

Multinukleare NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Biomineralisation bei Diatomeen



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Katharina Lutz
aus Regensburg

Mai 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.05.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Eike Brunner

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Gutachter: Prof. Dr. Eike Brunner

2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Sumper

3. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Einführung	4
2.1	Biomineralisation	4
2.2	Diatomeen: Allgemeine Vorbemerkungen	5
2.3	Aufbau der Diatomeenzellwand und Zellteilung	6
2.4	Zellwandkomponenten	7
2.5	Silikatmetabolismus und der Prozess der Biom mineralisation	10
2.6	Zielsetzung	13
3	Materialien und Methoden	15
3.1	Relevante NMR-Experimente	15
3.1.1	Festkörper-NMR-Spektroskopie: <i>magic angle spinning</i>	16
3.1.2	Festkörper-NMR-Spektroskopie: <i>cross polarization</i>	18
3.1.3	Festkörper-NMR: Das HETCOR-Experiment	20
3.1.4	Spektrenaufnahme: Experimentelle Bedingungen	21
3.2	Dynamische Lichtstreuung	22
3.3	Kultivierung der Kieselalgen und Probenpräparation	23
3.3.1	Präparation der Zellwandproben verschiedener Diatomeen	23
3.3.2	Präparation von ganzen Diatomeenzellen für die ^{29}Si Festkörper-NMR-Spektroskopie	25
3.4	Fluoreszenzmikroskopie	26
3.5	Chemikalien und weitere verwendete Materialien	26
4	Modelluntersuchungen zur Aggregatbildung von Polyaminen	28
4.1	Stand der Forschung	28
4.2	Zeitabhängige Stabilität von PAA-Aggregaten	31
4.3	Einfluss von Pyrophosphat auf die Aggregatbildung von PAA	32
4.4	Experimente an natürlichen Polyaminen aus <i>Stephanopyxis turris</i>	37

5	Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen der organischen Moleküle in Diatomeenzellwänden	40
5.1	^{13}C Festkörper-NMR-Spektroskopie an Diatomeenzellwänden	41
5.1.1	Zuordnung der ^{13}C NMR-Signale und Quantifizierung des organischen Materials	41
5.1.2	Einfluss des Wassergehalts der Zellwände auf die Festkörper-NMR-Spektren	47
5.1.3	Einfluss der Messtemperatur auf die Festkörper-NMR-Spektren	51
5.2	^{15}N Festkörper-NMR-Spektroskopie an Diatomeenzellwänden	54
6	^{29}Si NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Silikatmetabolismus von Diatomeen	58
6.1	Optimierung der Versuchsbedingungen für <i>Ditylum brightwellii</i>	61
6.2	Untersuchung der zeitabhängigen Si-Aufnahme von <i>D. brightwellii</i>	63
6.2.1	Wachstumskurve	64
6.2.2	^{29}Si Festkörper-NMR-Spektroskopie und Quantifizierung der Signale	65
6.2.3	Versuchsbegleitende mikroskopische Untersuchungen	68
6.3	Flüssigkeits-NMR-spektroskopische Untersuchungen	70
7	^{31}P NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Phosphorylierung von Silaffinen	74
8	Zusammenfassung	78
9	Literaturverzeichnis	80
10	Anhang	92
10.1	^{13}C MAS NMR-Experimente an Diatomeenzellwänden	92
10.2	NMR-Experimente an isolierten Silaffinen von <i>T. pseudonana</i>	93
	Danksagung	95
	Erklärung	96

1 Einleitung

Diatomeen (Kieselalgen) sind bereits seit über hundert Jahren wegen ihrer auffälligen, regelmäßig strukturierten Silikatzellwände ein faszinierendes Studienobjekt. Diese, mit bloßem Auge kaum sichtbaren, einzelligen Algen sind im Meer äußerst zahlreich vorhanden und von großer ökologischer Bedeutung: Sie bilden die Basis der marinen Nahrungskette, leisten einen großen Beitrag zur Sauerstoffproduktion der Erde und sind in der Lage, atmosphärisches Kohlenstoffdioxid zu binden und auf den Grund des Ozeans zu „pumpen“ [Chisholm 2000]. Im Gegensatz dazu ist bis heute nur wenig über die Biosynthese ihrer anorganischen Zellwände bekannt. Die Erforschung der Biomineralisation der Diatomeen ist nicht nur hinsichtlich der Grundlagenforschung von großem Interesse. Bereits heute kommen in der Industrie Diatomeenschalen unter anderem als Schleifmittel (z. B. in Zahnpasta) oder als Filtriermittel zum Einsatz. Materialwissenschaftler und Nanotechnologen erhoffen sich auch die außergewöhnlichen Eigenschaften der Diatomeenzellwände -wie ihre große mechanische Stabilität [Hamm 2003]- in Zukunft zu Nutze machen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der magnetischen Kernresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) eingesetzt, um die Biomineralisation bei Diatomeen zu untersuchen. Die NMR-Spektroskopie ist heute eine der wichtigsten spektroskopischen Methoden. Diese vielseitige Methode kommt hauptsächlich bei der Strukturaufklärung von Molekülen zum Einsatz. Daneben können auch Informationen zur Dynamik und eventuellen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen gewonnen werden. Die Methode ist nicht invasiv, das heißt, die Proben können vermessen werden, ohne sie modifizieren zu müssen und liegen nach der Messung wieder unverändert vor. In dieser Arbeit wurden neben NMR-spektroskopischen Messungen an flüssigen Proben auch Festkörper-NMR-spektroskopische Experimente durchgeführt, welche zum Beispiel eine Untersuchung der Diatomeenzellwände im Ganzen ermöglichen.

2 Einführung

2.1 Biomineralisation

Unter dem Begriff „Biomineralisation“ versteht man die Bildung von Mineralien innerhalb oder außerhalb der Zellen lebender Organismen [Boskey 2003]. Biomineralien erfüllen viele verschiedene Funktionen: Sie dienen unter anderem dem Schutz gegen Feinde (z.B. Muschelschalen), als Werkzeuge (Zähne) oder als stützendes Gerüst (z.B. Skelett der Wirbeltiere). Manche Lebewesen nutzen Biomineralien als Schwerkräftensensoren (Otolithen, Statolithen) oder zur Orientierung im Erdmagnetfeld (Magnetorezeptoren). Außerdem können Biomineralien auch als Vorratssystem wirken, nämlich indem bei physiologischem Bedarf Ionen aus diesen herausgelöst werden [Boskey 2003, Simkiss 1989].

Biomineralien sind häufig amorph und hydratisiert. Ihre Bildung, welche unter strenger biologischer Kontrolle erfolgt, wird durch Wechselwirkungen des anorganischen Festkörpers mit einer organisch-chemischen Matrix gesteuert. Das endgültige Verhältnis von organischem zu anorganischem Material im fertigen Biomineral variiert stark je nach Organismus und Biomineral. So ist zum Beispiel der organische Anteil im Zahnschmelz der Wirbeltiere geringer als 1 %, wohingegen in den Wirbeltierknochen das Verhältnis von anorganischem Calciumphosphat zu organischem Kollagen nahezu 1 beträgt [Boskey 2003].

Calciumcarbonat (CaCO_3) ist das häufigste Biomineral in der Natur. Man findet es zum Beispiel im Exoskelett mariner Einzeller (Coccolithophoren), in den Schalen von Weichtieren oder in den Eierschalen von Vögeln. Ein weiteres Calcium-basiertes Biomineral ist Calciumphosphat. Als Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) sorgt es beispielsweise für die Stabilität und Härte der Wirbeltierskelette und -zähne. Bei manchen Meereslebewesen spielen Metallsulfate (CaSO_4 , BaSO_4 , SrSO_4) eine wichtige Rolle, da sie ihnen als Schwerkräftensensoren oder stabilisierende und schützende Exoskelette dienen. Eisenoxide (Fe_3O_4 , FeOOH) treten in magnetotaktischen Bakterien auf und bilden die Zähne verschiedener Schnecken. Daneben wird dieses Biomineral als Ferrihydrit von Tieren und Pflanzen als Eisenspeicher genutzt. Siliziumdioxid (SiO_2) findet man in vielen verschiedenen Pflanzen, wie zum Beispiel in den Stängeln, Blättern oder Samen von Reispflanzen, Gräsern, Schachtelhalmen oder Brennnesselgewächsen. Viele einfache

Lebensformen im Meer produzieren Exo- und Endoskelette aus Silikat. Beispiele hierfür sind mehrzellige Organismen wie Kiesel Schwämme, oder Einzeller wie Radiolarien oder Kieselalgen (Diatomeen) [Boskey 2003, Simkiss 1989]. Letztere waren schon Anfang des letzten Jahrhunderts wegen ihrer außergewöhnlich strukturierten und gemusterten Silikatzellwände ein beliebtes Studienobjekt bei Mikroskopikern [Haeckel 1904].

2.2 Diatomeen: Allgemeine Vorbemerkungen

Diatomeen sind einzellige, photosynthetische Algen, welche fast alle Gewässerlebensräume der Erde in großer Zahl besiedeln. Im Meer- und Süßwasser stellen sie die größte Gruppe eukaryontischen Phytoplanktons. Daneben existiert eine Vielzahl an benthonischen Formen, welche zum Beispiel auf Sedimenten, Steinen, im Boden oder auf den Panzern bzw. der Haut von Wassertieren leben [Falciatore 2002, Round 1990]. Diatomeen bilden innerhalb der *Heterokontophyta* die Klasse der *Bacillariophyceae* [Round 1990]. Wahrscheinlich existieren weit mehr als 250 Gattungen und 100000 Arten [Mann 1996]. Kieselalgen sind auch aus ökologischer Hinsicht von größter Bedeutung. So sind sie für einen großen Teil der photosynthetischen Kohlenstofffixierung verantwortlich [Falkowski 1998] und bilden das erste Glied der marinen Nahrungskette [Scala 2001]. Diatomeen können je nach Art Größen zwischen 5 μm und 5 mm erreichen [Falciatore 2002]. Ein besonderes Merkmal der Kieselalgen ist ihre Zellwand aus amorphem Siliziumdioxid, die artspezifische Muster aufweist (Abbildung 2.1). Diese außergewöhnlich schönen, regelmäßigen Strukturen sind genetisch festgelegt und werden

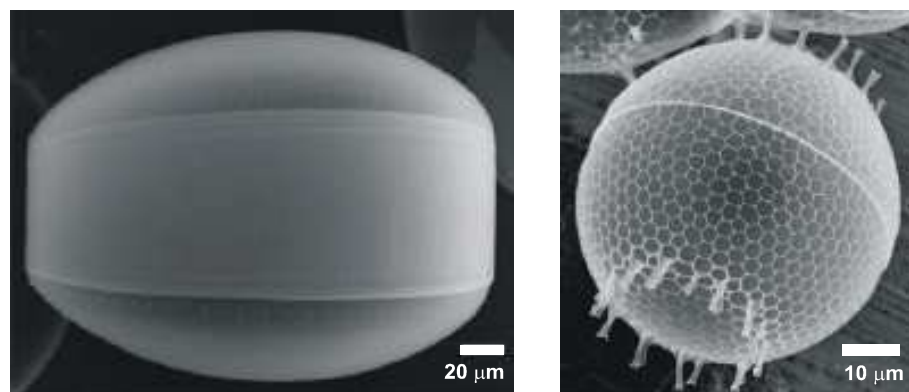


Abb. 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellwände der Diatomeen *Coscinodiscus granii* (links) und *Stephanopyxis turris* (rechts) (Aufnahmen von M. Sumper, Universität Regensburg).

exakt von Generation zu Generation weitervererbt. Das Silikat fossiler Diatomeenzellwände ist in den Sedimenten der Meeresböden vorherrschend und spielt eine wichtige Rolle in der Biogeochemie der Ozeane [Falciatore 2002]. Die fossilen Ablagerungen werden heute als so genannte „Diatomeenerde“ in Filtern, Waschpulver, Zahnpasta oder Dynamit genutzt [Kooistra 2003, Scala 2001]. Im Gegensatz zur ökologischen Bedeutung der Diatomeen ist nur wenig über ihre Biologie und die Entstehung ihrer Zellwände auf molekularer Ebene bekannt [Scala 2001].

2.3 Aufbau der Diatomeenzellwand und Zellteilung

Je nach Symmetrie ihrer silifizierten Zellwand werden Kieselalgen in zwei Ordnungen eingeteilt: Die Zellwand der *Centrales* ist radialsymmetrisch (z.B. rund, oval oder dreieckig), während die der *Pennales* bilateralsymmetrisch ist. Die Zellwand selbst besteht aus zwei fast identischen Hälften, der Epitheka und der Hypotheka, die wie eine Schachtel mit ihrem Deckel aufeinander sitzen (Abbildung 2.2). Gemeinsam bilden sie die so genannte Frustel. Jede Theka setzt sich aus einer Valva, die den Außenteil der Theka ausmacht, sowie aus mehreren ringförmigen Gürtelbändern, welche sich an der Überlappungsstelle der beiden Valven befinden, zusammen [Falciatore 2002, Round 1990]. Im Allgemeinen vermehren sich Diatomeen vegetativ durch Zweiteilung. Hierbei wird jede Valva der Mutterzelle zur Epitheka einer Tochterzelle. Die Hypotheka jeder Tochterzelle muss neu synthetisiert werden. Dies erfolgt in einem spezialisierten Vesikel, dem *silica deposition vesicle* (SDV). Während der Silikatpolymerisation im Inneren des Vesikels streckt sich das SDV kontinuierlich in die Länge, bis die neue Hypotheka vollständig ist. Anschließend wird die neue Zellwand durch Exozytose nach außen geschleust, wobei die SDV-Membran mit der Plasmamembran verschmilzt. Das Einfügen neuer Gürtelbänder

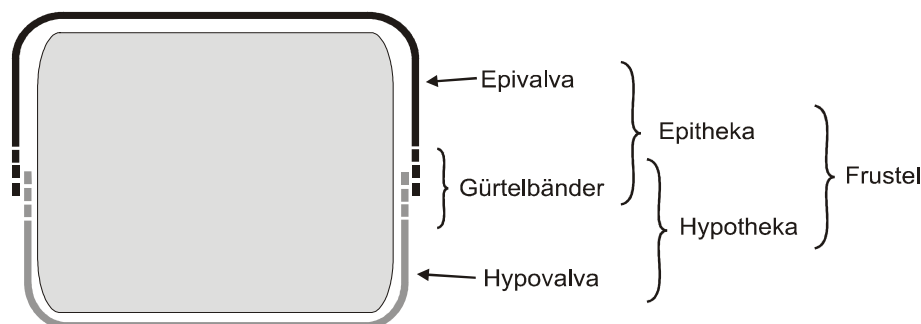


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Diatomeenfrustel.

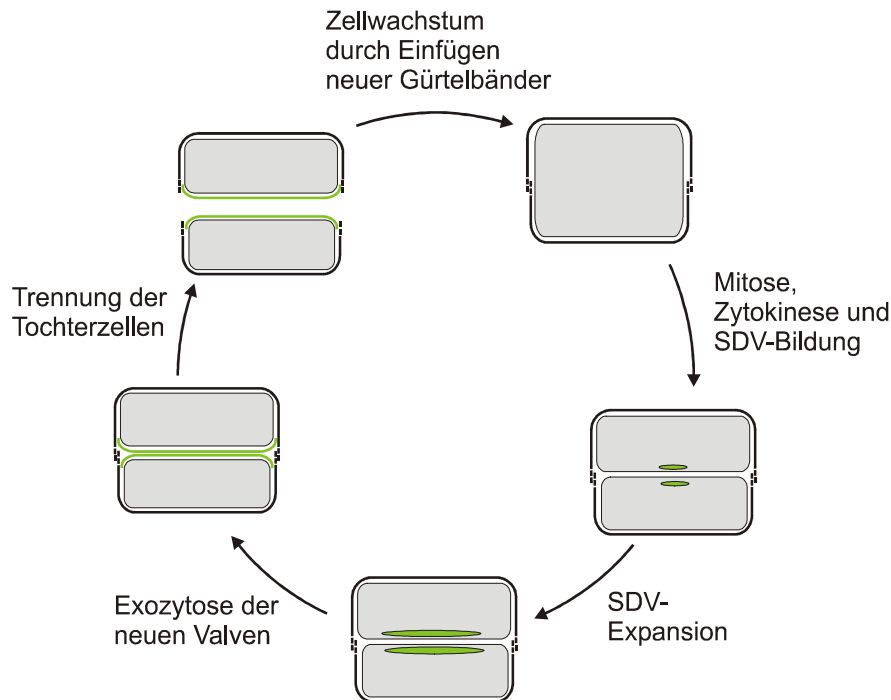


Abb. 2.3: Überblick über den Zellteilungszyklus von Diatomeen [nach Falciatore 2002].

ermöglicht den getrennten Tochterzellen unidirektional entlang der Zellteilungsachse zu wachsen. Der Zellteilungsprozess ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt [Falciatore 2002, Zurzolo 2001]. Da die Hypotheka immer etwas kleiner ist als die Epitheka, verringert sich die Zellgröße der Tochterzellen durch aufeinander folgende Zellteilungen kontinuierlich. Die Wiederherstellung der ursprünglichen Größe erfolgt nach Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes (ungefähr 30-40 % der maximalen Größe) durch die Bildung von Auxosporen, welche normalerweise mit sexueller Vermehrung verbunden ist [Drebes 1977, Round 1990].

2.4 Zellwandkomponenten

Der größte Bestandteil der Diatomeenzellwand ist amorphes, hydratisiertes SiO_2 , welches sich durch die Summenformel $[\text{Si}_n\text{O}_{2n-(nx/2)}(\text{OH})_{nx}]$ mit $x \leq 4$ beschreiben lässt [Martin-Jézéquel 2003]. Der Silifizierungsgrad der Frustel kann je nach Art und Lebensstadium zwischen 1 % und 50 % des Trockengewichts variieren [Volcani 1977].

Die Silikatstrukturen der Zellwand sind außerdem von einer organischen Hülle umgeben, welche teils ungewöhnliche Zusammensetzungen von Aminosäuren, Zuckern und Lipiden enthält [Hecky 1973, Reimann 1965, Round 1990, Volcani 1977, Volcani 1981]. Sie übt

eine Schutzfunktion aus, in dem sie zum Beispiel verhindert, dass sich das Silikat der Frustel im Wasser auflöst [Volcani 1981]. In den letzten Jahren wurden die verschiedenen organischen Komponenten der Zellwand genauer erforscht. Einen Großteil der Proteinaußenhülle machen die so genannten Frustuline aus. Diese 75-200 kDa großen Glykoproteine haben die Fähigkeit Ca^{2+} zu binden. Sie sind nicht kovalent gebunden und lassen sich mithilfe von EDTA ablösen [Kröger 1994, Kröger 1996, Van de Poll 1999]. Außerdem konnten polyanionische Proteine, die so genannten Pleuraline (früher HEPs) (150-200 kDa), identifiziert werden, welche sich zwischen den sich überlappenden Gürtelbändern der Zellwand befinden [Kröger 1997]. Aufgrund ihrer Lage könnten diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung der Gürtelbänder mit den Valven, genauso wie bei deren Separation während der Zellteilung, spielen. Am Biomineralisationsprozess scheinen sie jedoch nicht direkt beteiligt zu sein [Kröger 2000b]. Kürzlich führten Frigeri *et al.* eine systematische Analyse der SDS-extrahierbaren Zellwandproteine der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* durch, wobei sie 31 Proteine identifizierten, von denen einige an der Zellwandsynthese beteiligt sein könnten [Frigeri 2006].

Daneben existiert jedoch noch eine weitere Fraktion von Biomolekülen, welche sich nicht durch die Behandlung mit EDTA/SDS von den Schalen ablösen lässt. Diese Moleküle sind fest mit dem Silikat der Zellwände verbunden und können nur durch das Auflösen des Silikats mithilfe von Flusssäure (HF) [Kröger 1999] oder Ammoniumfluorid (NH_4F) [Kröger 2002, Swift 1992] zugänglich gemacht werden. Auf diese Weise wurden verschiedene weitere organische Komponenten identifiziert und erforscht: Silaffine, eine Gruppe stark zwitterionischer Proteine [Kröger 1999, Kröger 2001, Kröger 2002, Poulsen 2003, Poulsen 2004, Sumper 2007, Wenzl 2004], Silacidine (stark saure Phosphopeptide) [Wenzl 2008] und langkettige Polyamine [Kröger 2000a, Sumper 2005, Sumper 2006a].

Silaffine sind Polypeptide mit vielen posttranslationalen Modifikationen (Abbildung 2.4 [Kröger 2002]). Die Analyse von Silaffinen aus *Thalassiosira pseudonana* und *Cylindrotheca fusiformis* ergab, dass die Serinreste meist phosphoryliert vorliegen, während die Lysinreste über ihre ϵ -Aminogruppe kovalent an langkettige Polyamine gebunden sind oder in ϵ -*N,N*-Dimethyllysin oder ϵ -*N,N,N*-Trimethyl- δ -hydroxylysin derivatisiert sind. Quaternäre Ammoniumgruppen wurden zum Beispiel auch in *Eucampia zodiacus* und *Coscinodiscus wailesii* identifiziert [Sumper 2006a, Wenzl 2004]. Bereits vor fast 40 Jahren wurden derart außergewöhnlich modifizierte Lysine in Zellwandextrakten

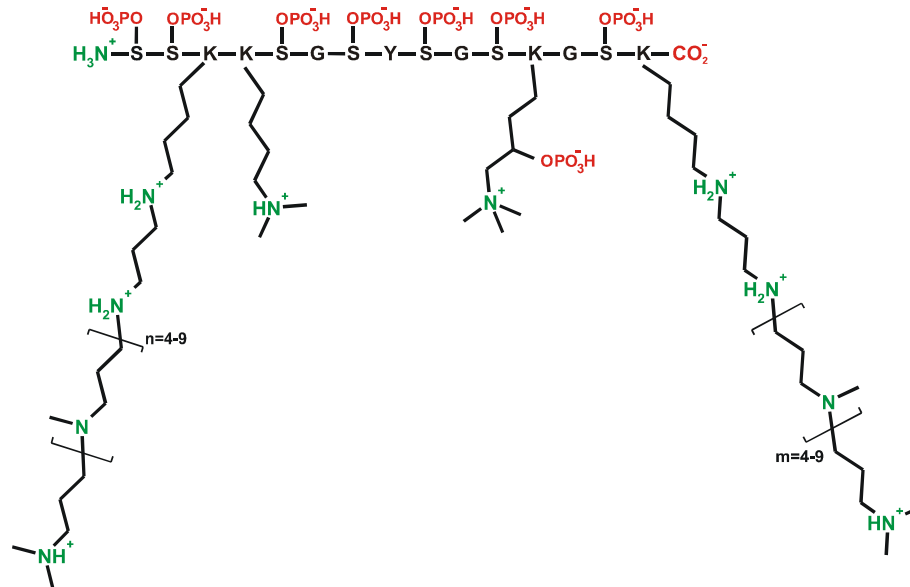


Abb. 2.4: Chemische Struktur von natSil-1A₁, einem Silaffin aus den Zellwänden von *Cylindrotheca fusiformis* [Kröger 2002].

von Diatomeen beschrieben [Nakajima 1970]. Silaffine aus *T. pseudonana* können außerdem sulfatiert und glykosyliert vorliegen [Poulsen 2004].

Kürzlich wurden erstmals die stark sauren Silacidine aus *T. pseudonana* beschrieben [Wenzl 2008]. Diese Peptide bestehen hauptsächlich aus den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat. Mindestens 60 % der ebenfalls zahlreich vorhandenen Serinreste liegen phosphoryliert vor.

Ferner wurden in allen bisher untersuchten Diatomeenarten freie langkettige Polyamine entdeckt [Kröger 2000a, Sumper 2005, Sumper 2006a]. Diese linearen Moleküle bestehen aus bis zu 20 Propylamineinheiten, welche an eine 1,3-Diaminopropan- oder Putrescinbasis gebunden sein können [Sumper 2006b]. Die Polyamingemische, die jede Art synthetisiert, variieren sehr stark. Abgesehen von der Kettenlänge unterscheiden sie sich zum Beispiel auch im Methylierungsgrad oder der Existenz quaternärer Aminogruppen. Abbildung 2.5 fasst die Polyaminstrukturen vierer verschiedener Diatomeenarten zusammen [Sumper 2006a, Sumper 2006b].

Sowohl Silaffine als auch Polyamine sind fest mit dem SiO₂-Gerüst verbunden. Beide spielen im Prozess der Biomineralisation, welcher Gegenstand des nächsten Kapitels ist, eine große Rolle.

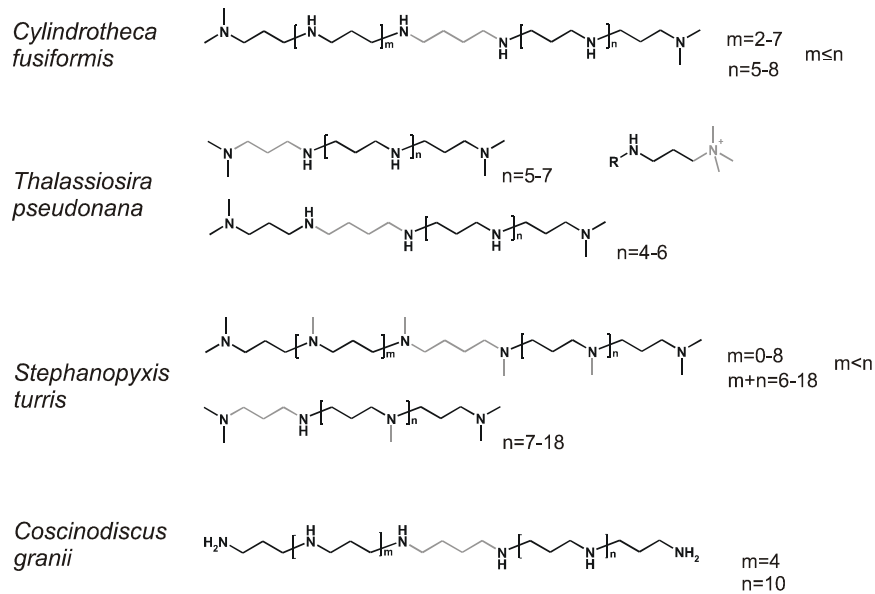


Abb. 2.5: Strukturen langkettiger Polyamine aus vier verschiedenen Diatomeenarten [Sumper 2006a, Sumper 2006b].

2.5 Silikatmetabolismus und der Prozess der Biomineralisation

Das schwach saure Orthokieselsäure-Monomer ($Si(OH)_4$) ($pK_a=9,8$) ist die lösliche Form von Silikat [Iler 1979]. Im Wasser ist es bei neutralem pH nur in sehr niedrigen Konzentrationen (ca. 2 mM) stabil. Sobald die Konzentration die Löslichkeitsgrenze überschreitet, findet eine Autopolykondensationsreaktion statt, das heißt, ionisierte Kieselsäuremoleküle reagieren mit nicht-ionisierten Molekülen, um schließlich ein Polymer zu bilden. Das Produkt besitzt dabei in der Regel eine maximale Anzahl an Siloxanbindungen (Si-O-Si) und eine minimale Anzahl an nicht kondensierten Si(OH)-Gruppen [Iler 1979, Perry 2000]. Je nach pH-Wert und ionischen Bedingungen bilden sich verschiedene Zwischenprodukte, aus denen entweder Silikatsole (d.h. stärker polymerisierte Partikel mit Durchmessern größer als ca. 50 Å) oder -gele (d.h. dreidimensionale Netzwerke aus Silikatpartikeln) entstehen. Die Untereinheiten der Produkte sind in beiden Fällen kugelförmig und tragen bei neutralem pH negative Ladungen auf ihrer Oberfläche [Hildebrand 2003b, Iler 1979].

Trotz der relativ niedrigen Monokieselsäurekonzentration im Meerwasser (1-70 μM [Martin-Jézéquel 2000]) sind Diatomeen in der Lage, diese aufzunehmen und in viel höherer Konzentration im Zellinneren zu speichern. Dieser Transportprozess wird durch die so genannten SIT-Proteine (*silicic acid transporter*) gewährleistet, deren Gene isoliert

und charakterisiert worden sind [Hildebrand 1997, Hildebrand 1998]. Dieser Na^+ -abhängige Transporter besteht aus zehn Transmembranspannen und einer langen intrazellulären, carboxyterminalen Domäne, welche über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen an der Kontrolle der Aktivität des Transporters oder seiner Lokalisierung in der Zelle beteiligt sein könnte [Hildebrand 2003a]. Die Siliziumaufnahme ist eng mit dem Zellzyklus gekoppelt. So existieren während der Mitose verschiedene Silikat-abhängige Kontrollpunkte, wie am G_1/S - oder G_2/M -Phase-Übergang [Brzezinski 1990]. Dagegen ist der intrazelluläre Transport der Kieselsäure bis ins saure SDV, wo die neue Zellwand synthetisiert wird, bislang kaum erforscht [Hildebrand 2004]. Diatomeen sind auch in der Lage, aufgenommene Kieselsäure intrazellulär für die Synthese neuer Valven zu speichern [Martin-Jézéquel 2000, Werner 1966]. Je nach untersuchter Art kann die Größe solcher Speicher löslicher Kieselsäure stark variieren: Während zum Beispiel Stoffmengen von 1,6-7,0 fmol pro Zelle der Art *Stephanopyxis turris* gefunden wurden, ist eine Zelle der Art *Ditylum brightwellii* in der Lage 12,3 pmol Kieselsäure zu speichern, was einem Anteil von 50 % am Gesamtsilikatgehalt entspricht [Chisholm 1978, Martin-Jézéquel 2000]. Bis heute ist nicht sicher bekannt, wie Kieselalgen diese hohen Kieselsäurekonzentrationen jenseits der Sättigungsgrenze stabilisieren. Azam *et al.* [Azam 1974] schlugen vor, dass die Kieselsäure zur Stabilisierung an organisches Material gebunden vorliegt. Schmid und Schulz [Schmid 1979] entdeckten bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen Vesikel im Cytoplasma, die mit dem SDV fusionieren und schlossen daraus, dass die Kieselsäure in diesen Kompartimenten gespeichert und transportiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre die Stabilisierung der Kieselsäure in vorkondensierter Form in einem Polyamin-stabilisierten Silikatsol [Sumper 2004].

Bereits Iler [Iler 1979] beschrieb, dass kationische und wasserstoffbrückenbildende Polymere in der Lage sind, die Silikatpräzipitation aus Monokieselsäure *in vitro* zu induzieren. Insbesondere besitzen Polyamine die Fähigkeit, die Silikatkondensation zu katalysieren. Da hierbei Protonenübergänge notwendig sind, könnten die dabei entstehenden Übergangszustände durch das Zusammenspiel von sich in geeigneten Abständen befindenden Aminogruppen stabilisiert werden. Offensichtlich treten dabei die positiv geladenen Polyamine mit den negativ geladenen Polysilikatmolekülen durch elektrostatische Wechselwirkung in Kontakt. Die organischen Moleküle werden in die resultierenden Silikatpartikel eingeschlossen [Mizutani 1998a, Mizutani 1998b]. Auch Silaffine und Polyamine aus Diatomeen besitzen diese Eigenschaften. Sie sind ebenfalls in der Lage, Siliziumdioxid aus Monokieselsäurelösungen zu präzipitieren, was zur

Entstehung von SiO₂-Netzwerken kugelförmiger Struktur führt, deren Durchmesser je nach Reaktionsbedingungen stark variieren können [Kröger 1999, Kröger 2000a, Kröger 2001, Kröger 2002]. Entscheidend bei dieser Reaktion ist jedoch die Anwesenheit multivalenter Anionen, wie Phosphat. Diese können entweder als anorganisches Phosphat in der Pufferlösung vorliegen, oder, wie im Fall der Silaffine, kovalent an die präzipitierenden Moleküle gebunden sein [Kröger 2000a, Kröger 2002]. Diese Anionen induzieren die elektrostatische Zusammenlagerung der Polyamine zu größeren Aggregaten, welche für die Silikatpräzipitation unentbehrlich sind [Brunner 2004]. Die Phosphatkonzentration bestimmt außerdem die Größe der resultierenden Silikatkügelchen: Je größer die Phosphatkonzentration, desto größer sind die entstehenden SiO₂-Partikel [Sumper 2003]. Interessanterweise besitzen die kürzlich entdeckten, stark negativ geladenen Silacidine ebenso die Fähigkeit die Selbstaggregation von Polyaminen herbeizuführen und die Größe der präzipitierten Silikatkügelchen zu bestimmen, weshalb sie beim Prozess der Silikatpräzipitation durch Polyamine *in vivo* das notwendige Anion darstellen könnten [Wenzl 2008].

Jede Diatomeenart besitzt eine charakteristische Zusammensetzung aus Polyaminen und/oder Silaffinen, die gemeinsam für die Bildung der spezifischen Zellwandmuster verantwortlich sind [Kröger 2000a] (siehe auch Kapitel 2.4).

Kürzlich wurden erstmals auch aus dem marinen Kieselchwamm *Axinyssa aculeata* langkettige Polyamine (LCPA-Aa) isoliert, welche ebenso fähig sind, sich zu Aggregaten zusammenzulagern und Silikat zu präzipitieren [Matsunaga 2007]. Dies deutet darauf hin, dass die Chemie der Silifizierung von Schwämmen der der Kieselalgen ähnlich ist.

Für Modellversuche *in vitro* wird häufig Poly(allylaminhydrochlorid) (PAA), ein synthetisches langkettiges Polyamin, eingesetzt. In Anwesenheit von Phosphat besitzt es ebenfalls die Fähigkeit, die Polykondensation von Kieselsäure zu induzieren [Mizutani 1998a, Mizutani 1998b]. Wie oben für die natürlichen Polyamine beschrieben, bildet auch PAA in Anwesenheit von Phosphat Aggregate. Übersteigt die Phosphatkonzentration einen gewissen Schwellenwert, findet eine mikroskopische Phasentrennung statt (das heißt die Proben trüben sich). Bei noch höheren Phosphatkonzentrationen geht die mikroskopische in eine makroskopische Phasentrennung über. Die SiO₂-Präzipitation aus einer PAA/Kieselsäure-Lösung kann nur stattfinden, wenn eine mikroskopische Phasentrennung vorliegt [Brunner 2004] (siehe auch Kapitel 4.1).

