

## University of Groningen

### Nanoscale architecture

Hazelaar, Sandra

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Hazelaar, S. (2006). *Nanoscale architecture: The role of proteins in diatom silicon biomineralization*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## Samenvatting



Diatomeeën zijn in de wetenschappelijke literatuur tevens bekend onder de naam Bacillariophyceae. Dit is een klasse binnen de groep microalgen, de belangrijkste fotosynthetiserende organismen in het aquatisch milieu. Het zijn ééncelligen met discoïde of cilindrische symmetrie van de celwand (de ‘centrische’ diatomeeën); wanneer cellen een bilaterale symmetrie vertonen spreekt men van pennate diatomeeën. Er zijn wel 250 verschillende genera, die met elkaar samen minstens 10.000 verschillende soorten vertegenwoordigen. Elke soort heeft een heel specifieke celwandstructuur, en een eigen celvorm en celgrootte. De celwand van de diatomee, de ‘frustule’, bestaat uit twee plaatdelen die op elkaar passen als een petrischaal en bij elkaar worden gehouden door 1 of meer gordelbanden. Grote en (ultra)kleine hoek röntgenverstrooiingsexperimenten hebben recent het vermoeden bevestigd dat het kiezelachtige “glazen” (of opale) deel van de celwand bestaat uit amorf silica. Dit betekent dat op atomair niveau de structuur van de silicacelwand geen enkele vorm van regelmaat vertoont, maar desondanks is er morfologisch wel degelijk een regelmatige poriestructuur aanwezig. De silicacelwand is omsloten door een organische laag die bestaat uit polysacchariden, lipiden en eiwitten. Deze laag beschermt de silica in de frustule tegen het spontaan oplossen in het aquatisch milieu waarin diatomeeën leven.

Als een diatomeeëncel zich deelt ontstaan er twee haploïde dochtercellen binnen in de ‘moederfrustule’, waarna DNA wordt gerepliceerd en de twee dochtercellen elk een halve frustule (de hypovalve en benodigde gordelbanden) nieuw ontwikkelen. De hypovalve wordt in een speciaal soort ‘vesicle’ gevormd, die ‘silica deposition vesicle’ (SDV) wordt genoemd. Gedurende de silicavorming in de SDV wordt de architectuur en nanostructuur van de celwand bepaald. Dit is een proces waarbij verondersteld wordt dat polypeptiden zoals silaffines en long-chain polyamines (LCPAs) een rol spelen bij silicaprecipitatie en mogelijk ook bij de structuurvorming van de celwand. Aangezien in iedere soort de celwandstructuur van de afstammelingen van generatie tot generatie precies hetzelfde blijft, kan het niet anders dan dat dit proces onder genetische controle staat.

Als diatomeeën dood gaan zinken ze door hun gewicht naar de bodem van zeeën, oceanen en meren. Door deze constante “regen” van dode diatomeeën hebben zich in de loop van miljoenen jaren dikke lagen van diatomeeënrusten opgehoopt, de ‘diatom ooze’. Deze miljoenen jaren oude resten zijn vastgelegd in grondlagen die tegenwoordig als diatomeeënaarde opgegraven kunnen worden in groeven waar de sedimenten aan het aardoppervlak liggen. Deze silicabron wordt gebruikt in verschillende toepassingen, maar hoofdzakelijk als vulmaterialen, absorptiematerialen, of als schuurmiddel in bijvoorbeeld tandpasta. De meest spectaculaire toepassing is het gebruik als stabilisator voor het zeer explosieve nitroglycerine voor de productie van dynamiet, een uitvinding van Alfred Nobel. Vanwege veroudering zijn de oorspronkelijke nanospecifieke frustulestructuren in de loop van de tijd verloren gegaan, waarbij vaak ook vervuiling met katalytisch actieve elementen is opgetreden; hierdoor wordt de toepassing van diato-

