

Biominalisation von Einzellern

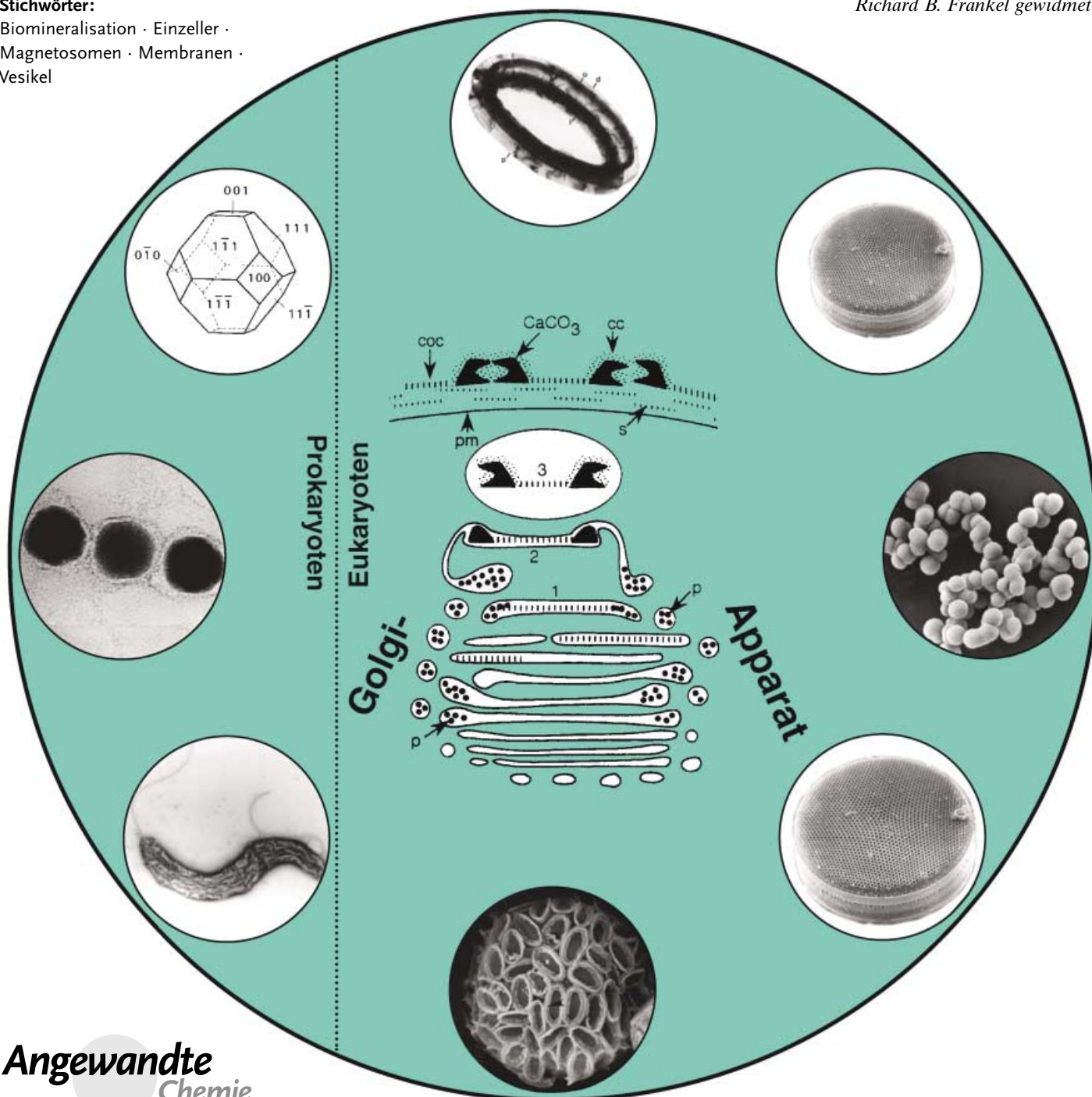
Biominalisation von Einzellern: eine außergewöhnliche Membranbiochemie zur Produktion anorganischer Nano- und Mikrostrukturen

Edmund Bäuerlein*

Stichwörter:

Biominalisation · Einzeller · Magnetosomen · Membranen · Vesikel

Richard B. Frankel gewidmet



Die Natur hat es im Laufe ihrer Entwicklung mit einzigartiger Erfindungsgabe verstanden, auch anorganische Strukturen in vielfältigen Formen zu bilden. Jede Art, die biogene Mineralien hervorbringt, erzeugt diese in einer für sie spezifischen Form, die demnach offensichtlich biologisch kontrolliert ist. Es wird angenommen, dass sowohl die Synthese als auch die Form eines jeden biogenen Materials genetisch programmiert und gesteuert sind. Dies zu untersuchen und die Mechanismen der Biomineralisation zu beschreiben ist erst möglich geworden, seitdem moderne Methoden in der Biologie zu Verfügung stehen. Einzeller wie magnetische Bakterien, Kalkalgen und Kieselalgen, die zu den einfachsten Lebewesen gehören, eignen sich in besonderem Maße, mit diesen Methoden untersucht zu werden. In ihnen entstehen Kristalle und Verbundmaterialien aus Proteinen und amorphen anorganischen Polymeren, welche in der anorganischen Chemie bis heute unbekannt sind.

1. Einleitung

Vieles deutet darauf hin, dass Bakterien oder Archaea (Archaeobakterien), die man den Prokaryoten zuordnen kann, im späten Archaikum und dem Proterozoikum die ersten Lebewesen auf der Erde waren.^[1] Mikrofossilien^[2] lassen darauf schließen, dass sie vor etwa 3.6 Ga (Ga = giga anna, 10⁹ Jahre) existiert haben. Bis heute können beide unter so extremen Bedingungen überleben oder leben, wie das sonst in der belebten Welt kaum vorkommt. Solche Extremophile^[3] gedeihen sehr gut bei hohen oder tiefen Temperaturen (Thermo- bzw. Psychrophile), unter stark sauren oder alkalischen Bedingungen (Acido- bzw. Alkalophile), hohen Salzkonzentrationen (Halophile) und hoher γ -Strahlung (strahlenresistente Mikroorganismen).

Auch wenn es Fossilien mikrobieller Lebewesen aus kohleartigem Material gibt, bestehen die ältesten Fossilien aus versteinerten Formen, die Bakterienmorphologien entsprechen; Magnetitkristalle können daher als direkte und verlässliche Hinweise auf frühes Leben angesehen werden (Abbildung 1 A). Dies trifft jedoch nur zu, wenn sie die fünf wichtigsten Eigenschaften des biologisch kontrollierten Magnetits tragen,^[4] die in den heutigen magnetischen Bakterien gefunden werden.^[5] Diese Eigenschaften sind:

- 1) Kristallgröße einer magnetischen Einzeldomäne und eingeschränkte anisotropische Breiten/Längen-Verhältnisse
- 2) chemische Reinheit
- 3) kristallographische Perfektion
- 4) ungewöhnliche Kristallmorphologien
- 5) kristallographische Richtung der Ausdehnung magnetischer Kristalle, die detailliert in Lit. [4b,c] beschrieben sind.

Lineare Ketten zu bilden ist eine wichtige zusätzliche Eigenschaft von biogenen Magnetitkristallen, die in lebenden Magnetobakterien allerdings von einer speziellen Phospholipidmembran umgeben sind und deshalb Magnetosomen genannt werden.^[6] Auch an Magnetofossilien aus bis zu zwei Milliarden Jahre alten Erdsedimenten^[7a-c] und möglicherweise in Meteoriten vom Mars^[7d] wurden biogene Magnetitkris-

talle nachgewiesen (Abbildung 1 B). Nach ihrer Isolierung aus einer Kultur von *Magnetospirillum gryphiswaldense* wurden Magnetosomen mithilfe eines Stabmagneten für die Elektronenmikroskopie parallel angeordnet, um ihre Reinheit und Magnetosommembran nachzuweisen.^[7e,f] Da in Gegenwart des Stabmagneten lange statt der ursprünglich vorhandenen kurzen Ketten nachgewiesen wurden (Abbildung 1 C), könnte dieses Experiment ein Modell sein für die Bildung von Magnetitkristall-Ketten auf dem Mars, falls nach dem Absterben der Bakterienzellen kurze Ketten freigesetzt wurden.

Die terrestrischen Magnetofossilien sind für den Zeitraum von vor zwei Milliarden Jahren bis zum Präkambrium vor etwa 550 Millionen Jahren die einzigen Zeugen einer Biomineralisation. Erst für die Spätzeit des Präkambriums finden sich Hinweise auf eine Matrix-vermittelte Bildung eines Calciumminerals durch das wirbellose Tier *Cloudina*.^[8] Mehrere hundert Millionen Jahre zuvor scheinen sich die tierischen Hauptphyla schon getrennt zu haben.^[9,10] Noch im frühen Kambrium vor 525 bis 510 Millionen Jahren erfolgte dann geradezu ein explosionsartiger Anstieg der Biomineralisation, Kambrische Explosion (cambrian explosion) genannt. Es entwickelten sich vor allem innerhalb der ersten 10 Millionen Jahre nahezu exponentiell eine Vielzahl biomineralisierender Tierarten.^[4a,11,12] Die meisten der wichtigsten Skelettmaterialien sind hierbei entstanden. Danach haben nur die Korallen, einige Algen und die Wirbeltiere in marinen Habitaten Skelette gebildet.^[13] Diese Erkenntnis haben

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	637
2. Biomineralisation an bakteriellen Oberflächen	638
3. Bildung von Nanokristallformen aus Fe ₃ O ₄ in magnetischen Bakterien	640
4. Bildung komplexer Kristallmorphologien von CaCO ₃ in einzelligen Algen	647
5. Bildung nanostrukturierter Zellwände aus amorpher Polykieselsäure in Diatomeen	652
6. Zusammenfassung und Ausblick	660

[*] Prof. em. Dr. E. Bäuerlein
Abteilung Membranbiochemie
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18 A, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-3777
E-mail: e_baerlein@yahoo.de