Silaffine und Polyamine induzieren also die Silikatpräzipitation. Aber sind diese auch für die Entstehung der verschiedenen Strukturen und Muster verantwortlich? Sumper [Sumper

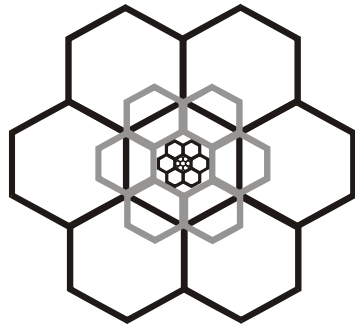


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Zellwandstruktur von *Coscinodiscus granii* (nach [Sumper 2006a]).

2002] entwickelte ein Modell, welches die Strukturbildung der Diatomeenzellwände der Gattung *Coscinodiscus* erklären könnte. Die Silikatstrukturen dieser Kieselalgen setzen sich aus mehreren übereinander liegenden, sechseckigen Strukturen verschiedener Größe zusammen und weisen eine exakte Symmetrie auf. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.6 dargestellt [Sumper 2006a]. Das Modell schlägt vor, dass diese Silikatstrukturen durch aufeinander folgende Phasentrennungsprozesse entstehen. Zunächst lagern sich im flachen SDV Tröpfchen aus amphiphilen Polyaminen dicht in hexagonaler Form aneinander. In den Zwischenräumen der aneinandergrenzenden Tröpfchen findet nun an deren hydrophiler Oberfläche die Silikatpräzipitation statt; dabei entstehen die sechseckigen Areolae der Basisschicht der Valva. Bei diesem Prozess wird Polyamin verbraucht und neue Oberflächen aus polymerisiertem Silikat entstehen, was nun eine Folge von weiteren Phasentrennungsprozessen antreibt: Die großen Polyamintröpfchen brechen in kleinere auf, und durch sukzessive Silikatpolymerisation an den neu entstanden Polyaminoberflächen entstehen immer kleinere sechseckige Strukturen. Bereits Schmid *et al.* [Schmid 1983] leiteten aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ab, dass bei der Zellwandmorphogenese der Diatomeen zunächst die Grobstrukturen (Areolae) und dann die Feinstrukturen gebildet werden. Jedoch erklärt dieses Modell nicht alle Eigenschaften der Zellwandentstehung in *Coscinodiscus*, so könnte auch das SDV durch Formgebung und Bewegungen an der Entstehung von Strukturen höherer Ordnung beteiligt sein [Hildebrand 2003a].

2.6 Zielsetzung

Im Biomineralisationsprozess der Diatomeen ist eine Aneinanderlagerung von Polyaminen notwendig, damit die Präzipitation von Silikat stattfinden kann. Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 4) werden Modellexperimente vorgestellt, die das Verständnis des

Prozesses der Selbstaggregation von Polyaminen weiter vertiefen sollen. Insbesondere wird dabei der Einfluss von Pyrophosphationen auf die Modellsysteme untersucht.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, die in die Diatomeenzellwände fest eingelagerten oder fest mit ihnen assoziierten organischen Moleküle, welche beim Prozess der Biomineralisation von großer Bedeutung sind, in ihrem natürlichen Kontext zu untersuchen (Kapitel 5). Dies sollte mithilfe von ^{13}C - und ^{15}N -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen realisiert werden. In diesem Zusammenhang stellte sich vor allem die Frage, ob eventuell Bindungen oder Wechselwirkungen zwischen dem organischen Material und dem Silikatgerüst vorliegen.

In Anknüpfung an die Arbeit von Gröger *et al.* [Gröger 2008a] wird in Kapitel 6 die Aufnahme von Kieselsäure und ihr Einbau in die Zellwände untersucht. Ziel dieses Versuchs war die Detektion und Charakterisierung von intrazellulär gespeicherter Kieselsäure mithilfe von ^{29}Si -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen an ganzen *Ditylum brightwellii*-Zellen.

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg werden im letzten Abschnitt (Kapitel 7) ^{31}P NMR-spektroskopische Messungen an aufgereinigten Silaffinproben vorgestellt, welche einen Beitrag zur Bestimmung der Phosphorylierung dieser Moleküle liefern soll.

3 Materialien und Methoden

3.1 Relevante NMR-Experimente

Die magnetische Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) gehört heute zu den wichtigsten spektroskopischen Methoden zur Strukturaufklärung von Biomolekülen und zur Untersuchung vieler verschiedener Materialien. Neben der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie gewinnt auch die Festkörper-NMR-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung. Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von Kernen, die ein magnetisches Kernmoment μ besitzen, mit einem äußeren, statischen Magnetfeld B_0 . Kerne sind dann NMR-aktiv, wenn sie eine Spinquantenzahl $I \neq 0$ aufweisen. Die im Gleichgewicht zufällig orientierten magnetischen Momente richten sich in einem solchen Magnetfeld relativ zur Feldrichtung aus, wobei die Energieniveaus der Kerne aufspalten (Zeeman-Effekt). Übergänge zwischen den Energieniveaus können durch das Einstrahlen von Radiofrequenzpulsen induziert und anschließend detektiert werden. Dabei besitzt jeder Kern eines Isotops eine charakteristische Resonanzfrequenz. Zusätzlich erfährt jeder Kern eines Moleküls aufgrund seiner elektronischen Umgebung ein anderes lokales Magnetfeld, was dazu führt, dass jeder Kern eine geringfügig unterschiedliche Resonanzfrequenz aufweist. Im NMR-Experiment spiegelt sich dies in der so genannten chemischen Verschiebung (δ) wider, welche relativ zu einer Referenzprobe in ppm (*parts per million*) angegeben wird [Cavanagh 1996].

Für die vorliegende Arbeit wurden Flüssigkeits- bzw. Festkörper-NMR-Messungen an ^1H -, ^{31}P -, ^{29}Si -, ^{13}C - und ^{15}N -Kernen durchgeführt. Sie besitzen alle einen Spin $I = \frac{1}{2}$. Die natürliche Häufigkeit dieser Kerne sowie ihr gyromagnetisches Verhältnis (γ) sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Vom gyromagnetischen Verhältnis -einer charakteristischen Konstante für jedes Isotop eines Elements- hängt die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns ab [Cavanagh 1996].

Der auffälligste Unterschied zwischen der Flüssigkeits- und Festkörper-NMR-Spektroskopie liegt in den Linienbreiten der Spektren. Während die Signale in Spektren flüssiger Proben sehr schmal sind (typischerweise wenige Hz), erreichen die Halbwertsbreiten der Signale eines Festkörper-NMR-Spektrums meist mehrere kHz. Dieser Unterschied ist auf die schnelle, isotrope Bewegung der Moleküle in Lösung

Kern- Isotop	Natürliche Häufigkeit [%]	Gyromagnetisches Verhältnis γ [$10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
^1H	99,9885	26,7522
^{13}C	1,07	6,7283
^{15}N	0,368	-2,7126
^{29}Si	4,68	-5,3190
^{31}P	100	10,8394

Tab. 3.1: Natürliche Häufigkeit und gyromagnetisches Verhältnis γ verschiedener Kerne (Werte aus [Friebolin 2006]).

zurückzuführen, wodurch räumlich anisotrope magnetische Wechselwirkungen der Kernspins ausgemittelt werden, während diese im Festkörper erhalten bleiben.

3.1.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie: *magic angle spinning*

Die großen Linienbreiten in der Festkörper-NMR-Spektroskopie erschweren bzw. verhindern die Auswertung und Interpretation der statischen Spektren. Eine Verschmälerung der Signale ist deshalb oft unerlässlich. So kann ein hochaufgelöstes Spektrum durch schnelle Probenrotation um eine Achse erreicht werden. Diese Achse muss relativ zum äußeren Magnetfeld B_0 um einen Winkel von $\theta_m \approx 54,7^\circ$ geneigt sein. Diesen Winkel bezeichnet man als den „magischen Winkel“ (*magic angle spinning*, MAS) [Andrew 1958, Lowe 1959]. Dieses Phänomen lässt sich mithilfe einer Betrachtung der Wechselwirkungen innerhalb der untersuchten Probe erklären. Diese können mit dem Hamiltonoperator (\mathcal{H}) beschrieben werden und setzen sich im Festkörper aus der Zeemanwechselwirkung (\mathcal{H}_Z), der homonuklearen (\mathcal{H}_{II} , \mathcal{H}_{SS}) und der heteronuklearen (\mathcal{H}_{IS}) magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung, der chemischen Verschiebung (\mathcal{H}_{CSA}) und der elektrischen Quadrupolwechselwirkung (\mathcal{H}_Q) zusammen:

$$(3.1) \quad \mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{II} + \mathcal{H}_{IS} + \mathcal{H}_{SS} + \mathcal{H}_{CSA} + \mathcal{H}_Q.$$

Zur Vereinfachung wird im Folgenden ein isoliertes 2-Spin-System zweier heteronuklearer Spin-1/2-Kerne I (z.B. ^1H) und S (z.B. ^{13}C) in einem Magnetfeld B_0 betrachtet. Somit können \mathcal{H}_{II} , \mathcal{H}_{SS} und \mathcal{H}_Q vernachlässigt werden. Außerdem genügt die Betrachtung des säkularen Anteils der einzelnen Terme, da nur dieser einen Energiebeitrag liefert. Die Linienbreite wird hauptsächlich durch die heteronukleare magnetische Dipol-Dipol-

Wechselwirkung, \mathcal{H}_{IS} , sowie durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung, \mathcal{H}_{CSA} , bestimmt. \mathcal{H}_{IS} und \mathcal{H}_{CSA} sind abhängig vom Winkel, der vom Kernverbindungsvektor der Spins I und S (\vec{r}_{IS}) und dem Magnetfeld B_0 eingeschlossen wird (θ) (siehe Abbildung 3.1) und von den Winkeln, welche die Hauptachsen der chemischen Verschiebung mit B_0 einschließen (ϑ, φ):

$$(3.2) \quad \mathcal{H}_{IS} = -2\pi D_{IS} \cdot (3/2 \cos^2\theta - 1/2) \cdot I_Z \cdot S_Z$$

$$(3.3) \quad \mathcal{H}_{CSA} = \gamma B_0 I_Z \cdot [\delta_{iso} + 1/3 \Delta\sigma (3 \cos^2\vartheta - 1) + \eta_{CSA} \sin^2\vartheta \cos^2\varphi],$$

wobei:

$$(3.4) \quad D_{IS} = \frac{1}{\pi} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \gamma_I \gamma_S \hbar r_{IS}^{-3}$$

δ_{iso} : Isotrope chemische Verschiebung

$\Delta\sigma$: Anisotropie der chemischen Verschiebung

η_{CSA} : Asymmetrieparameter der chemischen Verschiebung

I_Z, S_Z : z-Komponente des Kernspindrehmoments I bzw. S

μ_0 : Permeabilität des Vakuums

Aus Gleichung (3.2) und (3.4) ist ersichtlich, dass \mathcal{H}_{IS} proportional zum Produkt der gyromagnetischen Verhältnisse $\gamma_I \gamma_S$ ist und umgekehrt proportional zu r_{IS}^3 . Aus diesem Grund nimmt die magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit steigendem Abstand

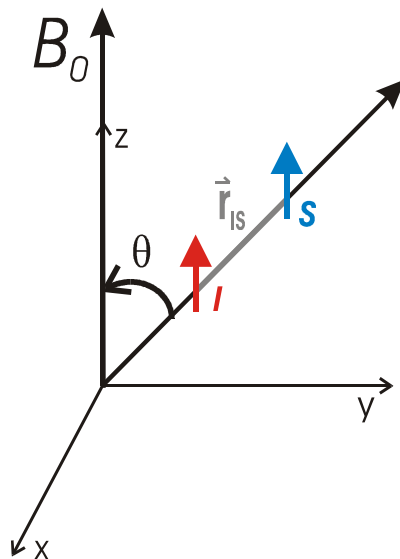


Abb. 3.1: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung des Winkels θ , welcher von B_0 und dem Verbindungsvektor \vec{r}_{IS} zweier Spins I und S eingeschlossen wird.

zwischen zwei Kernen schnell ab. Außerdem ist \mathcal{H}_{IS} abhängig von der Orientierung des Verbindungsvektors der untersuchten Spins relativ zu B_0 . In Lösung wird der Term $(3/2 \cos^2 \theta - 1/2)$ aufgrund der schnellen und isotropen Umorientierung der Moleküle ausgemittelt. Anschaulich lässt sich dies durch Integration über alle möglichen Werte des Winkels θ zeigen. Für ein sich schnell und isotrop bewegendes Spinsystem ist der Mittelwert von \mathcal{H}_{IS} daher proportional zu:

$$(3.5) \quad \int_0^\pi (3/2 \cos^2 \theta - 1/2) \sin \theta \, d\theta = 0.$$

Im Festkörper, in dem keine schnelle Umorientierung der Moleküle stattfindet, kann eine Verringerung des Beitrags der heteronuklearen magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung \mathcal{H}_{IS} ermöglicht werden, wenn die Probe um den „magischen Winkel“ (*magic angle*) $\theta_m = \arccos 3^{-1/2} = 54,7^\circ$ rotiert wird, da dies bewirkt, dass $(3/2 \cos^2 \theta - 1/2)$ zu 0 gemittelt wird. Im zeitlichen Mittel orientieren sich nun alle Spinverbindungsvektoren entlang dieser Achse. Die magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung, ebenso wie die ebenfalls winkelabhängige Anisotropie der chemischen Verschiebung (vergleiche Gleichung (3.2) und (3.3)), werden demzufolge zu Null ausgemittelt [Gerstein 1985, Laws 2002]. Bei niedrigen Probenrotationsfrequenzen erscheinen beim *magic angle spinning* so genannte Rotationsseitenbänder. Diese befinden sich im Abstand von ganzzahligen Vielfachen der Rotationsfrequenz von der Zentrallinie [Duer 2004, Laws 2002].

3.1.2 Festkörper-NMR-Spektroskopie: *cross polarization*

Die Methode der Kreuzpolarisation (*cross polarization*, CP) ist eine der am häufigsten angewandten Techniken in der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Im Allgemeinen kann die Untersuchung von Kernen mit geringer Häufigkeit (wie ^{13}C , ^{29}Si oder ^{15}N) einige Probleme bereiten. Neben einem geringen Signal/Rausch-Verhältnis sind häufig auch die Relaxationszeiten (T_1) dieser Kerne sehr lang, da kaum homonukleare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auftreten, welche die Relaxation beschleunigen könnten. Aufgrund dessen sind zwischen den Einzelerperimenten (*scans*) einer Messung lange Pausen notwendig (häufig länger als eine Minute), die zur Folge haben, dass die Messzeiten für ein Spektrum mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis sehr lang werden können. Mithilfe des CP-Experimentes lässt sich dieses Problem lösen [Duer 2004]. Dieses basiert auf der starken

heteronuklearen Dipol-Dipol-Kopplung zwischen seltenen (S , z.B. ^{13}C) und häufigen Spins (I , z.B. ^1H) im Festkörper, wobei ein Polarisationstransfer von einem Spinsystem zum anderen stattfinden kann [Pines 1973]. Thermodynamisch lässt sich dieses Phänomen durch Betrachten der Spintemperatur erklären [Gerstein 1985]: Die Spinreservoirs der I - und S -Spinsysteme weisen jeweils eine bestimmte Spintemperatur (β_I und β_S) auf und können miteinander in Kontakt treten. Die inverse Spintemperatur ist dabei wie folgt definiert:

$$(3.6) \quad \beta = \frac{\hbar}{k_B T}$$

Außerdem stehen die Spinreservoirs in Kontakt mit dem sogenannten Gitter (*lattice*), einem unendlichen Reservoir der Temperatur β_L . Dies ist in Abbildung 3.2 dargestellt (nach [Gerstein 1985]). T_{IS} und T_{II} bezeichnen die Spin-Gitter-Relaxationsraten und T_{IS} die Polarisationstransferrate zwischen dem I - und S -Reservoir. Aufgrund der bestehenden

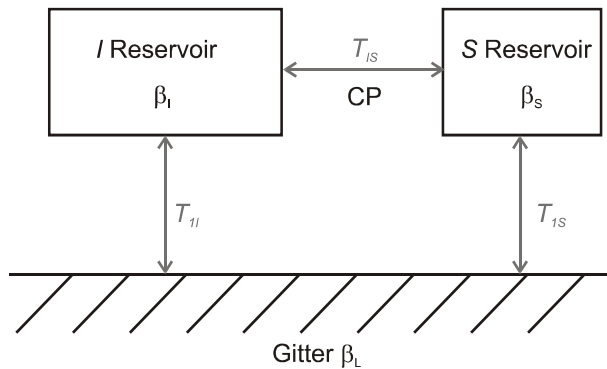


Abb. 3.2: Schematische Darstellung zu Veranschaulichung der bestehenden Transfurmöglichkeiten zwischen den Spinreservoirs I und S und dem Gitter durch *cross polarization* oder Spin-Gitter-Relaxation (nach [Gerstein 1985]).

Kopplung ist bei einer Reduktion der I -Spintemperatur ein Ausgleich möglich, in dem Polarisierung vom I - auf das S -Reservoir fließt. Experimentell kann dies durch eine Pulssequenz erreicht werden, wie sie in Abbildung 3.3 dargestellt ist: Zunächst wird ein 90° -Impuls auf die I -Spins (z.B. ^1H) einer Probe eingestrahlt. Durch das sogenannte *spin locking* werden die Spins in der xy -Ebene fixiert und die Temperatur des I -Reservoirs verringert. Das gleichzeitige Einstrahlen eines starken Radiofrequenzimpulses auf die S -Spins (z.B. ^{13}C) ermöglicht einen Polarisationstransfer von den I - auf die S -Spins während der Kontaktzeit (τ_{CP}), wenn die Präzessionsfrequenzen der beiden Spins gleich sind. Dies wird durch die sogenannte Hartmann-Hahn-Bedingung gewährleistet [Hartmann 1962]:

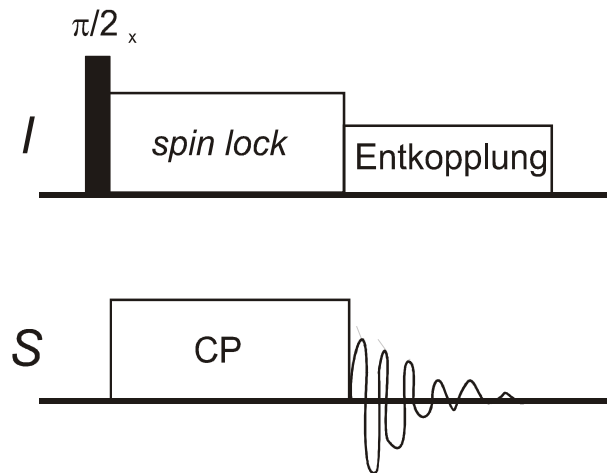


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des CP-Experiments.

$$(3.7) \quad \gamma_I \cdot B_{II} = \gamma_S \cdot B_{IS}.$$

γ bezeichnet das gyromagnetische Verhältnis und B_I das *spin lock*-Feld der Spins I bzw. S . Schließlich können die S -Spins durch Aufnahme des FIDs (*free induction decay*) mit gleichzeitiger Entkopplung der I -Spins detektiert werden [Gerstein 1985, Laws 2002].

Dieses Experiment bietet neben der verbesserten Detektion seltener Kerne viele weitere Vorteile. Da die kürzere Relaxationszeit T_I der I -Spins (^1H) zum Tragen kommt, kann die Messzeit erheblich verkürzt werden. Außerdem kann die Analyse des CP-Verhaltens Aufschluss über die chemische Umgebung und den Bewegungszustand der untersuchten Kerne liefern.

3.1.3 Festkörper-NMR: Das HETCOR-Experiment

Zweidimensionale, heteronukleare Korrelationsexperimente (*heteronuclear correlation*, HETCOR) erlauben die Korrelation von räumlich benachbarten Kernen (z.B. ^{13}C und ^1H) in einem Experiment. Im Gegensatz zur Flüssigkeits-NMR beruht diese Methode im Festkörper nicht auf der J-Kopplung, sondern auf der dipolaren Wechselwirkung zwischen den Kernen. Eine typische Pulssequenz für ein solches Experiment ist in Abbildung 3.4 dargestellt [Laws 2002]. Nach einem 90° -Impuls auf die I -Spins (z.B. ^1H) entwickelt sich das System während einer variablen Zeit t_1 . Daran schließt sich eine konstante CP-Mischzeit an, in welcher Magnetisierung von den I -Kernen auf die S -Kerne (z.B. ^{13}C) übertragen und schließlich während einer Zeit t_2 detektiert werden kann. Zur Unterdrückung von homo- bzw. heteronuklearen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen werden

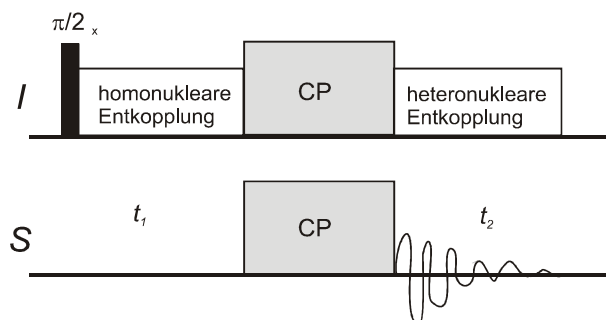


Abb. 3.4: Darstellung des Prinzips eines HETCOR-Experiments in der Festkörper-NMR.

während t_1 und t_2 spezielle Entkopplungssequenzen angewandt. In den ^1H - ^{13}C HETCOR-Experimenten dieser Arbeit erfolgte die Entkopplung während t_2 mithilfe einer TPPM-Sequenz (*two-pulse phase-modulation*) [Bennett 1995] und während t_1 mithilfe einer PMLG-Sequenz (*phase-modulated Lee-Goldburg*) [Lee 1965, Vinogradov 1999].

3.1.4 Spektrenaufnahme: Experimentelle Bedingungen

Die Flüssigkeits-NMR-Spektren wurden an einem Avance 500-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Die Resonanzfrequenzen betrugen 500,1 MHz für ^1H , 202,5 MHz für ^{31}P und 99,4 MHz für ^{29}Si . Die ^1H NMR-Spektren wurden intern auf DSS geeicht. Im Falle der Messungen der Polyamine aus Diatomeen (siehe Abschnitt 4.4) wurde auf eine Referenzierung verzichtet, um eine Zugabe von DSS zu den Proben zu vermeiden. Die ^{31}P und ^{29}Si NMR-Spektren wurden extern auf Phosphorsäure (85 %) bzw. Tetramethylsilan (TMS) geeicht. Allen Proben wurde mindestens 5 % D_2O zugesetzt, um das Feld/Frequenz-Verhältnis des Spektrometers während der Messung durch ein so genanntes Locksignal konstant zu halten. Die Proben (je ca. 500 μl Probenvolumen) befanden sich für die ^1H und ^{31}P NMR-Messungen in 5 mm-Glasröhrchen; für die ^{29}Si NMR-Messungen wurden 10 mm-Glasröhrchen benutzt, um ein größeres Volumen (ca. 2 ml) vermessen zu können.

Die Festkörper-NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance 300-Spektrometer durchgeführt. Die Resonanzfrequenzen betrugen 300,1 MHz für ^1H , 75,5 MHz für ^{13}C , 30,4 MHz für ^{15}N und 59,6 MHz für ^{29}Si . Die Referenzierung der ^{13}C NMR-Spektren erfolgte extern auf TMS, indem das Methylen-Signal von Adamantan auf 38,48 ppm gesetzt wurde [Morcombe 2003]. Die ^{15}N NMR-Spektren wurden mithilfe von $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ extern auf Nitromethan geeicht [Hayashi 1991]. Zur externen Referenzierung der ^{29}Si NMR-Spektren auf TMS wurde das stärkere Signal von Octavinylsiloxan ($\text{C}_2\text{H}_3\text{SiO}_{1,5}$)₈ auf -79,9 ppm gesetzt [Bonhomme 1997]. Für

die ^{13}C und ^{15}N NMR-Messungen wurde ein 4 mm-Rotor, für die ^{29}Si NMR-Messungen ein 7 mm-Rotor aus Zirkonoxid benutzt. Weitere Messbedingungen wie Temperatur (T), MAS-Rotationsfrequenz (ν_r) und Zahl der aufgenommenen *scans* sind im Text bei den jeweiligen Experimenten angeführt. Die NMR-Spektren wurden mithilfe der Software Topspin Version 2.0 prozessiert. Die weitere Auswertung erfolgte mit Origin Version 6.0.

3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) erlaubt die Bestimmung von Teilchengrößen. Diese Technik macht sich die Brown'sche Molekularbewegung zunutze. Richtet man einen linear polarisierten Laserstrahl auf eine flüssige Probe, so wird dieser an den Teilchen in der Probe gestreut. Dieses Streulicht kann mittels eines Detektors, der sich in einem bestimmten Streuwinkel θ befindet, erfasst werden. Abbildung 3.5 veranschaulicht dieses Prinzip. Die Intensität der Streuung wird über einen bestimmten

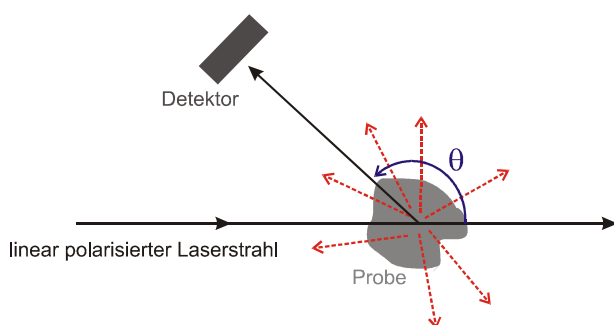


Abb. 3.5: Schematische Zeichnung zur Veranschaulichung des Prinzips der dynamischen Lichtstreuung. Der Streuwinkel θ ist in blau eingezeichnet.

Zeitraum beobachtet. Sie ändert sich durch die Bewegung und Umorientierung der Makromoleküle in der Probe. Je größer die Teilchen, desto langsamer ist ihre diffusive Bewegung. Durch Zeitmittelung erhält man daraus die sogenannte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ mit der Korrelationszeit τ_c [Berne 2000]:

$$(3.8) \quad G(\tau) = G(0) \cdot e^{-\tau/\tau_c}$$

Unter der Annahme, dass es sich um kugelförmige Teilchen handelt, kann mithilfe der aus der Korrelationsfunktion abgelesenen Korrelationszeit τ_c (τ bei $G(0)/e$) und der Gleichung von Stokes und Einstein der Partikelradius (r_h) berechnet werden:

$$(3.9) \quad r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

In dieser Gleichung bezeichnet k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, η die Viskosität der Probe und D den Diffusionskoeffizienten, welcher durch

$$(3.10) \quad D = \frac{1}{q^2 \tau_c}$$

gegeben ist. Der Streuvektor q ist dabei wie folgt definiert:

$$(3.11) \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2},$$

wobei n den Brechungsindex der Probe angibt, λ die Wellenlänge des Lasers und θ den Streuwinkel, der sich zwischen dem einfallenden Laserlicht und dem Detektor befindet.

Die Lichtstreuungsmessungen dieser Arbeit erfolgten an einem HPPS5001-Nanosizer-Gerät der Firma Malvern am Lehrstuhl Biochemie I.

3.3 Kultivierung der Kieselalgen und Probenpräparation

3.3.1 Präparation der Zellwandproben verschiedener Diatomeen

Zur Präparation isotopenmarkierter Zellwandproben wurden Kieselalgenkulturen von *Stephanopyxis turris*, *Coscinodiscus granii* und *Thalassiosira pseudonana* jeweils in 20 l sterilem, künstlichem Meerwassermedium kultiviert. Das Meerwassermedium wurde wie von der „North East Pacific Culture Collection“ vorgeschlagen hergestellt [Harrison 1980]. Hierfür war zunächst die Präparation von mehreren Stocklösungen notwendig. Die Zusammensetzung dieser Lösungen ist in Tabelle 3.2 aufgelistet. Für die Herstellung von 1 l Meerwasser sind von Lösung I und II je 100 ml notwendig, von Lösung 1, 2, 4, 5, 6 und 7 je 1 ml. Von Lösung 3 werden 2 ml benötigt. Zusätzlich ist die Zugabe von 20 µl Thiamin (10 g/l), 1 µl Vitamin B₁₂ (4 g/l) und 1 µl Biotin (2 g/l) nötig. Der pH-Wert des Mediums sollte sich am Ende zwischen 8,0 und 8,2 befinden. Nach Sterilfiltration kann das Medium zur Kultivierung der Kieselalgen eingesetzt werden.

	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration in der Stocklösung</i>
Lösung I:	NaCl	3,627 M
	Na ₂ SO ₄	0,25 M
	KCl	80,3 mM
	NaHCO ₃	20,67 mM
	KBr	7,25 mM
	H ₃ BO ₃	3,72 mM
	NaF	0,657 mM
Lösung II:	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4718 M
	CaCl ₂	91,34 mM
	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,82 mM
Lösung 1:	NaNO ₃	549,1 µM
Lösung 2:	Na ₂ -Glycerophosphat	21,8 µM
Lösung 3:	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	105,6 µM
Lösung 4:	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	9,81 µM
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	6,562 µM
Lösung 5: (pH=6 mit Na ₂ CO ₃ einstellen)	MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,42 µM
	ZnCl ₂	0,254 µM
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,0569 µM
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,520 µM
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5,05 µM
Lösung 6:	Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	0,001 µM
Lösung 7:	CuCl ₂	1 mM

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Stocklösungen für die Herstellung von künstlichem Meerwasser [Harrison 1980].

Für die ¹³C- und ¹⁵N-Isotopenanreicherung der Diatomeenzellwände wurde dem Medium NaH¹³CO₃ (99 %) bzw. Na¹⁵NO₃ (98 %) zugesetzt.

Während des Wachstums der Kieselalgen wurde das Medium in den 20 l-Behältern belüftet und mithilfe eines Magnetrührers gerührt. Für die ¹³C-Anreicherung wurden die Behälter dicht verschlossen und auf eine Belüftung verzichtet, um den Austausch zwischen ¹³CO₂ mit ¹²CO₂ aus der umgebenden Atmosphäre zu vermeiden. Der pH-Wert lag zwischen 8,0 und 8,8, die Temperatur betrug 20 °C. Die Kulturen waren außerdem einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit ausgesetzt. Während der Wachstumsphase wurden zur Kontrolle in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, um den pH-Wert, die Zelldichte und die verbleibende Kieselsäurekonzentration im Medium zu bestimmen. Die Kieselsäurekonzentration wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen, photometrischen Molybdat-Silikattests der Firma Merck bestimmt.

Zur Ernte wurden die Kulturen mithilfe eines Siebs von 40 µm Porengröße (*C. granii*, *S. turris*) abfiltriert, bzw. 15 min bei 15900 g abzentrifugiert (*T. pseudonana*).

Die Zellwandpräparation erfolgte wie folgt: Die dicht gepackten Algen wurden in 100 ml Lysepuffer (0,1 M EDTA, 2 % SDS, pH=8,0) aufgenommen und 5 min bei 95 °C im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen der Proben im Eisbad wurden die Zellwände bei 3500 rpm abzentrifugiert. Der grüne Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat erneut in 100 ml Lysepuffer aufgenommen, um obigen Arbeitsschritt zu wiederholen. Anschließend wurden die Zellwände fünfmal mit 45 ml Wasser gewaschen und wie vorher durch Zentrifugation abgetrennt. Schließlich wurden die Zellwände, wenn nicht anders im Text erwähnt, über Nacht gefriergetrocknet, um sie NMR-spektroskopisch vermessen zu können.

3.3.2 Präparation von ganzen Diatomeenzellen für die ^{29}Si Festkörper-NMR-Spektroskopie

Für die ^{29}Si Festkörper-NMR-Experimente an ganzen Zellen wurde eine 20 l-Kultur der Kieselalge *Ditylum brightwellii* wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben, gezüchtet.

Zur ^{28}Si - oder ^{29}Si -Anreicherung wurde $\text{Na}_2^{28/29}\text{SiO}_3$ hergestellt, indem Na_2CO_3 mit isotonenangereichertem SiO_2 (98,5 %) in einem molaren Verhältnis von 1:1 in einem Platintiegel eine Stunde lang bei 1150 °C eingeschmolzen wurde [Brauer 1975]. Vor dem Zusetzen zum Meerwassermedium wurde das $\text{Na}_2^{28/29}\text{SiO}_3$ in einem Mörser zerrieben.

Die Synchronisation der Kultur erfolgte mit einigen angepassten Änderungen in Anlehnung an vorausgehende Arbeiten [Darley 1971, Frigeri 2006, Gröger 2008a]. Das Meerwassermedium enthielt zu Beginn des Experiments nur das Siliziumisotop ^{28}Si . Bei einer Zelldichte von ca. 4000 Zellen/ml wurde die Kultur mithilfe eines Siebs (Porengröße 11 µm) abfiltriert und zügig in frisches, Si-freies Medium umgesetzt. Nach einer Aushungerungsphase von 12 Stunden wurde frisches ^{29}Si in Form von $\text{Na}_2^{29}\text{SiO}_3$ zugegeben. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Probennahme von je 2 l durch Filtration. Die Zellen wurden mehrfach mit Si-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurden sie mithilfe selbst gemachter Zentrifugenröhrcheneinsätze 2 min lang bei 2000 rpm in verschließbare Rotoreinsätze zentrifugiert [Gröger 2008d]. Die Proben wurden schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren, dicht verschlossen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Während des Wachstums der Algen und während der Probennahme wurden zusätzlich kleine Proben zur Kontrolle des pH-Werts, der Kieselsäurekonzentration (siehe oben) und

der Zelldichte im Medium genommen. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mithilfe einer Zählkammer nach Sedgewick-Rafter.