meeënaarde beperkt. Vandaar dat men op industriële schaal kunstmatige silica's is gaan produceren, waarbij recent veel aandacht wordt geschonken aan de productie van silica's met zeer specifieke porositeit en oppervlakte-eigenschappen. Tegenwoordig worden synthetische silica's gebruikt in vulmaterialen, filters, materialen voor katalysatoren, ionwisselaars, wasmiddelen, tandpasta's, verf, en in farmaceutische en cosmetische producten. Zelfs in de rubberindustrie – hoofdzakelijk in de productie van banden – worden artificiële silica's gebruikt, namelijk in vulkanisatieprocessen ter vervanging van het milieu-onvriendelijke roet. Over het algemeen worden kunstmatige silica's geproduceerd bij hoge temperaturen en druk, en worden vaak sterke zuren gebruikt in de synthese. Om tot goedkopere en milieuvriendelijkere productieprocessen te komen bestaat er belangstelling bij silicaproductanten om via hun onderzoek- en ontwikkeling (Research and Development) nieuwe syntheseroutes op het spoor te komen die gebaseerd zijn op de wijze waarop in de natuur siliciummineralisatie plaatsvindt. Tevens is het de bedoeling om de natuurlijke processen na te bootsen om zo nieuwe silicamaterialen te verkrijgen, met nanostructuren zoals waargenomen in meso- tot macroporeuze diatomeeëncellen.

Er is tot dusver nog niet heel veel bekend van de moleculaire en fysisch-chemische aspecten die een rol spelen in siliciumbiomineralisatie in diatomeeën. Resultaten uit experimenten met modelverbindingen suggereren dat organische moleculen essentieel zijn voor het induceren van silicaprecipitatie en/of bij het sturen van de silicastructuur tijdens de vorming van kunstmatige micro- en mesoporeuze silica's en zeolieten. Er zijn inmiddels enkele eiwitten geïdentificeerd die mogelijk een belangrijke rol spelen in silicaprecipitatie in diatomeeën, maar ondanks verschillende *in vitro* studies die wijzen op een dergelijke rol, zijn de mechanistische eigenschappen van de eiwit-silica interacties in diatomeeëncellen nog niet bekend. Juist deze eigenschappen zijn van wezenlijk belang om het natuurlijke proces van de vorming van de gecompliceerde frustule-architectuur in diatomeeën te kunnen begrijpen en te vertalen naar innovatieve syntheseroutes. Het assortiment van eiwitten dat is betrokken bij silicavorming in diatomeeën is ongetwijfeld groter dan de paar nu bekende eiwitten.

*Het thema van dit proefschrift was het identificeren van nieuwe eiwitten die betrokken zijn bij silicacelwandvorming in diatomeeën, en het bepalen van hun rol in de vorming van structuren op nano- tot micrometerniveau.*

Om in staat te zijn onderscheid te maken tussen eiwitten die betrokken zijn bij het siliciummetabolisme van de diatomeeëncellen en eiwitten die betrokken zijn bij andere processen werd affiniteit voor silica gekozen als selectiecriteria. Hierbij werden verschillende celextracten gebruikt van de door ons gekozen modelsoort *Navicula pelliculosa* (Brébisson et Kützing) Hilse. Één eiwit dat met behulp van deze aanpak werd geïsoleerd bleek op grond van de N-terminale

aminozuur-sequentie homoloog te zijn aan ubiquitine. Ubiquitine is een zeer geconserveerd (evolutionair goed behouden gebleven) eiwit met een molecuulgewicht van ongeveer 8,6 kDa dat een belangrijke rol speelt in eiwitafbraakprocessen in eukaryote cellen. Immunocytochemische lokalisatie van ubiquitine in *N. pelliculosa* toonde aan dat dit eiwit niet alleen intracellulair aanwezig is, maar dat het ook aanwezig is langs de frustule en in de voor diatomeeën zo karakteristieke poriën; in het bijzonder bleek deze celwandlokalisatie specifiek voor de stadia van de celdeling waarbij de nieuwe hypovalve gevormd werd. Deze resultaten sluiten goed aan bij een eerdere studie door leden van onze onderzoeksgroep aan de rol van peptiden en (bio)polymeren in fasescheidingsprocessen in chemische silicasynthese. Uit dit onderzoek ontstond een model dat een verklaring zou kunnen geven van de manier waarop micromorfogenese plaatsvindt in diatomeeën. Dit model is gebaseerd op de suggestie dat tijdens silicavorming eiwit- en silicarijke fases gescheiden worden tijdens de vorming van de uiteindelijke vaste stof silica. Afhankelijk van de aanwezigheid van organische moleculen in de SDV, met name de kleine moleculen (silaffines en LCPAs) die een snelle silicaprecipitatie teweegbrengen en grotere moleculen die fasescheiding induceren, worden de eiwitrijke fases omsloten door de silicarijke fases die vervolgens overgaan in vast silica. Dit model verklaart veel van de ideeën over silicavorming in syntheses en in diatomeeën die tot nu toe zijn ontwikkeld. In diatomeeën zijn de eiwitrijke fases niet meer aanwezig in de voltooide celwand, en hieruit kan de conclusie getrokken worden dat eiwitten die een rol hebben gespeeld in structuurvorming op een of andere manier verwijderd zouden moeten worden. De identificatie van ubiquitine en de specifieke locatie van ubiquitine langs de nieuwe celwanddelen in delende diatomeeëncellen leidde tot de hypothese dat het ubiquitine-afhankelijke eiwitafbraakmechanisme betrokken is bij het verwijderen van de eiwitrijke fases tijdens de silicavorming (hoofdstuk 2).