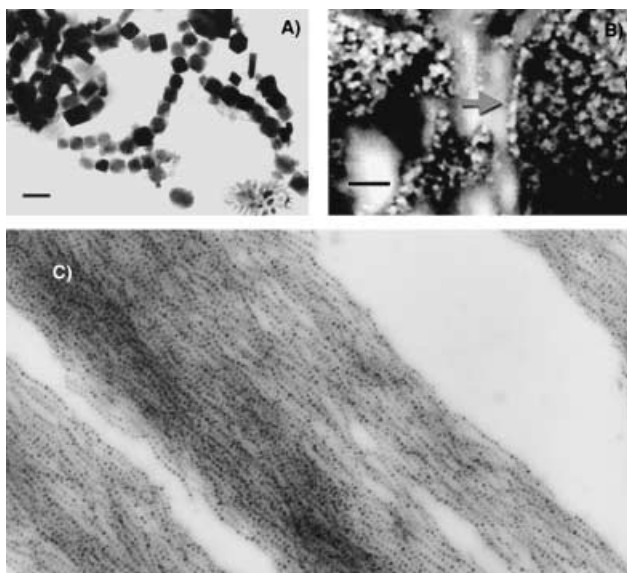


Abbildung 1. Fossile Ketten von Magnetitkristallen aus magnetotaktischen Bakterien (Magnetofossilien): A) Terrestrische Magnetofossilien aus marinen Sedimenten. Die Fossilien stammen aus Bohrungen im Südatlantik (*Deep Sea Drilling Project* (Leg 73), Angola Basin), ihr Alter beträgt ca. 50 Millionen Jahre; die Länge des Balkens entspricht 100 nm. (Unveröffentlichte elektronenmikroskopische Aufnahme mit freundlicher Genehmigung von N. Petersen und M. Hanzlik, München). B) Magnetofossilien im Marsmeteorit ALH 84001. Elektronenmikroskopische Aufnahme (SEM-BSE) einer langen Kette von Magnetitkristallen (Pfeil), die durch die intakte Oberfläche eines frischen Bruches aufgenommen wurde. Die Magnetitkristalle befinden sich am Rande von Carbonatkügelchen in ALH 84001. Die Länge des Balkens entspricht 200 nm. (Ausschnitt aus Abbildung 4 A von Lit. [7d] mit freundlicher Genehmigung von I. Friedmann und der National Academy of Science, USA). C) Lange Magnetosomketten. Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Magnetosomen aus *Magnetospirillum gryphiswaldense*, die bei der Anordnung für die Elektronenmikroskopie im schwach magnetischen Feld lange Ketten gebildet hatten. (Von Lit. [7d] mit freundlicher Genehmigung von D. Schüler). SEM = Raster-Elektronenmikroskopie, BSE = Rückstreuerelektronen-Modus.

Kirschvink und Hagedorn dazu veranlasst, eine kühne, zusammenfassende Hypothese aufzustellen:^[14] Die komplizierten mineralischen Strukturen in Tieren und Pflanzen, wie wir sie heute vorfinden, sind demnach aus einem schon existierenden, einfacheren System hervorgegangen. Dabei



Edmund Bäuerlein, geb. 1932 in Höchst, studierte Chemie in Saarbrücken, München und Frankfurt/M., promovierte bei Prof. Th. Wieland über biologisch relevante Hydrochione und wechselte an das Max-Planck-Institut für medizinische Forschung nach Heidelberg. Er habilitierte sich 1974 an der Fakultät für Chemie der Universität Heidelberg und wurde 1980 zum apl. Professor der Universität Heidelberg ernannt. 1984 wechselte er an das Max-Planck-Institut für Biochemie in München, Abteilung Membranbiochemie, der er bis zum Ende seiner aktiven Dienstzeit 1997 als Forschungsgruppenleiter angehörte.

sollen Genmuster, die sich für eine spezielle Funktion entwickelt haben, durch Genduplikation, Mutation und Adaption in einem anderen biologischen System für eine neue Rolle, eine andere mineralische Struktur, verändert worden sein.^[15] Die paläontologischen Befunde stehen nicht im Widerspruch zu der Idee, dass die Bildung von Magnetitkristallen magnetischer Bakterien die Vorstufe der biogenen Mineralbildung in Eukaryoten sein könnte. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass Magnetitkristalle auch in eukaryotischen Einzellern wie Euglena-Algen (*Euglenophyta*)^[16] und Dinoflagellaten^[4b] sowie in höheren Organismen wie Lachs,^[17] Forelle,^[18] Brieftaube,^[19] Wanderameise^[19] und auch im menschlichen Gehirn^[20] nachgewiesen wurden.

Aber nicht nur die Fähigkeit, Magnetitkristalle zu bilden, ist offensichtlich in mehreren höheren Organismen vorhanden. Es könnte auch schon das auf intracytoplasmatischen Vesikeln aufbauende System, durch das Biomineralien gebildet werden, von den magnetotaktischen Bakterien an die eukaryotischen Einzeller übertragen worden sein. Ließe sich diese Hypothese verifizieren, könnte die Aufklärung der Mechanismen, die zur Bildung komplizierter Strukturen bis zu den Knochen und Zähnen führen, einfacher sein.

2. Biomineralisation an bakteriellen Oberflächen

2.1. Immobilisierung von Ionen

Bakterielle Zellen haben ein Volumen von $1.5\text{--}2.5\ \mu\text{m}^3$,^[21] und folglich ein hohes Oberflächen/Volumen-Verhältnis. Um sich davon eine Vorstellung zu machen, kann man einen Würfel von 1 cm Kantenlänge in 10^{12} Würfel von $1\ \mu\text{m}$ Kantenlänge zerlegen. Dabei ist die gesamte Oberfläche dieser 10^{12} kleinen Würfel 10000-mal größer als die des großen Würfels.^[22] Die große Oberfläche einer Bakterienzelle ist vor allem für die Aufnahme von Nährstoffen und die Ausscheidung von Abfallstoffen geeignet. Beide Vorgänge hängen vollständig von den Diffusionsgradienten der jeweiligen Substanzen ab.

Darüber hinaus bieten die unterschiedlichen Zellwandstrukturen der beiden Gruppen von Bakterien, die ursprünglich entsprechend ihrem Färbeverhalten bei der Gramfärbung als grampositiv oder gramnegativ bezeichnet wurden, eine Fülle von Möglichkeiten, Kationen und auch Anionen zu binden. So besteht die Zellwand von grampositiven Bakterien aus einem hochvernetzten Polymer, einer 25 nm dicken Peptidoglycan-Schicht, auch Murein-Sacculus genannt, das reich an Carboxylatgruppen ist. Sekundäre Polymere wie Teichonsäure, Ketten von 8–50 Glycerin- oder Ribitolmolekülen, die über Phosphatbrücken verestert sind, oder Teichuronsäure, die im Wesentlichen auf Uronsäuren basiert, erweitern das Arsenal an negativ geladenen Verbindungen (Phosphat- und weitere Carboxylatgruppen). Die Zellwand von gramnegativen Bakterien dagegen setzt sich aus einer dünnen Peptidoglycanschicht von 4 nm zusammen, die von der Lipid/Protein-Doppelschicht ihrer Außenmembran gegen die Umgebung abgeschirmt wird. Deshalb sind die nach außen ragenden Lipopolysaccharide (LPS), die mit ihren lipophilen Enden in der Außenmembran verankert sind, mit

ihren vielen Phosphat- und oft auch Carboxylatgruppen hier wahrscheinlich die bevorzugten Zentren der Kationenbindung.

Zusätzliche Schichten der äußeren Oberfläche werden sowohl bei den grampositiven wie auch den gramnegativen Bakterien durch saure Mucopolysaccharide gebildet: als Kapseln, wenn sie an den Zellwänden festgebunden sind, oder als Schleim, wenn sie sich frei zwischen den Bakterien bewegen können.^[23] Auch Scheiden, röhrenförmige Hüllen von Filamente bildenden Bakterien, die aus einem Heteropolysaccharid bestehen, binden durch die darin vorkommende Gluconsäure Kationen. Solch eine Immobilisierung kann auch aktiv durch Enzyme stattfinden, die in den Scheiden lokalisiert sind, wobei z. B. Mn^{II} zu Mn^{IV} oxidiert wird und als MnO_2 ausfällt.^[23]

Viele Bakterien und Archaea bilden parakristalline Oberflächenschichten mit einer zweidimensionalen Proteinanordnung, die S-Layer (surface layer), die hier jetzt S-Schicht genannt wird.^[24] Die polaren Aminosäurefunktionen scheinen überwiegend im Innern der S-Schicht-Proteine verborgen zu sein. In den Kanälen, die das S-Schicht-Netz durchziehen, können jedoch solche Funktionen die gefundenen Biomineralisationen erklären.^[23] Bemerkenswerterweise sind S-Schicht-Proteine die ersten Glycoproteine, die in Prokaryoten nachgewiesen wurden und zwar zuerst in dem Archaeon *Halobacterium salinarium* (früher *H. halobium*).^[25]

Insgesamt ergibt sich für alle wesentlichen bakteriellen Oberflächen durch die beschriebenen COOH- und PO(OH)-Gruppen bei neutralem pH-Wert der Umgebung eine negative Oberflächenladung. So werden im einfachsten Fall die positiv geladenen Metallionen durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden. Jedoch gibt es wegen der komplexen Struktur der Oberflächen wenig konkrete Hinweise auf wirkliche Metallkomplexe. Ein Drei-pK-Modell für Zellwände von *Bacilli*, das aus Säure-Base-Titrations hervorgegangen ist, weist nicht nur auf die Teilnahme von Carboxy- und Phosphoryl-, sondern auch auf Hydroxygruppen hin, die bei der Komplexbildung involviert sein können.^[23,26] Für Cd^{II} , Cu^{II} , Pb^{II} und Al^{III} konnten die Stabilitätskonstanten der Metallcarboxylate bestimmt werden.^[26]

Obwohl die Oberflächen vieler Bakterien negativ geladen sind, können auch Anionen wie Carbonat oder Silicat bei neutralem bis saurem pH-Wert gebunden werden. Diaminopimelinsäure, im Peptidoglycan von grampositiven Bakterien wie *Bacillus subtilis*, und *N*-Acetylfucosamin, im Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, bieten nach Protonierung hierzu eine begrenzte Anzahl positiv geladener funktioneller Gruppen.