Weitere experimentelle Details sind an den jeweiligen Stellen im Text angegeben.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Synthese neuer Zellwände besser verfolgen zu können, wurde das Wachstum und die Zellteilung der Algen mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen verfolgt. Hierfür wurde einer 13 ml-Kultur von *D. brightwellii* zum Zeitpunkt der Kieselsäurezugabe nach der Aushungerungsphase zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff „LysoTracker Yellow-HCK-123“ (Invitrogen) zugegeben, welcher sich ins SDV und in entstehende Silikatstrukturen einlagert [Desclés 2008]. Die Endkonzentration des Farbstoffs im Meerwassermedium betrug 1 μ M. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden kleine Proben entnommen und direkt unter einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) untersucht. Die Anregungswellenlänge des Argonlasers betrug 488 nm. Die grün dargestellte Fluoreszenz des Farbstoffs wurde mithilfe eines Emissionsfilters im Bereich von 505 bis 545 nm detektiert. Für die Detektion der Autofluoreszenz der Chloroplasten (auf den Photographien in rot dargestellt) wurde ein Emissionsfilter des Wellenlängenbereichs 660-800 nm genutzt. Außerdem wurde eine 20x Objektlinse (Plan-Neofluar 20x/0,5) eingesetzt.

3.5 Chemikalien und weitere verwendete Materialien

Die pH-Messungen wurden an einem pH-Meter der Firma Beckman Instruments vorgenommen. Zur Zentrifugation der Diatomeenproben wurde eine Zentrifuge der Firma Hettich (Universal 320R) verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Polyamin- und Silaffinproben von *S. turris* bzw. *T. pseudonana* wurden am Lehrstuhl für Biochemie I (Prof. Dr. M. Sumper) der Universität Regensburg präpariert.

Die verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Hinsichtlich der Präparation aller weiteren, in diesem Abschnitt nicht genannten Proben sei auf die jeweiligen Kapitel dieser Arbeit verwiesen.

Adamantan	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
Ammoniumsulfat- ¹⁵ N ₂ (95 %)	Chemotrade, Leipzig
Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-sulfat-heptahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deuteriumoxid 99,9 % (D ₂ O)	Deutero GmbH, Kastellaun
D-Glucose-6-Phosphat (Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumdihydrogenpyrophosphat	Fluka, Buchs, Schweiz
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kupfer(II)-chlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat- ¹³ C (99 %)	Chemotrade, Leipzig
Natriummetasilikat-nonahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriummolybdat-dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumnitrat- ¹⁵ N (98 %)	Chemotrade, Leipzig
Natriumselenit-pentahydrat	Fluka, Buchs, Schweiz
o-Phospho-L-Serin	Sigma-Aldrich, Steinheim
o-Phospho-L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
o-Phospho-L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphat-Eichpuffer, pH 7	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Phthalat-Eichpuffer, pH 4	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Poly(allylaminhydrochlorid) (PAA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PSS-Octavinyl substituiert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Siliziumdioxid- ²⁸ Si (98,5 %)	euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
Siliziumdioxid- ²⁹ Si (98,5 %)	euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
Tetramethylsilan	Fluka, Buchs, Schweiz
Vitamin B ₁ -Hydrochlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Vitamin B ₁₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 3.3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.

4 Modelluntersuchungen zur Aggregatbildung von Polyaminen

4.1 Stand der Forschung

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, besitzen aus Diatomeen isolierte Polyamine die Fähigkeit in Anwesenheit von Phosphationen Aggregate zu bilden und die Präzipitation von Silikat zu induzieren. Um ein besseres Verständnis dieser Vorgänge zu erhalten, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl ausführlicher Experimente an Modellsystemen durchgeführt. Beliebte Modellpolyamine sind zum Beispiel Poly(ethylenimin) [Bauer 2007, Yuan 2005, Yuan 2006], Poly(propylenimin) [Menzel 2003], so genannte Dendrimere [Knecht 2004, Knecht 2005] oder Poly(allylamin) [Brunner 2004, Lutz 2005b, Mizutani 1998a, Mizutani 1998b, Patwardhan 2002a, Patwardhan 2002b, Patwardhan 2003, Sumper 2004]. Poly(allylamin) (PAA) ($M=15$ kDa) ist ein langkettiges, synthetisches Polyamin mit folgender Struktur: $[-CH_2CH(CH_2NH_2 \cdot HCl)-]_{n=160}$. Dieses Polyamin eignet sich ausgezeichnet als Modellsubstanz, da es kommerziell in großen Mengen verfügbar ist und ebenfalls in Anwesenheit von Phosphat aggregiert und SiO_2 aus Monokieselsäurelösungen präzipitiert (vergleiche Abschnitt 2.5). So wurde zum Beispiel der Einfluss der Orthophosphatkonzentration auf PAA-Lösungen bei konstantem pH-Wert mithilfe der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und der NMR-Spektroskopie untersucht [Brunner 2004]. Abbildung 4.1 zeigt die mithilfe von DLS bestimmten Durchmesser der

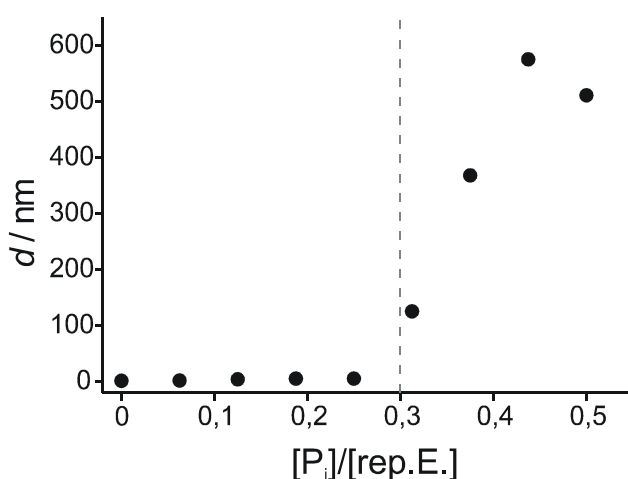


Abb. 4.1: Durchmesser der PAA-Aggregate in Abhängigkeit von der Zahl der Phosphationen pro repetitiver Einheit (rep.E.) von PAA (1 mM, pH=5,8). Die Linie bei 0,3 $[P_i]/[rep.E.]$ markiert die Phosphatkonzentration, bei der die Silikatpräzipitation einsetzt.

Poly(allylamin)-Aggregate und ihre Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration. Diese wird hier und im Folgenden als die Anzahl der Phosphationen, welche je repetitiver Einheit des PAA-Moleküls vorliegen ($[P_i]/[\text{rep.E.}]$), angegeben. Die Polyaminaggregate sind bei niedrigen Phosphatkonzentrationen zunächst relativ klein (ca. 5 nm), um dann –von einem Schwellenwert von 0,3 $[P_i]/[\text{rep.E.}]$ an– mit steigender Phosphatkonzentration zu wachsen, bis sie Durchmesser von fast 600 nm erreichen. Diesen Prozess kann man auch mit bloßem Auge verfolgen. Die klaren Proben werden von dem oben genannten Schwellenwert an trüb, es setzt eine mikroskopische Phasentrennung ein. Überschreitet die Phosphatkonzentration einen Wert von ca. 0,6 $[P_i]/[\text{rep.E.}]$, werden die Partikel so groß, dass sie zu Boden sinken und dort eine separate Phase bilden (makroskopische Phasentrennung), weshalb sie hier im DLS-Experiment nicht mehr detektiert werden konnten. Diese Ergebnisse konnten mithilfe von ^{31}P NMR Experimenten bestätigt werden (siehe auch Abbildung 4.5 in Abschnitt 4.3). Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit dem Silikatpräzipitationsverhalten derselben Lösungen ergab sich, dass die PAA/Phosphat-Lösungen genau im Konzentrationsbereich der mikroskopischen Phasentrennung in der Lage sind, Silikatkügelchen zu präzipitieren [Brunner 2004].

Die Phosphatkonzentration ist jedoch nicht der einzige Parameter, welcher in dem hier untersuchten Modellsystem die Größe der PAA-Aggregate bestimmt. Diese wird insbesondere auch vom pH-Wert der Lösungen beeinflusst. Die Abhängigkeit der Partikelgröße vom pH-Wert, welche ebenfalls mithilfe von DLS-Messungen bestimmt wurde, ist in Abbildung 4.2 für vier verschiedene Phosphatkonzentrationen dargestellt [Lutz 2005b]. Bei niedrigen pH-Werten sind die Proben klar und weisen keine Aggregate auf. Mit steigendem pH wächst die Größe der PAA-Partikel kontinuierlich und die

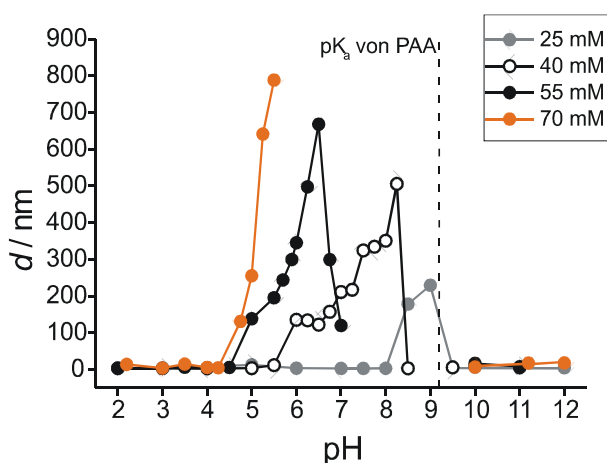


Abb. 4.2: Vergleich der Durchmesser der PAA-Aggregate in Abhängigkeit vom pH-Wert bei vier verschiedenen Phosphatkonzentrationen (jeweils 1 mM PAA).

Lösungen trüben sich. Dabei bestimmt die Phosphatkonzentration das Einsetzen der mikroskopischen Phasentrennung. Auf molekularer Ebene lässt sich das wie folgt erklären: Der steigende pH-Wert bewirkt, dass die positive Ladung der PAA-Moleküle abnimmt. Dies führt dazu, dass die abstoßenden Kräfte zwischen ihnen immer geringer werden. Gleichzeitig nimmt die negative Ladung der Phosphationen zu, weshalb die Quervernetzung der langkettigen Polyamine immer effektiver wird. Sobald der pH-Wert den pK_a -Wert des PAA überschreitet (ca. 9), werden die Polyaminmoleküle neutral, was zur Folge hat, dass keine elektrostatischen Wechselwirkungen zu den Phosphationen mehr stattfinden können. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PAA-Aggregation auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu den negativ geladenen Phosphationen beruht, welche die Polyaminketten quervernetzen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die Phosphationen auch durch andere Ionen ersetzt werden können. Hierzu wurden ebenfalls DLS-Experimente durchgeführt [Brunner 2004]. Diese ergaben, dass monovalente Anionen, wie Chlorid, nicht in der Lage sind, die Bildung größerer Polyaminaggregate herbeizuführen. Multivalente Anionen wie Phosphat, Pyrophosphat oder Sulfat [Brunner 2004] können dagegen sehr wohl die Aggregatbildung von PAA induzieren, obwohl sie, je nach pH-Wert, auch nur eine negative Ladung aufweisen können. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Ladung der Anionen, sondern auch ihre Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Quervernetzungen zwischen den PAA-Molekülen –und somit ihrer Aneinanderlagerung zu größeren Aggregaten– spielt. Um diese Annahme bestätigen zu können, wurden Methylphosphonat (MeP) und Phosphit, zwei weitere multivalente Anionen untersucht [Lutz 2005b]. Da ihre pK_a -Werte nahe denen des Phosphats liegen (Phosphat: 2,1/7,1/12,3, MeP: 2,3/7,9, Phosphit: 1,3/6,7 [Van Wazer 1973]) und ihre Größe ebenfalls mit der des Phosphats vergleichbar ist, lässt sich erwarten, dass sie sich auch ähnlich wie Phosphat verhalten und die Aggregation von PAA induzieren können. Abbildung 4.3 zeigt jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die ioneninduzierte Aggregatbildung von Poly(allylamin) ein sehr komplexer Vorgang ist, zu dessen Erklärung die Fähigkeit zur Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen der Ionen zu PAA nicht ausreichend ist. Die Struktur von Phosphit und Methylphosphonat unterscheidet sich hinsichtlich der Tatsache, dass jeweils eines der vier Sauerstoffatome von Orthophosphat durch entweder ein Proton oder eine Methylgruppe ersetzt ist. Dadurch ist offensichtlich

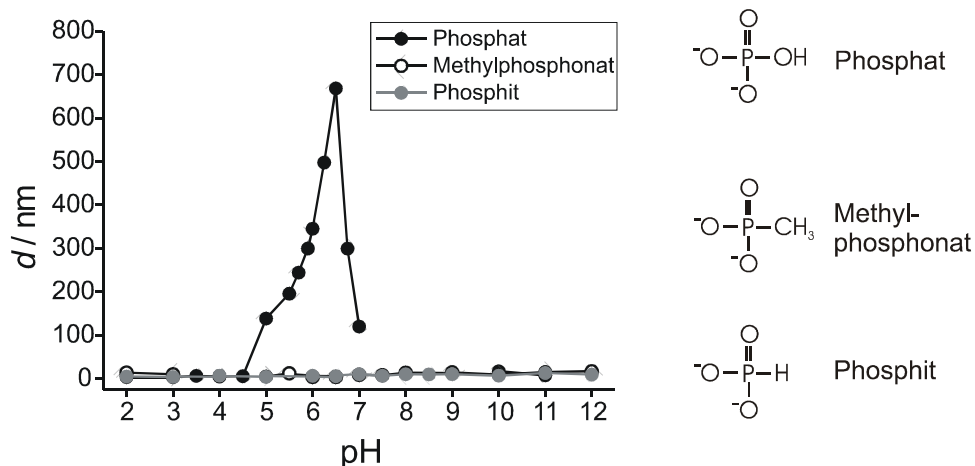


Abb. 4.3: Durchmesser der PAA-Aggregate in Abhängigkeit vom pH-Wert in Gegenwart von Phosphat, Methylphosphonat und Phosphit (jeweils 1 mM PAA, 55 mM Anion). Zum Vergleich sind die Strukturen der verschiedenen Anionen ebenfalls dargestellt.

die Ausbildung eines komplexen Netzwerkes zwischen weiteren Anionen und PAA-Molekülen gestört.

Um die beschriebenen Ergebnisse und das Verständnis des Aggregationsvorgangs noch zu vervollständigen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit einige ergänzende Versuche durchgeführt, welche im Folgenden beschrieben werden.

4.2 Zeitabhängige Stabilität von PAA-Aggregaten

Im thermodynamischen Gleichgewicht sollten Partikel, die durch Selbstaggregation entstanden sind, über einen längeren Zeitraum stabil sein [Philip 1996]. Um dies für das hier untersuchte System zu überprüfen, wurden verschiedene Proben mit je 1 mM PAA und 50 mM Phosphat bei unterschiedlichen pH-Werten hergestellt. Diese Probenreihe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels dynamischer Lichtstreuung vermessen. In Abbildung 4.4 sind die ermittelten Aggregatdurchmesser in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Die Messungen wurden eine Stunde, sechs Stunden, bzw. sechs Tage nach der Probenpräparation durchgeführt. Diese Experimente machen deutlich, dass die Durchmesser der Poly(allylamin)aggregate über mehrere Tage fast konstant bleiben. Aus diesem Grund kann die phosphatinduzierte Aggregatbildung von PAA eindeutig als Selbstaggregationsprozess bezeichnet werden [Gröger 2008b].

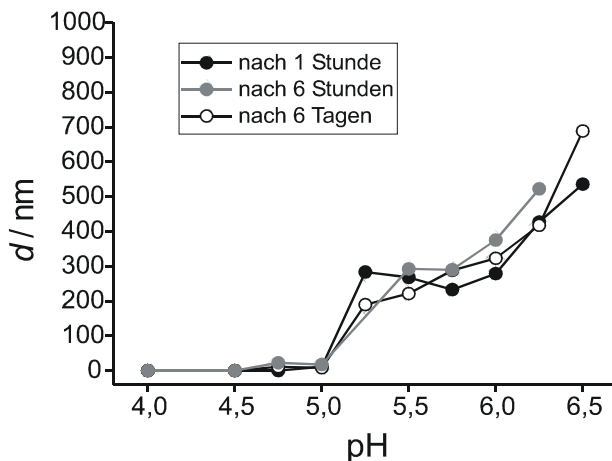


Abb. 4.4: Mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmter Durchmesser (d) der Poly(allylamin)-aggregate in Abhängigkeit vom pH-Wert (jeweils 1 mM PAA, 50 mM Orthophosphat). Die Messungen wurden eine Stunde (schwarz), sechs Stunden (grau), bzw. sechs Tage (weiß) nach Probenpräparation durchgeführt.

4.3 Einfluss von Pyrophosphat auf die Aggregatbildung von PAA

An aus *Stephanopyxis turris* isolierten Polyaminen wurde gezeigt, dass Pyrophosphationen ebenfalls deren Aggregation und die Präzipitation von Silikat induzieren können [Sumper 2003]. Dabei sind wesentlich kleinere Ionenkonzentrationen nötig, um einen großen Effekt zu erzielen. Die hierbei entstehenden Silikatpräzipitate erreichen Durchmesser von bis zu 1000 nm, während in Anwesenheit von Orthophosphat Silikatkügelchen von maximal 700 nm beobachtet wurden.

Diese Ergebnisse waren der Anlass für eine genauere Untersuchung des Einflusses von Pyrophosphationen (PP_i) auf das verwendete PAA-Modellsystem. Hierfür wurde eine Messreihe vorbereitet, deren Proben jeweils 1 mM PAA und schrittweise steigende Konzentrationen von PP_i (0-100 mM) enthielten. Bei allen Proben wurde ein pH-Wert von 5,8 eingestellt. Diese Proben wurden dann mithilfe von ^{31}P NMR-spektroskopischen Experimenten untersucht. Zum Vergleich wurde außerdem eine entsprechende Probenreihe mit Orthophosphat vermessen (vergleiche [Brunner 2004]).

Bei niedrigen PP_i -Konzentrationen sind die Proben klar. Erreicht man jedoch eine Konzentration von 0,14 [PP_i]/[rep.E.] werden die Proben milchig trüb, es findet eine mikroskopische Phasentrennung statt. Oberhalb von 0,30 [PP_i]/[rep.E.] ist schließlich eine makroskopische Phasentrennung zu beobachten, da die PAA-Aggregate so groß sind, dass sie in den Teströhrchen zu Boden sinken und dort eine nicht mehr mischbare separate Phase bilden. Diese Beobachtungen entsprechen exakt jenen, die für Gemische aus PAA und Phosphat gemacht worden sind (siehe Abschnitt 4.1, [Brunner 2004]), lediglich die jeweiligen Schwellenkonzentrationen sind unterschiedlich.

³¹P NMR-Spektroskopie

Interessante Ergebnisse liefern auch die ³¹P NMR-spektroskopischen Messungen. Die ³¹P NMR-Signale wurden jeweils hinsichtlich ihrer chemischen Verschiebung (δ), ihrer Intensität (Integral des Signals in willkürlichen Einheiten [a.u.]) und ihrer Halbwertsbreite ($\Delta\nu_{1/2}$) ausgewertet. In Abbildung 4.5 sind die Resultate der PP_i- und der P_i-Messreihen in je drei Graphen gegenübergestellt. Die chemische Verschiebung der ³¹P NMR-Signale (Abbildung 4.5, oben) variiert je nachdem, wie hoch die Anionenkonzentration ist. So beträgt die chemische Verschiebung bei niedriger Konzentration ca. 2,6 ppm für Phosphat beziehungsweise -6,3 ppm für Pyrophosphat, wohingegen sie bei hoher Anionenkonzentration Werte von 1,2 ppm (P_i) und -8,4 ppm (PP_i) annimmt. Diese Unterschiede entstehen aufgrund der verschiedenen Zustände des Phosphats bzw. Pyrophosphats in den Proben. Je nachdem, ob die Anionen an PAA gebunden oder frei vorliegen, weisen sie unterschiedliche chemische Verschiebungen auf (δ_{geb} bzw. δ_f). Aufgrund des schnellen Austauschs zwischen den beiden Zuständen entspricht die gemessene chemische Verschiebung (δ) dann dem gewichteten Mittel dieser. Dies lässt sich mithilfe folgender Gleichung veranschaulichen, wobei p_{geb} die Wahrscheinlichkeit bezeichnet, für welche das jeweilige Anion im gebundenen Zustand vorliegt:

$$(4.1) \quad \delta = p_{geb}\delta_{geb} + (1-p_{geb})\delta_f.$$

Bei niedrigen Anionenkonzentrationen liegen hauptsächlich Anionen vor, welche mit den PAA-Molekülen in Wechselwirkung stehen. Mit steigender Anionenkonzentration steigt auch die Konzentration an freien (das heißt nicht mit PAA interagierenden) Anionen, weshalb sich die ³¹P NMR-Signale zu immer kleineren chemischen Verschiebungen bewegen.

Die Signalintensität der untersuchten Proben (Abbildung 4.5, Mitte) spiegelt wider, wie viel ³¹P sich in den untersuchten Lösungen befindet. So lässt sich der Kurvenverlauf leicht erklären: Zunächst steigt die Signalintensität mit steigender Anionenkonzentration, bis sie ein Maximum erreicht. In diesem Bereich sind die Proben klar, was bedeutet, dass sich die gesamte Anionenkonzentration in Lösung befindet und mittels NMR detektiert werden kann. Sobald die mikroskopische Phasentrennung einsetzt, werden die PAA-Partikel immer größer, weshalb immer mehr von ihnen sedimentieren, was zur Folge hat, dass schließlich bei Einsetzen der makroskopischen Phasentrennung die gemessene Anionenkonzentration in Lösung fast einen Wert von Null erreicht. An diesem Punkt

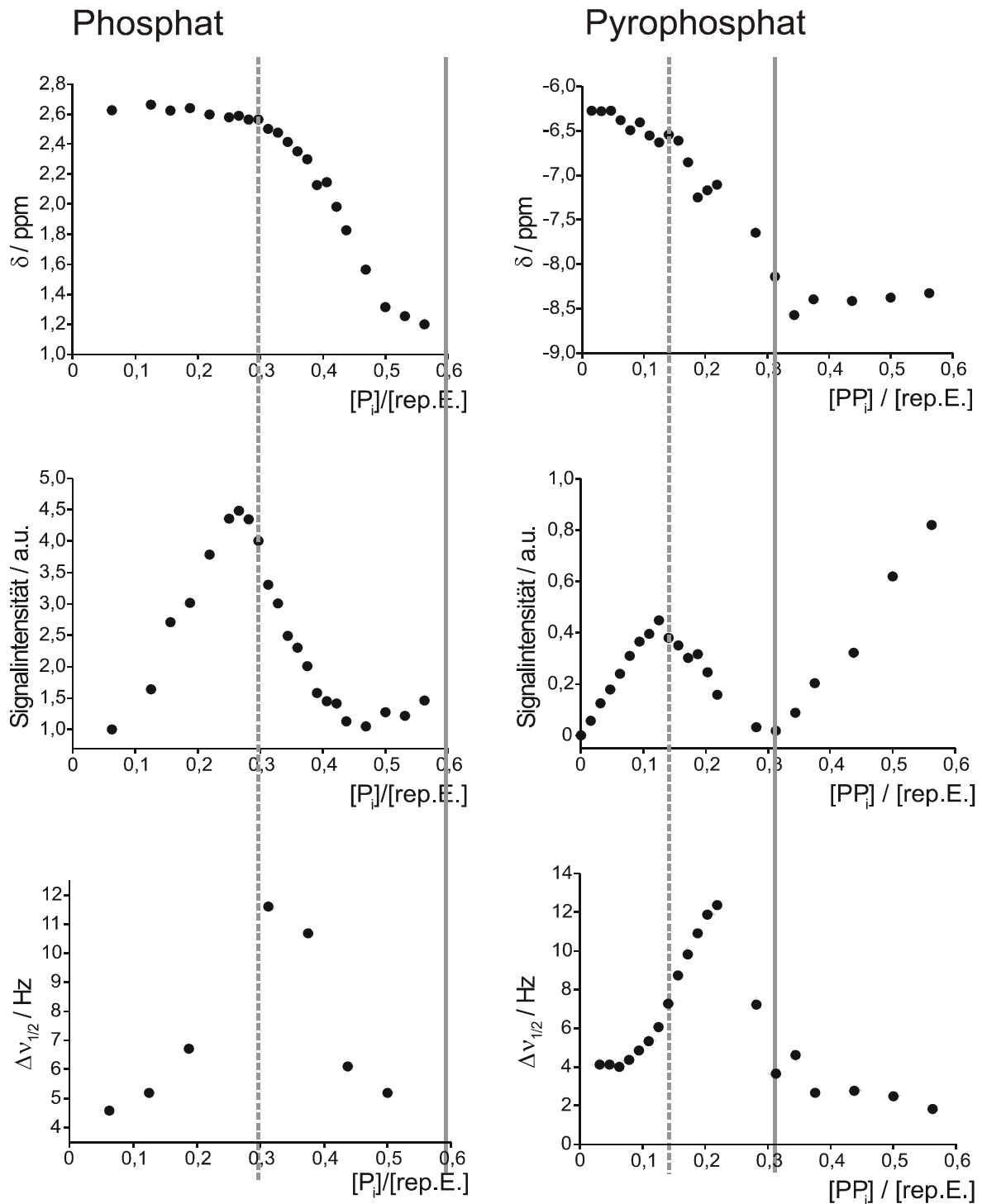


Abb. 4.5: Vergleich des Aggregationsverhaltens von PAA-Anion-Lösungen in Abhängigkeit der Anionenkonzentration mithilfe von ^{31}P NMR-spektroskopischen Messungen. Es sind jeweils die chemische Verschiebung (δ , oben), die Intensität (Mitte) und die Halbwertsbreite ($\Delta\nu_{1/2}$, unten) der ^{31}P NMR-Signale für die Orthophosphat- (links) und Pyrophosphatproben (rechts) gegenübergestellt (je 1 mM PAA, pH=5,8). Die grauen Linien markieren jeweils die Schwellenwerte für das Einsetzen der mikroskopischen (gestrichelt) und der makroskopischen (durchgezogen) Phasentrennung.

befinden sich nahezu alle vorliegenden PAA-Moleküle mit Anionen „gesättigt“ am Grund der Teströhrchen. Ein weiteres Erhöhen der Anionenkonzentration lässt die Signalintensität wieder steigen, da diese Anionen nun nicht mehr an PAA binden können und sich somit frei in Lösung befinden.

Schließlich wurde noch die Halbwertsbreite ($\Delta\nu_{1/2}$) der ^{31}P NMR-Signale ausgewertet. Diese ist bei niedrigen Anionenkonzentrationen sehr klein (ca. 4 Hz), steigt dann stark an, bis sie ein Maximum von ca. 12 Hz erreicht. Die Lage des Maximums hängt wieder davon ab, welches Anion sich in der Lösung befindet (0,32 $[\text{P}_i]/[\text{rep.E.}]$ bzw. 0,22 $[\text{PP}_i]/[\text{rep.E.}]$). Bei noch höheren Konzentrationen sinkt die Halbwertsbreite wieder und erreicht im Bereich der makroskopischen Phasentrennung wieder einen sehr kleinen Wert (1,6 Hz für P_i [Brunner 2004] bzw. ca. 2 Hz für PP_i). Auch bei der Halbwertsbreite handelt es sich um einen gewichteten Mittelwert der gebundenen und freien Anionen, welcher sich aufgrund ihres schnellen Austauschs ergibt. Hierbei ist jedoch auch das kontinuierliche Wachstum der Aggregate von großer Bedeutung. Am Anfang der Messreihe überwiegen gebundene Anionen, eine Aggregation hat aber noch nicht stattgefunden. Die beobachtete Halbwertsbreite von 4 Hz entspricht also der des an Poly(allylamin) gebundenen Anions. Mit steigender Anionenkonzentration werden die PAA-Aggregate immer größer. Dies bewirkt, dass ihre Bewegungen immer langsamer werden und somit ihre rotatorische Korrelationszeit τ_c -das heißt die mittlere benötigte Zeit, um sich einmal um ihre eigene Achse zu drehen- steigt. Dies wirkt sich wiederum auf $\Delta\nu_{1/2}$ aus, was aus folgender Gleichung leicht ersichtlich ist:

$$(4.2) \quad \Delta\nu_{1/2} = (\pi \cdot T_2)^{-1} .$$

T_2 bezeichnet hierbei die transversale Relaxationszeit, welche mit zunehmendem τ_c (also zunehmender Partikelgröße) sinkt [Cavanagh 1996]. Sobald die Kurve ihr Maximum erreicht hat, wird der Einfluss des freien Phosphats, dessen Konzentration kontinuierlich steigt, bemerkbar. Im Bereich der makroskopischen Phasentrennung ist schließlich nur noch freies Phosphat in der Lösung, weshalb nur dessen (kleinere) Halbwertsbreite beobachtet werden kann.

Vergleicht man nun die aus der ^{31}P NMR erhaltenen Kurven für Phosphat und Pyrophosphat, lässt sich feststellen, dass ihr Verlauf im Wesentlichen gleich ist. Sie unterscheiden sich lediglich in den jeweiligen Schwellenwerten des Einsetzens der mikroskopischen und makroskopischen Phasentrennung. Aus Tabelle 4.1 ist ersichtlich,

	Phosphat (P_i)	Pyrophosphat (PP_i)
Einsetzen der mikroskopischen Phasentrennung	0,30	0,14
Einsetzen der makroskopischen Phasentrennung	0,63	0,31

Tab. 4.1: Schwellenwerte der P_i - und PP_i -Konzentration (in [Anion]/[rep.E.]) für das Einsetzen der mikroskopischen bzw. makroskopischen Phasentrennung in PAA-Anion-Lösungen (je 1 mM PAA, pH=5,8).

dass diese Ereignisse für Pyrophosphat jeweils genau bei der halben für Phosphat ermittelten Konzentration stattfinden. Das bedeutet, dass im Selbstaggregationsprozess von PAA ein Pyrophosphation genau zwei Phosphationen ersetzen kann. Zieht man die pK_a -Werte dieser Ionen (P_i : 2,1/7,1/12,3, PP_i : 1,0/2,0/6,6/9,6 [Van Wazer 1973]) hinzu, lässt sich dies leicht erklären: Beim untersuchten pH-Wert (5,8) liegen die meisten Orthophosphationen einfach negativ geladen vor, wohingegen beim Pyrophosphat hauptsächlich zweifach negativ geladene Ionen vorhanden sind.

Diskussion

Mithilfe der beschriebenen ^{31}P NMR-Experimente an anionenkonzentrationsabhängigen PAA-Messreihen ließ sich zeigen, dass im Vergleich zu Orthophosphat jeweils nur die halbe Konzentration von Pyrophosphat notwendig ist, um die Phasentrennungsprozesse der PAA-Lösungen zu induzieren. Bazzicalupi *et al.* [Bazzicalupi 1999] untersuchten die Wechselwirkung von Ortho- und Pyrophosphationen mit verschiedenen Polyaminen. Aus ihren Daten geht hervor, dass sich die Bindungskonstanten der beiden Anionen an die verschiedenen Polyamine teils nur geringfügig voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund ist der hier diskutierte Effekt höchstwahrscheinlich nicht auf eine stärkere Bindung des Pyrophosphats an PAA zurückzuführen. Entscheidend sind dagegen die unterschiedlichen Ladungen der Anionen beim gegebenen pH-Wert, wie oben bereits diskutiert wurde. Offensichtlich erfordert das Einsetzen der mikroskopischen Phasentrennung die Gegenwart einer bestimmten Anzahl negativer Ladungen, welche durch die Zugabe von Pyrophosphat früher erreicht wird als durch die Zugabe von Orthophosphat.

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt wurde, wurden vor einigen Jahren Silikatpräzipitationsexperimente in Gegenwart von Ortho- und Pyrophosphat an natürlichen *Stephanopyxis turris*-Polyaminen durchgeführt [Sumper 2003]. Die

resultierenden Silikatkügelchen waren in Anwesenheit von PP_i nicht nur wesentlich größer als in Anwesenheit von P_i , sondern bildeten sich bereits bei fast zwei Größenordnungen kleineren Anionenkonzentration. Dieser Effekt lässt sich mit dem hier diskutierten PAA-Modell nicht erklären. Womöglich gewährleistet die Größe der Pyrophosphationen bei der Quervernetzung der Polyamine einen größeren Abstand zwischen den positiv geladenen Aminogruppen, was sich zwar nicht auf die Phasentrennung auswirkt, jedoch bei der Entstehung von SiO_2 -Präzipitaten eine Rolle spielen könnte.

4.4 Experimente an natürlichen Polyaminen aus *Stephanopyxis turris*

Der unterschiedliche Einfluss von Ortho- und Pyrophosphat auf das Aggregationsverhalten von Poly(allylamin)-Lösungen ist äußerst interessant. In diesem Zusammenhang stellte sich nun die Frage, wie sich natürliche Polyamine in *in vitro*-Experimenten verhalten. Natürliche Polyamine besitzen eine kürzere Kettenlänge als Poly(allylamin) und ihre Aminogruppen befinden sich in der Hauptkette. Außerdem können sie viele weitere Modifikationen wie Methylgruppen aufweisen. Bereits vor einigen Jahren wurden von Sumper *et al.* hierzu 1H NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt [Sumper 2003]: Die Untersuchung der phosphatinduzierten chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) eines 1H NMR-Signals von Polyaminen aus *Stephanopyxis turris* ergab, dass diese unter dem Einfluss von Pyrophosphat viel größer ist als unter dem Einfluss von Orthophosphat.

Um das Aggregationsverhalten der natürlichen Polyamine noch genauer verstehen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere pH-abhängige Experimente an Polyaminen aus Zellwänden von *Stephanopyxis turris* durchgeführt. Polyamine aus *S. turris* besitzen bis zu 18 sich wiederholende Propylamineinheiten (siehe Abbildung 2.5, Kapitel 2.4). Die Phosphatkonzentration der untersuchten Proben wurde jeweils (entsprechend der PAA-Experimente) auf 0,25 [P_i]/[rep.E.] bzw. auf 0,15 [PP_i]/[rep.E.] konstant eingestellt, während der pH-Wert zwischen 2 und 12 variiert wurde. Die Proben wurden mithilfe von DLS und NMR vermessen. Zum Vergleich wurde zusätzlich die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Signale einer Polyaminprobe in Abwesenheit von Phosphat untersucht.

