auftreten von β -Faltblatt-Konformationen ist außerdem in Einklang mit zwei aufgelösten Signalen in der Glycinregion ($\delta = 45$ und 43.5 ppm), die der β -Faltblatt bzw. Random-Coil-Faltung ($\delta = 45$ ppm) und Proteinsegmenten in ausgeprägter β -Faltblatt-Konformation ($\delta = 43.5$ ppm) zuzuordnen sind. Weitere Aussagen ließen sich anhand des ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Korrelations- und des NCACX-Experiments treffen (Abbildung 4c,d). Dominante Signale erschienen in der Seitenkettenregion der häufig vorkommenden Asparagin- und Glutaminsäure (Abbildung 4c). Dabei stimmten erneut die intensitätsstärksten Korrelationen mit einer β -Faltblatt-Konformation überein.

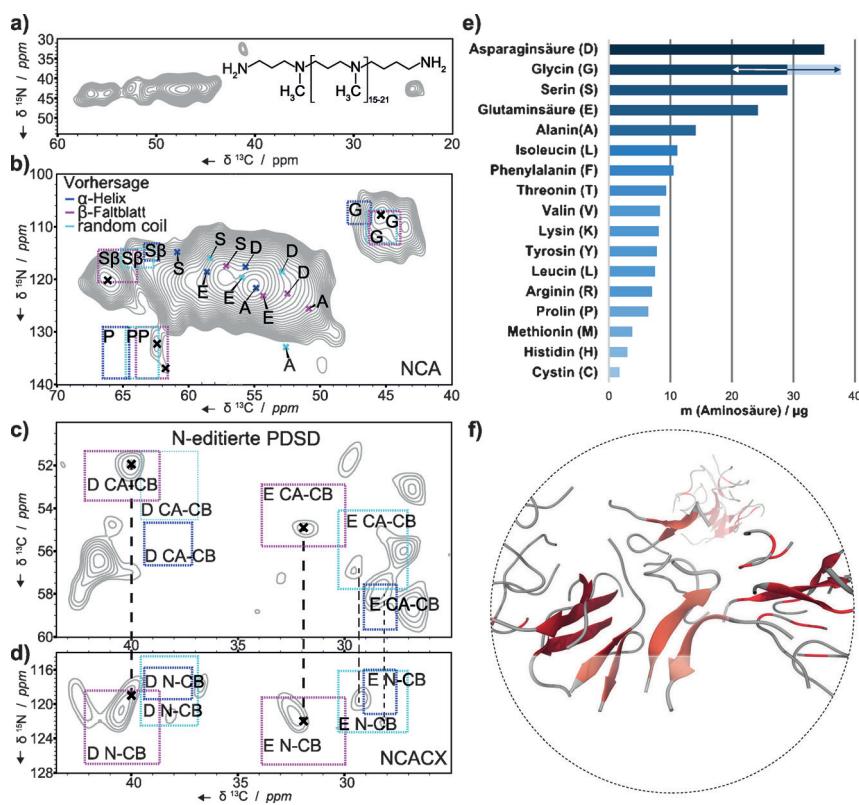


Abbildung 4. Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung und Sekundärstruktur der Proteine. a-d) Analyse eines 2D- ^{13}C - ^{15}N - und ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperiments, das an einem 400-MHz-DNP-Spektrometer aufgenommen wurde. a) Polyaminregion eines NCA-Experiments mit der bekannten Struktur.^[3a] b) Proteinregion mit einer Vorhersage der chemischen Verschiebung^[15,16] für unterschiedliche Sekundärstrukturen (pink: β-Faltblatt, cyan: Random Coil, blau: α-Helix). Die Größe der Boxen veranschaulicht die Standardabweichung der Vorhersagen für ausgewählte Aminosäuren. c, d) Ausschnitte eines 2D-Experiments von *S. turris* mit AMUPol als DNP-Radikal: c) ^{15}N -editierte ^{13}C - ^{13}C -Korrelation^[17] und d) NCACX-Experiment zeigen C_β -Signale der Asparagin- (D) und Glutaminsäure (E) überwiegend in β-Faltblatt-Konformation (vollständige Spektren siehe Abbildungen S2–S4). Gestrichelte Linien und Kreuze wurden zur besseren Übersichtlichkeit eingeführt. e) Quantitative Aminosäureanalyse mithilfe von LC-MS/MS (Tabelle S7). Glycin konnte allerdings nur mithilfe von GC-MS nachgewiesen werden (Tabelle S8). f) Repräsentativer Schnapschuss einer MD-Simulation von 40 Modellpeptiden (Ac-DASAGLGSD-COOH) in wässriger Lösung.