Da die Menge des gebundenen Silicats hoch ist im Verhältnis zur Anzahl der positiven Gruppen, wird angenommen, dass mehrwertige Metallionen wie Fe^{III} eine Brückenfunktion ausüben, indem sie zuerst an negativ geladene Gruppen gebunden werden und anschließend das Silication immobilisieren. Wenn keine mehrwertigen Metallionen in Lösung vorhanden sind, binden sehr wahrscheinlich die positiven Gruppen die Silicationen.^[27]

2.2. Keimbildung und Kristallwachstum von Biomineralien

Lebende Bakterien, die von Mineralien teilweise oder vollständig umhüllt sind, werden in vielen, vor allem wässrigen Milieus gefunden. Mikrofossilien^[2] bestehen im Wesentlichen aus einer speziellen Mineralschicht um ein Volumen, das demjenigen von Bakterien ähnelt. Um den biogenen Ursprung der Mikrofossilien zu erhärten, wurden ausgedehnte Untersuchungen zu ihrer Entstehung an lebenden Bakterien durchgeführt.^[2] Bakterien können also nicht nur Ionen binden, sondern auch an ihrer sehr reaktiven Oberfläche Mineralien bilden. Um die dazu notwendige lokale Übersättigung herzustellen, können sie die freie Energie erniedrigen, die zur Fällung notwendig ist. Dies kann geschehen, indem sie durch ihren Metabolismus den pH-Wert oder das Redoxpotential an ihren Oberflächen verändern. Als Zentren dieses Wachstums werden die Ionenbindungsstellen angenommen.^[28] Hierbei werden wenig geordnete bis kristalline Phasen aus Eisen- und Manganoxiden durch enzymatische Redoxreaktionen um Größenordnungen schneller gefällt als durch chemische Redoxreaktionen aus einer Lösung ohne Bakterien.^[23] Metallionen wie Fe^{III} , allein oder zusammen mit Al^{III} , bilden nicht nur Brücken zwischen Carboxylat- oder Phosphatgruppen der Oberfläche und Silicaten, sondern sind auch entscheidend für die Bildung von amorphen und wenig geordneten, feinkörnigen Polysilicaten.^[23,27] Ein außergewöhnliches Beispiel der Keimbildung und des Kristallwachstums, hier von Carbonatmineralien, wurde an der S-Schicht photosynthetischer Bakterien nachgewiesen.^[29] Die S-Schicht besteht im konkreten Fall aus Kopien eines 104-kDa-Proteins in einer hexagonalen Konfiguration. S-Schichten sind also bis jetzt die am besten bekannten, organischen Matrizen, allerdings nicht in, sondern an der Oberfläche eines Organismus. Bei schwachem Licht bildet sich Gips ($CaSO_4$) auf ihnen, bei laufender Photosynthese Calcit ($CaCO_3$) durch pH-Erhöhung in unmittelbarer Nachbarschaft.

2.3. Biomoleküle als Matrizen

Die Stabilität der ausgedehnten zweidimensionalen Gitter von S-Schichten ermöglicht die Isolierung und Nutzung dieser Biomoleküle als Matrizen zur Herstellung von molekular geprägten Nanostrukturen.^[24e,30,31] So konnte metallisches Platin durch Reduktion von $K_2[PtCl_4]$ auf einer isolierten S-Schicht derart deponiert werden, dass sich hochgeordnete und periodische Anordnungen von Metallclustern auf der Schicht bilden. Gut getrennte und nahezu sphärische Partikel (dunkel) sind auf der kristallinen Proteinmatrix angeordnet und geben die tetragonale Struktur der S-Schicht wieder (Abbildung 2).^[31a]

2.4. Metall- oder Mineralbildungen im Inneren von Bakterien – ein Übergang von außen nach innen?

Alle bisher beschriebenen Mineralien sind an den Oberflächen von Bakterien (Abschnitt 2.1) entstanden.^[2a] Im folgenden Abschnitt wird die Biomineralisation von Magne-

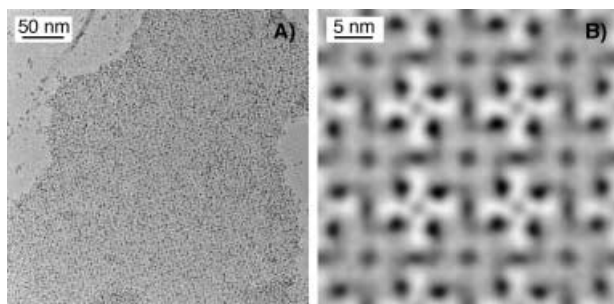


Abbildung 2. Platin-Nanocluster, hochgeordnet auf einer kristallinen, bakteriellen S-Schicht (surface layer). A) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme von Platinclustern, die auf isolierten S-Schichten von *Sporosarcina urea* durch Reduktion eines Platinsalzes hergestellt wurden. B) Verteilung von Platinclustern (schwarz) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 1.9 ± 0.6 nm auf der zweidimensionalen Proteinmatrix, sichtbar gemacht durch Bildverarbeitung. Die Einheitszelle des Clustergitters hat eine Größe von 13.2×13.2 nm. (Von Lit. [31a] mit freundlicher Genehmigung von W. Pompe und H. Engelhardt sowie des Springer Verlags, Heidelberg).

tit(Fe_3O_4)-Kristallen in speziellen Phospholipidvesikeln des Zellinneren (Cytoplasma) von Bakterien beschrieben. Hierbei stellt sich die Frage, ob es auf einem Weg von außen nach innen eine primitive Stufe von Biomineralisation im Cytoplasma gibt, d.h. ohne Membran. In der Tat können Goldionen als Au^{III} oder $[\text{AuCl}_4]^-$ bis ins Cytoplasma von Endosporen, also metabolisch ruhenden Bakterien, vordringen und dort in einer Redoxreaktion viele Nanopartikel von 5–20 nm Durchmesser aus metallischem Gold bilden (Abbildung 3).^[2a] Obwohl Au^{III} -Ionen anders als Hg^{II} -Ionen starke Oxidationsmittel sind, ähnelt ihre Metallbildung im Cytoplasma^[32] der von Hg^{II} -Ionen bezogen auf das Entgiftungs- oder Resistenzverhalten von Bakterien. Jedoch wird metallische Gold abgelagert, während elementares Quecksilber, das hier erst durch die *cytosolische* Quecksilber-Reduktase entstanden ist, als Dampf aus den Bakterien diffundiert.^[33]

Intrazelluläre partikelförmige Eisensulfidablagerungen, die unregelmäßig verteilt waren und aus amorphem Material bestanden, wurden in einigen Sulfat-reduzierenden Bakterien gefunden. Sie sind wahrscheinlich von keiner Membran umgeben, da sie nach Lyse der Zellen nicht durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden konnten.^[34] Darüber hinaus wurden in einigen Purpurbakterien, die eine anoxygene Photosynthese betreiben, – also aus der Frühzeit der sich entwickelnden Photosynthese stammen –, dann sphärische Partikel gefunden, wenn sie in Medien mit relativ hoher Eisenkonzentration kultiviert wurden. Diese Partikel, die von einer Art Membran umgeben waren und in der Zelle eine Kette bildeten, waren wahrscheinlich für die magnetische Reaktion der Bakterien verantwortlich. Solche Purpurbakterien könnten also eine frühere Stufe der Biomineralisation in Vesikeln sein.^[34]

Als fehlendes Bindeglied (missing link) zwischen bakterieller Biomineralisation an Oberflächen einerseits und im Cytoplasma oder in intracytoplasmatischen Vesikeln andererseits wurde ein Bakterium beschrieben,^[35a] das wahrscheinlich beides zugleich vermag. Es ist *Shewanella putrefaciens* CN 32, ein gramnegatives und fakultativ anaerobes

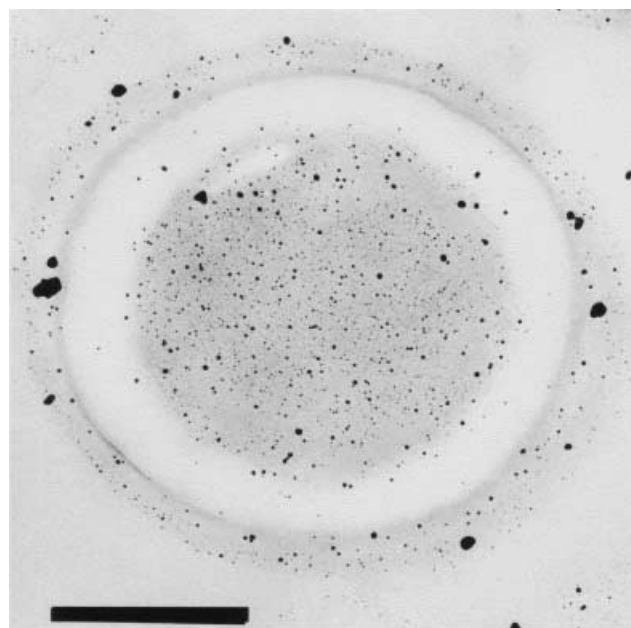


Abbildung 3. Bildung von Gold-Nanopartikeln im Cytoplasma der Endosporen von *Clostridium botulinum*. Werden diese Endosporen 10 min bei Raumtemperatur in einer Lösung von AuCl_3 suspendiert, entstehen Goldpartikel mit Durchmessern von 5–20 nm. Im Dünnschnitt ohne Negativkontrastierung sind die Goldpartikel elektronenmikroskopisch nahezu ausschließlich im Cytoplasma zu finden. Die Länge des Balkens entspricht 500 nm. (Von Lit. [2a] mit freundlicher Genehmigung von T. J. Beveridge).

Bakterium, das Fe^{III} als Elektronenacceptor bei seiner anaeroben Energiegewinnung zu Fe^{II} reduzieren kann (dissimilatorische Eisenreduktion, siehe auch Abschnitt 3.4). Unter den strikt anaeroben Bedingungen einer H_2/Ar -Atmosphäre und nur in Gegenwart des Fe^{III} -Oxids Ferrihydrit (2-Linien-Ferrihydrit)^[35] bilden diese Bakterien nicht nur Magnetit (Fe_3O_4) außerhalb der Bakterien. Sie bilden dann, wenn nach einiger Zeit Fe^{II} im Reaktionsgemisch nachweisbar ist, etwa 60 Eisenoxidpartikel von 30 – 50 nm Durchmesser im Cytoplasma. Die Partikel sind sehr wahrscheinlich von einer Lipiddoppelmembran umgeben und erzeugen bei transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen Reflexe in der Feinbereichstreuung (selected area electron diffraction, SAED), die sich dem Magnetit oder Maghämait zuordnen lassen.^[35] Diese Mineralien wurden anders als im zuvor beschriebenen Experiment^[34] bei Eisenkonzentrationen gebildet, wie sie in Böden und Sedimenten gefunden werden.^[35a]

3. Bildung von Nanokristallformen aus Fe_3O_4 in magnetischen Bakterien

3.1. Vorkommen magnetischer Bakterien

Magnetische Bakterien, auch magnetotaktische Bakterien genannt, sind in aquatischen Habitaten weit verbreitet und bevorzugen mikroaerophile Bereiche, die „Oxidisch-anoxidische Übergangszone“ (oxic-anoxic transition zone, OATZ).^[36,37] Solche charakteristischen Lebensräume erstre-

cken sich überwiegend in der Wasser-Sediment-Zwischenschicht von Süßwassertümpeln, -seen und -flüssen, wo auch die meisten magnetischen Bakterien gefunden wurden. Der Chiemsee in Bayern ist dafür ein gutes Beispiel.^[7f] Auch in den Übergängen von Brack- zu Meerwasser, die durch besondere, z. B. vertikal angeordnete chemische Schichten – von oben oxidierend und von unten reduzierend – charakterisiert sind, wurden auch zahlreiche magnetotaktische Bakterien nachgewiesen.^[38] Letztere befindet sich ungewöhnlicherweise einige Meter tief in einer Wassersäule, die abhängig von der Jahreszeit in vertikale Richtung wandert. Selbst im Salzwasser des Südatlantiks, vor den Kontinentalrändern seines östlichen Teils (Angola) wie auch denen seines westlichen Teils (Brasilien), wurden magnetotaktische Bakterien in Oberflächensedimenten in bis zu 3000 m Tiefe entdeckt.^[39]