Mit bloßem Auge ließ sich weder bei den P_i - noch bei den PP_i -Proben eine Trübung oder makroskopische Phasentrennung erkennen. Ebenso lieferten die DLS-Messungen keine verwertbaren Ergebnisse. Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringe Polyaminkonzentration in den Proben zurückzuführen. Aufgrund der geringen Polyaminmengen in Diatomeenzellwänden ist die Präparation in noch größerem Maßstab

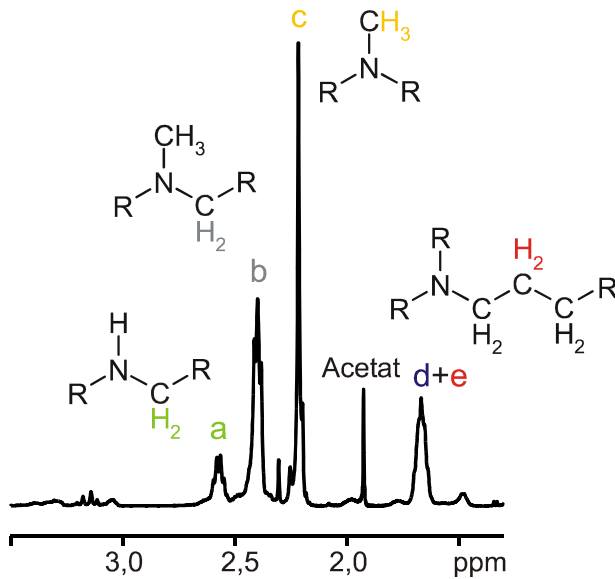


Abb. 4.6: ^1H NMR Spektrum von Polyaminen aus *Stephanopyxis turris* (pH=11, 298 K) mit Zuordnung der verschiedenen Signale.

nur mit großem Aufwand realisierbar. Jedoch sind kleinere Mengen gut für NMR-Messungen geeignet. Abbildung 4.6 zeigt das ^1H NMR-Spektrum des untersuchten Polyamins sowie dessen Signalzuordnung bei pH=11 [Lutz 2005a]. Die chemische Verschiebung der Signale ist stark pH-abhängig und ändert sich während der Titration (siehe Abbildung 4.7, ungefüllte Kreise). Die Anwesenheit von Ortho- bzw. Pyrophosphationen während der Titration wirkt sich ebenfalls auf die chemische

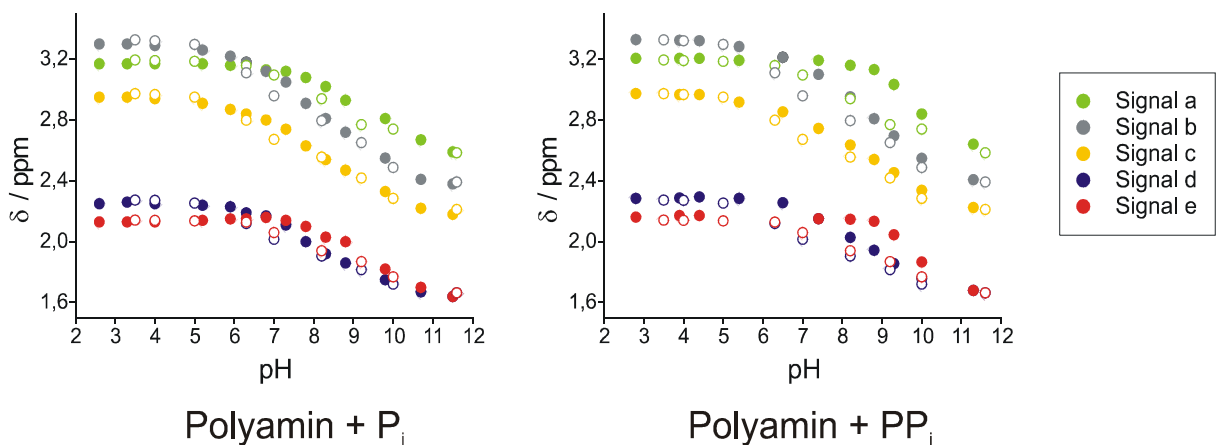


Abb. 4.7: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung δ der ^1H NMR-Signale von Polyaminen aus *Stephanopyxis turris* in Anwesenheit von P_i (links) bzw. PP_i (rechts) (ausgefüllte Kreise). Zum Vergleich ist in beiden Diagrammen die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der Polyaminsignale in Abwesenheit der Anionen eingezeichnet (ungefüllte Kreise). Die Signalzuordnung ist in Abb. 4.6 dargestellt (Anionenkonzentration 0,25 $[\text{P}_i]/[\text{rep.E.}]$ bzw. 0,15 $[\text{PP}_i]/[\text{rep.E.}]$).

Verschiebung der ^1H NMR-Signale aus. Dies ist in Abbildung 4.7 dargestellt (ausgefüllte Kreise). Es ist deutlich erkennbar, dass die Differenz der chemischen Verschiebungen der ^1H NMR-Signale des Polyamins in An- und Abwesenheit der Anionen ($\Delta\delta$) im Fall von Pyrophosphat wesentlich größer ist, als in Anwesenheit von Orthophosphat. Dieser Effekt ist für Signal a (grüne Kreise in Abb. 4.7) und Signal e (rote Kreise in Abb. 4.7) am stärksten. Bei Signal a handelt es sich um die Protonen an den Kohlenstoffatomen, welche direkt an die (nicht methylierten) Aminogruppen angrenzen. Signal e entsteht durch die Protonen am C-2 der Propylamineinheiten. Da die Anionen elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen (also protonierten) Aminogruppen eingehen, wird die chemische Verschiebung der benachbarten Protonen am meisten beeinflusst. Die Abbildungen machen außerdem deutlich, dass $\Delta\delta$ im pH-Bereich von ca. 6 bis 10 am größten ist.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Experimente veranschaulichen, dass die Anwesenheit von Anionen auch in Lösungen von natürlichen Polyaminen einen großen Einfluss auf deren Zustand nimmt. Die pH-Abhängigkeit demonstriert, dass die untersuchten Phosphationen und die Polyamine nur dann in Wechselwirkung treten können, wenn sie bestimmte Ladungen aufweisen. Ihre Wechselwirkungen sind im neutralen bis leicht alkalischen Bereich am stärksten; wahrscheinlich ist hier ein optimales Verhältnis von protonierten Aminogruppen an den Polyaminen und negativen Ladungen an den Phosphationen gegeben. Zusätzlich bestätigt sich auch bei der Untersuchung natürlicher Polyamine, dass Pyrophosphat einen viel stärkeren Effekt auslöst als Orthophosphat. Dies lässt sich wiederum durch die Ladung der Ionen erklären. Die Orthophosphationen sind im entscheidenden pH-Bereich ein- bis zweifach negativ geladen, während die Pyrophosphationen eine zwei- bis dreifach negative Ladung aufweisen (pK_a -Werte siehe Abschnitt 4.3). An dieser Stelle sei auch noch einmal darauf hingewiesen, dass unterschiedliche Phosphatkonzentrationen eingesetzt wurden ($0,25 [\text{P}_i]/[\text{rep.E.}]$ und $0,15 [\text{PP}_i]/[\text{rep.E.}]$). Dies verdeutlicht, dass der Effekt der Pyrophosphationen wesentlich stärker ist, obwohl ihre Konzentration in der Lösung nur $3/5$ der Orthophosphatkonzentration entspricht. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Sumper *et al.* [Sumper 2003].

5 Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen der organischen Moleküle in Diatomeenzellwänden

Im Silikat der Diatomeenzellwände befindet sich eine Vielzahl organischer Moleküle (siehe Abschnitt 2.4). Einige sind fest mit dem Silikatgerüst verbunden bzw. darin eingelagert und lassen sich nicht mithilfe von EDTA/SDS ablösen. Hierzu zählen langkettige Polyamine [Kröger 2000a, Sumper 2005, Sumper 2006a], sowie Silaffine [Kröger 1999, Kröger 2001, Kröger 2002, Poulsen 2003, Poulsen 2004, Sumper 2007, Wenzl 2004] und die kürzlich entdeckten Silacidine [Wenzl 2008]. Mithilfe von *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Biomoleküle in der Lage sind, SiO₂-Kügelchen aus Monokieselsäurelösungen zu präzipitieren [Kröger 1999, Kröger 2000a, Kröger 2001, Kröger 2002, Wenzl 2008] (siehe auch Abschnitt 2.5). Sie sind somit für den Biomineralisationsprozess der Diatomeenzellwände von entscheidender Bedeutung. Um diese interessanten Biomoleküle untersuchen zu können, muss das Silikat der Zellwände durch die Behandlung mit HF [Kröger 1999] oder NH₄F [Kröger 2002, Swift 1992] aufgelöst werden. Dieses Verfahren macht sie zugänglich für die verschiedensten Analysemethoden, zum Beispiel auch für die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie (siehe z.B. Abbildung 4.6 oder 5.3) und für die oben genannten *in vitro*-Präzipitationsexperimente. Allerdings können auf diese Weise nur isolierte Moleküle untersucht werden. Auf der anderen Seite besteht auch großes Interesse daran, Informationen über Polyamine und Silaffine in ihrer eigentlichen Umgebung zu erhalten: Welche Wechselwirkungen bestehen mit dem Silikatgerüst, liegen womöglich sogar kovalente Bindungen vor? In diesem Kontext schlugen Hecky *et al.* [Hecky 1973] ein Modell vor, nach welchem eine Kondensationsreaktion zwischen den Hydroxylgruppen von Serinresten und der Kieselsäure stattfindet. Die hierbei entstehenden Si-O-C-Bindungen zwischen dem mineralischen und organischen Material wurden in der Literatur vielfach diskutiert, jedoch konnten sie bislang nicht nachgewiesen werden [Lobel 1996, Perry 1998].

Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine hervorragend geeignete Methode, um Diatomeenschalen und die darin eingeschlossenen organischen Moleküle im Ganzen zu erforschen. Neben zahlreichen ²⁹Si NMR-spektroskopischen Experimenten zur Untersuchung des anorganischen Silikats der Zellwände [Bertermann 2003, Christiansen 2006, Gendron-Badou 2003, Perry 1998, Tesson 2008], existieren nur wenige Festkörper-

NMR-Studien zu deren organischen Bestandteilen [Christiansen 2006, Tesson 2008, Vrieling 2003]. Christiansen *et al.* führten unter anderem ^{13}C und ^{15}N NMR Experimente an gefriergetrockneten Zellwänden von *Thalassiosira pseudonana* durch, welche mithilfe von Ultraschall aufgeschlossen worden waren [Christiansen 2006]. Diese Methode gewährleistet nicht, dass sämtliches lose gebundenes, organisches Material abgelöst wird. Im Gegensatz dazu soll in dieser Arbeit mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie das organische Material von Diatomeenzellwänden untersucht werden, welches fest an das Silikatgerüst gebunden oder in dieses eingelagert vorliegt.

Die wichtigste Voraussetzung für die Durchführung von NMR-Messungen ist hierbei die Isotopenmarkierung. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen sind nur geringe Mengen organischer Moleküle in den Zellwänden vorhanden. Erschwerend kommt hinzu, dass die natürliche Häufigkeit der NMR-aktiven Isotope ^{13}C und ^{15}N nur sehr gering ist (1,11 % für ^{13}C , 0,36 % für ^{15}N) und diese Kerne ein ungünstiges gyromagnetisches Verhältnis γ besitzen [Cavanagh 1996] (siehe auch Tabelle 3.1 in Abschnitt 3.1).

5.1 ^{13}C Festkörper-NMR-Spektroskopie an Diatomeenzellwänden

5.1.1 Zuordnung der ^{13}C NMR-Signale und Quantifizierung des organischen Materials

Eine 20 l-Kultur der Kieselalge *Stephanopyxis turris* (Abbildung 5.1, rechts) wurde mithilfe von $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ ^{13}C -angereichert (siehe Abschnitt 3.3.1). Nach neun Tagen

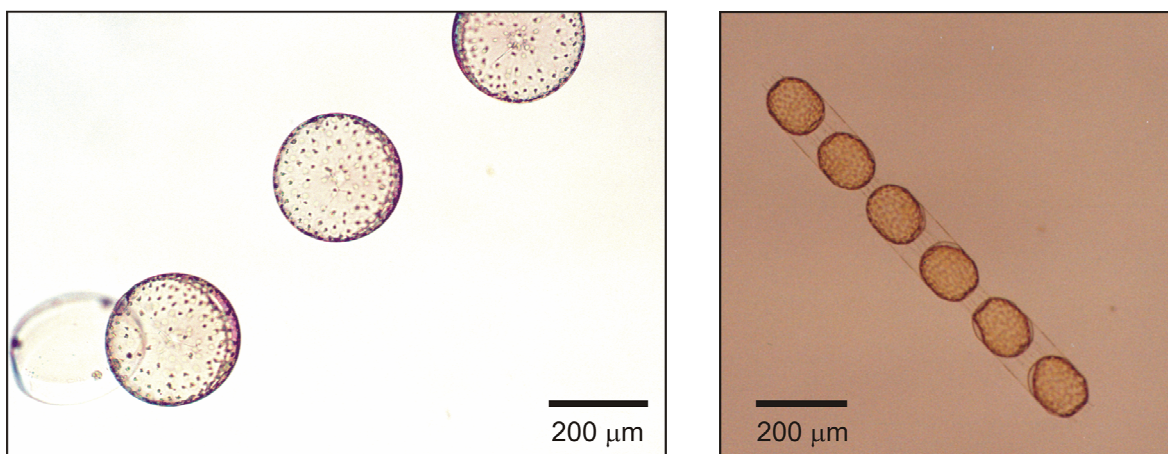


Abb. 5.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier in dieser Arbeit mithilfe von Festkörper-NMR untersuchter Diatomeenarten: *Coscinodiscus granii* (links) und *Stephanopyxis turris* (rechts). Der Skalierungsbalken entspricht 200 μm .

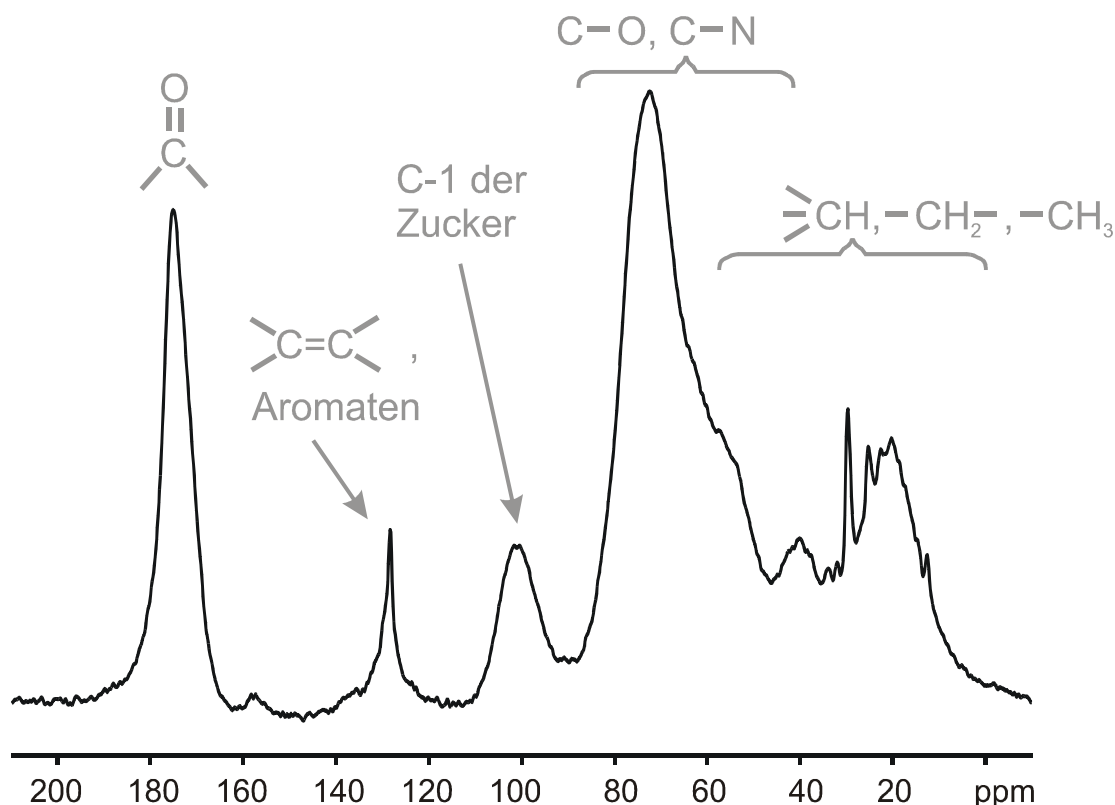


Abb. 5.2: ^{13}C MAS NMR-Spektrum isolierter *Stephanopyxis turris*-Zellwände mit Zuordnung der verschiedenen Signale (298 K, $\nu_r=10$ kHz, 4k scans).

konnten die Zellen geerntet und die Zellwände mithilfe von EDTA/SDS isoliert werden. Die gewaschenen und gefriergetrockneten weißen Schalen wurden dann für die Festkörper-NMR-Spektroskopie in einen 4 mm-MAS-Rotor eingewogen, um später eine Quantifizierung zu ermöglichen. Abbildung 5.2 zeigt das resultierende ^{13}C MAS NMR-Spektrum mit direkter Anregung der ^{13}C -Atome bei Raumtemperatur. Es weist eine große Vielzahl von Signalen auf, welche das organische Material der Zellwände (wie Proteine, Polyamine und Zuckerreste) widerspiegeln. Das große Signal bei 160-190 ppm entsteht durch die Carbonylkohlenstoffatome der Peptidbindungen. Die Signale der Alkylkohlenstoffatome befinden sich zwischen 10 und 60 ppm. In diesem Bereich findet man zum Beispiel die ^{13}C NMR-Signale der Polyamine und der C^α -Atome der Aminosäuren. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 5.3 das ^{13}C Flüssigkeits-NMR-Spektrum von isolierten Polyaminen aus *S. turris* [Brunner 2007]. An diese Signale schließen sich die N- und O-Alkylsignale an (40-90 ppm), welche unter anderem durch die C-N-Kohlenstoffatome der Polyamine entstehen, oder durch verschiedene Aminosäurereste. Der Großteil der C-O-Signale muss jedoch den Zuckern zugeordnet werden. Die kleineren Signale sind den C-1-Kohlenstoffatomen aus Zuckern (95-110 ppm)

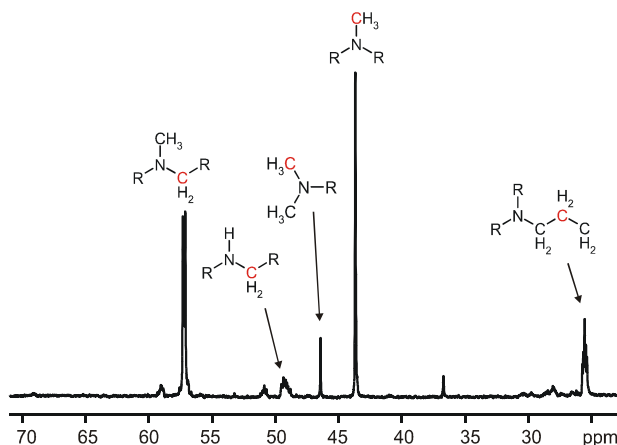


Abb. 5.3: ^{13}C Flüssigkeits-NMR Spektrum von isolierten Polyaminen aus *Stephanopyxis turris* (pH=11, 298 K) mit Zuordnung der verschiedenen Signale [Brunner 2007].

[Bubb 2003] bzw. aromatischen Kohlenstoffen und Kohlenstoffen aus Doppelbindungen (120-140 ppm) zuzuordnen.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, wie stark sich die ^{13}C MAS NMR-Spektren verschiedener Diatomeenarten voneinander unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden für weitere Messungen Zellwände von *Thalassiosira pseudonana* und *Coscinodiscus granii* (siehe Abbildung 5.1, links) wie oben beschrieben präpariert. Abbildung 5.4 zeigt die erhaltenen Spektren [Gröger 2008c]. Vergleicht man die ^{13}C NMR-Spektren der drei Arten (das *S. turris*-Spektrum ist der Übersichtlichkeit halber ebenfalls dargestellt) fällt sofort ins Auge, dass der Gehalt an organischem Material in den Zellwänden von Art zu Art sehr stark variiert. Während die Größenordnungen für *T. pseudonana* und *S. turris* vergleichbar sind, enthalten die Schalen von *C. granii* wesentlich weniger Biomoleküle, obwohl alle drei Proben auf identische Art und Weise behandelt wurden. Es sei darauf hingewiesen, dass für das Spektrum von *C. granii* außerdem dreimal mehr *scans* aufsummiert wurden. Durch Integration der Signale dieser Spektren lässt sich der Gehalt an ^{13}C -Atomen in den untersuchten Zellwänden bestimmen. Voraussetzung für diese Berechnungen ist die Kenntnis der Masse der untersuchten Zellwandproben sowie das Vermessen einer Standardprobe (z.B. Adamantan) mit bekannter Masse und Stoffmenge der darin enthaltenen ^{13}C -Atome unter identischen Bedingungen. Unter der Annahme, dass das Signal bei 175 ppm ausschließlich durch die Carbonylkohlenstoffatome der Peptidbindungen entsteht und dass das durchschnittliche Gewicht einer Aminosäure etwa 110 g/mol beträgt [Stryer 1996], lässt sich der Anteil an eingelagerten Aminosäuren abschätzen. Auf die gleiche Weise lässt sich auch der Kohlenhydratanteil der Zellwände bestimmen, wenn man davon ausgeht, dass das Signal bei ca. 101 ppm alleine durch anomere Kohlenstoffatome hervorgerufen wird und ihr mittleres Molekulargewicht ca.

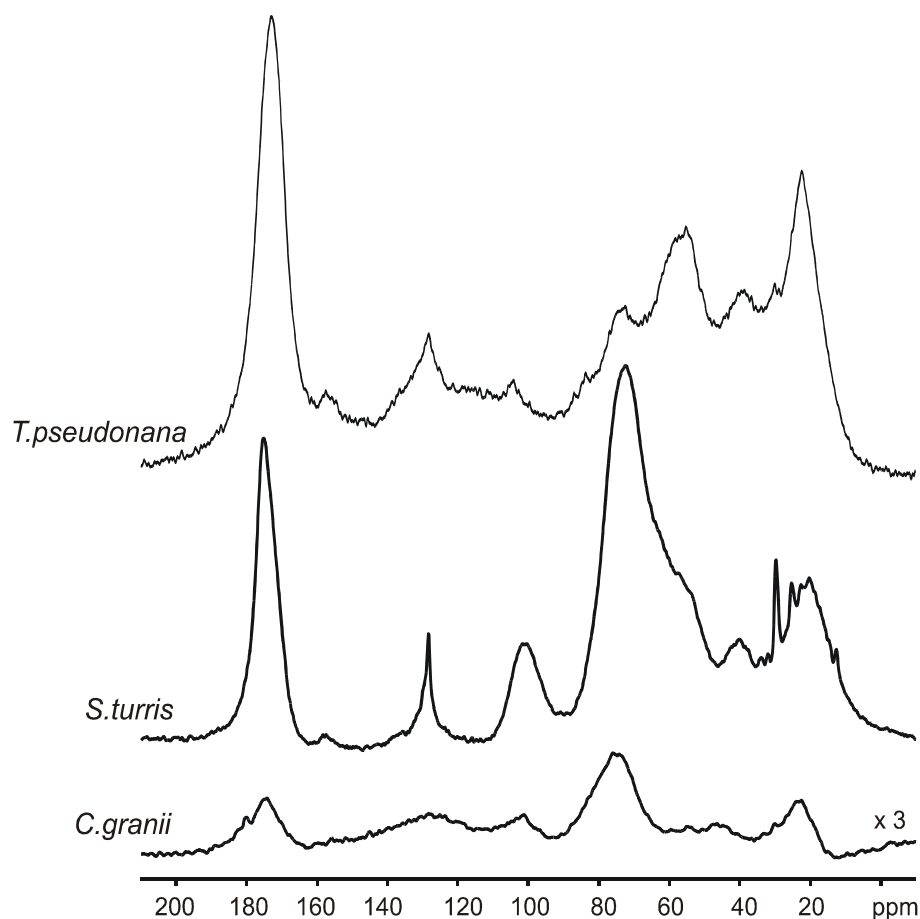


Abb. 5.4: ^{13}C MAS NMR-Spektren der Zellwände dreier verschiedener Diatomeenarten (298 K, $\nu_r=10$ kHz, 4k scans (*T. pseudonana*, *S. turris*) bzw. 12k scans (*C. granii*)).

180 g/mol ausmacht. Das Ergebnis dieser Abschätzungen ist in Tabelle 5.1 dargestellt [Gröger 2008c]. Der ^{13}C -Gehalt der untersuchten Zellwände für die verschiedenen Spezies bestätigt die oben aus den NMR-Spektren gewonnenen Informationen: Während der Anteil an organischem ^{13}C in den Zellwänden von *T. pseudonana* und *S. turris* ungefähr dieselbe

	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	<i>Stephanopyxis turris</i>	<i>Coscinodiscus granii</i>
^{13}C -Gehalt gesamt	7,6 %	4,1 %	0,3 %
Aminosäuren* (AS)	14,2 %	6,7 %	0,5 %
Kohlenhydrate* (KH)	2,3 %	3,9 %	0,2 %
Verhältnis KH/AS	0,16	0,58	0,40

Tab. 5.1: Mithilfe von ^{13}C MAS NMR bestimmter Anteil (w/w) des organischen Materials in isolierten Diatomeenzellwänden dreier Spezies (Die Aminosäure- und Kohlenhydratanteile (*) stellen abgeschätzte Werte dar).

Größenordnung aufweist (7,6 % für *T. pseudonana* und 4,1 % für *S. turris*), beträgt dieser in den Zellwänden der Spezies *C. granii* nur 0,3 %. Dementsprechend ist auch der Kohlenhydrat- bzw. Aminosäureanteil in den Proben sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zu *T. pseudonana* findet sich im organischen Material der Zellwände von *S. turris* und *C. granii* ein großer Anteil von Kohlenhydraten, was sich auch in den Spektren von Abbildung 5.4 in dem starken, breiten Signal bei 73 ppm und dem kleineren Signal bei 101 ppm widerspiegelt. Insbesondere ist auch das Verhältnis der Masse der Kohlenhydrate zu der der Aminosäuren von Interesse. Dieser Quotient beträgt für die Arten *S. turris* und *C. granii* 0,58 bzw. 0,40, während er für *T. pseudonana* nur einen Wert von 0,16 annimmt. Ergänzend wurden neben den oben diskutierten 1D-Festkörper-NMR-Messungen auch 2D- ^1H - ^{13}C HETCOR-Experimente durchgeführt [Gröger 2008c]. In diesen Experimenten werden die chemischen Verschiebungen räumlich benachbarter ^{13}C - und ^1H -Kerne miteinander korreliert. Abbildung 5.5 zeigt drei Spektren von Zellwänden der Kieselalge

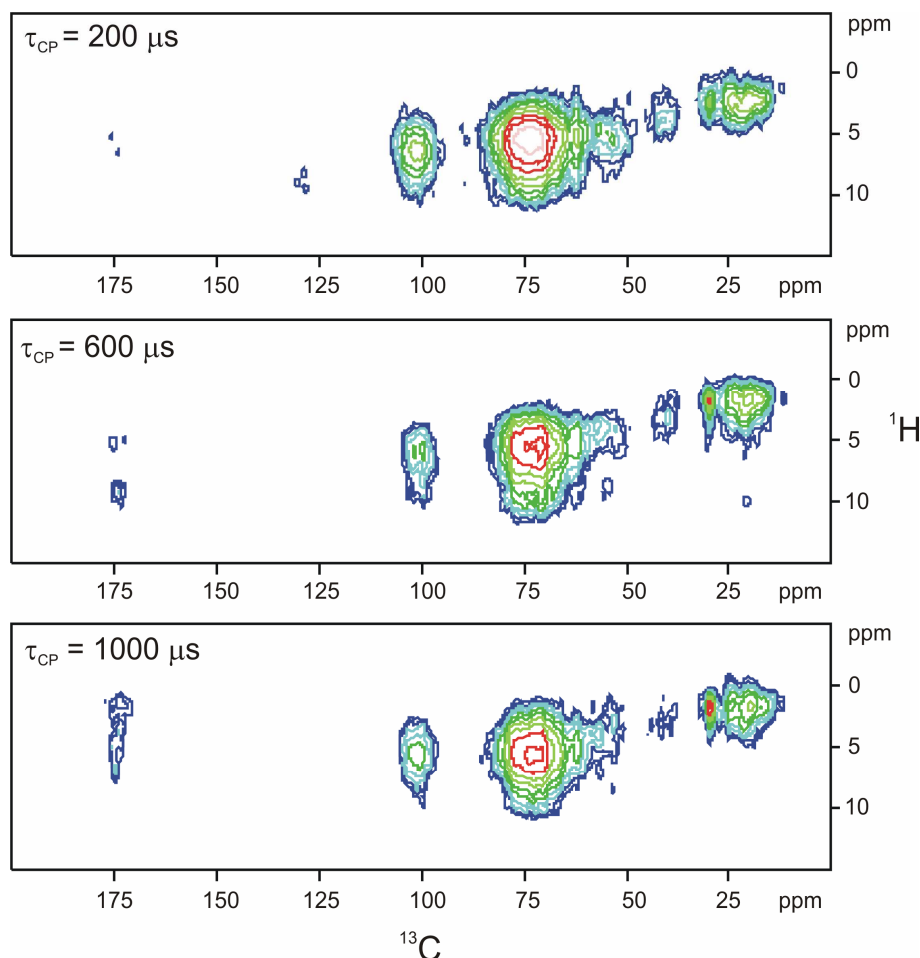


Abb. 5.5: 2D ^1H - ^{13}C HETCOR NMR-Spektren von Zellwänden der Kieselalge *S. turris* bei drei verschiedenen CP-Kontaktzeiten (τ_{CP}) (298 K, $\nu_r=8$ kHz, 128 scans, 256 Datenpunkte in indirekter Dimension).

S. turris, welche sich lediglich in der Länge der CP-Kontaktzeit (τ_{CP}) voneinander unterscheiden. Bei kurzen Kontaktzeiten von 200 μ s sind die Signale der anomeren und Alkylkohlenstoffatome am stärksten. Mit steigendem τ_{CP} bis hin zu 1 ms werden diese Signale immer schwächer, wohingegen die Signale der Carbonylkohlenstoffatome stärker werden. Da diese Atome keine direkt benachbarten Protonen aufweisen, können sie nur bei längeren Kontaktzeiten Magnetisierung von ^1H -Kernen erhalten. Trotz der –in der Festkörper-NMR häufig beobachteten– breiten Signale, lässt sich mithilfe dieser Spektren die oben getroffene Zuordnung der 1D ^{13}C NMR-Signale erhärten (siehe Abbildung 5.2): Die korrelierten ^1H NMR-Signale im 2D-Experiment weisen die typischen Verschiebungswerte der Gruppen auf, welche den ^{13}C NMR-Resonanzen zugeordnet wurden. So wird insbesondere auch bestätigt, dass es sich bei dem ^{13}C NMR-Signal bei 101 ppm tatsächlich um die anomeren Kohlenstoffatome der Zucker handeln muss. Die korrelierte ^1H -chemische Verschiebung dieses Signals ($5,8 \pm 0,3$ ppm) liegt in dem Bereich, in dem gewöhnlich die Verschiebungen der anomeren Protonen von Zuckern zu finden sind (4,4-5,5 ppm [Bubb 2003]). Auch an Zellwänden von *Thalassiosira pseudonana* konnte ein ^1H - ^{13}C HETCOR-Experiment erfolgreich durchgeführt werden (siehe Anhang 10.1, Abbildung 10.1).

Diskussion

In diesem Abschnitt wurden ein- und zweidimensionale ^{13}C NMR-Experimente durchgeführt, um das organische Material von ^{13}C -angereicherten Zellwänden verschiedener Diatomeenarten zu vermessen und den Signalen des Spektrums zuzuordnen. Mithilfe einfacher Annahmen ließ sich der Gehalt an Aminosäuren und Kohlenhydraten quantifizieren. So konnte gezeigt werden, dass die Zellwände aller untersuchten Arten neben Proteinen (wie Silaffinen und Silacidinen) auch Kohlenhydrate, wenn auch in sehr unterschiedlich großen Mengen, enthalten, welche fest an das Silikatgerüst gebunden vorliegen. Da die Zellwände für die Messungen mehrmals mit SDS/EDTA und Wasser gewaschen worden sind, ist es unwahrscheinlich, dass diese Zuckerreste aus der organischen Hülle der Frustel stammen. Höchstwahrscheinlich sind sie teilweise auf stark glykosylierte Silaffine zurückzuführen, von denen bereits einige charakterisiert worden sind [Poulsen 2003, Poulsen 2004]. Hierzu gehören zum Beispiel auch die Silaffine aus der hier untersuchten Art *Thalassiosira pseudonana*. Dagegen scheinen jedoch in den Zellwänden von *C. granii* keine Silaffine vorhanden zu sein [Sumper 2002]. Trotzdem sind im ^{13}C NMR-Spektrum dieser Spezies schwache Signale zu sehen, welche durch

Kohlenhydrate und Proteine oder Peptide entstehen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in den Zellwänden dieser Kieselalgen weitere, bisher nicht analysierte, Biomoleküle existieren. In der Zwischenzeit konnte zum Beispiel in Zellwänden von *T. pseudonana* Chitin identifiziert werden [Tesson 2008] (siehe auch Abschnitt 5.2).