De volgende stap (hoofdstuk 3) was het bepalen van het stadium waarop dat ubiquitinatiemechanisme geactiveerd wordt tijdens de celwandvorming. Middels een specifieke identificatiemethode werd met name gelet op het expressieniveau van ubiquitine (aanwezig als polyubiquitines of geubiquitineerde eiwitten) in extracten van *N. pelliculosa* cellen. Dit expressieniveau werd gevolgd tijdens celwandvorming in 3 verschillende eiwitextracten: i) in celvrije-extracten die oplosbare eiwitten bevatten, ii) in EDTA-extracten van celresten verkregen uit de eerste fractionering, en iii) in SDS-extracten van celwanden verkregen na de eerste en tweede fractionering. De fracties uit ii) en vooral iii) bevatten celwandgebonden eiwitten. Voor 7 oplosbare en 6 SDS-geëxtraheerde eiwitten bleek een significante positieve tweede-orde polynomiale correlatie te bestaan tussen de duur van de celwandvorming en de relatieve hoeveelheid (poly)ubiquitines en geubiquitineerde eiwitten in de extracten. Hierbij werd een duidelijke toename in hoeveelheid in de eerste 120 minuten van celwandvorming gevolgd door een afname in de resterende periode, totdat celdeling volledig voltooid was. Voor EDTA-extraheerbare eiwitten

werd deze correlatie niet gevonden. Op basis van de massa van ubiquitine en na uitsluiting van mono- en polyubiquitines, werd een verdeling gemaakt tussen grotere (> 50 kDa) en kleinere (< 50 kDa) geubiquitineerde eiwitten en de relatieve bijdrage van deze groepen in de extracten bepaald. Het onderscheid werd bepaald op basis van eerdere silica-syntheses, waarbij fasescheiding afhankelijk bleek van de grootte van het toegepaste polymeer of peptide. Deze analyse resulteerde in een duidelijk verschil in de bijdrage van elke groep in het eerste stadium van celwandvorming (< 90 min) en op de latere tijdstippen. In het vroege stadium bleek dat met name de grotere celwandgeassocieerde eiwitten (cluster > 50 kDa), met op basis van hun grootte de potentie om fasescheiding te induceren, geubiquitineerd werden. Deze resultaten impliceren dat ubiquitinatie van eiwitten die geassocieerd zijn met de diatomeeëncelwand gedurende celwandvorming een belangrijk proces is, waarbij de timing van het proces afhangt van de fase waarin de plaatvorming zich bevindt. In de eerste 120 minuten van plaatvorming – het stadium waarin vooral silica gevormd wordt – blijkt het eiwitafbraakmechanisme het meest van belang.

Door gebruik te maken van de fluorescerende stof 2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylamino-ethylaminocarbamoyl) methoxy)phenyl)oxazole (PDMPO) was het mogelijk om de allervroegste stadia van vorming van de nieuwe diatomeeëncelwand voor het eerst microscopisch vast te leggen (hoofdstuk 4). Op deze wijze werd het al eerder bestaande vermoeden bevestigd dat 2-dimensionale groei van de diatomeeëncelwand erg snel verloopt. Binnen 15 minuten zijn in delende cellen van de bestudeerde soort *Navicula salinarum* (Grunow) Husted de structuren van de nieuw gevormde hypovalve goed waar te nemen. De 3-dimensionale groei van de celwand verloopt echter veel langzamer en neemt het grootste gedeelte van de vorming van de celwand in beslag. Deze resultaten zijn van wezenlijk belang om de timing van moleculaire en fysisch-chemische processen te begrijpen in relatie tot morfogenese (hoofdstuk 2 en 3). PDMPO bleek zeer geschikt te zijn voor het bestuderen van specifieke ontwikkelingsstadia, maar biedt ook perspectief voor een gedetailleerde studie van de vorming van diatomeeënbiosilica om nieuwe strategieën te ontwikkelen voor het verkrijgen van verrijkte SDV-fracties. Op deze wijze zou de SDV specifiekere (bio)chemisch gekarakteriseerd kunnen worden om te weten te komen welke eiwitten en chemische condities van belang zijn in celwandvorming.