In allen wesentlichen Morphotypen, als Kokken, Spirillen, Vibrionen, Stäbchenbakterien und auch als vielzellige Bakterien^[40] kommen magnetotaktische Bakterien in den verschiedenen Habitaten vor. Sie sind wie viele anderen Sedimentbakterien schwer zu kultivieren. Daher sind seit 1979, der Isolierung des ersten magnetotaktischen Bakteriums, heute *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 genannt^[41] (früher *Aquaspirillum magnetotacticum*^[42]), nur zehn reine Kulturen bekannt.^[7f,43] Dass es trotzdem möglich wurde, eine Ökologie und einen ersten phylogenetischen Stammbaum der magnetotaktischen Bakterien zu beschreiben, ist einer eleganten Methode zu verdanken, welche die vergleich-

ende Sequenzanalyse von ribosomaler Ribonucleinsäure (rRNA)^[44] mit der In-situ-Hybridisierung von fluoreszierenden Oligonucleotidsonden (FISH) für bisher nicht kultivierbare Bakterien verbindet (Abbildung 4).^[45]

3.2. Artspezifische Magnetitkristalle

In den vielfältigen Bakterienformen (Morphotypen) findet man durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Magnetitkristalle mit bestimmten Größen und Morphologien, die beide für die jeweilige Bakterienart spezifisch zu sein scheinen. Diese Annahme konnte durch Isolierung und Kultivierung von Reinkulturen bestätigt werden: Die „reifen“ Kristalle stimmten in Größe (maximale Ausmaße) und Morphologie überein.^[5b] Wurden Isolate aus natürlichen Habitaten gewonnen, fielen gegenüber den weitgehend ungestörten reifen Kristallen der Reinkulturen Abweichungen auf,^[46] die wahrscheinlich aus Veränderung der Bakterienumgebung hervorgegangen waren, z. B. Änderungen der Eisenkonzentration, des Sauerstoffgehalts und der Temperatur. Etwas vereinfacht kann man drei Kristallmorphologien beschreiben, die in magnetotaktischen Bakterien gefunden wurden (Abbildung 5): kuboooktaedrische, pfeilspitzenartige und pseudo-hexagonal. Es soll hier noch besonders hervorgehoben werden, dass alle Magnetitkristalle das kubisch flächenzentrierte Kristallgitter von Magnetit, jedoch artspe-

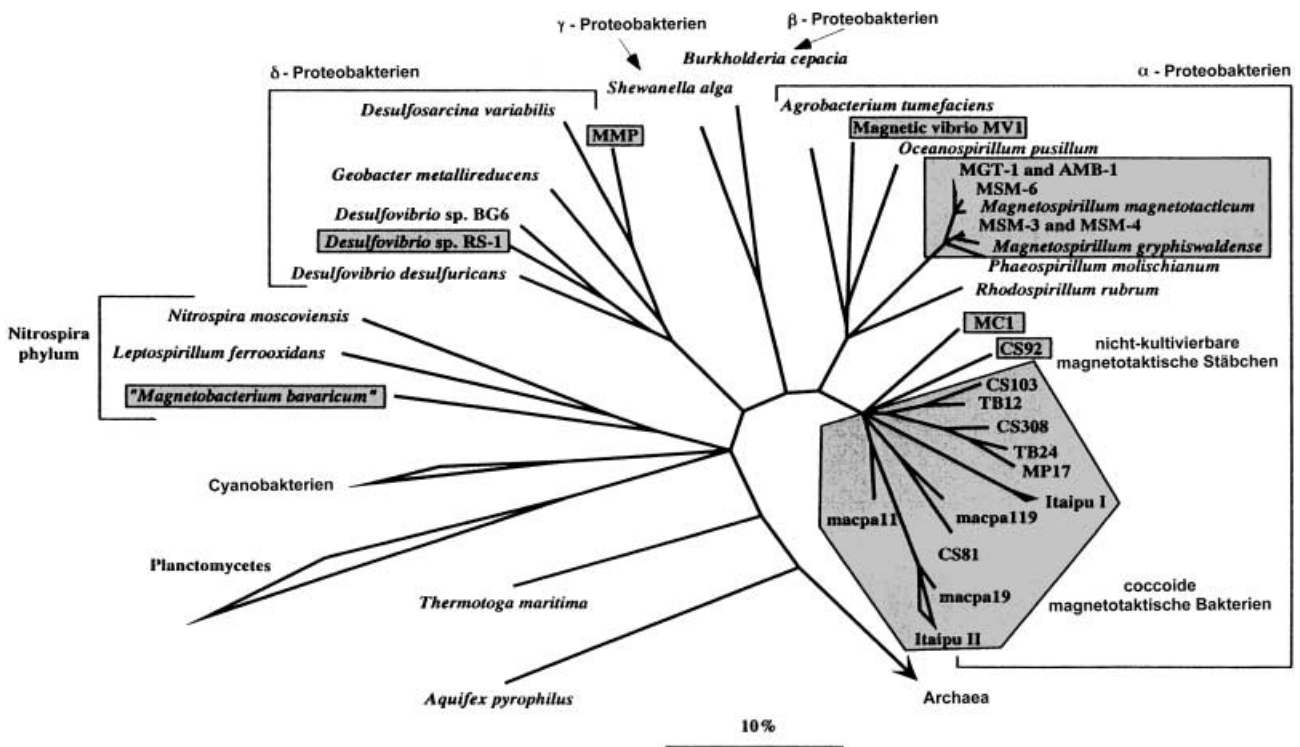


Abbildung 4. Rekonstruktion der Phylogenie magnetotaktischer Bakterien (schattierte Bereiche) nach vergleichender 16S-rRNA-Sequenzanalyse. Der Stammbaum wurde mit dem ARB-Softwarepaket erstellt und basiert auf einer Sparsamkeits(Parsimony)-Analyse. Er wurde entsprechend der Ergebnisse von Analysen der maximalen Wahrscheinlichkeit (maximum likelihood) und des „Neighbor-joining“ korrigiert, wobei instabile Abzweigungen durch Multifurkationen angezeigt werden. Die Baumtopologie beruht auf fast vollständigen 16S-rRNA-Sequenzen. Die Teilsequenzen der Stämme CS103, MC-1, MV-1, MMP und RS-1 wurden nachträglich mit dem Parsimony-Algorithmus eingefügt, wobei keine Änderungen der Gesamttopologie zugelassen wurden. (Von Lit. [45a] mit freundlicher Genehmigung von R. Amann).

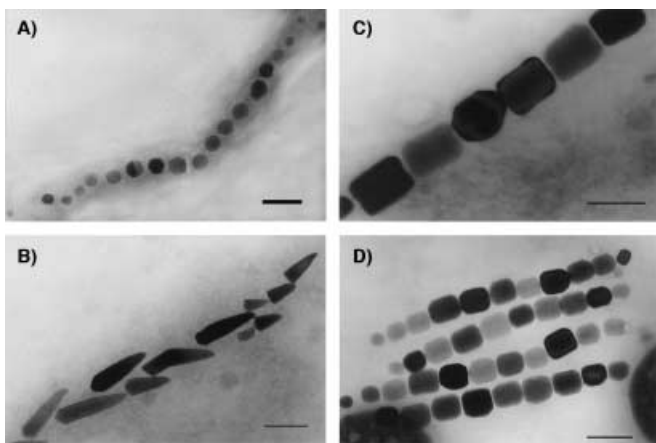


Abbildung 5. Kristallmorphologien und intrazelluläre Anordnung von Magnetosomen aus magnetotaktischen Bakterien: A) kubooktaedrisch, B) pfeilspitzenartig, C–D) pseudo-hexagonal. Die Magnetosomen sind in einer (C) oder mehreren (D) Ketten angeordnet. Die Länge des Balkens entspricht 100 nm.

zifische Kristallmorphologien haben.^[4b,c] Idealierte Kristallmorphologien dieser biogenen Kristalle sind in Abbildung 6 gezeigt. Zusätzlich sind dort auch solche Morphologien dargestellt, die für das magnetische Schwefelanalogon des Magnetits, Greigit (Fe_3S_4), nachgewiesen wurden.^[4b,c]

Das Unerwartete, ja Außergewöhnliche dieser biogenen Magnetitkristalle besteht nicht nur in einer engen Größenverteilung, sondern vor allem auch in einem Durchmesserbereich von 40–120 nm, der ihnen deshalb das höchste magnetische Moment zuordnet. Denn dieser Durchmesserbereich

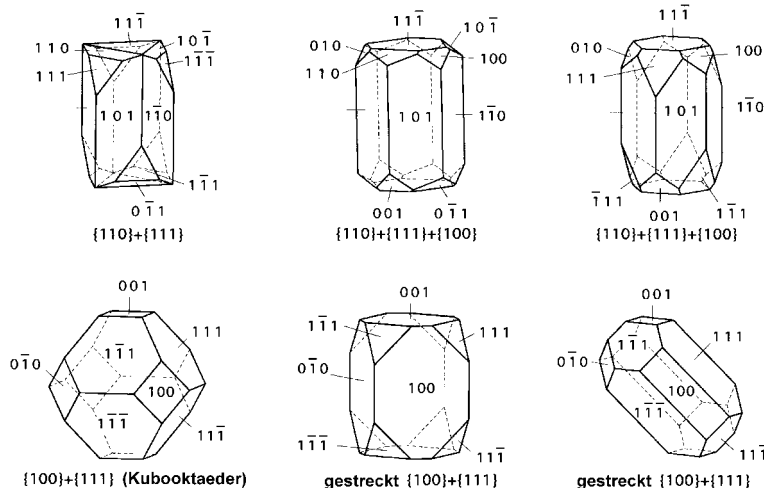


Abbildung 6. Idealierte Kristallmorphologien von Magnetit (Fe_3O_4) und Greigit (Fe_3S_4), die aus hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM)-Untersuchungen an Magnetosomen von magnetotaktischen Bakterien abgeleitet wurden. Obere Reihe: Variationen pseudo-hexagonaler Prismen; untere Reihe: (von links nach rechts) Kubooktaeder, der in Magnetosomen mit Magnetit und Greigit vorkommt; gestreckter Würfel mit schräg abgeschnittenen Ecken, der nur in Magnetosomen mit Greigit gefunden wurde; gestreckter Kubooktaeder, der in einigen Magnetosomen mit Magnetit vorkommt. (Nach Devouard et al.^[4c] abgewandelt, mit freundlicher Genehmigung von R. B. Frankel).

entspricht Magnetitkristallen mit einer magnetischen Einzeldomäne (single magnetic domain).^[47] Da Magnetitkristalle aus anorganischen Synthesen weder eine ähnlich enge Größenverteilung (und damit auch keine einheitlichen magnetischen Eigenschaften) noch eine solche Vielfalt an Kristallmorphologien bieten, wird die Bildung dieser biogenen Magnetit- und auch Greigitkristalle wahrscheinlich biologisch streng gesteuert. Die Erforschung dieser Kontrolle steht noch aus.