5.1.2 Einfluss des Wassergehalts der Zellwände auf die Festkörper-NMR-Spektren

Mithilfe von ^{13}C MAS NMR-Experimenten wurde der Einfluss des Hydratisierungszustands der Zellwände auf die Spektren untersucht. Hierfür wurden einerseits, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, gefriergetrocknete, ^{13}C -angereicherte Zellwandproben vermessen. Zusätzlich wurden hydratisierte Proben, welche einen Anteil Restwasser enthielten, analysiert. Abbildung 5.6 zeigt die resultierenden Spektren für Zellwände von *T. pseudonana* (a) und *S. turris* (b). Es sei darauf hingewiesen, dass sich für die verschiedenen Messungen unterschiedlich viel Substanz im MAS-Rotor befand, wodurch sich die großen Unterschiede im Signal/Rausch-Verhältnis erklären. Es wird deutlich, dass eine Linienverbreiterung stattfindet, wenn den Proben Wasser entzogen wird. Diese Beobachtung lässt sich unter der Annahme erklären, dass die organischen Bestandteile der Zellwände in Anwesenheit von Wasser beweglicher sind, als im dehydratisierten Zustand. Dies hat zur Folge, dass die Halbwertsbreiten ihrer Signale in den Festkörper-NMR-Spektren kleiner werden. Zusätzlich wurden in diesem Zusammenhang $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Experimente an den oben beschriebenen Proben durchgeführt. Die Spektren der Zellwände von *T. pseudonana* im trockenen und hydratisierten Zustand sind in Abbildung 5.7 dargestellt. (Die Spektren der *S. turris*-Zellwände finden sich im Anhang (Abschnitt 10.1, Abbildung 10.2).) Im Gegensatz zu den Spektren bei direkter ^{13}C -Anregung (siehe Abbildung 5.6 a) unterscheiden sich die CP-Spektren interessanterweise nicht in ihrer Auflösung. Jedoch ist die Signalintensität im Spektrum der hydratisierten Probe etwas geringer. Das bedeutet, dass hier der Magnetisierungstransfer von den ^1H -Kernspins auf die ^{13}C -Kerne weniger effizient ist. Dies ist unter anderem abhängig von der Umgebung der Kerne und ihrer Beweglichkeit. Aus diesen Gründen lässt sich folgern, dass die organischen Moleküle in den hydratisierten Zellwandproben eine gewisse Beweglichkeit aufweisen, während ihre Bewegungen im getrockneten Zustand stärker eingeschränkt sind. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der ^{13}C NMR-Spektren bei direkter Anregung (siehe oben).

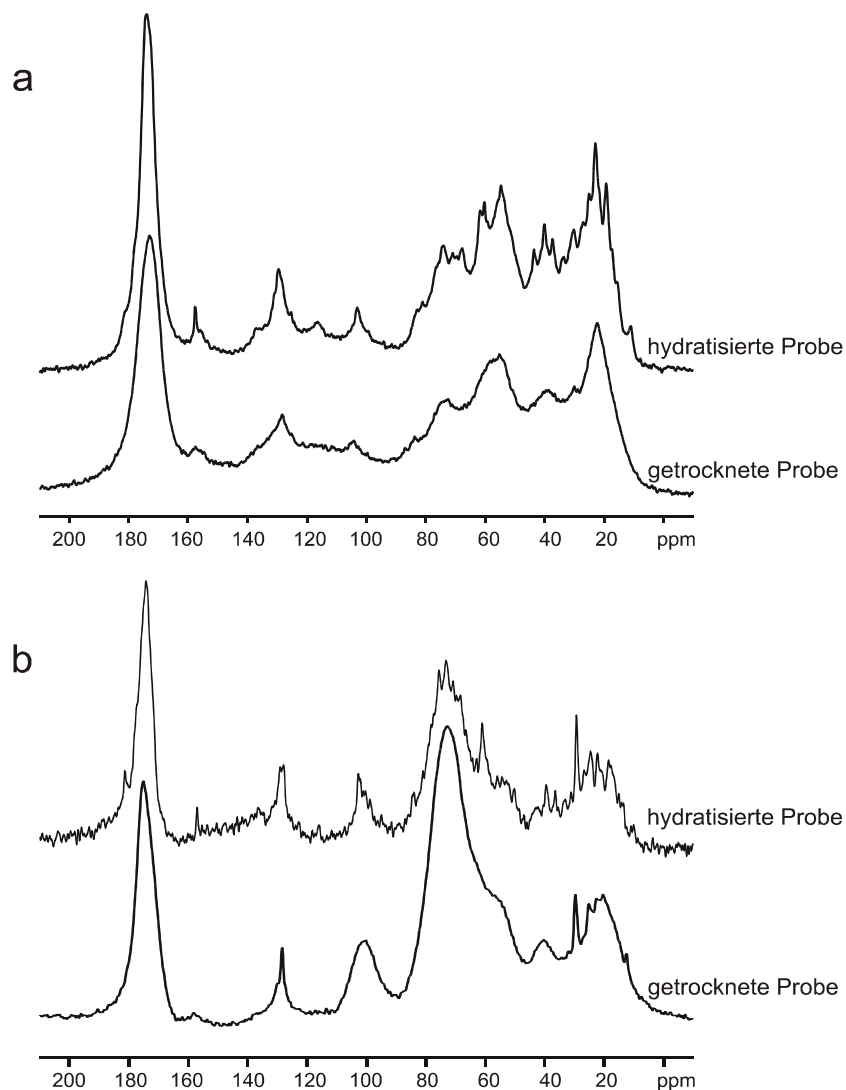


Abb. 5.6: ^{13}C MAS NMR-Experimente an Zellwänden von *T. pseudonana* (a) und *S. turris* (b) im hydratisierten (oben) und gefrier-getrockneten (unten) Zustand (298 K, $\nu_r=10$ kHz, 4k scans). Die großen Unterschiede im Signal/Rausch-Verhältnis kommen durch verschiedene Probenkonzentrationen im MAS-Rotor zustande.

Schließlich wurde ein weiteres Experiment zur Hydratation der Zellwände durchgeführt: Eine Probe von *Stephanopyxis turris*-Zellwänden wurde bei 200 °C vakuumgetrocknet, um sicher zu stellen, dass sie kein Wasser enthält. Im Vergleich mit dem ^{13}C NMR-Spektrum der gefriergetrockneten Probe weist das Spektrum dieser Probe (siehe Anhang 10.1, Abbildung 10.3) hinsichtlich der spektralen Auflösung keine Unterschiede auf. Lediglich die Intensität der Signale ist um ca. 25 % reduziert, was sich auf das Zersetzen der organischen Moleküle unter dem Einfluss der hohen Temperaturen zurückführen lässt.

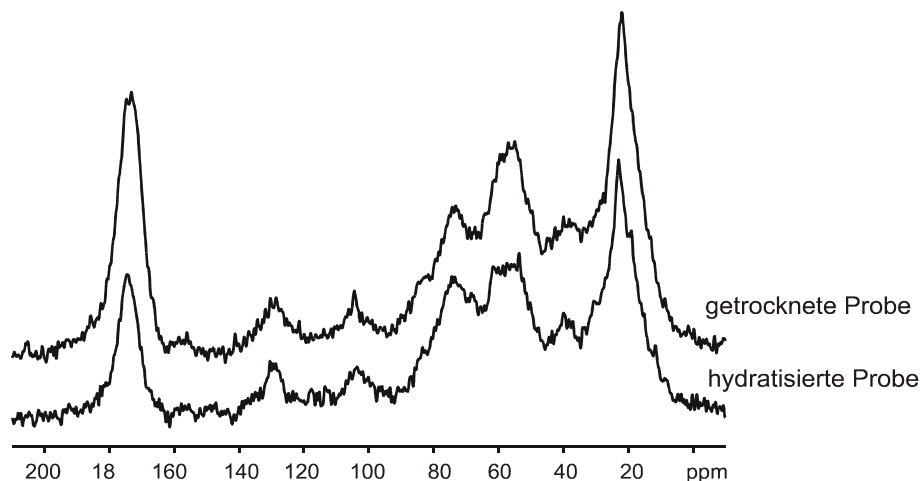


Abb. 5.7: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektren der Zellwände von *T. pseudonana* im getrockneten (oben) und hydratisierten (unten) Zustand (298 K, $\nu_r=10$ kHz, $\tau_{CP}=900$ μs , 4k scans).

Diskussion

Das hier gezeigte ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektrum von *T. pseudonana*-Zellwänden (siehe Abbildung 5.7) ist qualitativ mit den von Christiansen *et al.* [Christiansen 2006] und Tesson *et al.* [Tesson 2008] veröffentlichten Spektren vergleichbar. Kleine Unterschiede sind in den Signalintensitäten zu verzeichnen, was sich wahrscheinlich auf unterschiedliche Präparationsmethoden der Zellwände zurückführen lässt. Insbesondere ist bei den von Christiansen *et al.* untersuchten Zellwandproben, welche durch Ultraschallbehandlung der Zellen gewonnen wurden, davon auszugehen, dass sie nicht frei von locker gebundenem, organischem Material waren, wohingegen für die Präparation der hier verwendeten Proben eine Zelllyse mithilfe von SDS/EDTA durchgeführt wurde. Ein weiterer Unterschied besteht in dem Signal bei ca. 101 ppm, welches hier anhand der 1D- und 2D-NMR-Experimente den C-1-Kohlenstoffatomen der Zucker zugeordnet wurde (siehe Abschnitt 5.1.1). Dagegen identifizierten Christiansen *et al.* dort ein Rotationsseitenband. Die hier getroffene Zuordnung konnte durch die Veröffentlichung von Tesson *et al.* [Tesson 2008] bestätigt werden.

Der Einfluss des Hydratisierungszustands auf die Spektren von Proteinproben, wie zum Beispiel Lysozym, wurde bereits in etlichen Festkörper-NMR-Studien untersucht [Kennedy 1990, Hong 1999, Pauli 2000]. Diese ergaben, dass der Wassergehalt die Auflösung der Spektren stark beeinflusst. Das trifft auch für die hier gezeigten Spektren zu. Die organischen Moleküle sind in der Gegenwart von Wasser beweglicher, was zur

Folge hat, dass die beobachteten Signale in den ^{13}C MAS NMR-Spektren schmaler sind. Zumindest trifft das für diejenigen Biomoleküle zu, die für Wasser zugänglich sind. Da die spektrale Auflösung in den CP-Spektren der hydratisierten und dehydratisierten Proben jedoch keinen Unterschied aufweist, lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die ^{13}C MAS NMR-Spektren enthalten viele verschiedene überlagerte Signale von Biomolekülen. Ein Teil von ihnen ist sehr beweglich und ihre Signale sind deshalb sehr gut aufgelöst, wohingegen eine andere Gruppe organischer Moleküle stark immobilisiert und in ihrer Bewegung eingeschränkt ist, was zu sehr breiten ^{13}C NMR-Signalen führt. Im CP-Experiment werden dann die Signale verstärkt, welche durch die unbeweglichen Komponenten zustande kommen, da die CP-Effizienz mit der Beweglichkeit der untersuchten Moleküle abnimmt.

Da die Anwesenheit von Wasser einen großen Einfluss auf die hier gezeigten NMR-Spektren hat, lässt sich schließen, dass die in die silifizierten Zellwände eingelagerten Biomoleküle –zumindest teilweise– für Wasser zugänglich sind. Das ist gewährleistet, wenn sie sich entweder auf der Oberfläche der Zellwände, oder in Poren im Silikatgerüst, in die das Wasser eindringen kann, befinden.

Auch bei der Durchführung von ^{29}Si MAS NMR-Experimenten stellte sich heraus, dass der Hydratisierungszustand der Zellwände ausschlaggebend für die erhaltenen Spektren ist [Gröger 2008d, Brunner 2007, Gröger 2008c]. Abbildung 5.8 stellt die 2D ^1H - ^{29}Si HETCOR-Spektren hydratisierter und dehydratisierter ^{29}Si -angereicherter Zellwände von *T. pseudonana* gegenüber. Im Spektrum der getrockneten Probe (Abbildung 5.8, rechts) wird ^1H -Magnetisierung von den ^1H -Kernen der Silanolgruppen auf die benachbarten ^{29}Si -Kerne übertragen. Da an die Siliziumatome der Q^3 - und Q^2 -Gruppen Hydroxylgruppen gebunden sind (mithilfe der Q^n -Nomenklatur wird die Anzahl n der umgebenden Siloxanbindungen eines Siliziumatoms angegeben, siehe auch Abschnitt 6, Abbildung 6.2), werden deren Signale besonders verstärkt, wohingegen das Signal der Q^4 -Gruppe unterdrückt wird. Im Spektrum der hydratisierten Zellwände (siehe Abbildung 5.8, links) sind angelagerte Wassermoleküle an der Übertragung von ^1H -Magnetisierung auf die ^{29}Si -Kerne beteiligt. Dies äußert sich durch das starke ^1H NMR-Signal bei ca. 5 ppm. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass vom adsorbierten Wasser aus ein deutlicher Polarisationstransfer auf die Siliziumkerne der Q^4 -Gruppen stattfindet. Diese sollten sich eigentlich im –für Wasser unzugänglichen– Inneren des SiO_2 befinden. Die Ursache hierfür ist noch unklar. Jedoch wäre ein solcher Effekt denkbar, wenn entweder Wasser die Fähigkeit besitzt ins Innere des SiO_2 einzudringen, oder wenn während der CP-Kontaktzeit

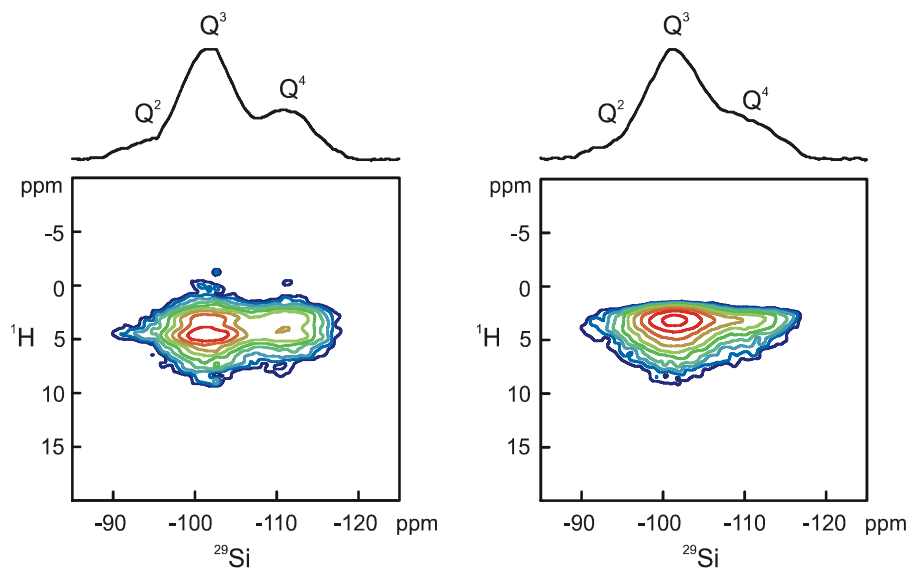


Abb. 5.8: ^1H - ^{29}Si -HETCOR-Spektren von hydratisierten (links) und dehydratisierten (rechts) ^{29}Si -angereicherten Zellwandproben von *T. pseudonana*. Die ^{29}Si -Projektionen sind oberhalb der Spektren dargestellt [Brunner 2007, Gröger 2008c, Gröger 2008d].

^{29}Si - ^{29}Si -Spindiffusion von den Q^2 - und Q^3 -Gruppen auf der Oberfläche zu den Q^4 -Gruppen im Inneren des Silikats stattfinden kann. Diese Ergebnisse belegen, dass sich der Hydratisierungszustand der Diatomeenzellwände nicht nur auf die ^{13}C NMR-Spektren der eingelagerten organischen Moleküle auswirkt, sondern auch auf die ^{29}Si $\{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR Spektren.

5.1.3 Einfluss der Messtemperatur auf die Festkörper-NMR-Spektren

In einem weiteren Versuch wurden die gefriergetrockneten ^{13}C -angereicherten Zellwände von *Stephanopyxis turris* bei unterschiedlichen Temperaturen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie vermessen. Die ^{13}C MAS NMR-Spektren bei 298 K und 220 K sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Die Spektren unterscheiden sich kaum voneinander. Im Vergleich zu dem Spektrum bei Raumtemperatur wird im Spektrum bei 220 K im Bereich von 10 bis 40 ppm die Auflösung geringfügig schlechter. Das lässt sich damit erklären, dass die Bewegungen dieser organischen Moleküle bei niedrigen Temperaturen „eingefroren“ werden. Ein weiterer Unterschied besteht in der größeren Signalintensität des gesamten Spektrums bei 220 K. Das lässt sich darauf zurückführen, dass bei tieferen Temperaturen der Besetzungsunterschied der Energieniveaus der Kerne größer wird und somit die Zahl der im NMR-Experiment anregbaren Spins steigt. Das Besetzungsverhältnis der

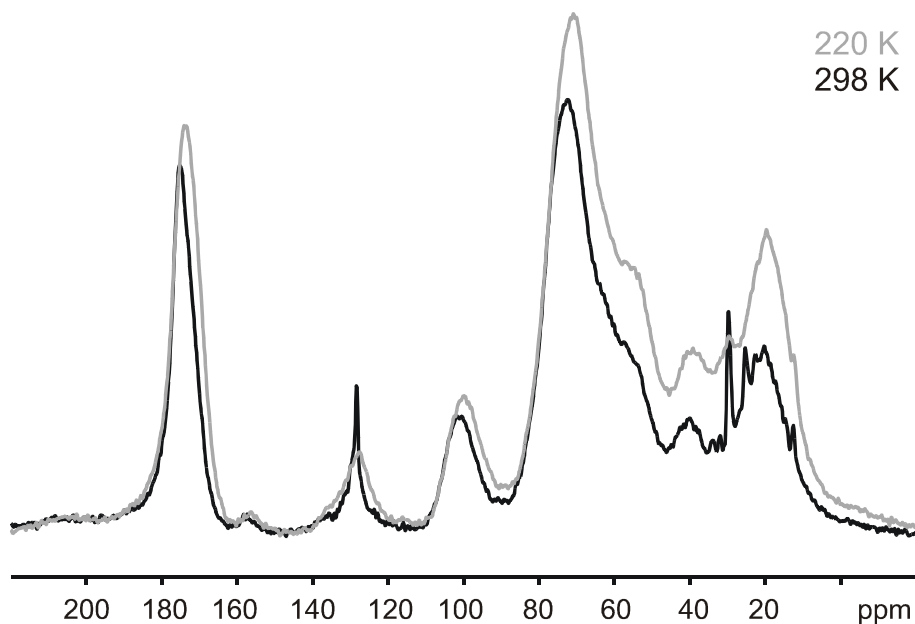


Abb. 5.9: Einfluss der Temperatur auf die ^{13}C MAS NMR-Spektren der Zellwandproben von *Stephanopyxis turris*. Die gezeigten Messungen wurden bei 220 K (graue Linie) und 298 K (schwarze Linie) durchgeführt ($\nu_r=10$ kHz, 4k scans).

Energieniveaus (N_β/N_α) kann mithilfe der Boltzmann-Verteilung beschrieben werden, wobei N_α und N_β die Zahl der Kerne im energieärmeren bzw. energiereicheren Niveau angeben [Friebolin 2006]:

$$(5.1) \quad \frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}$$

ΔE bezeichnet den Energieunterschied der Energieniveaus und k_B die Boltzmann-Konstante. Dies hat schließlich zur Folge, dass sich die Magnetisierung erhöht. Aus diesem Grund kann dieser Effekt nicht mit einer Änderung der Beweglichkeit der eingelagerten Biomoleküle in Verbindung gebracht werden.

Zusätzlich wurde anhand von $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektren bei 220 K und 298 K die CP-Dynamik untersucht. Zu diesem Zweck wurden für jede Temperatur mehrere CP-Spektren mit variierender Kontaktzeit (τ_{CP}) zwischen 0,05 und 15 ms aufgenommen (Abbildung 5.10). Ebenso wie die Experimente bei direkter ^{13}C -Anregung unterscheiden sich die CP-Spektren bei den verschiedenen Temperaturen wiederum nur leicht in der Auflösung und in der Signalintensität. So sind die CP-Aufbauraten für die Komponenten der breiten Signale nahezu temperaturunabhängig. Lediglich die schmalen Signale bei

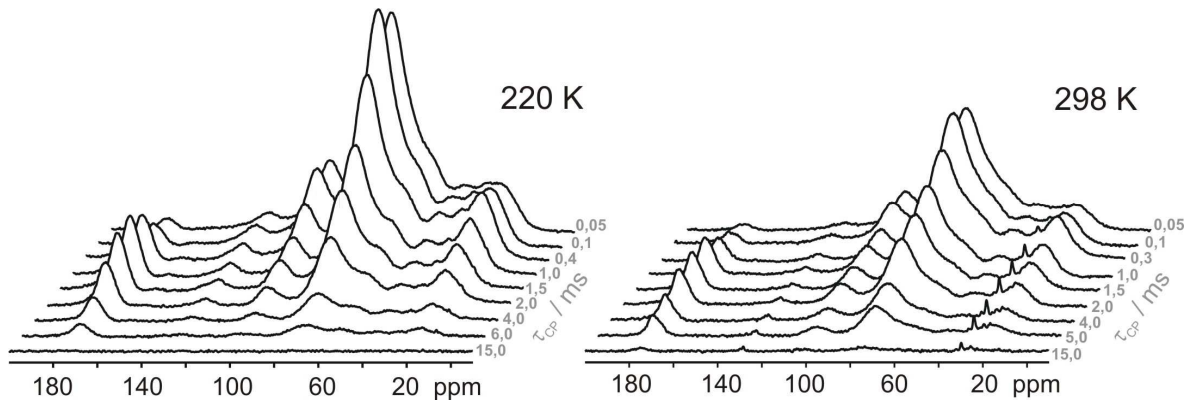


Abb. 5.10: Abhängigkeit der $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektren von der Kontaktzeit τ_{CP} bei 220 K (links) und 298 K (rechts) ($\nu_r=10$ kHz, 4k scans).

30 ppm und 128 ppm verbreitern sich bei tiefer Temperatur, was wieder darauf hindeutet, dass diese Komponenten im Vergleich zur Raumtemperatur-Messung an Beweglichkeit verlieren. Zur besseren Veranschaulichung wurden in diesem Zusammenhang zusätzlich die CP-Aufbaukurven aufgenommen. Diese ermöglichen die Bestimmung der Zeitkonstante für die Abnahme der H-Spin-Magnetisierung ($T_{1\rho}$) und die CP-Zeitkonstante (T_{CP}). Die CP-Intensität I_{CP} ist durch folgende Gleichung gegeben [Hunger 2004]:

$$(5.2) \quad I_{CP}(\tau_{CP}) \propto \left(1 - \frac{T_{CP}}{T_{1\rho}}\right)^{-1} \left(e^{-\frac{\tau_{CP}}{T_{1\rho}}} - e^{-\frac{\tau_{CP}}{T_{CP}}} \right)$$

In Abbildung 5.11 sind die CP-Aufbaukurven des ^{13}C NMR-Signals bei 30 ppm exemplarisch dargestellt. Die Temperatur beeinflusst das CP-Verhalten dieser Komponente

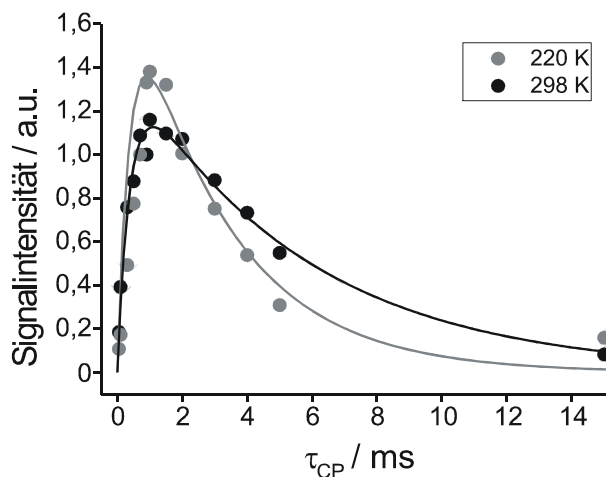


Abb. 5.11: CP-Aufbaukurven für das Signal bei 30 ppm im $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektrum der Zellwände von *S. turris* bei 220 K (grau) und 298 K (schwarz) (Die Linien stellen die Anpassung der Kurven dar.).

nur geringfügig. Die Signalintensität ist in den Spektren der gefrorenen Probe größer; der Grund hierfür wurde bereits oben erläutert. Diese Beobachtungen treffen auch für die CP-Aufbaukurven der anderen Signale zu.

Diskussion

In diesem Abschnitt wurde die Temperaturabhängigkeit der ^{13}C MAS NMR-Spektren von Zellwandproben der Kieselalge *Stephanopyxis turris* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich selbst bei sehr tiefen Temperaturen aufgenommene Spektren kaum von solchen unterscheiden, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Nur einige wenige Resonanzen werden bei 220 K verbreitert. Diese Beobachtung wurde sowohl in Experimenten mit direkter Anregung der ^{13}C -Kernspins als auch in ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Messungen gemacht. Daraus lässt sich schließen, dass ein Großteil der Biomoleküle in den gefriergetrockneten Zellwänden von *S. turris* bereits bei Raumtemperatur immobilisiert vorliegt und nur einige wenige bewegliche Komponenten existieren, deren Bewegungen durch Absenken der Temperatur ebenfalls eingeschränkt werden können. Diese Erkenntnis ist in Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt 5.1.2: In den gefriergetrockneten Zellwänden sind die eingeschlossenen Biomoleküle weitgehend unbeweglich, während in den hydratisierten Proben ihre Beweglichkeit zunimmt.

5.2 ^{15}N Festkörper-NMR-Spektroskopie an Diatomeenzellwänden

Neben den ^{13}C Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen können die organischen Moleküle im Silikat von Diatomeenzellwänden auch mithilfe von ^{15}N Festkörper-NMR-Experimenten detektiert und analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde, analog zur ^{13}C -Anreicherung, eine 20 l-Kultur der Kieselalge *Stephanopyxis turris* ^{15}N -angereichert. Die Stickstoffquelle stellte hierbei Natriumnitrat ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) dar. Nach sechs Tagen wurden die Zellen geerntet und die Zellwände isoliert. Für die Messungen wurde ein 4 mm-MAS-Rotor benutzt. Das ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Spektrum ist in Abbildung 5.12 dargestellt [Gröger 2008b]. Das dominierende Signal bei -260 ppm ist den Amid-Stickstoffen zuzuordnen, welches zum Beispiel durch Peptidbindungen entsteht. Im Bereich von -290 ppm bis -350 ppm befindet sich eine Signalgruppe, welche durch Amine zustande kommt. Hier liegen die Resonanzen der Polyamine. Da es sich hier um ein CP-Experiment handelt, ist eine quantitative Auswertung dieses Spektrums nicht möglich.

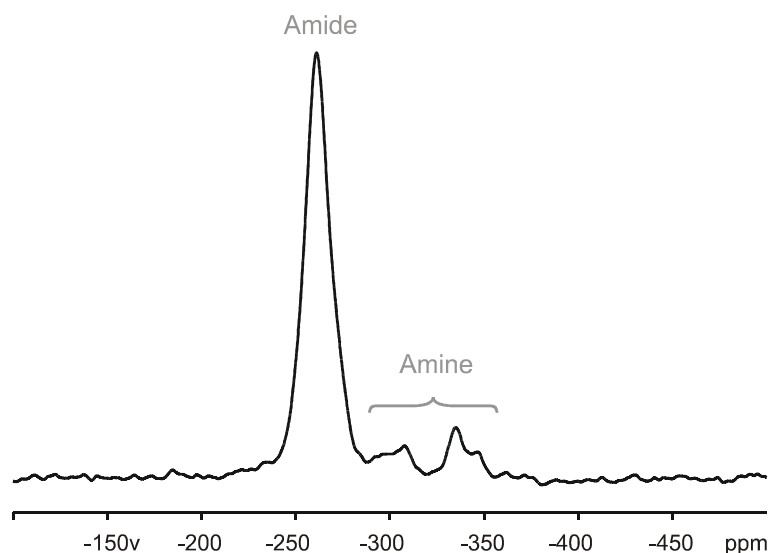


Abb. 5.12: ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Spektrum einer ^{15}N -angereicherten Zellwandprobe von *S. turris* (298 K, $\nu_r=8$ kHz, $\tau_{CP}=500$ μs , 20k scans).

Diskussion

Ein ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Spektrum von Diatomeenzellwänden wurde auch von Christiansen *et al.* [Christiansen 2006] und Tesson *et al.* [Tesson 2008] aufgenommen. Obwohl es sich in ihrem Fall um die Art *Thalassiosira pseudonana* handelte, stimmen die Spektren gut mit dem aus Abbildung 5.12 überein. Die Signale im Spektrum entstehen durch die Stickstoffatome der Peptidbindungen und Polyamine. Offensichtlich ist der Anteil an ^{15}N aus Amiden wesentlich größer als der Anteil an ^{15}N aus Aminen. Wie bereits oben erwähnt, können die Biomoleküle jedoch mithilfe dieses Spektrums nicht quantifiziert werden. Ebenso ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, welche Amin- oder Amid-Spezies in den Zellwänden vorliegen, da die Auflösung des Spektrums, trotz des sehr guten Signal/Rausch-Verhältnisses, sehr schlecht ist.

Die in Kapitel 5 diskutierten ^{13}C und ^{15}N Festkörper-NMR-Experimente an Zellwandproben von verschiedenen Kieselalgen ermöglichten die Quantifizierung des Anteils an fest mit dem Silikat verbundenem, organischem Material. Dieser variiert sehr stark von Art zu Art. So kann der Gehalt von Aminosäuren und Zuckern zwischen ca. 1 und 15 % der Gesamtmasse der Zellwand ausmachen. Die Anwesenheit von langkettigen Polyaminen, welche ein weiterer wichtiger Bestandteil der Frustel sind, konnte in dem ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Experiment nachgewiesen werden, jedoch war eine Quantifizierung dieser

Komponente nicht möglich. Im Allgemeinen sind die gezeigten Spektren aus vielen überlagerten Signalkomponenten unterschiedlicher Beweglichkeit zusammengesetzt, die die Vielfalt an organischem Material in den Zellwänden widerspiegeln. Durch Abkühlen oder Hydratisieren der Proben lässt sich Einfluss auf die Beweglichkeit der Komponenten nehmen, welche in gefriergetrockneten Zellwänden bei Raumtemperatur zum Großteil immobilisiert vorliegen. Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Experimente liefern somit nur einen Gesamtüberblick und keine detaillierten Informationen über die mit dem Silikatgerüst assoziierten Biomoleküle. Insbesondere können keine Aussagen hinsichtlich ihrer Nachbarschaft oder Wechselwirkungen mit dem Silikat getroffen werden. Die Signale von ^{13}C -Atomen in Si-O-C-Bindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Serinreste und den Silanolgruppen des Silikats würde man bei chemischen Verschiebungen von ca. 53 bis 55 ppm erwarten [Sahai 2001]. Aufgrund der schlechten Auflösung der ^{13}C NMR-Spektren in diesem Bereich kann die Existenz dieser Spezies folglich weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die Existenz von kovalenten Bindungen zwischen organischen Molekülen und den Silanolgruppen der Diatomeenzellwände, wie sie von Hecky *et al.* vorgeschlagen wurde [Hecky 1973], konnte auch in anderen Studien weder mithilfe der ^{29}Si Festkörper-NMR [Perry 1989], noch mithilfe von Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) [Heredia 2008] nachgewiesen werden. Viel wahrscheinlicher scheint aber eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrückenbindungen zu sein [Heredia 2008, Perry 1989, Swift 1992]. In einer aktuellen Veröffentlichung von Tesson *et al.* [Tesson 2008] wurden ausgedehnte Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen an *T. pseudonana*-Zellwänden durchgeführt. Die Behandlung der Zellwände mit H_2O_2 hatte zur Folge, dass noch mehr organisches Material von den Zellwänden abgelöst wurde und nur noch eine kleine Fraktion in den Messungen detektierbar war. Dieses kleine Molekül kann womöglich tiefer in die porösen Silikatstrukturen eindringen und dort organisches Material entfernen. An dieser Stelle sei jedoch auch auf die stark oxidierende Wirkung von Wasserstoffperoxid hingewiesen. Die ^{13}C NMR-Spektren der mit H_2O_2 gereinigten Zellwände wiesen schließlich eine sehr gute Auflösung auf, was eine Zuordnung von einzelnen Signalen ermöglichte. Auf diese Weise konnten Chitin und ungesättigte Fettsäuren als Hauptbestandteile identifiziert werden. Die Autoren schlugen vor, dass diese Fettsäuren aus dem Silicalemma stammen könnten. Chitin konnte bereits in extrazellulären Fibrillen mancher Diatomeen nachgewiesen werden [Gifford 1981, Herth 1978, Imai 2003]. Obwohl seine Funktion bislang nicht vollständig verstanden ist, gehen die Autoren davon aus, dass es nicht am Prozess der

Silikatpräzipitation beteiligt ist. In einer Studie von Chiovitti *et al.* [Chiovitti 2005] an vier verschiedenen Diatomeenarten wurde auch eine Vielzahl von Zuckern identifiziert, welche fest mit dem Silikat der Zellwände verbunden sind. Der Zuckergehalt ihrer Extrakte bewegte sich zwischen 0,9 % und 1,8 %. Diese Werte liegen im Bereich der hier bestimmten Werte (0,2 % bis 3,9 %). Es stellte sich heraus, dass Mannose der vorherrschende Zucker in den Polysacchariden aller untersuchter Spezies war. Auch wenn die biologische Funktion dieser Polysaccharide bisher unbekannt ist, spekulieren die Autoren, dass sulfatierte 1,3-glykosidisch verbundene Mannane an der Silikatpräzipitation der Diatomeen beteiligt sein könnten, in dem sie, genau wie Phosphationen, die Selbstaggregation von Polyaminen über elektrostatische Wechselwirkungen induzieren.

6 ²⁹Si NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Silikat-metabolismus von Diatomeen

Diatomeen nehmen das zur Synthese von neuen Zellwänden benötigte SiO₂ hauptsächlich in Form von löslicher, undissoziierter Monokieselsäure (Si(OH)₄) auf. Nur wenige Arten sind in der Lage, auch die dissoziierte Form (SiO(OH)₃⁻) ins Zellinnere zu transportieren [Martin-Jézéquel 2003]. Dieser Transport erfolgt durch Na⁺-abhängige Kieselsäuretransporter (*silicic acid transporter*, SIT), welche von Hildebrand *et al.* ausführlich untersucht und charakterisiert worden sind [Hildebrand 1997, Hildebrand 1998, Hildebrand 2003a, Hildebrand 2004] (siehe auch Abschnitt 2.5). Vor der Synthese einer neuen Valva im SDV kann die Kieselsäure in relativ großen Mengen in der Zelle konzentriert und gespeichert werden [Martin-Jézéquel 2000, Werner 1966]. Die Existenz intrazellulärer Kieselsäure wurde erstmals von Werner beschrieben [Werner 1966]. Die zytoplasmatische Kieselsäurekonzentration variiert stark je nach Art und Zeitpunkt im Zellteilungszyklus (19 bis 340 mM [Hildebrand 2004]) und überschreitet häufig die Löslichkeitsgrenze von Monokieselsäure (ca. 2 mM [Iler 1979]). Bis heute ist nicht genau erwiesen, wie diese hohen Konzentrationen im Zellinneren aufrechterhalten werden und eine unkontrollierte Autopolykondensationsreaktion verhindert wird. In der Literatur wurden bislang verschiedene Theorien diskutiert. Da Schmid und Schulz in elektronenmikroskopischen Studien im Cytoplasma mit dem SDV fusionierende Vesikel entdeckten, schlossen sie, dass diese die Kieselsäure speichern und transportieren könnten [Schmid 1979], was jedoch bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde in Erwägung gezogen, dass die Bildung von Organosilikat-Verbindungen oder einer vorkondensierten Form von Kieselsäure für die Aufrechterhaltung des löslichen Silikatspeichers verantwortlich ist [Azam 1974, Sullivan 1979]. So schlug Sumper vor, dass eine solche vorkondensierte Form als Polyamin-stabilisiertes Silikatsol vorliegen könnte [Sumper 2004].