Naast ubiquitine werden ook verschillende andere eiwitten in *N. pelliculosa* extracten geïdentificeerd met behulp van silica-affiniteit studies. Dit waren actine, oxygen-evolving enhancer eiwit (een enzym dat bijdraagt aan zuurstofvorming als een onderdeel van het fotosyntheseproces in planten) en ferredoxine-NADP reductase (FNR; een enzym dat betrokken is in oxidatie en reductie van ijzer in de fotosynthese). Dit laatste enzym werd in meer detail bestudeerd omdat het op basis van N-terminale aminozuurvergelijking homologie bleek te hebben met carbonic anhydrase (een enzym dat betrokken is bij kooldioxideomzetting in fotosynthese)

en silicase. Silicase werd recentelijk geïdentificeerd in sponzen door Duitse collega's en zij suggereerden op basis van dissolutie-experimenten dat dit enzym een rol kan spelen in silicaherstructurering en -onderhoud. Het voorgestelde mechanisme is als volgt: silicase is in staat een zink-ion te binden dat katalytisch functioneert als een zogenaamd Lewiszuur. Deze katalytische eenheid is in staat om de esterverbinding tussen silicium en zuurstof te verbreken middels hydrolyse, waarbij een siliciumzuurion ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) vrijkomt. Vanwege FNR's homologie met silicase, en omdat het eveneens in staat is zink te binden, werd de hypothese geformuleerd dat FNR functioneert in herstructurering en onderhoud van diatomeeën-silica op een manier die vergelijkbaar is aan die van silicase.

Om deze hypothese nader te testen werd in de genomsequentie van de soort *Thalassiosira pseudonana* Hasle en Heimdal gezocht naar homologen van het *N. pelliculosa* FNR gen, zodat hiermee experimenten gedaan konden worden. Er werden in totaal drie FNR genen (te weten: newV2.0.genewise.31.175.1, newV2.0.genewise.39.343.1, and newV2.0.genewise.91.65.1) met een homologe nucleotide-sequentie gevonden in het *T. pseudonana*-genoom, waarvan mRNA-expressieniveaus werden gekwantificeerd met behulp van de zogeheten Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) voor cellen die gekweekt werden onder gedefinieerde groeiomstandigheden. De drie omstandigheden die werden onderzocht waren: i) synchrone celdeling, ii) groei en celdeling gedurende silicabeperking en iii) groei gedurende een licht-donker-licht regime om de rol van FNR in fotosynthese te bepalen. Eveneens werd met de eerder genoemde PDMPO-methode de vorming van platen in delende *T. pseudonana* cellen bepaald. Het mRNA-expressieniveau van de 3 FNR-genen correleerde niet met de waargenomen stadia van celwandformatie. Omdat FNR een rol speelt in fotosynthese was het moeilijk om een specifieke rol van FNR in het silificatieproces simpel vast te kunnen stellen. Om de potentiële rol van FNR in silicaherstructurering te bestuderen werden daarom ook *in vitro* dissolutie-experimenten uitgevoerd op een vergelijkbare wijze als voor silicase. Deze experimenten werden uitgevoerd met het commercieel verkrijgbare spinazie-FNR, dat homolog is aan diatomeeën-FNR. Naast de dissolutie-experimenten werden ook de nanostructurele eigenschappen van synthetische silica's en diatomeeënsilica's bepaald met behulp van kleine-hoek röntgenverstrooiinganalyses gedurende incubaties met spinazie-FNR. Uit deze experimenten is gebleken dat spinazie-FNR het oplossen van het kiezelskelet niet bevorderde en dat er geen waarneembare nanostructurele veranderingen optraden voor de geteste silica's. Ondanks het feit dat FNR homolog is aan silicase (en zoals eerder vermeld ook aan carbonic anhydrase), het een relatief hoge affiniteit heeft met silica en in staat is om zink te binden, is nog niet aangetoond dat FNR *in vitro* een rol speelt in herstructurering van silica. Het is aannemelijk dat FNR geen directe rol speelt bij herstructurering van silica in diatomeeën. Dat wil echter niet zeggen dat herstructurering van silica niet plaats vindt in diatomeeën, maar dat andere eiwitten bij dit proces betrokken kunnen zijn. Herstructureringsprocessen

zijn tot dusver nooit ter sprake gebracht in studies van diatomeeënbiomineralisatie onderzoek. Inzicht in dit soort natuurlijke processen zou nieuwe perspectieven kunnen bieden bij de ontwikkeling van kunstmatige silica's voor nanotechnologische toepassingen.