3.3. Das Magnetosom: eine Phospholipidvesikel zur Produktion artspezifischer Magnetitkristalle

3.3.1. Die Magnetosommembran

Den Pionieren Blakemore et al. und Frankel et al. gelang nicht nur die Isolierung^[36a] und Kultivierung^[42] von *Magnetospirillum magnetotacticum*, sondern auch die Identifizierung der Magnetitkristalle.^[5b] Sie konnten mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) auch zeigen, dass fast alle diese Kristalle von einer elektronenundurchlässigen Schicht, wahrscheinlich von einer Lipiddoppelschicht, umgeben sind. Der Begriff Magnetosom wurde für solch ein umhülltes magnetisches anorganisches Kristall eingeführt.^[6] Nach der Isolierung geringer Mengen an Magnetosomen wurden in einer ersten Lipidanalyse Neutrallipide, freie Fettsäuren, Glycolipide, Sulfolipide und Phospholipide gefunden.^[48] Mit dem phylogenetisch benachbarten *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Abbildungen 7 A, B) wurde eine Reinkultur gewonnen,^[41,49] die anders als das sauerstoffempfindlichen *M. magnetotacticum* praktisch sauerstofftolerant ist. Daraus ließ sich ein magnetotaktisches Bakterium entwickeln, das die höchsten Ausbeuten an Magnetosomen zu gewinnen ermöglichte. Die Magnetosomen wurden anschließend über eine neuartige Methode, eine magnetische Trennsäule, sehr rein erhalten.^[50] Daraufhin wurde die Lipidzusammensetzung nicht nur der Magnetosom-, sondern auch der Außen- und Cytoplasmamembran quantitativ bestimmt (Tabelle 1).^[74,51] Anders als bis dahin vermutet,^[48] unterschied sich das Lipidprofil der Magnetosommembran von dem der beiden anderen Membranen. So war die Menge an Phosphatidylglycerin etwa dreimal, diejenige an Phosphatidylcholin achtmal so groß wie in der Außen- oder Cytoplasmamembran. Ornithinamidlipid und ein anderes, bisher unbekanntes Lipid (X-NH_2), das ebenfalls keine Phosphatgruppe hat, konnten dagegen nur in der Außen- und der Cytoplasma-, jedoch nicht in der Magnetosommembran nachgewiesen werden. Beide Lipide waren wertvolle Marker bei der Trennung der Membranen. Diese Ergebnisse lassen zumindest vermuten, dass die Magnetosommembran einem eigenen Syntheseweg folgt und auch für die maximale Größe der Kristalle mitverantwortlich sein kann, da eine Deformation der Phospholipidvesikeln durch zu große Kristalle bisher nicht beobachtet wurde. Auch könnten variierende

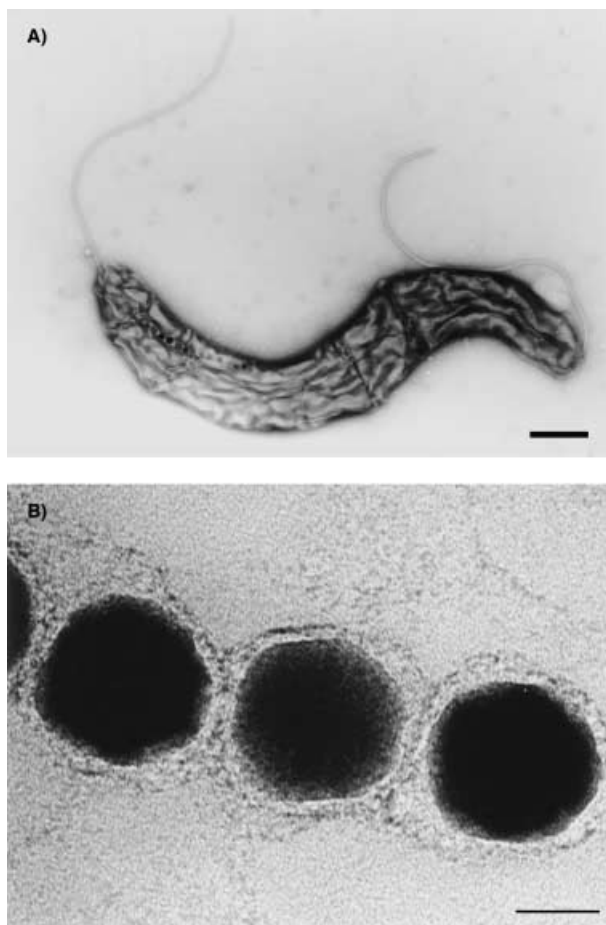


Abbildung 7. TEM-Aufnahmen von A) *Magnetospirillum gryphiswaldense* mit einer Kette von kubooktaedrischen Magnetitkristallen und einer Flagelle an jedem Pol (die Länge des Balkens entspricht 500 nm) und von B) seinen isolierten und gereinigten Magnetosomen, die von einer Membran umgeben sind (die Länge des Balkens entspricht 20 nm).

Tabelle 1: Lipidzusammensetzung der Membranen von *M. gryphiswaldense*

Lipid	Außenmembran [Mol-%]	Cytoplasmamembran [Mol-%]	Magnetosommembran [Mol-%]
Phosphatidylethanolamin	59.9 ± 5.1	70.7 ± 0.5	52.8 ± 5.5
Phosphatidylglycerin	13.9 ± 0.9	12.6 ± 1.9	38.3 ± 5.7
Ornithinamidlipid	18.6 ± 5.8	4.7 ± 0.4	–
Phosphatidylcholin	–	1.1	8.9 ± 0.5
XNH ₂	7.6 ± 0.7	7.2 ± 1.9	–

Phospholipid-Zusammensetzungen der Membranen und damit die Membranoberflächen für die jeweilige Kristallmorphologie der Magnetitkristallen eine Rolle spielen.

Funktionell noch wichtiger als Phospholipide sind die Proteine der Magnetosommembran, von denen angenommen wird, dass sie den Mechanismus der Magnetitkristallbildung beeinflussen. Sie sollten demnach in einer biologisch gesteuerten Biomineralisation,^[4a,52] deren erstes Prinzip die intrazelluläre räumliche Kompartimentierung ist, mit der

Lipiddoppelschicht der Magnetosomen verbunden sein. An der Steuerung dieses Mechanismus sollen Eisentransportproteine, die in den Magnetosomen lokale Übersättigung erzeugen, Proteine, die die Kristallkeimbildung katalysieren, und Redoxproteine, die eine Fe^{III}/Fe^{II}-Stöchiometrie von 2:1 für Fe₃O₄ herstellen, beteiligt sein.

Das proteinchemische und molekularbiologische Interesse hat sich daher auf die Proteine der Magnetosommembran gerichtet,^[48,53] die wahrscheinlich für den einfachsten Mechanismus einer gesteuerten Biomineralisation von zentraler Bedeutung sind. Isolierte Magnetosomen bilden wegen der elektrostatischen Eigenschaften ihrer Membran stabile Suspensionen. Detergentien konnten die Magnetosommembran auflösen, wobei die Magnetitkristalle sofort agglomerierten.^[7f] Durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden in diesen Extrakten der Magnetosomen von *M. gryphiswaldense* zunächst neun spezifische Proteinbanden,^[54] in solchen von *M. magnetotacticum* entweder zwei^[48] oder drei^[53a] für die entsprechende Magnetosommembran gefunden. Nach weiteren Untersuchungen an *M. gryphiswaldense* erhöhte sich die Zahl der spezifischen Banden auf dreizehn.^[55]

3.3.2. Klonierung und Sequenzanalyse der Gene von Magnetosommembranproteinen

Der erste Schritt in die Molekularbiologie der Magnetosommembran führte durch Fukumori et al. vor sieben Jahren vom SDS-Polyacrylamidgel über die N-terminale Aminosäuresequenz eines 22-kDa-Proteins (MAM 22) von *M. magnetotacticum* zur Klonierung und Sequenzanalyse des zugehörigen Gens.^[53a] Auf gleichem Wege wurde die Aminosäuresequenz eines 24-kDa-Proteins (MamA) aus *M. gryphiswaldense* bestimmt, die zu 91 % mit dem Protein aus *M. magnetotacticum* übereinstimmt.^[54] Obwohl in einer Reihe von *Magnetospirillum*-Stämmen durch SDS-PAGE sehr unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der Magnetosommembranen nachgewiesen wurden, konnte dabei durch Western-Blotting (Identifizierung des Proteins durch einen spezifischen Antikörper) gezeigt werden, dass dieses 24-kDa-Protein in allen Membranen vorkommt.^[53b] Es zeigt eine signifikante Homologie zur Tetratricopeptid-Repeat (TPR)-Familie von bisher 25 Proteinen.^[56] Die Primärstruktur des TPR-Motivs ist ein degeneriertes 34(Tetratrico)-Aminosäuren-Wiederholungsmuster, das meist in Tandems von bis zu neun Einzelmotiven angeordnet ist. Dieses Motiv kommt in vielen Organismen von Bakterien bis zum Menschen vor. TPR-Proteine können zahlreiche biologische Funktionen ausüben, die von der Transkriptionskontrolle über den Proteintransport und die Zellteilung bis zur Proteinfaltung reichen. Das bis zu sechsmal wiederholte Tetratricopeptid-Motiv scheint in der Protein-Protein-Wechselwirkung eine wichtige Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu typischen Membranproteinen hat MamA keinen hydrophoben Membranteil, sodass man annehmen kann, dass es elektrostatisch an die Magnetosommembran gebunden ist.^[54] Für das homologe MAM-22-Protein wurde eine Funktion als Rezeptor wie auch eine solche bei der Wechselwirkung mit den cytoplasmatischen Proteinen vorgeschlagen.^[57]