Bisher wurden die unterschiedlichsten Methoden zur Untersuchung von Silikatspeichern angewandt. Mithilfe der Molybdatmethode lässt sich nach Zerstören der Zellen die Konzentration von Mono- und Dikieselsäure im Zellinneren bestimmen [Martin-Jézéquel 2000]. Dabei werden jedoch andere Formen gespeicherter Kieselsäure nicht erfasst. Eine weitere Methode besteht darin, das radioaktive Isotop ⁶⁸Ge als Analogon zu Silizium zu

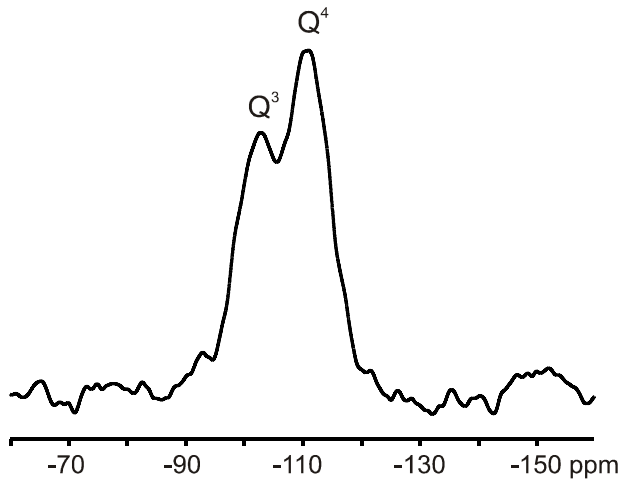


Abb. 6.1: ²⁹Si MAS NMR-Spektrum von Zellwänden der Kieselalge *Coscinodiscus granii* [Lutz 2005b].

nutzen und seine Aufnahme in die Zelle und seinen Einbau in die neue Zellwand zu verfolgen [Chisholm 1978]. Mithilfe dieser Techniken ließ sich die Konzentration an intrazellulärer Kieselsäure bestimmen, jedoch konnten keine Informationen hinsichtlich der Form, in welcher sie vorliegt und gespeichert wird, gewonnen werden. In diesem Zusammenhang ist die ²⁹Si NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet, intakte Zellen zu untersuchen und verschiedene Si-Spezies voneinander zu unterscheiden. Isolierte Diatomeenzellwände wurden bereits vielfach mithilfe der ²⁹Si Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht [Bertermann 2003, Christiansen 2006, Gendron-Badou 2003, Lutz 2005b]. Ein Beispiel für ein typisches Spektrum ist in Abbildung 6.1 dargestellt [Lutz 2005b]. Es zeigt das ²⁹Si MAS NMR-Spektrum von Zellwänden der Kieselalge *Coscinodiscus granii*. Die Signale können den so genannten Qⁿ-Einheiten zugeordnet werden. Die Qⁿ-Nomenklatur wird genutzt, um anzugeben, von wie vielen Siloxanbindungen (Si-O-Si) n ein Siliziumatom umgeben ist. Dies ist in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt. In den Zellwänden von *C. granii* überwiegen somit die Q⁴- und Q³-Gruppen, das heißt die höher kondensierten Formen des Silikats. Ganze Diatomeenzellen wurden erstmals in einer ²⁹Si Flüssigkeits-NMR-Studie untersucht [Kinrade 2002]. Die Autoren detektierten in einer synchronisierten *Navicula pelliculosa*-Kultur neben einem starken Monokieselsäuresignal bei -71 ppm ein weiteres, sehr schwaches Signal bei -131 ppm, welches einem Organosilikatkomplex zugeordnet wurde. Jedoch können mithilfe von Flüssigkeits-NMR-Experimenten keine immobilisierten Kieselsäurespezies detektiert werden. Aus diesem Grund bietet es sich an, Festkörper-NMR-spektroskopische Messungen unter MAS-Bedingungen an intakten Diatomeenzellen durchzuführen, um jede Form von ²⁹Si in den Zellen erfassen zu können. In diesem Zusammenhang entwickelten Gröger *et al.* eine neue Methodik zur Analyse der Si-Spezies

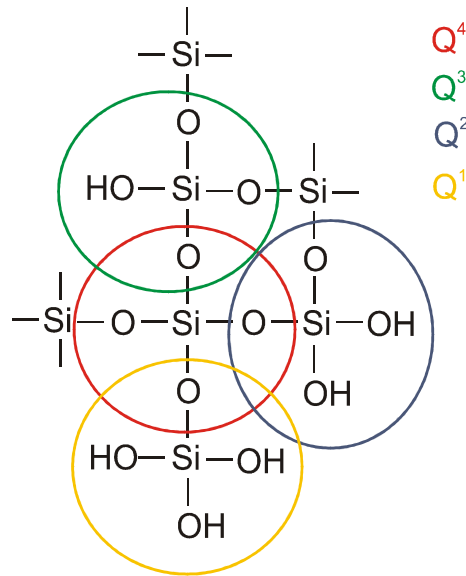


Abb. 6.2: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Qⁿ-Nomenklatur der Silikate.

in ganzen, nicht behandelten Diatomeenzellen mithilfe der ²⁹Si Festkörper-NMR-Spektroskopie [Gröger 2008a, Gröger 2008d]. In diesen Experimenten wurde eine dichte, mit ²⁸Si angereicherte Kultur der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* synchronisiert, in dem sie 24 Stunden lang ausgehungert, das heißt ohne Kieselsäure im Medium, kultiviert wurde. Nach Zugabe des NMR-aktiven Isotops ²⁹Si in Form von Na₂SiO₃ wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen, um den Einbau von ²⁹Si in die neuen Zellwände nachzuvollziehen. Die Zellen dieser Proben wurden in die MAS-Rotoren zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur NMR-Messung bei -20 °C gelagert. Diese tiefgefrorenen Proben wurden schließlich mithilfe von ²⁹Si Festkörper-NMR-Messungen bei -2 °C untersucht. Die resultierenden Spektren zeigten die typischen Signale der Qⁿ-Gruppen des Silikats der Zellwände: Mit fortschreitender Zeit stiegen die Signalintensitäten an und das Intensitätsverhältnis von Q⁴- zu Q³-Gruppen wuchs. Diese Ergebnisse spiegelten die Synthese neuer Gürtelbänder und Zellwände und die Bildung von immer höher kondensiertem SiO₂ wider. In den Spektren wurden dagegen keine Signale von stabilen Organosilikatkomplexen detektiert, was darauf hindeutet, dass in der Kieselalge *T. pseudonana* Monokieselsäure in vorkondensierter Form gespeichert werden könnte, deren NMR-Signale im Bereich der Q-Gruppen zu finden wäre.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente knüpfen an die oben beschriebenen Ergebnisse an. Mithilfe der von Gröger *et al.* [Gröger 2008a] entwickelten Methode soll eine weitere Diatomeenart hinsichtlich eines möglichen Silikatspeichers ²⁹Si Festkörper-NMR-spektroskopisch untersucht werden. Die intrazellulären Kieselsäurespeicher in *T. pseudonana*-Zellen weisen nur sehr kleine Stoffmengen von 0,9

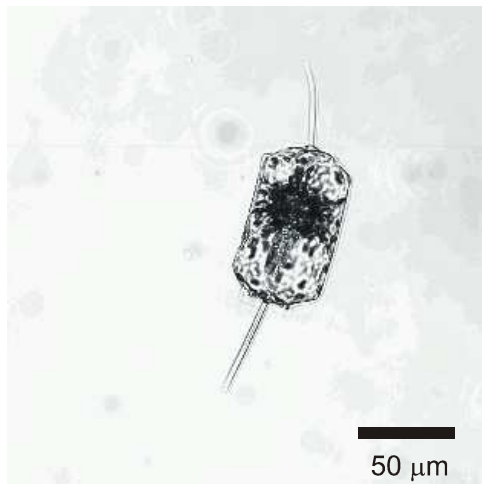


Abb. 6.3: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Kieselalge der Art *Ditylum brightwellii*. Der Skalierungsbalken entspricht 50 µm.

bis 4,6 fmol/Zelle auf [Martin-Jézéquel 2000]. Für die hier beschriebenen Versuche wurde deshalb die Kieselalge *Ditylum brightwellii* (Abbildung 6.3) ausgewählt, da eine Zelle dieser Art in der Lage ist, bis zu 12,3 pmol Kieselsäure zu speichern [Chisholm 1978, Martin-Jézéquel 2000]. Dies könnte die Detektion des intrazellulären Siliziums in den NMR-Experimenten erleichtern. Zusätzlich weist diese Art eine weitere Eigenschaft auf, welche sich positiv auf die Untersuchungen auswirken kann: Chisholm *et al.* zeigten, dass sich *D. brightwellii*-Zellen synchron teilen, wenn die Kultur Tag/Nacht-Zyklen ausgesetzt ist [Chisholm 1978]. Außerdem weisen sie einen strengen Tag/Nacht-Rhythmus auf und teilen sich nur während der Lichtperiode. In der Dunkelperiode dagegen findet nur Zellwachstum, das heißt die Synthese von neuen Gürtelbändern, statt. Die Kieselsäureaufnahme erfolgt jedoch sowohl bei Tag als auch bei Nacht [Chisholm 1978, Eppley 1967]. Dies bedeutet, dass der Siliziumspeicher am Ende der Dunkelperiode –also kurz vor der ersten Zellteilung bei Licht– seine maximale Größe erreicht haben sollte.

6.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für *Ditylum brightwellii*

Vor der Durchführung des eigentlichen Versuchs zum Silikatmetabolismus von *D. brightwellii*, waren einige Experimente notwendig, um die Versuchsbedingungen für diese Art zu optimieren. Hierzu wurden 1 l-Kulturen ohne Anreicherung eines Si-Isotops gezüchtet. Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch beobachtet. Die Zelldichte wurde durch Auszählen der Zellen mithilfe einer Sedgewick-Rafter-Zählkammer bestimmt.

In einem ersten Experiment wurde das Zellwachstum einer *D. brightwellii*-Kultur über einen längeren Zeitraum beobachtet. Dies ergab, dass Zellen bei pH-Werten größer als 9

und bei hohen Zelldichten von mehr als 6000 Zellen/ml sterben. Dies ließ sich unter dem Mikroskop leicht an zerbrochenen oder deformierten Zellen erkennen.

Für die ²⁹Si Festkörper-NMR-Messungen müssen die Zellen in die Rotoreinsätze zentrifugiert werden, um eine möglichst hohe Konzentration im Rotor zu erreichen. Die Zellen sind dabei starken Kräften ausgesetzt. Deshalb muss ausgeschlossen werden, dass sie während dieses notwendigen Arbeitsschritts zerbrechen. Hierfür wurden mehrere Proben einer dichten, gesunden Zellkultur durch Filtration geerntet und unter unterschiedlichen Bedingungen (Zahl der Umdrehungen pro Minute (rpm) und Dauer) zentrifugiert. Diese Proben wurden anschließend in frisches Medium gegeben, um zu kontrollieren, ob die Zellen wieder anwachsen. Diese Experimente ergaben, dass eine Zentrifugation von 2 min bei 2000 rpm ausreicht, um die Zellen in die Rotoreinsätze zu zentrifugieren. Unter dem Mikroskop waren keine beschädigten Zellen erkennbar und die Kultur wuchs in frischem Medium sofort weiter. Das bedeutet, dass die Zellen nach einer Probenpräparation unter den hier genannten Bedingungen intakt sind.

In einem weiteren Experiment wurden der Startzeitpunkt und die Dauer der Aushungerungsphase ermittelt. Dazu wurde eine (nicht angereicherte) *Ditylum brightwellii*-Kultur unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie von Gröger *et al.* [Gröger 2008a] beschrieben, gezüchtet. Das heißt, die Aushungerungsphase begann, als die Kieselsäure im Medium aufgebraucht war. Nach 24 Stunden siliziumfreien Wachstums wurde frische Kieselsäure in das Medium gegeben. Dieses Vorgehen erwies sich jedoch für die hier verwendete Art als ungünstig. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Kieselsäure im Meerwassermedium aufgebraucht war, waren bereits viele Zellen deformiert oder geplatzt. Ebenso stellte sich heraus, dass eine 24-stündige Aushungerungsphase für *D. brightwellii*-Zellen zu lang ist, da dies ebenfalls bewirkt, dass viele Zellen vor Versuchsende sterben. Aus diesem Grunde wurde die Algenkultur für den Versuch in der vorliegenden Arbeit bei einer Zelldichte von ca. 4000 Zellen/ml in frisches, siliziumfreies Medium umgesetzt. Frisches Silizium in Form von Na₂SiO₃ wurde bereits nach einer Aushungerungsphase von 12 Stunden zugegeben. Diese Versuchsbedingungen erwiesen sich als optimal.

In einem letzten Experiment wurde schließlich überprüft, ob die Phase des Aushungerns besser tagsüber oder über Nacht stattfinden soll. Für diesen Versuch wurden zwei 1 l-Kulturen bei einer Zelldichte von ca. 4000 Zellen/ml in frisches siliziumfreies Medium überführt und 12 Stunden bei Tag (Kultur 1) bzw. bei Nacht (Kultur 2) ausgehungert. Nach Zugabe von Si erfolgte die Probennahme je nach Kultur bei Nacht (Kultur 1) oder bei Tag (Kultur 2). Die Wachstumskurven dieses Versuchs sind in Abbildung 6.4 dargestellt. Sie

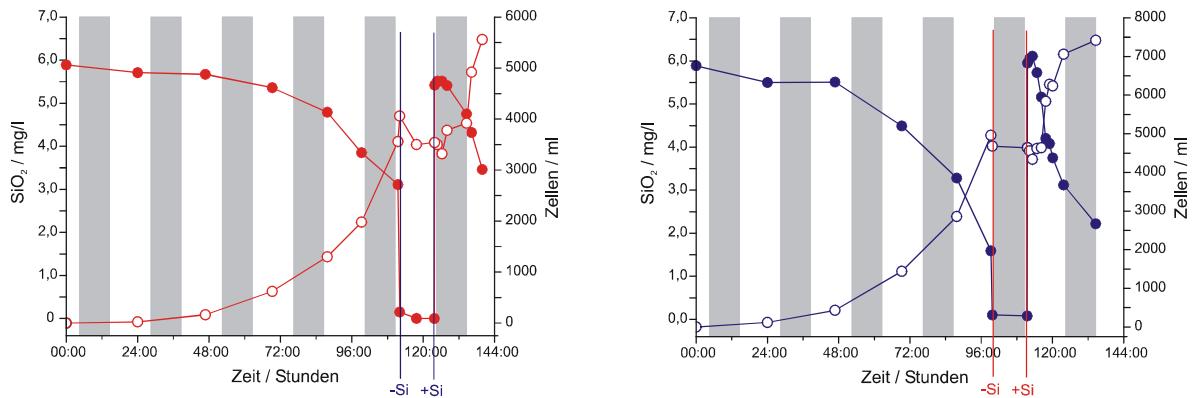


Abb. 6.4: Wachstumskurven zweier *D. brightwellii*-Kulturen: Der Verlauf der Zelldichte (ungefüllte Kreise) und des Silikatgehalts im Medium (ausgefüllte Kreise) sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Das Umsetzen der Kultur in Si-freies Medium und die Zugabe von Si sind durch senkrechte Linien gekennzeichnet. Diese Aushungerungsphase fand bei Tag (Kultur 1, linke Graphik) oder bei Nacht (Kultur 2, rechte Graphik) statt. Die senkrechten, grauen Balken markieren die Nachtphasen.

veranschaulichen den Verlauf der Zelldichte und des Silikatgehalts im Medium in Abhängigkeit der Zeit. Das Umsetzen der Kulturen in frisches, siliziumfreies Medium, sowie die Zugabe von Silizium nach 12 Stunden ist durch senkrechte Linien ebenfalls dargestellt. Diese Wachstumskurven bestätigen die oben genannten Eigenschaften von *D. brightwellii*: Beide Kulturen beginnen sofort nach der Aushungerungsphase Kieselsäure aufzunehmen, unabhängig davon, ob das Aushungern tagsüber oder über Nacht stattgefunden hat. Dies äußert sich in der starken Abnahme des SiO_2 -Gehalts im Meerwassermedium. Ganz unterschiedlich verhält sich jedoch die Zelldichte der beiden Kulturen: In Kultur 1 bleibt die Zellzahl während der sich an die Si-Zugabe anschließenden Dunkelphase relativ stabil. Erst bei Licht beginnt die Zellteilung. Dagegen beginnt in Kultur 2 nach Si-Zugabe bereits nach wenigen Stunden die Zellteilung, da sich diese Kultur nun in der Lichtphase befindet. Für die ^{29}Si Festkörper-NMR-Messungen wurden deshalb Zellen einer tagsüber ausgehungerten Kultur verwendet, welche nach Si-Zugabe in der anschließenden Nachtphase große Mengen Kieselsäure aufnehmen können, ohne sich jedoch zu teilen.

6.2 Untersuchung der zeitabhängigen Si-Aufnahme von *D. brightwellii*

Schließlich wurde das Experiment zum Silikatmetabolismus von *D. brightwellii* durchgeführt. Um nach Silizium-Zugabe in regelmäßigen Abständen Proben von jeweils 21 nehmen zu können, wurde eine 20 l-Kultur angesetzt. Als Silizium-Quelle diente

zunächst NMR-inaktives $\text{Na}_2^{28}\text{SiO}_3$. Erst nach dem Aushungern wurde $\text{Na}_2^{29}\text{SiO}_3$ zugesetzt, um die Aufnahme von ^{29}Si in die Zellen verfolgen zu können. Die Proben wurden wie oben beschrieben in der Dunkelphase durch Filtration geerntet, mehrfach mit siliziumfreiem Meerwassermedium gewaschen, in die Rotoreinsätze zentrifugiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu den NMR-Messungen wurden die Proben bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

6.2.1 Wachstumskurve

Abbildung 6.5 zeigt die Wachstumskurve des Experiments. Wieder sind die Abnahme der SiO_2 -Konzentration (rot) und der Anstieg der Zelldichte (blau) im Verlauf des Versuchs dargestellt. Nach Umsetzen der Algen in siliziumfreies Medium verringert sich die Zelldichte geringfügig. Dieser Verlust ist auf die experimentelle Durchführung

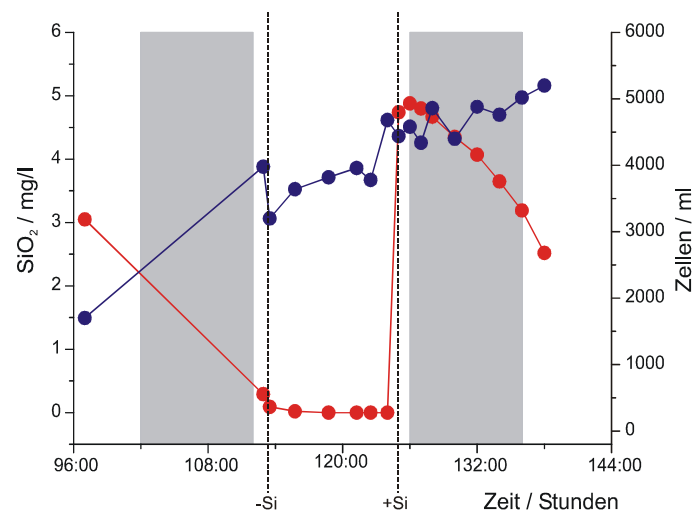
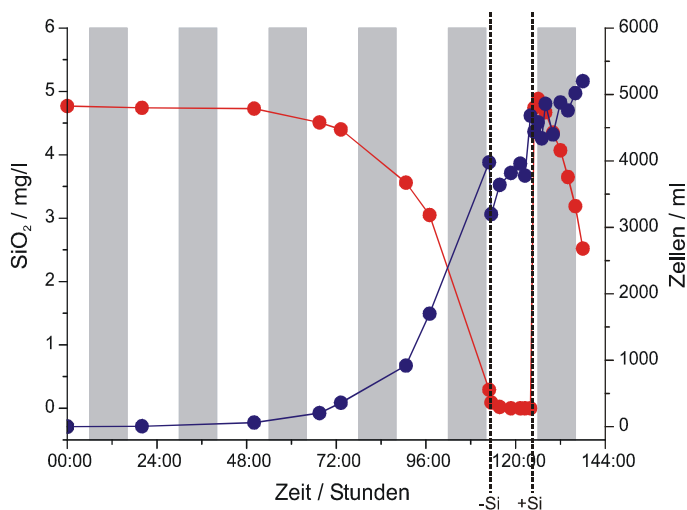


Abb. 6.5: Wachstumskurve der 20l-Kultur von *D. brightwellii*. Es sind die Zelldichte (blau) und der Silikatgehalt im Medium (rot) im Verlauf des Versuchs dargestellt. Das Umsetzen der Kultur in Si-freies Medium und die Zugabe von ^{29}Si sind durch senkrechte, gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die grauen Balken markieren die Nachtphasen. Die untere Graphik vergrößert den Ausschnitt zwischen 96:00 und 138:00 Stunden.

zurückzuführen. Im Zeitraum der Probennahme nach ²⁹Si-Zugabe (von 125:00 bis 138:00) vermehren sich die Zellen kaum, jedoch sinkt der SiO₂-Gehalt von 4,9 auf 2,5 mg/l. Da keine Zellteilung und somit auch keine Synthese neuer Zellwände stattfindet, kann die aufgenommene Kieselsäure nur zur Herstellung neuer Gürtelbänder für das Zellwachstum genutzt werden, oder im Zellinneren bis zum Beginn der Tagphase gespeichert werden.

6.2.2 ²⁹Si Festkörper-NMR-Spektroskopie und Quantifizierung der Signale

Anschließend wurden die eingefrorenen Diatomeenzellen ²⁹Si Festkörper-NMR-spektroskopisch vermessen. Hierfür wurden die verschlossenen Rotoreinsätze in 7 mm-MAS-Rotoren geschoben. Die Messungen erfolgten bei 265 K, um zu gewährleisten, dass die Proben kontinuierlich gefroren bleiben. Die Spektren bei direkter Anregung der ²⁹Si-Kerne sind in Abbildung 6.6 dargestellt. Sie spiegeln das Fortschreiten der Aufnahme und des Einbaus von ²⁹Si in die Zellen wider. Erst einige Stunden nach ²⁹Si-Zugabe sind die typischen Signale der Q-Gruppen des Silikats erkennbar. Die Intensität der Signale steigt im Lauf des Experiments. Da sich die Zellen in der Nacht strecken, sind diese Signale dem Silikat der Gürtelbänder zuzuordnen. Ein deutlicher Anstieg der Signalintensitäten ist erst beim letzten Spektrum zu verzeichnen. Dieses stammt von einer Probe, die 13 Stunden nach Silizium-Zugabe genommen wurde und deren Zellen bereits zwei Stunden belichtet worden sind. Hier trägt das Silikat neu gebildeter Valven stark zu dem beobachteten Signal bei. Dieses Ergebnis entspricht im Wesentlichen dem von Gröger *et al.* [Gröger 2008a]. Weitaus interessanter ist jedoch das schmale Signal bei -71 ppm. Aufgrund seiner chemischen Verschiebung kann es Monokieselsäure zugeordnet werden. Dieses Signal ist in allen aufgenommenen Spektren sichtbar, außer im Spektrum der Nullprobe, welche vor der Zugabe von ²⁹Si genommen wurde. Da die Zellen nach Probennahme abfiltriert und mehrere Male mit siliziumfreiem Medium gewaschen wurden, kann die detektierte Kieselsäure in dieser hohen Konzentration keine Verunreinigung aus dem Medium sein, sondern muss sich tatsächlich im Zellinneren befinden.

Mithilfe dieser Spektren und der Messung einer Standardprobe lassen sich, genau wie in Abschnitt 5.1.1 für die organischen Bestandteile der Zellwände beschrieben, die ²⁹Si-Atome, welche für die Entstehung der Signale verantwortlich sind, quantifizieren. Als Standardprobe diene reines SiO₂. So konnte für jeden Zeitpunkt der Anteil an Silizium bestimmt werden, welcher von den Zellen bis dahin aufgenommen wurde. In diese Berechnung wurden alle ²⁹Si NMR-Signale der Spektren einbezogen, das heißt die Signale der Q-Gruppen und das Signal der Kieselsäure. Der in den Wachstumskurven dargestellte

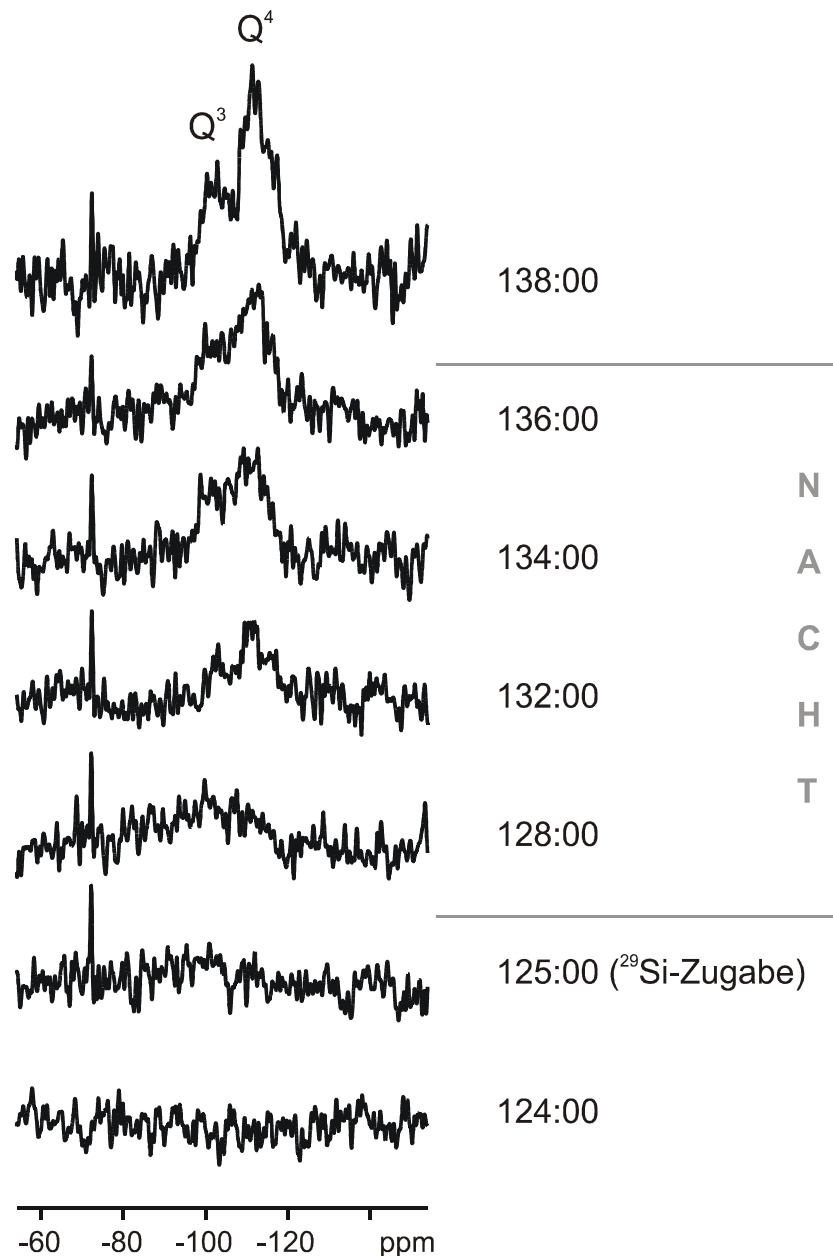


Abb. 6.6: ^{29}Si Festkörper-NMR-Spektren von ganzen, gefrorenen *D. brightwellii*-Zellen einer Si-ausgehungerten Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten nach ^{29}Si -Zugabe. Die Zeiten in der Graphik (in Stunden) beziehen sich auf die Wachstumskurve in Abb. 6.5. Die grauen Linien markieren die Dunkelphase im Tag/Nacht-Zyklus (265 K, 3500 scans, $\nu_r=3,5$ kHz).

SiO_2 -Gehalt im Meerwassermedium (siehe Abbildung 6.5, rote Kurve) wurde mithilfe eines Molybdat-Silikattests bestimmt. Auch hiermit lässt sich bestimmen, wie viel Silizium bis zu jeder Probennahme aus dem Medium in die Zellen aufgenommen worden war. Zur Kontrolle wurden die mit diesen beiden Methoden bestimmten Werte verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.7 graphisch dargestellt. Die Werte stimmen sehr gut überein.

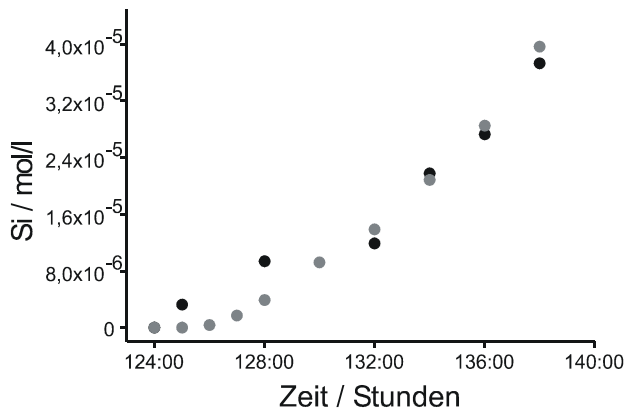


Abb. 6.7: Konzentration des aus dem Medium aufgenommenen Si zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs. Es sind die mithilfe der NMR-Spektren (schwarz) und des Silikattests (grau) bestimmten Werte dargestellt. Die Unterschiede zu Beginn des Versuchs ergeben sich durch die erschwerte Integration der NMR-Signale aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses der Spektren.

Lediglich zu Beginn der Kurve ergeben sich Unterschiede. Dies ist jedoch auf das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis und die noch sehr schwachen Q-Gruppen-Signale in diesen NMR-Spektren zurückzuführen, weshalb ihre Integrale einen großen Fehler aufweisen. Trotzdem lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass sich das gesamte aus dem Medium aufgenommene Silizium tatsächlich im Inneren oder in den Gürtelbändern oder Schalen der Zellen befindet und in den NMR-Messungen vollständig detektiert wird.

Durch Integration des Monokieselsäuresignals allein lässt sich auch bestimmen, wie groß der Gehalt an Monokieselsäure im Zellinneren ist. Auch wenn diese Bestimmung aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses mit einem großen Fehler behaftet sein kann, ist eine eindeutige Tendenz erkennbar (Abbildung 6.8): Direkt nach der Zugabe von ²⁹Si ist der Gehalt von Kieselsäure im Zellinneren am größten. Das bedeutet, dass die Zellen nach dem Aushungern sehr schnell (zwischen ²⁹Si-Zugabe und Filtrieren der Zellen vergingen ca. 10-15 min) Kieselsäure aufnehmen. Während der Nachtphase (126:00 bis 136:00 Stunden) bleibt der Kieselsäuregehalt in etwa konstant (0,14 pmol/Zelle). Sobald die

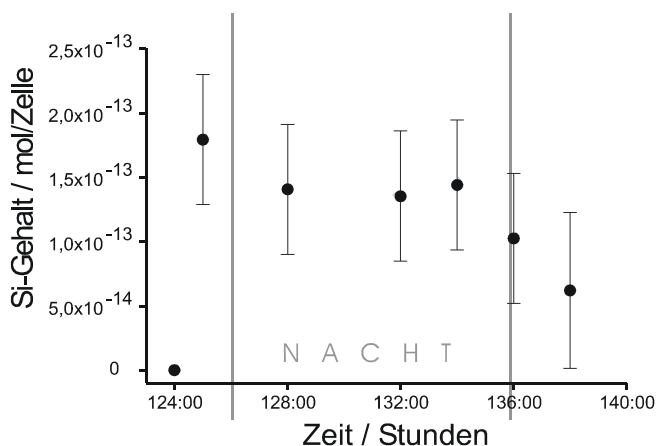


Abb. 6.8: Mithilfe der NMR-Spektren bestimmter Kieselsäuregehalt der Zellen im Verlauf des Experiments. Die senkrechten grauen Linien markieren die Nachtphase.

Kultur wieder belichtet wird und Zellteilung stattfindet, verkleinert sich der Speicher in der Zelle. Es sei darauf hingewiesen, dass die Stoffmenge der Kieselsäure pro Zelle unter der Annahme bestimmt wurde, dass sich bei jeder Messung 4000000 Zellen im Rotor befanden. Hiermit lässt sich auch die Kieselsäurekonzentration im Zellinneren während der Dunkelphase bestimmen. Geht man davon aus, dass die Zellen ein Volumen von 6000 bis 175000 μm^3 [Chisholm 1978] aufweisen, erhält man eine Kieselsäurekonzentration von 0,8 bis 23 mM.