Zusammenfassend lassen die Befunde darauf schließen, dass die nativen Silikat-assoziierten Proteine vorrangig durch fünf Aminosäuren gebildet werden und diese hauptsächlich in β-Faltblatt- und Random-Coil-Konformation vorliegen. Zusätzlich zeigen MD-Simulationen (Abschnitt S1.7) für Modellpeptide, die aus der Aminosäureanalyse abgeleitet wurden (Abschnitt S2.5), eine klare Tendenz zur β-Faltblatt-Sekundärstruktur (Abbildung 4 f). In-vitro-Experimente mit einem rekombinanten Silikat-assoziierten Protein, rSilC, an Flüssig-fest- und Luft-fest-Grenzflächen zeigten bereits früher eine Umwandlung vom Random Coil zur β-Faltblatt-Sekundärstruktur.^[18]

In den ssNMR-Spektren sind außerdem auffällige Signale enthalten, die auf Kohlenhydrate zurückzuführen sind. Wie in Abschnitt S2.4 beschrieben, zeigen Experimente auf Basis von ^{13}C - ^{13}C -Doppelquanten(DQ)/Einzelquanten(SQ)- sowie Protonen-getriebener Spindiffusion in Kombination mit ^{15}N -editierten ^{13}C - ^{13}C -Daten das Vorhandensein einer Sauerstoff-

verbrückten Glucuronsäure als Hauptbestandteil der Saccharide.

Insgesamt wurde mithilfe der DNP-verstärkten ssNMR-Spektroskopie ein struktureller Einblick in das Diatomeen-Biosilikat erhalten, ein Hybridmaterial mit vergleichsweise geringer spezifischer Oberfläche. Das resultierende Modell (Abbildung 5) enthält eine Oberflächenschicht aus Polysacchariden und Proteinen, welche die langketigen Polyamine und das Silikat abschirmen. Diese Beobachtung stimmt mit vorangegangenen Arbeiten überein, die auf Polysaccharide als eine äußere Oberflächenschicht verweisen.^[3h] Die 2D-DNP-ssNMR-Daten gaben einen direkten Einblick in die Faltung des Peptidrückgrats der nativen Biosilikat-assoziierten Proteine. Die ssNMR-Analyse in Verbindung mit MD-Simulationen weist auf eine Mischung von Random-Coil- und β-Faltblatt-Konformation hin, die möglicherweise Kompattheit und intermolekulare Vernetzung sicherstellt.

Bemerkenswerterweise zeigen sowohl ssNMR-Spektroskopie als auch MS, dass diese Proteine eine Aminosäurezusammensetzung aufweisen, die hauptsächlich Serin, Alanin, Glycin sowie Asparagin- und Glutaminsäure umfasst. Außerdem enthält das Silikat (Abbildung 5) langketige Polyamine. Eine geschätzte Dicke von 40–80 nm für die Silikat/LCPA-Schicht ist konsistent mit unseren ssNMR-Daten und den mikroskopischen Untersuchungen, die Schichtdicken von ca. 50 nm zeigen. Auf chemischer Ebene konnten gut aufgelöste Signale der *N*-Methylpropylimin-Einheit der LCPAs zugeordnet werden (Abbildung 4a). Damit konnte die Poly-

aminstruktur,^[3a] die für aus *S. turris*-Biosilikat isolierte LCPAs bereits zuvor bestimmt worden war, für intaktes Biosilikat bestätigt werden. Zudem zeigte die 2D-DNP-ssNMR-Spektroskopie das Vorhandensein einer Sauerstoff-verbrückten Glucuronsäure als Bestandteil des Silikat-assoziierten Kohlenhydratmaterials. Stickstoff-verbrückte Saccharide sowie *N*-Acetylglucosamin konnten ausgeschlossen werden. Unsere Untersuchungen verdeutlichen die einzartigen Möglichkeiten, welche die Kombination von DNP-ssNMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie mit MD-Simulationen zur Untersuchung von intakten, komplexen Biomaterialien bietet. Solche Materialien sind sowohl auf atomarer Ebene als auch auf der Nanometerskala durch Beugungsmethoden nur sehr schwer zu untersuchen. Die erlangten Strukturinformationen könnten zum Design neuartiger Hybridmaterialien führen.

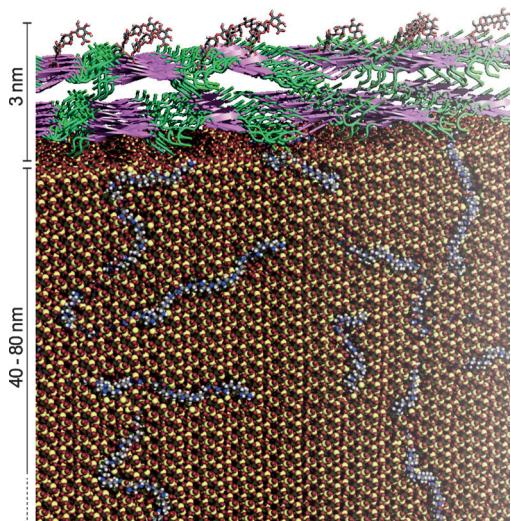


Abbildung 5. Modell für die supramolekulare Architektur des Biosilikats von *S. turris*. Eine etwa 3 nm dicke Schicht aus Kohlenhydraten und Proteinen bedeckt die 40–80 nm dicke Silikatphase (farblich dargestellt in Rot und Gelb). Die Proteine zeigen eine Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen, was mithilfe von 2D-DNP-ssNMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte. Die geringen DNP-Signalverstärkungsfaktoren der langketigen Polyamine im Vergleich zu allen anderen organischen Bestandteilen lassen darauf schließen, dass die LCPAs (in Grau, Blau und Weiß) über die Silikatphase verteilt vorliegen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand innerhalb der Förderprogramme BIONMR, EastNMR und COST (Action TD1103). Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR 2038, BR 1278/24-1) und NWO (722.012.002 – M.W.; 700.11.344 und 700.26.121 – M.B.) für die finanzielle Unterstützung. Besonderer Dank gilt Prof. P. Tordo und seiner Gruppe für die Bereitstellung von AMUPol und Prof. N. Kröger (Dresden) für wertvolle Diskussionen.