Die in Abschnitt 3.3.1 erwähnten Untersuchungen an *M. gryphiswaldense*^[55] haben zur Klonierung und Sequenzierung von vier weiteren Genen wesentlicher Proteine der Magnetosommamembran geführt. Diese Gene (*mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamE*) und auch ihre abgeleiteten Proteine wurden bisher mit der Magnetitkristallbildung keines anderen magnetischen Bakteriums in Verbindung gebracht. Das Gen *mamB* kodiert ein Protein, dessen Bande in der SDS-PAGE einer Molekülmasse von 33.3 kDa entspricht.^[55] Die signifikante Sequenzhomologie mit Proteinen der weit verbreiteten Kation-Diffusions-Erleichterung(CDF)-Familie^[58] macht MamB zu einem Kandidaten für den Eisentransport. Denn diese Proteinfamilie ist nicht nur für den Transport von Schwermetallen verantwortlich, sondern auch für die Resistenz gegen bestimmte Schwermetalle. Eine solche Resistenz kann zu deren Export führen – beispielsweise zum Verdampfen von Quecksilber, dessen Ionen erst im bakteriellen Cytoplasma durch eine Quecksilber-Reduktase in Metall verwandelt werden^[33] – oder auch zur Ablagerung von Schwermetallen in Vesikeln.^[59] Das Gen *mamC* kodiert ein 15.5-kDa-Protein, das das Hauptprotein der Magnetosommamembran ist. Das Gen

konnten in den Genomsequenzen der beiden magnetischen Bakterien die homologen Gene mit signifikanter Ähnlichkeit zu *mamA* und *mamB* aus *M. gryphiswaldense* identifiziert werden.^[55] Die Mam-Proteine von *M. gryphiswaldense* und *M. magnetotacticum* haben bei 91–97% Übereinstimmung fast identische Sequenzen, während die Übereinstimmung von Aminosäuresequenzen zwischen *Magnetospirillum*-Arten und *Magnetococcus*-MC1 bei 46–67% liegt. Durch eine weitere vergleichende Analyse konnte der N-terminalen Aminosäuresequenz des 36.3-kDa-Proteins von *M. gryphiswaldense* das vierte neue Gen, *mamE*, zugeordnet werden.^[55]

3.3.3. Der mamAB-Gencluster in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus* MC-1

Nicht nur homologe Gene zu *mamA* und *mamB* aus *M. gryphiswaldense* sind in den beiden Genomen von *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus* MC-1 enthalten; zusätzlich sind noch die benachbarten Gene, offene Leserahmen (open reading frames, ORFs), in allen drei Bakterienstämmen colinear angeordnet (Abbildung 8). Darüber hinaus

Proteinfamilien, die aus Gruppen von homologen Genen abgeleitet sind welche im mamAB-Gencluster aller magnetischen Bakterien vorliegen

Sequenzähnlichkeiten zu :

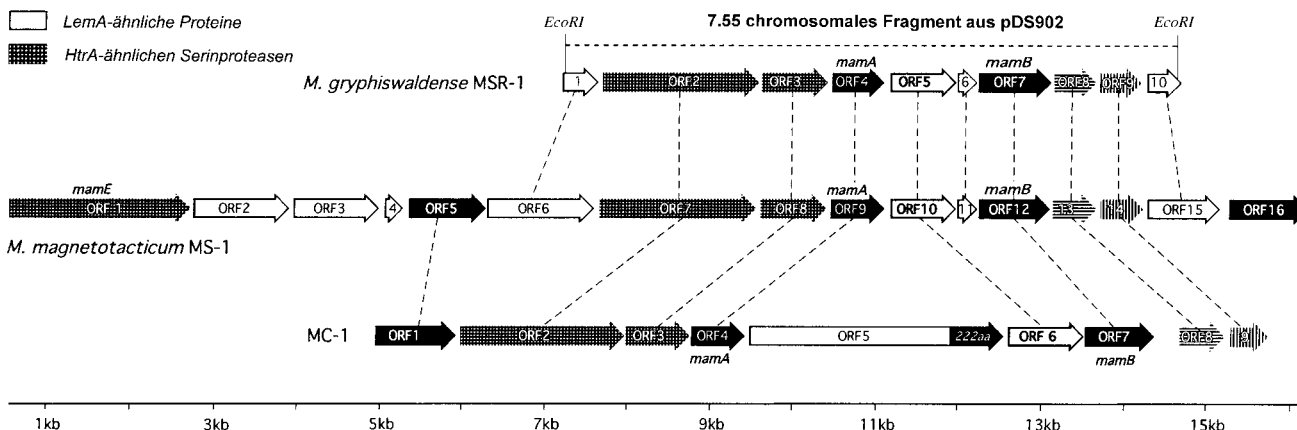
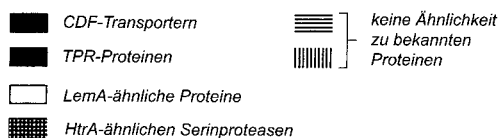


Abbildung 8. Molekulare Organisation der *mamAB*-Cluster in *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus* MC-1. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Die verschiedenen Markierungen der graphisch charakterisierten Pfeile zeigen ORFs (offene Leserahmen), die zu den jeweiligen Familien homologer Gene gehören, welche in jedem *mamAB*-Cluster der drei untersuchten magnetotactischen Bakterien vorkommen. Die gestrichelten Linien verbinden äquivalente Gene, d.h. die ähnlichsten Homologe. (Von Lit. [55a] mit freundlicher Genehmigung von D. Schüler und der American Society of Microbiology).

mamD kodiert ein Protein, das einem Protein von 21.9 kDa entspricht.^[55] In Datenbanken konnten keine Hinweise auf zu MamC und MamD homologen Proteinen gefunden werden.

Während dieser Arbeiten wurden die Genome der beiden magnetischen Bakterien, *Magnetospirillum magnetotacticum* und *Magnetococcus* MC-1 (zusammen mit denen von 13 nicht magnetischen Bakterien) durch das Joint Genome Institute (JGI) des U.S. Department of Energy innerhalb von vier Wochen fast vollständig (d.h. zu mehr als 95%) sequenziert und der Öffentlichkeit sofort zugänglich gemacht.^[60] Dadurch

gehören die entsprechenden ORFs überwiegend den gleichen bekannten Proteinfamilien an oder haben keine Gemeinsamkeiten mit bekannten Proteinen.^[55] So lassen sich offensichtlich diesen drei, möglicherweise auch allen bekannten, magnetischen Bakterienstämmen in dem *mamAB*-Cluster folgende Proteinfamilien zuordnen (Abbildung 8):

1) TPR-Proteine

Die *mamA*-Gene in allen drei Stämmen weisen Gemeinsamkeiten mit den Genen der TPR-Proteine auf (Abschnitt 3.3.2).

2) CDF-Proteine

Nicht nur die Proteine der *mamB*-Gene in allen drei Stämmen (Abschnitt 3.3.2) sind homolog zu den CDF-Proteinen, sondern auch zusätzliche CDF-Homologe wurden in den *mamAB*-Clustern von *M. magnetotacticum* und *Magnetococcus MC-1* nachgewiesen (Abbildung 8).

3) HtrA-ähnliche Serin-Proteasen

Bisher wurden neben dem *mamE*-Gen von *M. magnetotacticum* zusätzlich Gene, deren Proteine diesen Serin-Proteasen^[61] ähnlich sind, hier in den *mamAB*-Clustern von allen drei Stämmen gefunden, ORF 2 in *M. gryphiswaldense*, ORF 7 in *M. magnetotacticum* und ORF 2 in *Magnetococcus MC-1* (Abbildung 8).

4) LemA-ähnliche Proteine

In jedem der drei Bakterienstämme wurde jeweils ein ORF mit Sequenzähnlichkeit zu *lemA*-ähnlichen Genen zwischen den *mamA*- und *mamB*-Genen nachgewiesen. Die Funktionen dieser Proteinfamilie^[62] sind bisher unbekannt.

In erstaunlicher Parallelität treten auch zwei weitere Genklassen im *mamAB*-Cluster aller drei magnetischen Bakterien auf, die ORFs 8 und 9 in *M. gryphiswaldense*, die ORFs 13 und 14 in *M. magnetotacticum* und die ORFs 8 und 9 in *Magnetococcus MC-1* (Abbildung 8).^[55] Da für ihre abgeleiteten Proteine weder in Prokaryoten noch in Eukaryoten irgendwelche signifikanten Sequenzähnlichkeiten gefunden wurden, könnten sie wichtige Funktionen der Magnetitbiomineralisation repräsentieren. Neben diesen vielen Einzelheiten kann aus Abbildung 8 mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass die jetzigen Gene Operon-ähnlich organisiert und funktionell miteinander verbunden sind und damit eine spezifische Rolle bei der Magnetitbiomineralisation spielen könnten.

Wie jetzt bekannt wurde (D. Schüler, persönliche Mitteilung) treten die Gene *mamC*^[55] und *mamD*^[55] in einem zweiten Gencluster auf.

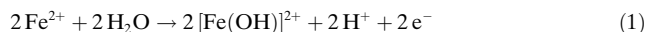
3.4. Zum Mechanismus der Magnetitkristallbildung in Magnetosomen

Bevor jetzt durch Abschalten einzelner Gene (Knock-out-Methode) der detaillierte Mechanismus der Magnetitkristallbildung erklärt werden wird, sollen hier noch einmal die Ergebnisse der klassischen Mikrobiologie zur Magnetitbiomineralisation beschrieben werden.

Die außergewöhnlich hohe Eisenaufnahme der magnetotaktischen Bakterien führt unter mikroaeroben Bedingungen und bei 10–20 µM FeSO₄ zu einem Maximum sowohl an Magnetismus wie auch an Zellwachstum. Dabei ist meist ein Eisengehalt von ca. 3%, im *Magnetobacterium bavaricum*^[37,45a] bis 10% des Trockengewichts nachweisbar. Eisenionen werden nicht als Fe^{II} aufgenommen, sondern als Fe^{III}, – das durch schnelle Oxidation im Medium aus Fe^{II} entsteht, – obwohl die maximale Löslichkeit von Fe^{III} im Wasser bei biologischem pH-Wert nur bei 10⁻¹⁸M liegt. Dies ist ohne Ausfällung deshalb möglich, da die enorme Fe^{III}-Aufnahme in einem Medium erfolgt, in dem zuvor eine stationäre Kultur von *M. gryphiswaldense* unter moderatem

Eisenmangel kultiviert wurde und das dann die Fe^{III}-Aufnahme stark stimuliert.^[63] Jedoch gibt es keinen Hinweis darauf, dass eines der bekannten Siderophore^[64] (Fe^{III}-spezifische Komplexbildner, Molekulargewicht etwa 1000 Da, Komplexkonstante $K_f = 10^{30} - 10^{50}$) der Komplexbildner ist, wie ihn viele – vor allem aerobe – nichtmagnetische Bakterien unter dem Stress geringer Eisenkonzentrationen synthetisieren. Dies wurde auch bei dem aerotoleranten *Magnetospirillum sp.* AMB-1 nachgewiesen.^[65] Die Fe^{III}-Aufnahme von *M. gryphiswaldense* folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Konstanten $V_{max} = 0.86 \text{ nmol Fe}^{III} \text{ min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ und $K_M = 3 \text{ µM Fe}^{III}$. Diese Daten entsprechen einem Transportsystem niedriger Affinität und hoher Geschwindigkeit.^[66]