6.2.3 Versuchsbegleitende mikroskopische Untersuchungen

Anhand der aufgetragenen Zelldichte in der Wachstumskurve (siehe Abbildung 6.5) ließ sich schließen, dass sich die Zellen während der Nachtphase, in der die Probennahme stattfand, kaum vermehrten. Um diese Aussage überprüfen zu können, wurden parallel zum Versuch mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde eine 13 ml-Kultur von *D. brightwellii* -identisch wie im Hauptexperiment- in der Tagphase 12 Stunden lang ausgehungert. Zum Zeitpunkt der Silizium-Zugabe wurde zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff „LysoTracker Yellow-HCK-123“ zugegeben. Dieser hat die Eigenschaft, sich in Zellkompartimente mit niedrigem pH-Wert, also auch in das SDV, einzulagern und schließlich in die entstehenden Silikatstrukturen eingebaut zu werden [Desclés 2008]. Abbildung 6.9 zeigt die verschiedenen Stadien der Zellen im Verlauf des Versuchs. Die Fluoreszenz der Chloroplasten ist in rot dargestellt, die Fluoreszenz des Farbstoffs in grün. Die schwachen grünen Signale im Zellinneren entstehen ebenfalls durch fluoreszierende Chloroplasten bzw. durch die zusätzliche Anreicherung des Farbstoffs in anderen intrazellulären Vesikeln, wie zum Beispiel der Vakuole [Desclés 2008]. Das erste Bild zeigt eine unmarkierte Zelle direkt nach Si-Zugabe (125:00 Stunden). Bereits wenige Stunden später (127:00 Stunden) werden in einigen Zellen erste Gürtelbänder synthetisiert. Je mehr Zeit vergeht, desto mehr Zellen mit fluoreszierenden Gürtelbändern konnten detektiert werden. Reife *D. brightwellii*-Zellen besitzen 20 bis 45 Gürtelbänder [Li 1985]. Im dritten Bild ist zu erkennen, dass die Zellteilung bei wenigen Zellen doch bereits in der Dunkelphase einsetzt, nämlich neun Stunden nach Silizium-Zugabe (134:00 Stunden). Zwei bis drei Stunden später, in der Lichtphase, sind schließlich sehr viele sich teilende Zellen zu beobachten und auch einige wenige, die schon geteilt sind, also eine ganze fluoreszierende Valva besitzen (136:00 Stunden). Die letzte Aufnahme wurde einige Stunden nach Ende des Versuchs aufgenommen. Sie zeigt eine Zelle, welche sich nach Si- und Farbstoffzugabe bereits zum zweiten Mal teilt. Auch wenn der hier beobachtete

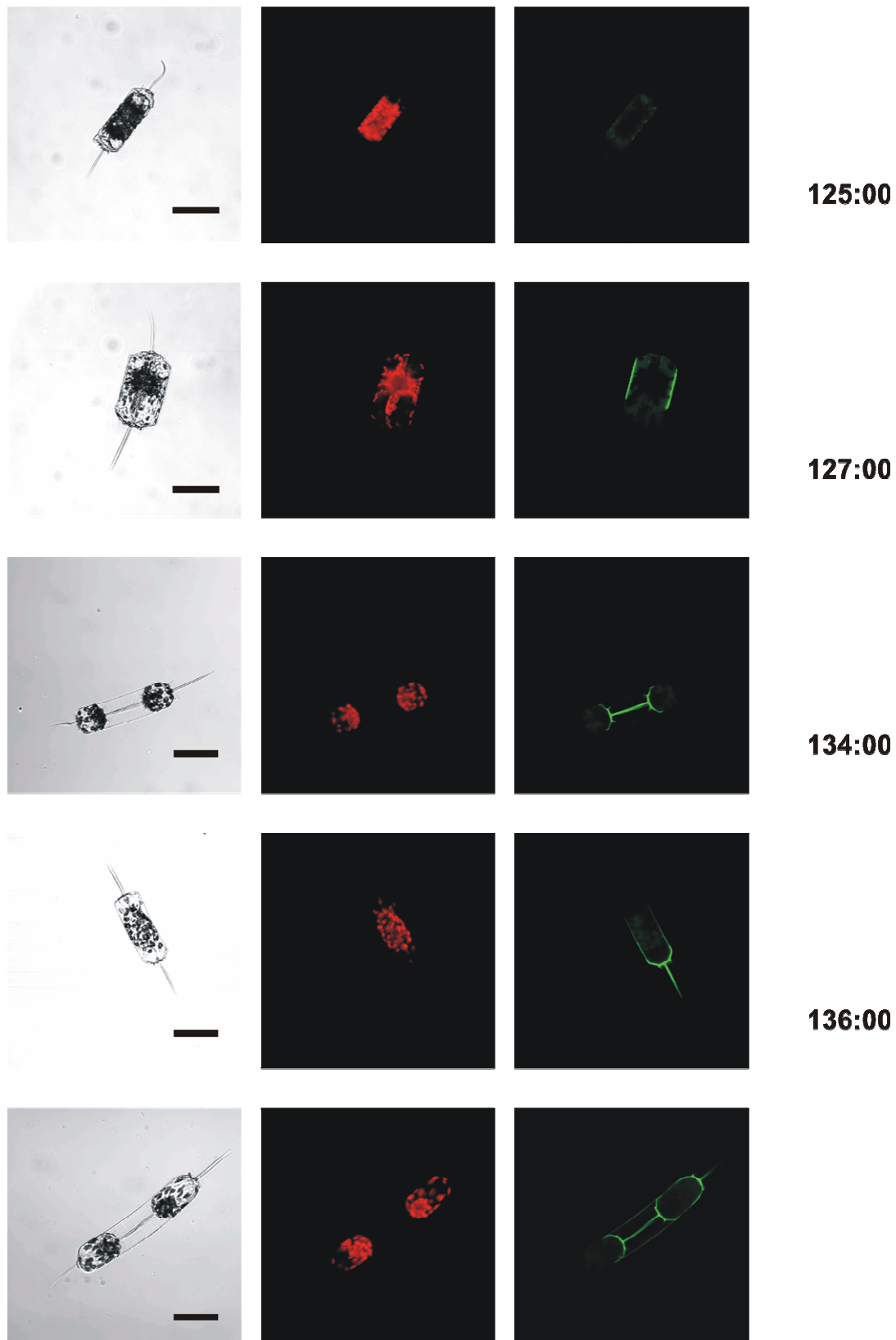


Abb. 6.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *D. brightwellii*-Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Zeiten (in Stunden) entsprechen denen der Wachstumskurve in Abbildung 6.5. Die Fluoreszenz der Chloroplasten ist rot dargestellt, die des Farbstoffs HCK-123 in neu entstandenen Silikatstrukturen grün (Skalierungsbalken: 50 μm). Die letzte Aufnahme entstand einige Stunden nach Versuchsende und zeigt eine Zelle, die sich nach Si- und Farbstoffzugabe bereits zum zweiten Mal teilt.

Tag/Nacht-Rhythmus hinsichtlich der Zellteilung nicht ganz so streng zu sein scheint, wie in der Literatur beschrieben [Chisholm 1978, Eppley 1967], zeigen diese Ergebnisse, dass die Annahme weitgehend zutrifft und nur ein geringer Anteil der nachts aufgenommenen Kieselsäure zur Synthese neuer Valven am Ende der Nachtphase genutzt wird.

6.3 Flüssigkeits-NMR-spektroskopische Untersuchungen

Da für das im vorangehenden Abschnitt beschriebene Experiment in regelmäßigen Abständen Proben von der *D. brightwellii*-Kultur genommen werden mussten, war nicht ausreichend Material vorhanden, um daran weitere Experimente, zum Beispiel mithilfe der ²⁹Si Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie, durchzuführen. Aus diesem Grund wurde der Versuch ein weiteres Mal wiederholt, jedoch wurde die Kultur nur am Ende der Nachtphase untersucht (bei 136:00 Stunden). Zu diesem Zeitpunkt wurde wie oben beschrieben eine Probe für die Festkörper-NMR präpariert. Zusätzlich wurden drei Proben für die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie vorbereitet. Hierfür wurden die Zellen durch Filtration geerntet, mehrmals mit siliziumfreiem Meerwassermedium gespült und für die erste Probe möglichst dicht zur sofortigen Messung in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Für eine weitere Probe wurden die gespülten Zellen mithilfe eines Ultraschallstabs aufgeschlossen und die Zellwände abzentrifugiert. Der grün-bräunliche Überstand, der die zytoplasmatischen Bestandteile enthielt, wurde ebenfalls ²⁹Si NMR-spektroskopisch vermessen. Zusätzlich wurde eine Probe Meerwassermedium ohne Zellen untersucht. Die Spektren dieser Proben sind in Abbildung 6.10 dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, dass sich die Spektren in der Zahl der aufaddierten Einzelerperimente (*scans*) voneinander unterscheiden. Das Festkörper-NMR-Spektrum (Abb. 6.10 a) bestätigt die Ergebnisse aus Abschnitt 6.2. Neben den Q-Gruppen-Signalen des Silikats ist wieder ein deutliches Signal von Monokieselsäure vorhanden. Da für dieses Experiment eine größere Zahl von *scans* durchgeführt wurde, ist das Signal/Rausch-Verhältnis gegenüber der ersten Spektren (siehe Abb. 6.6) deutlich verbessert. In den ²⁹Si Flüssigkeits-NMR-Spektren der ganzen (Abb. 6.10 b) und der aufgeschlossenen Zellen (Abb. 6.10 c) ist bei -71 ppm jeweils wieder ein starkes Signal von Monokieselsäure zu beobachten. Dieses ist im Spektrum der ganzen Zellen gegenüber dem der aufgeschlossenen Zellen verbreitert. Offensichtlich ist die Beweglichkeit der Kieselsäure im Zellinneren eingeschränkt, was zu einer Vergrößerung der rotatorischen Korrelationszeit τ_c führt (vergleiche Abschnitt 4.3) und eine Verbreiterung des Signals hervorruft. Darüber hinaus spielt womöglich auch die schlechtere Homogenität des Magnetfeldes („*shim*“) eine Rolle, da die Probe der ganzen

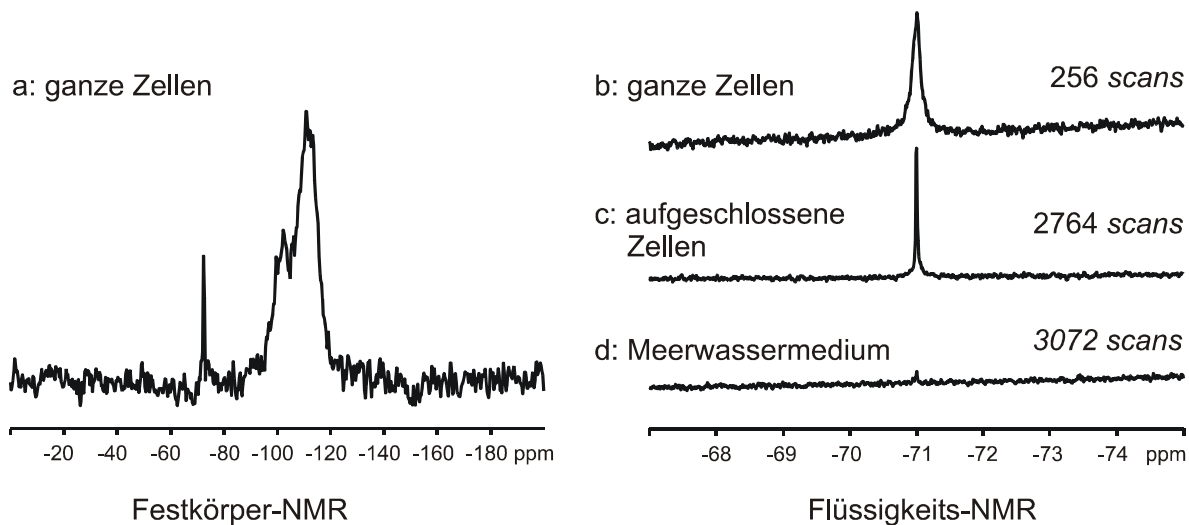


Abb. 6.10: ²⁹Si Festkörper- (links) und Flüssigkeits-NMR-Spektren (rechts) von Proben einer ausgehungerten und anschließend ²⁹Si-angereicherten *D. brightwellii*-Kultur am Ende der Nachtphase. Es sind Spektren von ganzen Zellen (a, b), aufgeschlossenen Zellen (c), und filtriertem Meerwassermedium (d) gezeigt (Festkörper-NMR: 265 K, 5830 scans, $\nu_r=3,5$ kHz, Flüssigkeits-NMR: 292 K, 256 (b), 2764 (c), 3072 (d) scans).

Zellen im Vergleich zur aufgeschlossenen Probe weniger homogen ist und sich im Laufe der Zeit am Boden des NMR-Röhrchen absetzt. Dagegen ist dieses Signal im Spektrum des Meerwassermediums (Abb. 6.10 d) sehr klein. Diese starken Konzentrationsunterschiede bestätigen, dass die Monokieselsäure in den Spektren der Zellen keine Verunreinigung aus dem Medium ist, sondern es sich tatsächlich um aufgenommene Kieselsäure handeln muss. Mithilfe dieser Spektren kann allerdings keine Aussage über den Gehalt an Monokieselsäure in den *D. brightwellii*-Zellen getroffen werden, da nicht bekannt ist, wie viele Zellen sich in den NMR-Röhrchen befanden.

Diskussion

Anhand von ²⁹Si NMR-spektroskopischen Messungen wurde in diesem Kapitel gezeigt, dass die Kieselalge *Ditylum brightwellii* Silizium in Form von Monokieselsäure speichert. Dies wurde sowohl Flüssigkeits- als auch Festkörper-NMR-spektroskopisch nachgewiesen. Die Kieselsäurekonzentration in einer Zelle konnte ebenfalls bestimmt werden. Der ermittelte Wert von 0,14 pmol/Zelle, was je nach Zellvolumen einer Konzentration von 0,8 bis 23 mM entspricht (siehe Abschnitt 6.2.2), liegt deutlich unter der in der Literatur für diese Art beschriebenen intrazellulären Kieselsäurekonzentration von 0,07 bis 2,0 M oder 12,3 pmol/Zelle [Chisholm 1978]. Womöglich war der Kieselsäurespeicher der Zellen in

dem hier beschriebenen Experiment nicht vollständig gefüllt. Die Polykondensation von Monokieselsäure beginnt bei Konzentrationen von ca. 2 mM [Iler 1979]. Das bedeutet, dass die hier bestimmten intrazellulären Kieselsäurekonzentrationen durchaus über dieser Löslichkeitsgrenze liegen, auch wenn sie niedriger als erwartet sind. Aus diesem Grund müssen die Zellen in der Lage sein, diese Moleküle auf irgendeine Weise zu stabilisieren. Dies könnte zum Beispiel durch die Anlagerung von intrazellulären organischen Molekülen gewährleistet sein [Martin-Jézéquel 2000, Sullivan 1979, Werner 1966]. Theoretische Berechnungen haben gezeigt, dass sich die ²⁹Si chemischen Verschiebungen vieler solcher wasserstoffbrückengebundenen Komplexe kaum von der der freien Monokieselsäure unterscheiden würden [Sahai 2002, Sahai 2004], weshalb mithilfe der gezeigten ²⁹Si NMR-Spektren keine genauere Aussage über die Natur eventuell vorliegender stabilisierender organischer Moleküle getroffen werden kann. Jedoch kann mithilfe der Halbwertsbreite des Kieselsäuresignals im Spektrum der aufgeschlossenen Zellen (siehe Abbildung 6.10c) ($\Delta\nu_{1/2} = 1,69$ Hz) die Größe eines solchen Komplexes abgeschätzt werden. Die Linienbreite erlaubt die Bestimmung der transversalen Relaxationszeit T_2 ($\Delta\nu_{1/2} = (\pi \cdot T_2)^{-1}$) [Cavanagh 1996]. Unter der Annahme, dass die dipolare Wechselwirkung des Siliziumatoms der Kieselsäure zu den vier benachbarten Protonen der OH-Gruppen den größten Beitrag zur T_2 -Relaxation liefert, lässt sich die Relaxationsrate wie folgt vereinfacht darstellen:

$$(6.1) \quad \frac{1}{T_2} = 4 \cdot \frac{1}{T_2^{DD}}$$

Die Relaxationsrate durch heteronukleare Dipol-Dipol-Wechselwirkung T_2^{DD} ist dabei durch folgende Gleichung gegeben [Cavanagh 1996]:

$$(6.2) \quad \frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_H^2 \gamma_{Si}^2 \hbar^2 \tau_c}{r_{HSi}^6}$$

Zur Erklärung der verwendeten Konstanten sei auf Gleichung (3.4) verwiesen. Mithilfe von Gleichung (6.2) lässt sich nun die Korrelationszeit τ_c berechnen, wenn der Abstand r_{HSi} zwischen dem Siliziumkern und dem Proton bekannt ist (siehe Abbildung 6.11). Schließlich kann durch Einsetzen der Korrelationszeit τ_c in die Gleichung von Stokes und

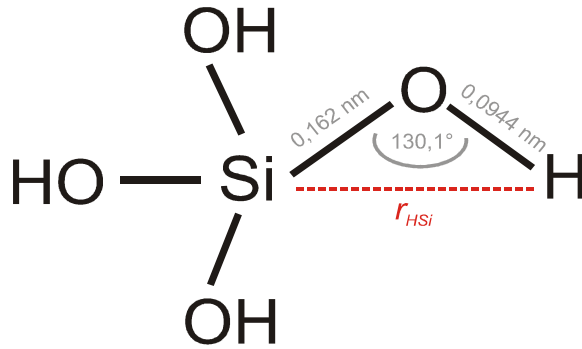


Abb. 6.11: Schematische Darstellung eines Kieselsäuremoleküls zur Veranschaulichung des Abstands zwischen dem Siliziumkern und einem Proton (r_{HSi}) (Bindungslängen und -winkel aus [Lasaga 1991]).

Einstein näherungsweise der Radius (r_H) des vorliegenden Komplexes berechnet werden (vergleiche Gleichung (3.9) zur Erläuterung der physikalischen Größen):

$$(6.3) \quad \tau_c = \frac{4\pi\eta r_H^3}{3k_B T}$$

Auf diese Weise konnte ein Radius von 3,76 nm berechnet werden. Unter anderem besitzen kleinere Proteine Radien in dieser Größenordnung [Stryer 1996]. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die Kieselsäuremoleküle tatsächlich durch wasserstoffbrückengebundenes, organisches Material stabilisiert vorliegen. Es sei darauf hingewiesen, dass dies eine vereinfachte Abschätzung ist, welche keine intra- oder intermolekularen Beweglichkeiten berücksichtigt.

7 ^{31}P NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Phosphorylierung von Silaffinen

Neben den bisher beschriebenen Polyaminen und Silaffinen wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biochemie I (Prof. Dr. Manfred Sumper) der Universität Regensburg auch weitere Biomoleküle untersucht und charakterisiert, die ebenfalls am Vorgang der Siliziumdioxidpräzipitation bei der Zellwandbiogenese der Diatomeen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang werden in diesem Abschnitt ^{31}P NMR-spektroskopische Untersuchungen an tpSil1/2L (ca. 19 kDa) und tpSil3 (35 kDa), zweier Silaffine der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana*, vorgestellt. Diese Silaffine weisen eine große Zahl posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Sulfatierungen oder modifizierte Lysinreste auf [Poulsen 2004]. Die hier beschriebenen NMR-Experimente sollen einen Beitrag zur Charakterisierung der Phosphorylierung dieser Moleküle leisten.

Die Silaffinproben enthielten in den NMR-spektroskopischen Experimenten jeweils 0,5 M NaCl, um eine Aggregation der Moleküle zu vermeiden. Abbildung 7.1 zeigt die ^{31}P NMR-

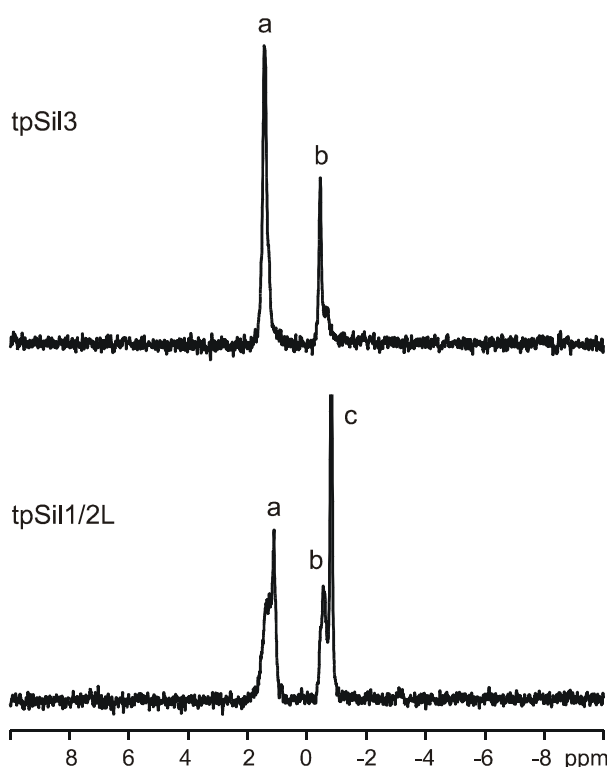


Abb. 7.1: ^{31}P NMR-Spektren der Silaffine tpSil1/2L (unten) und tpSil3 (oben) aus *Thalassiosira pseudonana* (0,5 M NaCl, pH=4,4, 290 K, tpSil1/2L: 13,5k scans, tpSil3: 14k scans).

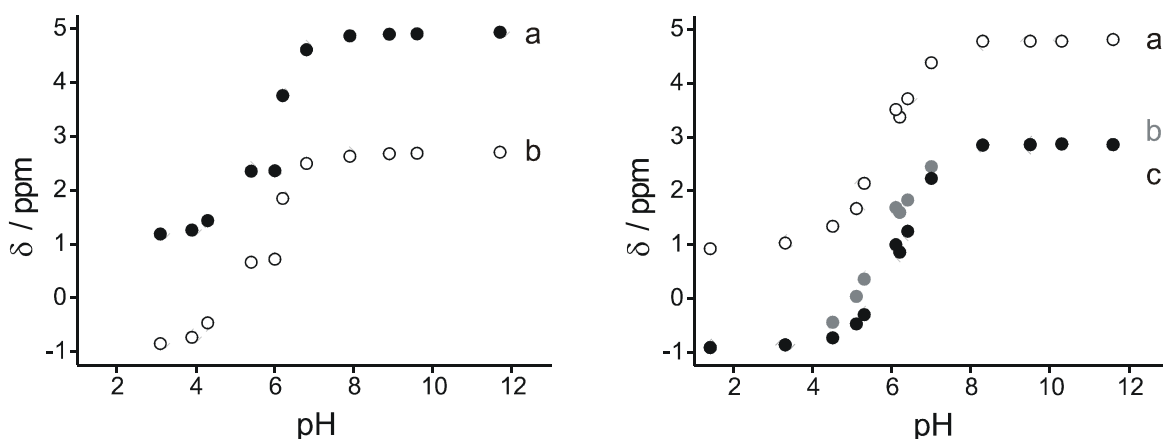


Abb. 7.2: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ³¹P NMR-Signale von tpSil3 (links) und tpSil1/2L (rechts). Die Beschriftung der Signale entspricht der der Spektren aus Abb. 7.1.

Spektren zweier Präparationen von tpSil1/2L und tpSil3 bei einem pH-Wert von ca. 4,4. Während das Spektrum von tpSil3 nur zwei Signale aufweist, sind im Spektrum von tpSil1/2L mehrere sich teils überlagernde Signale zu sehen. Die Spektren zeigen also, dass die Moleküle stark phosphoryliert vorliegen. Um eine Zuordnung dieser Signale vornehmen zu können, wurden die Proben durch die Zugabe von NaOH bzw. HCl titriert und anschließend mit den Titrationskurven anderer phosphorylierter Moleküle verglichen. Das pH-abhängige Verhalten der chemischen Verschiebung der ³¹P NMR-Signale ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Die zugehörigen Spektren finden sich im Anhang (Abschnitt 10.2, Abbildungen 10.4 und 10.5). Silaffine können zum Beispiel an den Aminosäureresten Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert sein. Aus diesem Grund wurde die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen der ³¹P NMR-Signale von Phospho-Serin, Phospho-Threonin und Phospho-Tyrosin mit der der Silaffine verglichen. Die übereinander gelegten Titrationskurven sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Aus diesen Graphen ist ersichtlich, dass bei beiden untersuchten Silaffinen nur die pH-Abhängigkeit von Signal a mit einer der phosphorylierten Aminosäuren, nämlich Phospho-Serin, übereinstimmt. Signal a der ³¹P NMR-Spektren kann somit mit großer Wahrscheinlichkeit den ³¹P-Kernen der Phosphate an Serinresten der Silaffine zugeordnet werden.

Jedoch erhebt sich die Frage, wie die anderen Signale zustande kommen, wenn es sich nicht um phosphorylierte Threonin- oder Tyrosinreste handelt. Da die untersuchten Moleküle glykosyliert vorliegen, könnte es sich auch um Phosphate an Zuckern handeln. Deshalb wurden analoge Untersuchungen an phosphorylierten Zuckern, nämlich Galactose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat, durchgeführt. Bei diesen beiden Zuckern

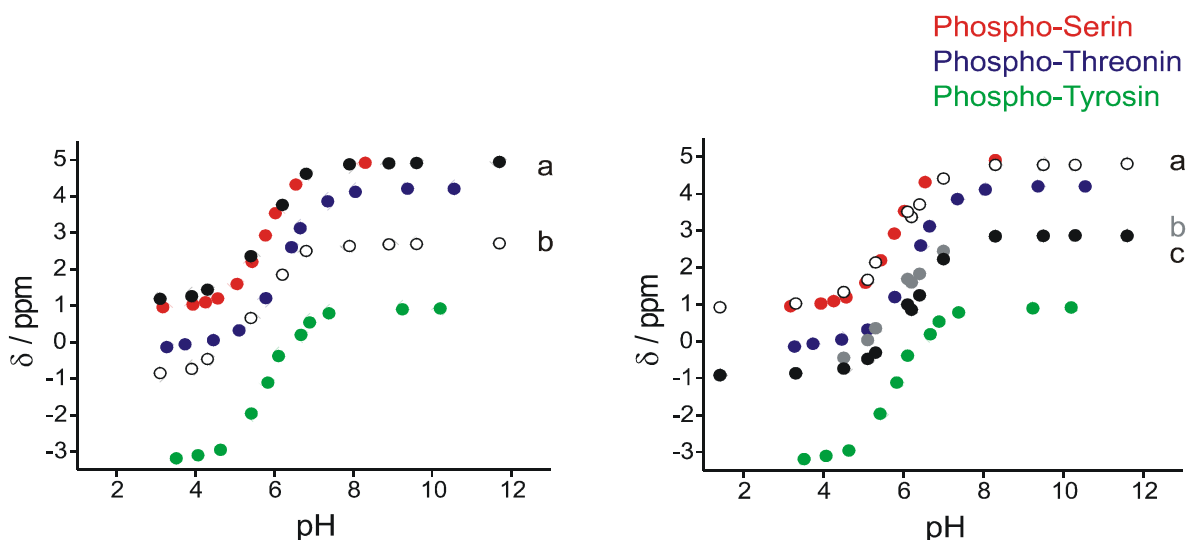


Abb. 7.3: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ³¹P NMR-Signale von tpSil3 (links) und tpSil1/2L (rechts) im Vergleich mit den phosphorylierten Aminosäuren Phospho-Serin (rot), Phospho-Threonin (blau) und Phospho-Tyrosin (grün). Die Beschriftung der Signale entspricht der der Spektren aus Abb. 7.1.

handelt es sich um Epimere, sie unterscheiden sich lediglich in der Stellung der OH-Gruppe am C-4-Atom, welches sich der Phosphatgruppe am nächsten befindet. Trotzdem ist in den Titrationskurven der beiden Zucker ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Diese sind wieder im Vergleich mit denen der zu untersuchenden Silaffine in Abbildung 7.4 dargestellt. Die pH-Abhängigkeit der ³¹P NMR-Signale der beiden untersuchten

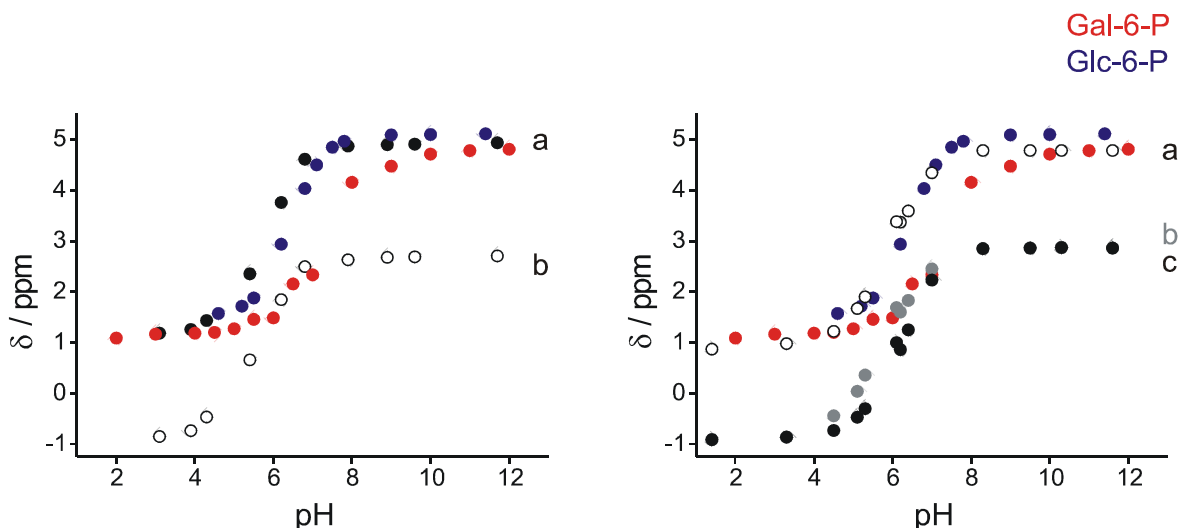


Abb. 7.4: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der ³¹P NMR-Signale von tpSil3 (links) und tpSil1/2L (rechts) im Vergleich mit den phosphorylierten Zuckern Galactose-6-Phosphat (rot) und Glucose-6-Phosphat (blau). Die Beschriftung der Signale entspricht der der Spektren aus Abb. 7.1.

phosphorylierten Zucker stimmt mit keinem der Silaffin-Signale überein. Aus diesem Grund handelt es sich bei den bisher nicht zugeordneten Silaffin-Signalen b und c vermutlich nicht um Phosphatreste an Galactose oder Glucose. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass andere phosphorylierte Zuckerreste in den Silaffinen vorhanden sind. Einen weiteren Hinweis für die Zuordnung der verbleibenden Signale liefert ein Vergleich mit dem ³¹P NMR-Spektrum von natSil-1A aus *Cylindrotheca fusiformis* [Kröger 2002]. In diesem Spektrum wurde ein ³¹P NMR-Signal bei ca. 0,8 ppm phosphoryliertem Trimethyl-Hydroxylysin zugeordnet. Signal b der ³¹P NMR-Spektren von tpSil1/2L und tpSil3 befindet sich beim selben pH-Wert (ca. 5) zwischen 0,1 und 0,7 ppm. Da gezeigt werden konnte, dass tpSil3 modifizierte Hydroxylysinreste besitzt [Sumper 2007], liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei Signal b tatsächlich um phosphorylierte Hydroxylysinreste handelt.

Diese Untersuchungen zeigen erneut, dass die ³¹P NMR-Spektroskopie einen großen Beitrag zur Bestimmung bzw. Bestätigung der Struktur phosphorylierter Proteine leisten kann.

8 Zusammenfassung

Diatomeen sind einzellige, photosynthetische Eukaryonten. Sie besitzen Zellwände aus amorphem Siliziumdioxid, deren artspezifische Muster sehr vielfältig sind. Über den Entstehungsprozess dieser komplexen Strukturen ist bis heute nur wenig bekannt. Die Entdeckung von organischen Zellwandkomponenten (Silaffine und Polyamine) ließ jedoch darauf schließen, dass diese eine wichtige Rolle bei der Biomineralisation der Diatomeen spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Biomineralisationsprozesses bei Diatomeen mithilfe der Flüssigkeits- und Festkörper-NMR-Spektroskopie.

In diesem Zusammenhang wurden zunächst Modellexperimente zur anioneninduzierten Polyaminaggregation durchgeführt. Dies geschah mittels dynamischer Lichtstreuung und ^{31}P NMR-Spektroskopie am synthetischen Polyamin Poly(allylamin) (PAA), sowie an natürlichen Polyaminen der Kieselalge *Stephanopyxis turris*. Insbesondere wurde der Einfluss von Pyrophosphationen auf die Selbstaggregation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Orthophosphat jeweils nur die halbe Konzentration von Pyrophosphat notwendig ist, um die Phasentrennungsprozesse der PAA-Lösungen zu induzieren, was wahrscheinlich auf die größere Zahl der negativen Ladungen pro Molekül zurückzuführen ist. Im Einklang damit konnte ebenso gezeigt werden, dass der Zustand von natürlichen Polyaminen durch die Anwesenheit von Pyrophosphat stärker beeinflusst wird als durch die Anwesenheit von Orthophosphat. Außerdem ist die Wechselwirkung zwischen Polyaminen und Phosphationen stark pH-abhängig.

Die organischen Moleküle, welche fest in das Silikat der Diatomeenzellwände eingelagert oder mit ihm assoziiert sind, sind für den Biomineralisationsprozess von großer Bedeutung. Um diese Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung untersuchen zu können, wurden isolierte, ^{13}C - und ^{15}N -angereicherte Diatomeenzellwände von *Stephanopyxis turris*, *Coscinodiscus granii* und *Thalassiosira pseudonana* ^{13}C - und ^{15}N -Festkörper-NMR-spektroskopisch vermessen. Mithilfe von ein- und zweidimensionalen ^{13}C NMR-Experimenten konnte nach erfolgreicher Signalzuordnung der Gehalt an Aminosäuren und Kohlenhydraten in den Zellwänden abgeschätzt werden. Dieser variierte sehr stark von Art zu Art und machte zwischen 1 und 15 % der Gesamtmasse der Zellwand aus. Zusätzlich wurde der Einfluss des Hydratisierungszustands und der Messtemperatur auf die

Zellwandproben untersucht. Die Gegenwart von Wasser bzw. ein Absenken der Temperatur wirkten sich auf die ^{13}C MAS NMR-Signale der meisten organischen Komponenten kaum aus, was darauf hindeutet, dass sie stark immobilisiert vorliegen. Jedoch existieren andere Biomoleküle, welche im hydratisierten Zustand wesentlich beweglicher sind und deshalb sehr schmale Linien aufweisen. Daraus wurde geschlossen, dass einige Biomoleküle in den silifizierten Zellwänden für Wasser zugänglich sind und somit entweder auf der Zellwandoberfläche, oder in für Wasser zugänglichen Poren im Silikatgerüst lokalisiert sein müssen. Die Anwesenheit von langkettigen Polyaminen konnte anhand eines ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ CP NMR-Experiments nachgewiesen werden. Die in diesem Abschnitt durchgeführten Festkörper-NMR-Experimente lieferten ein Gesamtbild der organischen Moleküle in den Zellwänden, jedoch konnten aufgrund der starken Signalüberlagerung keine Aussagen hinsichtlich ihrer Nachbarschaft oder Wechselwirkungen mit dem Silikat getroffen werden.