Stichwörter: Biomineralisierung · Diatomeen · DNP · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Organisch-anorganische Hybridverbindungen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15069–15073
Angew. Chem. **2015**, *127*, 15284–15288

- [1] C. Jeffryes, S. N. Agathos, G. Rorrer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 23–31.
- [2] C. Gröger, K. Lutz, E. Brunner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 54–68.
- [3] a) N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14133–14138; b) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, *286*, 1129–1132; c) S. Wenzl, R. Hett, P. Richthammer, M. Sumper, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1729–1732; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1753–1756; d) A. Scheffel, N. Poulsen, S. Shian, N. Kröger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3175–3180; e) R. E. Hecky, K. Mopper, P.

Kilham, E. T. Degens, *Mar. Biol.* **1973**, *19*, 323–331; f) A. Chiovitti, R. E. Harper, A. Willis, A. Bacic, P. Mulvaney, R. Wetherbee, *J. Phycol.* **2005**, *41*, 1154–1161; g) R. Hedrich, S. Machill, E. Brunner, *Carbohydr. Res.* **2013**, *365*, 52–60; h) B. Tesson, M. Hildebrand, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61675.

- [4] A. Roehrich, G. Drobny, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2136–2144.
- [5] a) C. Bonhomme, C. Gervais, D. Laurencin, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *77*, 1–48; b) B. Tesson, S. Masse, G. Laurent, J. Maquet, J. Livage, V. Martin-Jézéquel, T. Coradin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1889–1898; c) M. J. Duer, *J. Magn. Reson.* **2015**, *253*, 98–110; d) S. Kababya, A. Gal, K. Kahil, S. Weiner, L. Addadi, A. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 990–998; e) G. Goobes, R. Goobes, O. Schueler-Furman, D. Baker, P. S. Stayton, G. P. Drobny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16083–16088; f) Y.-Y. Hu, A. Rawal, K. Schmidt-Rohr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22425–22429.
- [6] a) L. R. Becerra, G. J. Gerfen, R. J. Temkin, D. J. Singel, R. G. Griffin, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 3561–3564; b) D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, R. G. Griffin, *Science* **1997**, *276*, 930–932; c) A. B. Barnes, G. D. Paeppe, P. C. A. van der Wel, K.-N. Hu, C.-G. Joo, V. S. Bajaj, M.-L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 237–263; d) M. Kaplan, A. Cukkemane, G. C. P. van Zundert, S. Narasimhan, M. Daniëls, D. Mance, G. Waksmann, A. M. J. J. Bonvin, R. Fronzes, G. E. Folkers, M. Baldus, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 649–652.
- [7] a) A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Copéret, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459–15461; b) E. J. Koers, M. P. López-Deber, M. Weingarth, D. Nand, D. T. Hickman, D. M. Ndao, P. Reis, A. Granet, A. Pfeifer, A. Muhs, M. Baldus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10905–10908; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11106–11109.
- [8] E. J. Koers, E. A. W. van der Cruijsen, M. Rosay, M. Weingarth, A. Prokofyev, C. Sauvée, O. Ouari, J. van der Zwan, O. Pongs, P. Tordo, W. E. Maas, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2014**, *60*, 157–168.
- [9] P. C. A. van der Wel, K.-N. Hu, J. Lewandowski, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10840–10846.
- [10] D. Wisser, S. I. Brückner, F. M. Wisser, G. Althoff-Ospelt, J. Getzschmann, S. Kaskel, E. Brunner, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2015**, *66–67*, 33–39.
- [11] C. Ader, R. Schneider, K. Seidel, M. Etzkorn, S. Becker, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 170–176.
- [12] E. G. Vrieling, Q. Sun, M. Tian, P. J. Kooyman, W. W. C. Gieskes, R. A. v. Santen, N. A. J. M. Sommerdijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10441–10446.
- [13] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussénac, R. T. Weber, O. Ouari, P. Tordo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10858–10861; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11058–11061.
- [14] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11385–11390.
- [15] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 852–861.
- [16] K. Seidel, M. Etzkorn, R. Schneider, C. Ader, M. Baldus, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2009**, *35*, 235–242.
- [17] L. A. Baker, M. Daniëls, E. A. W. van der Cruijsen, G. E. Folkers, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2015**, *62*, 199–208.
- [18] E. Kharlampieva, C. M. Jung, V. Kozlovskaya, V. V. Tsukruk, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5242–5250.

Eingegangen am 6. August 2015

Online veröffentlicht am 28. Oktober 2015