Für den Mechanismus ist auch von großer Bedeutung, ob und wann Fe^{III} bei einem Transport über die drei Membranen, die Außen-, die Cytoplasma- und die Magnetosommembran, zu Fe^{II} reduziert wird, d. h., ob Fe^{III}- oder Fe^{II}- Ionen in den „leeren“ Magnetosomvesikeln ankommen (leer heißt hier: ohne Magnetit). Eine Ferri-Reduktase, wie sie aus der Außenmembran eines dissimilatorisch eisenreduzierenden Bakteriums isoliert^[67a,b] und in *Candida albicans*^[67c] identifiziert werden konnte, wurde bisher nicht in magnetotaktischen Zellen nachgewiesen. Jedoch wurde aus *M. magnetotacticum* eine lösliche und cytoplasmatische Ferri-Reduktase gewonnen, die lose an die Cytoplasmamembran gebunden ist und durch Zn^{II}-Ionen gehemmt wird. Dadurch nimmt die durchschnittliche Magnetosomenzahl ab, und die Zahl der nichtmagnetischen Zellen nimmt zu.^[57,68] Würden Fe^{II}-Ionen in die leeren Magnetosomvesikeln transportiert, entstünden bei der Oxidation von zwei Fe^{II} zu zwei Fe^{III} zwei Protonen [Gl. (1)], da Fe₃O₄ stöchiometrisch zwei Fe^{III} und ein Fe^{II} enthält:



Damit wäre formal eine Ansäuerung des intravesikulären Mediums verbunden. In Analogie zu den Coccolithvesikeln der Coccolithophore, in denen die Calcifizierung (Calcitbildung) ebenfalls zur Entstehung von Protonen führt (Abschnitt 4.4.2), müssen wie dort die Protonen auch aus den Magnetosomen transportiert werden, um für die Magnetitkristallbildung eine definierte, alkalische Mikroumgebung zu erhalten.

Y. Fukumori et al. haben in einer Kultur von *M. magnetotacticum*, die Nitrat als Elektronenacceptor benutzt, als erste eine Fe^{II}-Oxidationsaktivität beschrieben. Diese konnte einer Nitrit-Reduktase im Periplasma zugeordnet werden: Cytochrom cd₁, das hohe Fe^{II}-Nitrit-Oxidoreduktase-Aktivität zeigt.^[57,68] Da offensichtlich Fe^{III} (Abschnitt 5.4) von den Bakterien aufgenommen wird, könnte Fe^{III} von diesem Enzym zu Fe^{II} reduziert und in die Leervesikeln transportiert werden. Oxidiert aber dieses Enzym Fe^{II} zu Fe^{III}, müssten die zweiwertigen Ionen in das Periplasma (zurück)transportiert werden.

Die Entstehung von Magnetitkristallen und damit von Magnetismus bot die einzigartige Möglichkeit, eine einfache spektroskopische Methode zu entwickeln, um zeitaufgelöst die Bildung eines Minerals, des Magnetits, in lebenden magnetischen Bakterien zu messen.^[69] In dieser durch Mag-

netismus induzierten Lichtstreuung (differential light scattering) wird ein Lichtstrahl durch eine Suspension der Zellen von *M. gryphiswaldense* geschickt, die einem starken homogenen Magnetfeld sowohl parallel (E_{\max}) als auch senkrecht (E_{\min}) zum Lichtstrahl ausgesetzt wird. Das Verhältnis der beiden Streuungsintensitäten $C_{\text{mag}} = E_{\max}/E_{\min}$ korreliert gut mit der durchschnittlichen Zahl von magnetischen Partikeln verschiedener Zellpopulationen.^[69] Diese empfindliche und schnelle Methode ermöglicht es, den Magnetismus parallel zur Eisenaufnahme wie auch zum Zellwachstum der Bakterien und zur Sauerstoffkonzentration im Medium zu untersuchen.

Wird radioaktives $^{55}\text{FeCl}_3$ zu einer Kultur nichtmagnetischer *M. gryphiswaldense* zum Zeitpunkt zugegeben, an dem die Sauerstoffkonzentration für die Magnetitbiominerali-

isation erreicht ist,^[50] beginnt sofort die umfangreiche Eisenaufnahme, offensichtlich eng gekoppelt mit dem parallel laufenden Anstieg des Magnetismus (Abbildung 9 A). Da die Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ Eisen im Medium für das Zellwachstum reicht, stützt dieses Ergebnis die Annahme, dass die überwiegende Menge des zugegebenen Eisens (Endkonzentration $30\ \mu\text{M}$) in die Vesikeln, die leeren Magnetosomen (Abbildung 9 B), transportiert wird. Auch wurden im Cytoplasma keine Cluster von gespeichertem Eisen gefunden.

Mithilfe der magnetisch induzierten Lichtstreuung wird Magnetismus schon 5–10 min nach Zugabe von Eisen ge-

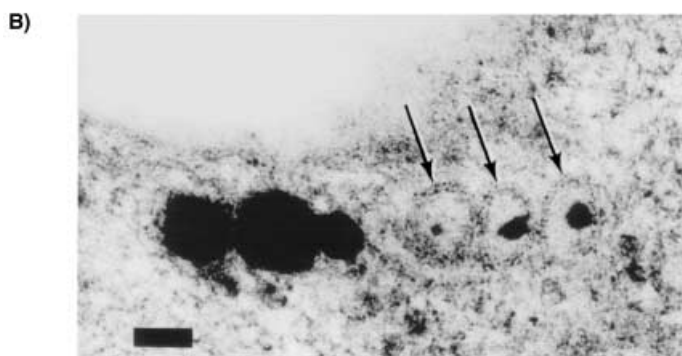
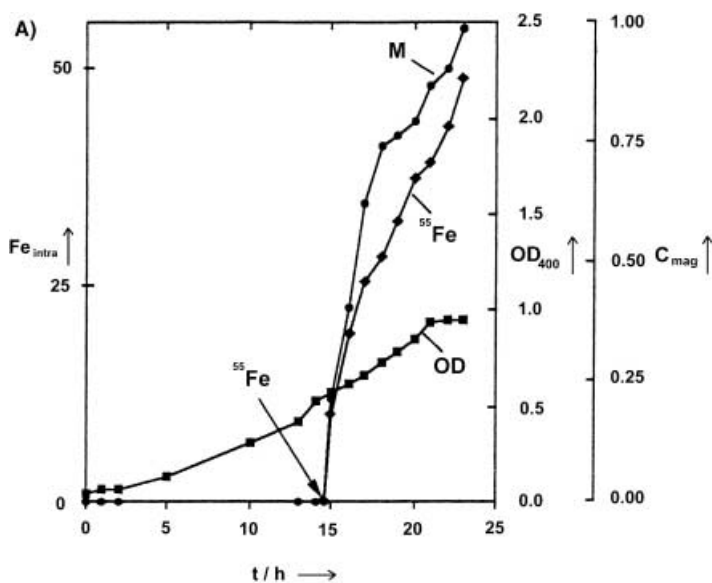


Abbildung 9. Enge Kopplung von erhöhtem Eisentransport und Magnetismus während des Wachstums von *M. gryphiswaldense*: A) Eisen wurde nach 14.5 h (Pfeil) als $^{55}\text{FeCl}_3$ zugegeben und eine Anfangskonzentration von $30\ \mu\text{M}$ eingestellt. Die Eisenaufnahme Fe_{intra} verläuft unter mikroaeroben Bedingungen fast parallel zur Entstehung des Magnetismus (M): ■ Zelldichte (OD), ● zellulärer Magnetismus (M) und ◆ intrazellulärer Eisengehalt (Fe_{intra} entspricht nmol Fe pro mg Trockengewicht). (Von Lit. ^[50] modifiziert). B) Darstellung von Leervesikeln. Dünnschnitt von *M. magnetotacticum* nach Eisenmangel über mehrere Generationen hinweg. Drei nahezu Magnetit-freie Magnetosomen (Leervesikeln) zeigen deutlich eine Doppelschichtmembran (Pfeile). Die Länge des Balkens entspricht 20 nm. (Von Lit. [2a] mit freundlicher Genehmigung von T. J. Beveridge).

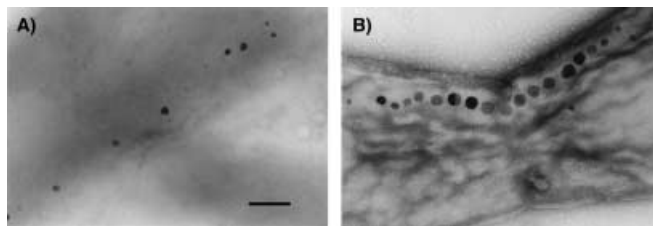


Abbildung 10. TEM-Aufnahmen zur Bildung von Magnetitkristallen in *M. gryphiswaldense*: A) Magnetitpartikel 30 min nach Induktion der Fe_3O_4 -Biominalisation durch Zugabe von $30\ \mu\text{M}$ FeCl_3 (siehe Abbildung 9 A). Diese frühen Partikel, die schon kettenähnlich angeordnet sind, haben einen Durchmesser von 5–20 nm; ihre Größe entspricht überwiegend der von superparamagnetischen Magnetitkristallen.^[47] B) Kette von Magnetosomen einer Zelle, die mehrere Stunden in Gegenwart von $30\ \mu\text{M}$ FeCl_3 (Zugabe) gewachsen ist. Die reifen Kristalle, die sich überwiegend in der Mitte der Kette befinden, sind kubooktaedrisch und haben den maximalen Durchmesser von 42–45 nm.

messen. Werden nach insgesamt 30 min Zellen entnommen und abgetötet, findet man in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen Partikel, die eine Kette anzudeuten beginnen (wenn auch verstreut; (Abbildung 10 A).^[50] Die frühen Partikel sind 5–20 nm groß und zeigen folglich Superparamagnetismus,^[47] d.h., sie haben kein permanentes magnetisches Dipolmoment. Diese schnelle, lokale Übersättigung und Kristallbildung setzt das Vorhandensein leerer Vesikeln voraus. Die Kette der überwiegend reifen Kristalle, die anders als anorganischer Magnetit von überraschender Regelmäßigkeit sind und einen Durchmesser von 42–45 nm haben (Abbildung 10 B), ist das Resultat dieser Biomineralisation. Die elementare Zuordnung von Eisen und Sauerstoff wurde durch Elektronenmikroskopie erhalten, die unter Niedrigdosis-Bedingungen arbeitet und die die automatisch arbeitende Dreifenster-Methode des Energie-spektroskopischen Imagings (ESI) nutzt.^[69b,70]