Kieselalgen sind in der Lage, Kieselsäure bis zu ihrem Einbau in eine neu entstehende Zellwand im Zellinneren zu speichern. In diesem Zusammenhang wurden ^{29}Si NMR-Experimente an *Ditylum brightwellii*-Zellen durchgeführt, um die intrazelluläre Form von Kieselsäure zu detektieren und zu charakterisieren. Diese Experimente knüpften an die Arbeit von Gröger *et al.* [Gröger 2008a] an. Zunächst wurden die Versuchsbedingungen an die hier verwendete Diatomeenart angepasst. Mithilfe von ^{29}Si MAS-NMR-spektroskopischen Experimenten an ganzen, gefrorenen Zellen wurde gezeigt, dass die Kieselalge *Ditylum brightwellii* Silizium in Form von Monokieselsäure speichert. Dies konnte auch anhand von Flüssigkeits-NMR-spektroskopischen Messungen bestätigt werden. Der ermittelte Kieselsäuregehalt betrug 0,14 pmol/Zelle. Ob und in welcher Form Monokieselsäure im Zellinneren -zum Beispiel durch die Anlagerung organischer Moleküle- stabilisiert wird, ist mithilfe dieser Messungen nicht vorherzusagen.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von Silaffinen der Kieselalge *T. pseudonana*, welche am Lehrstuhl Biochemie I der Universität Regensburg isoliert worden sind, ^{31}P NMR-spektroskopisch nachgewiesen.

9 Literaturverzeichnis

- Andrew ER, Bradbury A, Eades RG, 1958, Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed, *Nature* **182**: 1659.
- Azam F, Hemmingsen BB, Volcani BE, 1974, Role of silicon in diatom metabolism, V. Silicic acid transport and metabolism in the heterotrophic diatom *Nitzschia alba*, *Archives of Microbiology* **97**: 103-114.
- Bauer CA, Robinson DB, Simmons BA, 2007, Silica formation in confined environments via bioinspired polyamine catalysis at near-neutral pH, *Small* **3**: 58-62.
- Bazzicalupi C, Bencini A, Bianchi A, Cecchi M, Escuder B, Fusi V, Garcia-Espana E, Giorgi C, Luis SV, Maccagnis G, Marcelino V, Paoletti P, Valtancoli B, 1999, Thermodynamics of phosphate and pyrophosphate anions binding by polyammonium receptors, *Journal of the American Chemical Society* **121**:6807-6815.
- Bennett A, Rienstra C, Auger M, Lakshmi K, Griffin RG, 1995, Heteronuclear decoupling in rotating solids, *Journal of Chemical Physics* **108**: 9463-9479.
- Berne BJ, Pecora R, 2000, Dynamic light scattering, 2. Auflage, Dover Publications Inc., Mineola, New York.
- Bertermann R, Kröger N, Tacke R, 2003, Solid-state ^{29}Si MAS NMR studies of diatoms: structural characterization of biosilica deposits, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**: 630-634.
- Bonhomme C, Tolédano P, Maquet J, Livage J, Bonhomme-Courty L, 1997, Studies of octameric vinylsilasesquioxane by carbon-13 and silicon-29 cross polarization magic angle spinning and inversion recovery cross polarization nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1617-1626.

- Boskey AL, 2003, Biomineralization: An overview, *Connective Tissue Research* **44** (Suppl. 1): 5-9.
- Brauer G, 1975, Handbuch der präparativen anorganischen Chemie, Enke Verlag, Stuttgart.
- Brunner E, Lutz K, Sumper M, 2004, Biomimetic synthesis of silica nanospheres depends on the aggregation and phase separation of polyamines in aqueous solution, *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**: 854-857.
- Brunner E, Lutz K, 2007, Solid-state NMR in biomimetic silica formation and silica biomineralization, in: Handbook of Biomineralization: Biomimetic and Bioinspired Chemistry, P. Behrens, E.Bäuerlein (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, p. 19-38.
- Brzezinski MA, Olson RJ, Chisholm SW, 1990, Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms, *Marine ecology progress series* **67**: 83-96.
- Bubb WA, 2003, NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: characterizing the structural complexity, *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **19A**: 1-19.
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Skelton NJ, 1996, Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, Academic Press Inc., San Diego, California.
- Chiovitti A, Harper RE, Willis A, Bacic A, Mulvaney P, Wetherbee R, 2005, Variations in the substituted 3-linked mannans closely associated with the silicified walls of diatoms, *Journal of Phycology* **41**: 1154-1161.
- Chisholm SW, Azam F, Eppley RW. 1978, Silicic acid incorporation in marine diatoms on light:dark cycles: Use as an assay for phased cell division, *Limnology and Oceanography* **23**: 518-529.
- Chisholm SW, 2000, Stirring times in the southern ocean, *Nature* **407**: 685-687.
- Christiansen SC, Hedin N, Epping JD, Janicke MT, del Amo Y, Demarest M, Brzezinski M, Chmelka BF, 2006, Sensitivity considerations in polarization transfer and filtering using dipole-dipole couplings: Implications for biomineral systems, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **29**: 170-182.

- Darley WM, Volcani BE, 1971, Synchronized Cultures: Diatoms, *Methods in Enzymology* **23**: 85-96.
- Desclés J, Vartanian M, El Harrak A, Quinet M, Bremond N, Sapriel G, Bibette J, Lopez PJ, 2008, New tools for labeling silica in living diatoms, *New Phytologist* **177**: 822-829.
- Drebes G, 1977, Sexuality, in: The biology of diatoms, Botanical Monographs Vol. **13**, Werner D, Blackwell Scientific Publications, Oxford, S. 250-283.
- Duer M, 2004, Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Eppel M, 2003, Biomaterialien und Biomineralisation, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden.
- Eppley RW, Holmes RW, Paasche E, 1967, Periodicity in cell division and physiological behavior of *Ditylum brightwellii*, a marine planktonic diatom, during growth in light-dark cycles, *Archiv für Mikrobiologie* **56**:305-323.
- Falciatore A, Bowler C, 2002, Revealing the molecular secrets of marine diatoms, *Annual Review of Plant Biology* **53**: 109-130.
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V, 1998, Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production, *Science* **281**: 200-206.
- Friebolin H, 2006, Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Eine Einführung, 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Frigeri LG, Radabaugh TR, Haynes PA, Hildebrand M, 2006, Identification of proteins from a cell wall fraction of the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Molecular and Cellular Proteomics* **5**: 182-193.
- Gendron-Badou A, Coradin T, Maquet J, Fröhlich F, Livage J, 2003, Spectroscopic characterization of biogenic silica, *Journal of Non-Crystalline Solids* **316**: 331-337.
- Gerstein BC, Dybowski CR, 1985, Transient techniques in NMR of solids, Academic Press, Inc., London, UK.

- Gifford DJ, Bohrer RN, Boyd CM, 1981, Spines on diatoms: Do copepods care?, *Limnology and Oceanography* **26**: 1057-1061.
- Gröger C, Sumper M, Brunner E, 2008a, Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*: Solid-state ^{29}Si NMR and fluorescence microscopic studies, *Journal of Structural Biology* **161**: 55-63.
- Gröger C, Lutz K, Brunner E, 2008b, Biomolecular self-assembly and its relevance in silica biomineralization, *Cell biochemistry and biophysics* **50**: 23-39.
- Gröger C, Lutz K, Brunner E, 2008c, NMR studies of biomineralisation, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, im Druck (doi:10.1016/j.pnmrs.2008.02.003).
- Gröger C, 2008d, Solid-state NMR spectroscopic studies concerning the biomineralization process in diatoms and on inorganic phosphorus chalcogenide cage compounds, Doktorarbeit, Universität Regensburg.
- Haeckel E, 1904, Kunstformen der Natur, Verlag des bibliographischen Instituts, Leipzig und Wien.
- Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, Smetacek V, 2003, Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection, *Nature* **421**: 841-843.
- Harrison PJ, Waters RE, Taylor FJR, 1980, A broad spectrum artificial seawater medium for costal and open ocean phytoplankton, *Journal of Phycology* **16**: 28-35, <http://www3.botany.ubc.ca/cccm/NEPCC/esaw.html>.
- Hartmann SR, Hahn EL, 1962, Nuclear double resonance in the rotating frame, *Physical Review* **128**: 2042-2053.
- Hayashi S, Hayamizu K, 1991, Chemical shift standards in high-resolution solid-state NMR (2) ^{15}N nuclei, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **64**: 688-690.
- Hecky RE, Mopper K, Kilham P, Degens ET, 1973, The amino acid and sugar composition of diatom cell walls, *Marine Biology* **19**: 323-331.

- Heredia A, van der Strate HJ, Delgadillo I, Basiuk VA, Vrieling EG, 2008, Analysis of organo-silica interactions during valve formation in synchronously growing cells of the diatom *Navicula pelliculosa*, *ChemBioChem* **9**: 573-584.
- Herth W, 1978, A special chitin-fibril-synthesizing apparatus in the centric diatom *Cyclotella*, *Naturwissenschaften* **65**: 260-261.
- Hildebrand M, Volcani BE, Gassmann W, Schroeder JI, 1997, A gene family of silicon transporters, *Nature* **385**:688-689.
- Hildebrand M, Dahlin K, Volcani BE, 1998, Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrothecaa fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms, *Molecular General Genetics* **260**: 480-486.
- Hildebrand M, 2003a, Biological processing of nanostructured silica in diatoms, *Progress in Organic Coatings* **47**: 256-266.
- Hildebrand M, Wetherbee R, 2003b, Components and Control of Silicification in Diatoms, in: *Progress in Molecular and Subcellular Biology* Vol. **33**, W.E.G. Müller, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hildebrand M, 2004, Silicic acid transport and its control during cell wall silicification in diatoms, in: *Biom mineralization*, 2. Auflage, E. Bäuerlein (ed.), Wiley-VCH, Weinheim, S. 159-176.
- Hong M, 1999, Resonance assignment of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled solid proteins by two- and three-dimensional magic-angle-spinning NMR, *Journal of Biomolecular NMR* **15**: 1-14.
- Hunger M, Brunner E, 2004, NMR Spectroscopy, *Molecular Sieves* **4**: 201-293.
- Iler RK, 1979, The chemistry of silica, Wiley, New York.
- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J, 2003, The directionality of chitin biosynthesis: a revisit, *The Biochemical Journal* **374**: 755-760.
- Kennedy SD, Bryant RG, 1990, Structural effects of hydration: studies of lysozyme by ^{13}C solids NMR, *Biopolymers* **29**: 1801-1806.

- Kinrade SD, Gillson AME, Knight CTG, 2002, Silicon-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom *Navicula pelliculosa*, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **3**: 307-309.
- Knecht MR, Wright DW, 2004, Amine-terminated dendrimers as biomimetic templates for silica nanosphere formation, *Langmuir* **20**: 4728-4732.
- Knecht MR, Sewell SL, Wright DW, 2005, Size control of dendrimer-templated silica, *Langmuir* **21**: 2058-2061.
- Kooistra WHCF, De Stefano M, Mann DG, Medlin LK, 2003, The Phylogeny of the Diatoms, in: *Progress in Molecular and Subcellular Biology* Vol. **33**, W.E.G. Müller, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kröger N, Bergsdorf C, Sumper M, 1994, A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component, *The EMBO Journal* **13**: 4676-4683.
- Kröger N, Bergsdorf C, Sumper M, 1996, Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls, *European Journal of Biochemistry* **239**: 259-264.
- Kröger N, Lehmann G, Rachel R, Sumper M, 1997, Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall, *European Journal of Biochemistry* **250**: 99-105.
- Kröger N, Deutzmann R, Sumper M, 1999, Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation, *Science* **286**: 1129-1132.
- Kröger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M, 2000a, Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **97**: 14133-14138.
- Kröger N, Wetherbee R, 2000b, Pleuralins are involved in theca differentiation in diatom *Cylindrotheca fusiformis*, *Protist* **151**: 263-273.
- Kröger N, Deutzmann R, Sumper M, 2001, Silica-precipitating peptides from diatoms, *Journal of Biological Chemistry* **276**: 26066-26070.

- Kröger N, Lorenz S, Brunner E, Sumper M, 2002, Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis, *Science* **298**: 584-586.
- Lasaga AC, Gibbs GV, 1991, Quantum mechanical Hartree-Fock potential surfaces and calculations on minerals, II. 6-31G* Results, *Physics and chemistry of minerals* **17**: 485-491.
- Laws DD, Bitter HML, Jerschow A, 2002, Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry, *Angewandte Chemie International Edition* **41**: 3096-3129.
- Lee M, Goldberg WI, 1965, Nuclear-magnetic-resonance line narrowing by a rotating rf field, *Physical Review* **140**: A1261-A1271.
- Li CW, Volcani BE, 1985, Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms, VIII. Morphogenesis of the cell wall in a centric diatom, *Ditylum brightwellii*, *Protoplasma* **124**: 10-29.
- Lobel KD, West JK, Hench LL, 1996, Computational model for protein-mediated biomineralization of the diatom frustule, *Marine Biology* **126**: 353-360.
- Lowe IJ, 1959, Free induction decays of rotating solids, *Physical Review Letters* **2**: 285-287.
- Lutz K, 2005a, Untersuchungen zur Biomineralisation bei Diatomeen mittels kernmagnetischer Resonanz und dynamischer Lichtstreuung, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Lutz K, Gröger C, Sumper M, Brunner E, 2005b, Biomimetic silica formation: Analysis of the phosphate-induced self-assembly of polyamines, *Physical Chemistry Chemical Physics* **7**: 2812-2815.
- Mann DG, Droop JM, 1996, 3. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms, *Hydrobiologia* **336**: 19-32.
- Martin-Jézéquel V, Hildebrand M, Brzezinski MA, 2000, Silicon metabolism in diatoms: implication for growth, *Journal of Phycology* **36**: 821-840.

- Martin-Jézéquel V, Lopez PJ, 2003, Silicon – a central metabolite for diatom growth and morphogenesis, in: *Progress in Molecular and Subcellular Biology* Vol. **33**, W.E.G. Müller, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Matsunaga S, Sakai R, Jimbo M, Kamiya H, 2007, Long-chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation, *ChemBioChem* **8**: 1729-1735.
- Menzel H, Horstmann S, Behrens P, Bärnreuther P, Krueger I, Jahns M, 2003, Chemical properties of polyamines with relevance to the biomineralization of silica, *Chemical Communications*: 2994-2995.
- Mizutani T, Nagase H, Fujiwara N, Ogoshi H, 1998a, Silicic Acid Polymerization Catalyzed by Amines and Polyamines, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **71**: 2017-2022.
- Mizutani T, Nagase H, Ogoshi H, 1998b, Silicic acid polymerization catalyzed by amines and polyamines, *Chemistry Letters*: 133-134.
- Morcombe CR, Zilm KW, 2003, Chemical shift referencing in MAS solid state NMR, *Journal of Magnetic Resonance* **162**: 479-486.
- Nakajima T, Volcani BE, 1970, ϵ -N-trimethyl-L- δ -hydroxylysine phosphate and its nonphosphorylated compound in diatom cell walls, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **39**: 28-33.
- Patwardhan SV, Clarson SJ, 2002a, Silicification and biosilicification, Part 4. Effect of template size on the formation of silica, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers* **12**: 109-116.
- Patwardhan SV, Mekherjee N, Clarson SJ, 2002b, Effect of process parameters on the polymer synthesis of silica at neutral pH, *Silicon Chemistry* **1**: 47-55.
- Patwardhan SV, Clarson SJ, 2003, Silicification and biosilicification: Part 5, An investigation of the silica structures formed at weakly acidic pH and neutral pH as facilitated by cationically charged macromolecules, *Materials Science and Engineering C* **23**: 495-499.

- Pauli J, van Rossum B, Förster H, de Groot HJM, Oschkinat H, 2000, Sample optimization and identification of signal patterns of amino acid side chains in 2D RFDR spectra of the α -spectrin SH β domain, *Journal of Magnetic Resonance* **143**: 411-126.
- Perry CC, 1989, Chemical studies of biogenic silica, in: Biomineralization, Mann S, Webb J, Williams RJP, VCH, Weinheim, S. 223-256.
- Perry CC, Keeling-Tucker T, 2000, Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**: 537-550.
- Philip D, Stoddart JF, 1996, Self-assembly in natural and unnatural systems, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **35**: 1154-1196.
- Pines A, Gibby MG, Waugh JS, 1973, Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids, *Journal of Chemical Physics* **59**: 569-590.
- Poulsen N, Sumper M, Kröger N, 2003, Biosilica formation in diatoms: Characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis, *PNAS* **100**: 12075-12080.
- Poulsen N, Kröger N, 2004, Silica Morphogenesis by Alternative Processing of Silaffins in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Journal of Biological Chemistry* **279**: 42993-42999.
- Reimann BEF, Lewin JC, Volcani BE, 1965, Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms, I. The structure of the cell wall of *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin, *The Journal of Cell Biology* **24**: 39-55.
- Round FE, Crawford RM, Mann DG, 1990, The diatoms, Cambridge University Press, Cambridge.
- Sahai N, Tossell JA, 2001, Formation energies and NMR chemical shifts calculated for putative serine-silicate complexes in silica biomineralization, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**: 2043-2053.
- Sahai N, Tossell JA, 2002, ^{29}Si NMR shifts and relative stabilities calculated for hypercoordinated silicon-polyalcohol complexes: Role in sol-gel and biogenic silica synthesis, *Inorganic Chemistry* **41**: 748-756.

- Sahai N, 2004, Calculation of ^{29}Si NMR shifts of silicate complexes with carbohydrates, amino acids, and Multicarboxylic acids: Potential role in biological silica utilization, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**: 227-237.
- Scala S, Bowler C, 2001, Molecular insights into the novel aspects of diatom biology, *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1666-1673.
- Schmid AMM, Schulz D, 1979, Wall morphogenesis in diatoms: deposition of silica by cytoplasmic vesicles, *Protoplasma* **100**: 267-288.
- Schmid AMM, Volcani BE, 1983, Wall morphogenesis in *Coscinodiscus wailesii* Gran and Angst. I. Valve morphology and development of its architecture, *Journal of Phycology* **19**: 387-402.
- Simkiss K, Wilbur KM, 1989, Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition, Academic Press Inc., San Diego, California.
- Stryer L, 1996, Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Sullivan CW, 1979, Diatom mineralization of silicic acid IV. Kinetics of soluble Si pool formation in exponentially growing and synchronized *Navicula pelliculosa*, *Journal of Phycology* **15**: 210-216.
- Sumper M, 2002, A Phase Separation Model for the Nanopatterning of Diatom Biosilica, *Science* **295**: 2430-2433.
- Sumper M, Lorenz S, Brunner E, 2003, Biomimetic Control of Size in the Polyamine-Directed Formation of Silica Nanospheres, *Angewandte Chemie* **42**: 5192-5195.
- Sumper M, 2004, Biomimetic Patterning of Silica by Long-Chain Polyamines, *Angewandte Chemie* **43**: 2251-2254.
- Sumper M, Brunner E, Lehmann G, 2005, Biomineralization in diatoms: Characterization of novel polyamines associated with silica, *FEBS Letters* **579**: 3765-3769.
- Sumper M, Lehmann G, 2006a, Silica pattern formation in diatoms: species-specific polyamine biosynthesis, *Chem. Bio. Chem.* **7**: 1419-1427.

- Sumper M, Brunner E, 2006b, Learning from diatoms: nature's tools for the production of nanostructured silica, *Advanced Functional Materials* **16**: 17-26.
- Sumper M, Hett R, Lehmann G, Wenzl S, 2007, A code for lysine modifications of a silica biomineralizing silaffin protein, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **46**: 8405-8408.
- Swift DM, Wheeler AP, 1992, Evidence of an organic matrix from diatom biosilica, *Journal of Phycology* **28**: 202-209.
- Tesson B, Masse S, Laurent G, Maquet J, Livage J, Martin-Jézéquel V, Coradin T, 2008, Contribution of multi-nuclear solid state NMR to the characterization of the *Thalassiosira pseudonana* diatom cell wall, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**: 1889-1898.
- Van de Poll WH, Vrieling EG, Gieskes WWC, 1999, Location and expression of frustulins in the pennate diatoms *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula pelliculosa*, and *Navicula salinarum* (bacillariophyceae), *Journal of Phycology* **35**: 1044-1053.
- Van Wazer JR, 1973, Phosphorus and its compounds: volume 1, 2. Auflage, Wiley, New York.
- Vinogradov E, Madhu PK, Vega S, 1999, High-resolution proton solid-state NMR spectroscopy by phase-modulated Lee-Goldburg experiment, *Chemical Physics Letters* **314**: 443-450.
- Volcani BE, 1977, Role of silicon in diatom metabolism and silicification, in: *Biochemistry of Silicon and Related Problems*, Bendz G, Lindqvist I (eds.), Plenum Press, New York.
- Volcani BE, 1981, Cell wall formation in diatoms: morphogenesis and biochemistry, in: *Silicon and siliceous structures in biological systems*, Simpson TL, Volcani BE, Springer-Verlag, New York, S. 157-200.
- Vrieling EG, Hazelaar S, Gieskes WWC, Sun Q, Beelen TPM, van Santen RA, 2003, Silicon Biomineralisation: Towards Mimicking Biogenic Silica Formation in Diatoms, in: *Progress in Molecular and Subcellular Biology Vol. 33*, W.E.G. Müller, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Wenzl S, Deutzmann R, Hett R, Hochmuth E, Sumper M, 2004, Quaternary Ammonium Groups in Silica-Associated Proteins, *Angewandte Chemie International Edition* **43**: 5933-5936.
- Wenzl S, Hett R, Richthammer P, Sumper M, 2008, Silacidins: Highly acidic phosphopeptides from diatom shells assist in silica precipitation in vitro, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **47**: 1729-1732.
- Werner D, 1966, Die Kieselsäure im Stoffwechsel von *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin und Guillard, *Archiv für Mikrobiologie* **55**:278-308.
- Yuan JJ, Jin RH, 2005, Multiply shaped silica mediated by aggregates of linear poly(ethyleneimine), *Advanced Materials* **17**: 885-888.
- Yuan JJ, Zhu PX, 2006, Synthesis of nanofibre-based silica networks mediated by organized poly(ethylene imine): structure, properties, and mechanism, *Adv. Funct. Mater.* **16**: 2205-2212.
- Zurzolo C, Bowler C, 2001, Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking, *Plant Physiology* **127**: 1339-1345.

10 Anhang

10.1 ^{13}C MAS NMR-Experimente an Diatomeenzellwänden

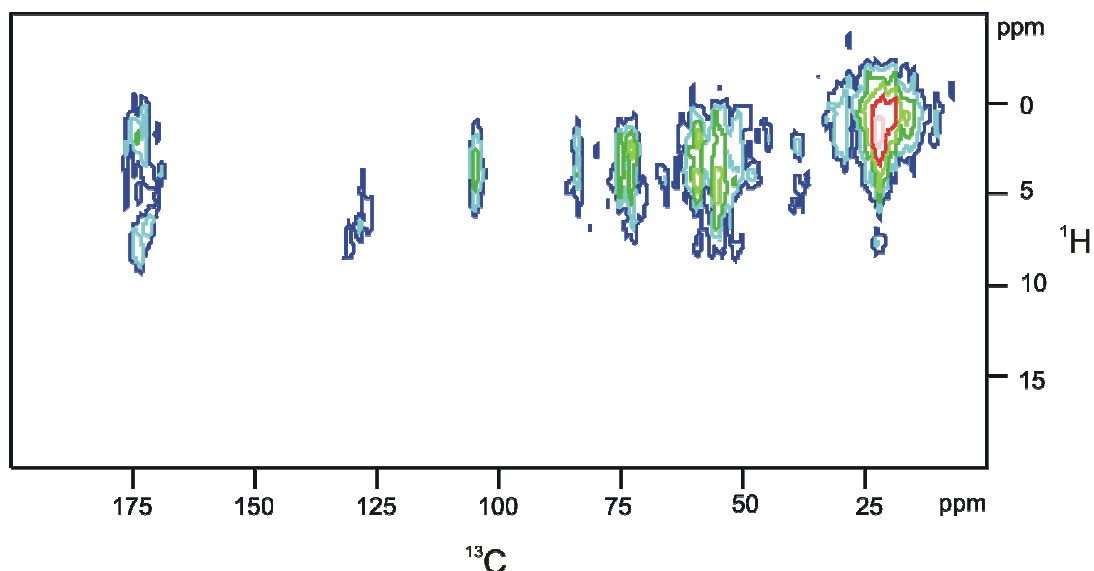


Abb. 10.1: 2D ^1H - ^{13}C HETCOR NMR-Spektrum von Zellwänden der Kieselalge *T. pseudonana* (298 K, $\tau_{\text{CP}}=600\ \mu\text{s}$, $\nu_r=8\ \text{kHz}$, 128 scans, 256 Datenpunkte in indirekter Dimension).

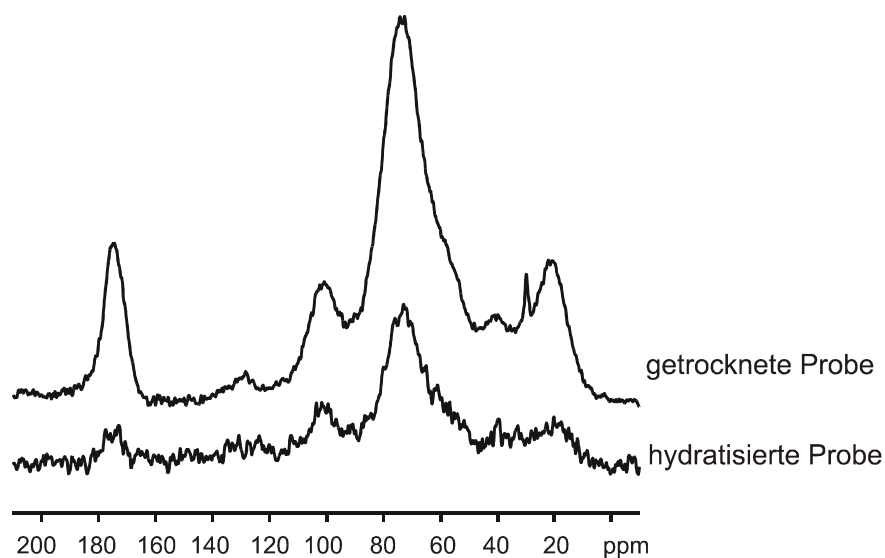


Abb. 10.2: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ CP MAS NMR-Spektren der Zellwände von *S. turris* im getrockneten (oben) und hydratisierten (unten) Zustand (298 K, $\nu_r=10\ \text{kHz}$, 4k scans). Die großen Unterschiede im Signal/Rausch-Verhältnis kommen durch unterschiedliche Probenkonzentrationen im MAS-Rotor zustande.

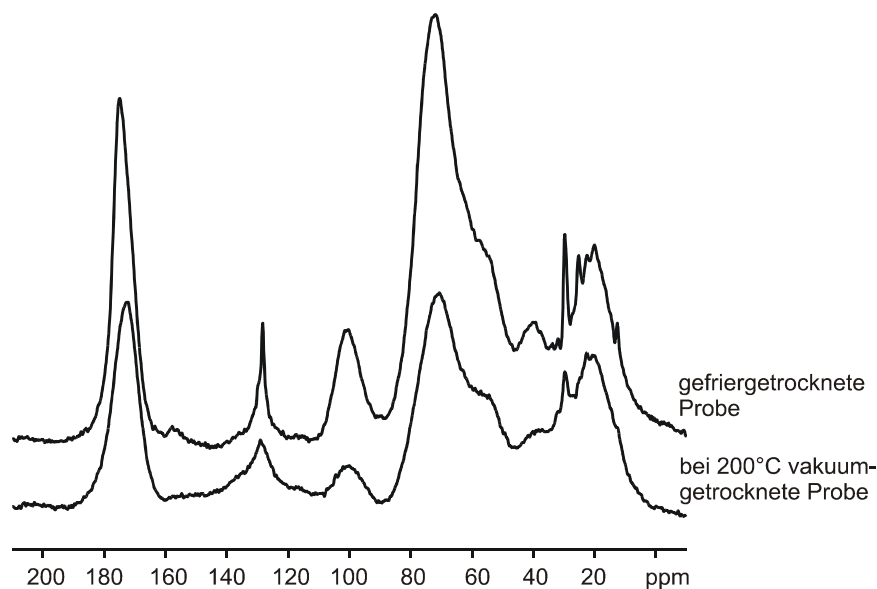


Abb. 10.3: ^{13}C MAS NMR-Spektren isolierter *S. turris*-Zellwände: Es sind die Spektren einer gefriergetrockneten (oben) und einer bei 200 °C vakuumgetrockneten (unten) Probe gegenübergestellt (298 K, $\nu_r=10$ kHz, 4k scans).

10.2 ^{31}P NMR-Experimente an isolierten Silaffinen von *T. pseudonana*

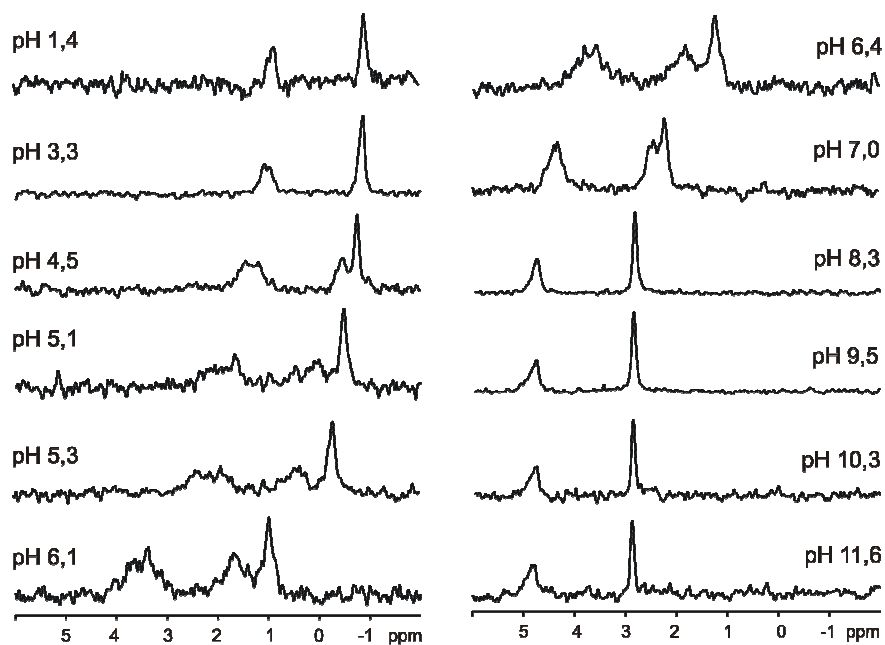


Abb. 10.4: pH-abhängige ^{31}P NMR-Messungen an tpSil1/2L (0,5 M NaCl, 290 K).

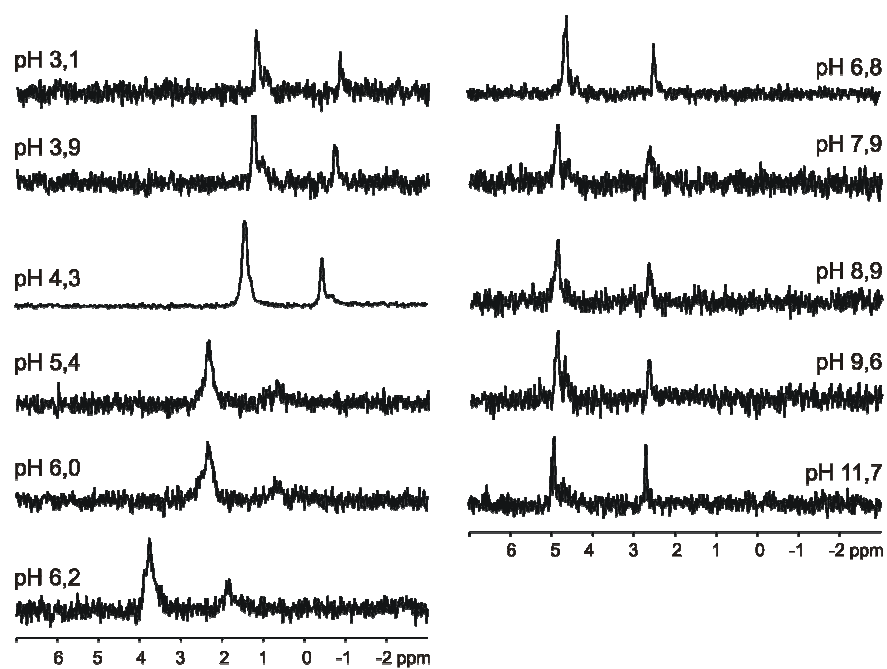


Abb. 10.5: pH-abhängige ^{31}P NMR-Messungen an tpSil3 (0,5 M NaCl, 290 K).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eike Brunner für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses interessante Thema bearbeiten zu können. Ihm danke ich auch für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Sumper bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, für die interessanten und hilfreichen Diskussionen und die Möglichkeit, in seinen Laboren zu arbeiten. Außerdem bedanke ich mich für die Bereitstellung der Silaffin- und Polyaminproben für die NMR-Spektroskopie. Herrn Robert Hett und Herrn Gerhard Lehmann möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Kultivierung der Kieselalgen danken, sowie Frau Ingrid Weiß für die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie.

Herrn Franz Rau danke ich für die Hilfe bei der Präparation von isotonenangereichertem Silikat.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer bedanke ich mich für den Zugang zu seinen Laboren.

Meinen Kollegen Herrn Christian Gröger, Frau Dr. Daniela Baumer, Herrn Christoph Liebold und Frau Ingrid Cuno, sowie allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während meiner gesamten Promotionszeit bedanken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Regensburg, den 21. Mai 2008

(Katharina Lutz)