## Perspectieven voor de toekomst

Het in dit proefschrift gepresenteerde onderzoek is uitgevoerd vanuit een biologisch perspectief, waarbij projectpartners aan de Technische Universiteit Eindhoven (TUE) dit werk hebben aangevuld met de daar opgebouwde kennis van silicachemie. Bij de aanvang van deze samenwerking waren biomacromoleculen nog niet uitvoerig gebruikt voor chemische syntheses van poreuze silicas. Wel werden er al polymeren gebruikt zoals polyethyleenglycol (PEG) en derivaten hiervan. Deze werden beschouwd als goedkope alternatieven voor natuurlijke moleculen, zodat voldoende experimenten uitgevoerd konden worden om de rol van organische moleculen op silicavorming te bepalen. Door gebruik te maken van verschillende molecuulgroottes van PEG en door met verschillende PEG/water-glasratio's te werken bleek het mogelijk om gedefinieerde mesoporeuze silicastructuren te maken met poriën met diameters tussen de 2 en 20 nm. Dat betekende weliswaar dat de verkregen silica's morfologisch nog niet op diatomeeëncelwanden leken, maar dat de organische polymeren wel degelijk beschouwd konden worden als alternatieven voor biomoleculen zoals eiwitten, enzymen en koolhydraten. De fasescheiding, die in diatomeeën wellicht de structuurvorming en dimensie van poriën beïnvloedt, bracht onze partners op het idee om met behulp van block-copolymeren als surfactant geordende holle silicabollen te produceren. Deze holle silicabolletjes, die qua grootte en mesoporositeit al veel meer lijken op diatomeeënsilica, bieden perspectief voor toediening van o.a. medicijnen en specifieke drug-delivery toepassingen, of van antipathogene stoffen in gewasbescherming. Het moge duidelijk zijn dat de manier waarop in de natuur silicabiomineralisatie plaatsvindt als inspiratie heeft gediend voor het creëren van milde syntheseroutes om kunstmatige structuren te maken waarbij de fysisch-chemische eigenschappen lijken op biologisch gevormde silica's. Met het precies vast stellen van de silica-polymeer interacties en optimalisatie van de synthesecondities kunnen meer van dergelijke specifieke silica's gemaakt worden.

Al in 1960 werd gesuggereerd dat de vorming van de diatomeeëncelwand een erg snel proces zou zijn. Vijfenveertig jaar later zijn we in staat gebleken om de tussenfases van celwandvorming in diatomeeën microscopisch vast te leggen en in de tijd te volgen, waarmee definitief is aangetoond dat het proces inderdaad erg snel verloopt. Inmiddels is dit bevestigd voor verschillende soorten, te weten *Navicula pelliculosa*, *N. salinarum*, en *Thalassiosira pseudonana*. Deze met fluorescentie bepaalde timing van plaatvorming in diatomeeën is een eerste stap,



waarmee gericht gekeken kan worden naar de verschillende ontwikkelingsstadia van biosilicavorming. De inbouw van de gebruikte fluorescente stof vormt tevens een goede basis om een gevoelige methode te ontwikkelen om zuivere of sterk verrijkte SDV-fracties te verkrijgen, die vervolgens in detail (bio)chemisch gekarakteriseerd kunnen worden. De verwachting is dat op deze wijze gekomen kan worden tot een precieze identificatie van alle betrokken eiwitten (zeker met de huidige ontwikkelingen op het terrein van proteomics) en reactiecondities in de SDV gedurende het gehele siliciummineralisatieproces.

Dat de timing van het ubiquitine-afhankelijke eiwitafbraakmechanisme correleert met de timing van celwandvorming in diatomeeën versterkt de hypothese dat porevorming in de frustule onder invloed van een eiwitrijke fase mogelijk is, waarbij deze fase in de vorming van amorf silica volgens het 'çire-perdue' principe gebruikt wordt. De celwand-geassocieerde eiwitten die in diatomeeën geubiquitineerd worden gedurende de plaatvorming dienen nog geïdentificeerd en nader gekarakteriseerd te worden om hun specifieke rol in silicavorming vast te stellen en om inzicht te krijgen in de wijze waarop in diatomeeën de zo opmerkelijke nanostructuren gevormd worden.