3.5. Magnetotaxis

Magnetotaktische Bakterien erhielten ihren Namen wegen der Eigenschaft, sich im Magnetfeld der Erde von $50\ \mu\text{T}$ (Tesla) zu 80–90% wie eine Magnetnadel auszurichten.^[71] Dies ist möglich, weil sie einen permanenten magnetischen Dipol haben. Er ist groß genug, um im Erdmagnetfeld die thermischen Kräfte zu überwinden, die ohne dieses zu einer statistischen Unordnung führen würden. Ein solcher Dipol

besteht aus den zuvor beschriebenen Magnetosomen, intrazellulären Phospholipidvesikeln, in denen sich Einzelmagnet-Domänen-Magnetitkristalle durch magnetische Wechselwirkung entlang einer Kette organisieren. Diese Kette wird wahrscheinlich mithilfe jedes einzelnen Magnetosoms und eines Proteins der TPR-Familie^[55] (Abschnitt 3.3.2) an die Innenseite der Cytoplasmamembran gebunden. Damit erhält die Bakterienzelle als Ganzes ein magnetisches Dipolmoment, das ungefähr der Summe der einzelnen magnetischen Momente der Magnetosomen entspricht^[72] und parallel zu ihrer Bewegungsachse orientiert ist. Passiv am Erdmagnetfeld ausgerichtet, schwimmt die Bakterienzelle dann entlang den magnetischen Feldlinien. Hierbei wird sie durch ihren Flagellenmotor angetrieben und durch eine Aerotaxis, d.h. durch eine Bewegung, die einem Konzentrationsgradient von Sauerstoff folgt, zu möglicherweise günstigeren mikroaeroben Habitaten gelenkt. Man kann deshalb nur von einer magnetisch unterstützten Aerotaxis,^[73] aber nicht von einer Magnetotaxis sprechen.

Da aber magnetische Bakterien, wie an *M. gryphiswaldense* experimentell bestimmt (Abbildung 9 A), schon mikroaerobe Bedingungen brauchen, um ihre Magnetitkristalle zu synthetisieren, scheint auch das oben beschriebene Ziel einer magnetisch unterstützten Aerotaxis fragwürdig.

Jedoch soll hier noch kurz eine neuartige Entwicklung erwähnt werden. Es gibt zumindest zwei Theorien, um den Mechanismus eines biologischen Kompasses in Tieren zu beschreiben: a) die magnetisch-mechanische Wechselwirkung des Erdmagnetfeldes mit winzigen magnetischen Kristallen (< 100 nm) in Geweben^[74] und b) die Wirkung der Änderungen magnetischer Felder auf biochemische Reaktionen.^[75] Obwohl beide Theorien ähnlich gut abgesichert sind, wird die erste Theorie gegenwärtig bevorzugt, da Magnetit in Geweben verschiedener Tiere identifiziert werden konnte. So konnten superparamagnetische Magnetitpartikel mit Korngrößen < 20 nm in Brieftauben und Wanderameisen^[19] sowie mit Korngrößen, wie sie für magnetische Bakterien typisch sind (30–120 nm), z.B. in Lachs^[17] und Forellen^[18] (Abschnitt 1) nachgewiesen werden. Für Letztere wird ein Mechanismus in einer gewissen Analogie zur Bildung der Magnetosomenkette vorgeschlagen, also eine Orientierung der Kette im Magnetfeld. Für die Ansammlung superparamagnetischer Magnetitpartikel wurde folgende Theorie entwickelt: Eine Membranvesikel von wenigen µm Durchmesser, die eine Vielzahl superparamagnetischer Magnetitpartikel enthält, wird durch ein äußeres Magnetfeld parallel zur Magnetfeldachse gedehnt und quer dazu zusammengezogen. Da dieser Effekt durch Änderung des osmotischen Drucks verstärkt werden kann, werden diese Membranvesikel, auch Ferrosesikel genannt, als magnetische Osmometer bezeichnet.^[76] Wahrscheinlich gibt es mindestens zwei Arten der Magnetorezeption in Tieren. Interessant ist die Frage, ob die vesikelabhängige Magnetorezeption die ältere ist und aus den Magnetosomen der magnetischen Bakterien hervorgegangen ist.

4. Bildung komplexer Kristallmorphologien von CaCO_3 in einzelligen Algen

4.1. Vorkommen von Coccolithophoren (kalkhaltigen Algen)

Die bekanntesten Arten von marinen, überwiegend einzelligen Algen, die einen Großteil des Phylums Haptophyta (Prymnesiophyta)^[77] bilden, sind die Coccolithophore (auch Coccolithophoride genannt). Sie werden von einem Panzer der Coccolithosphäre, einer häufig kugelförmigen Aggregation von Schalen, Plättchen oder Stäbchen umhüllt, die Coccolithe genannt werden und aus ungewöhnlichen Calcitkristallen zusammengesetzt sind. Diese kalkhaltigen Algen bilden neben den Foraminiferen, die kein Chlorophyll enthalten, einen Hauptteil des Meeresplanktons und sind die wichtigste Carbonatquelle für die Tiefseesedimente der Ozeane.

Fossile Coccolithophore aus dem späten Trias und dem Paläozoikum sind bisher nur in wenigen Exemplaren und in einer geringen Zahl von Arten bekannt.^[78] Jedoch werden sie in großer Vielfalt und Häufigkeit in den verbreiteten Ablagerungen von hellen Kalkgesteinen des frühen Juras (vor 190–170 Millionen Jahren) und vor allem in der oberen Kreide (vor 95–63 Millionen Jahren) gefunden. Das Ende der Kreidezeit und der Übergang zum Tertiär ist gekennzeichnet durch das Aussterben von etwa zwei Drittel der 50 Genera der damaligen Coccolithophore. Neue Arten entwickelten sich im Tertiär, und im Eozän (vor 50 Millionen Jahren) erreichte die Entwicklung einen neuen Höhepunkt.^[78,79] Auf der Grundlage von Coccolith-Ultrastrukturen wurde versucht, eine Art Phylogenie der Coccolithophore zu entwerfen.^[79c]

4.2. Holo- und Heterococcolithe

Entsprechend ihren Kristallmorphologien des Calcits unterscheidet man zwischen Holo- und Heterococcolithen. Heterococcolithe sind nur aus einfachen Calcitelementen zusammengesetzt, und zwar aus rhomboedrischen oder prismatischen Kristallformen. Sie werden im Allgemeinen extrazellulär gebildet.^[80]

Analog den Magnetitkristallen in den Magnetosomen sind die Calcitkristalle der Heterococcolithe ebenfalls artspezifisch und ihre komplizierten und komplexen Morphologien sind in der anorganischen Chemie unbekannt.^[81] Außerdem deutet die für Eukaryoten seltene Eigenschaft der Heterococcolithe, ihre Calcitstruktur auch intrazellulär und in Membranvesikeln zu bilden, auf einen evolutionären Zusammenhang zur bakteriellen Biomineralisation hin.

Obwohl die beiden einzelligen Algen *Emiliana huxleyi* und *Pleurochrysis carterae* gleichermaßen intensiv untersucht wurden, wird hier nur die letztgenannte beschrieben. Denn nur aus *Pleurochrysis carterae* (Abbildung 11) konnten bisher die Coccolithvesikel isoliert werden.^[82] Außerdem gelang es, Mutanten dieser Kalkalge zu finden oder zu erzeugen, durch die die jeweilige Funktion von jetzt drei sauren Polysacchariden bei der Bildung der komplexen Kristallmorphologien geklärt werden konnte (siehe auch Abschnitt 4.5.1).^[83]

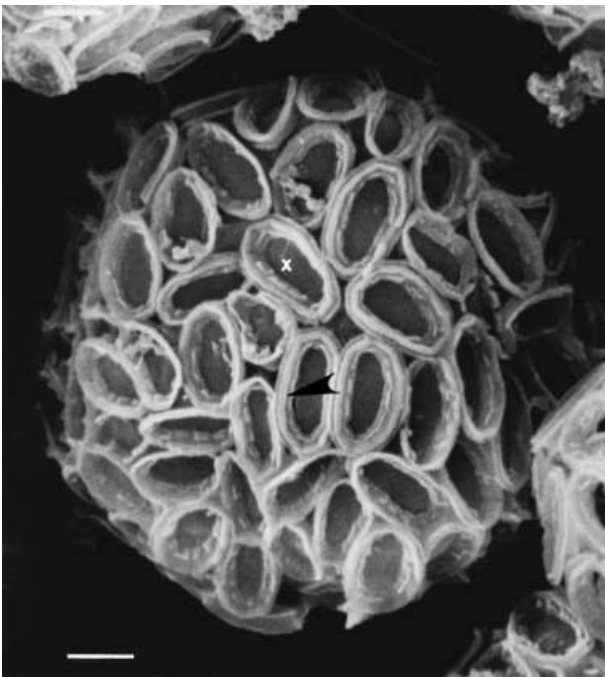


Abbildung 11. Rasterelektronenmikroskopie (SEM)-Aufnahme einer *Pleurochrysis*-Zelle, welche die mineralisierten Plättchen der Coccosphäre (des Kalkpanzers) zeigt. Diese Plättchen, Coccolithe genannt, bestehen aus einer organischen, ovalen Basalplatte (x) und zwei Schichten von CaCO_3 -Kristallen auf deren Rand (Pfeilspitze). Die Länge des Balkens entspricht 1.0 μm . (Von Lit. [89] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien).

4.3. Heterococcolithstruktur der einzelligen Alge *Pleurochrysis carterae*

Auf der Oberfläche von *Pleurochrysis* setzen sich die Heterococcolithen aus einer ovalen organischen Basalplatte und, daran gebunden, aus einem randständigen Ring aus Calcitkristallen zusammen. Diese Kristalle bilden zwei parallele Scheiben, die radial vom Coccolithrand ausgehen (Abbildungen 12 A, B).^[81] Der Ring selbst entsteht dadurch, dass sich einzelne Kristalle mit abwechselnd radialer (R) oder vertikaler (V) Ausrichtung verzahnen (Abbildung 13). Diese R- und V-Orientierung entspricht der Ausrichtung der kristallographischen c-Achsen der Kristalle zur Coccolithenebene. Mit Ausnahme des distalen Scheibenelements (distal shield element), das von der Basalplatte weiter entfernt ist und ungewöhnlicherweise wie eine gebogene Kristalloberfläche aussieht (Abbildung 12 B), sind alle anderen Oberflächen plattenähnliche Elemente (Abbildung 13).^[81]

4.4. Biomineralisation in Coccolithvesikeln von *Pleurochrysis carterae*

4.4.1. Membranproteine der Coccolithvesikeln

Die außergewöhnlichen Schwierigkeiten, Coccolithvesikeln zu isolieren, wurden bisher nur an *Pleurochrysis carterae* überwunden.^[82] Eine gelungene Kombination von a) der Auflösung des Cytoskeletts, das die Organellen der Coccoli-

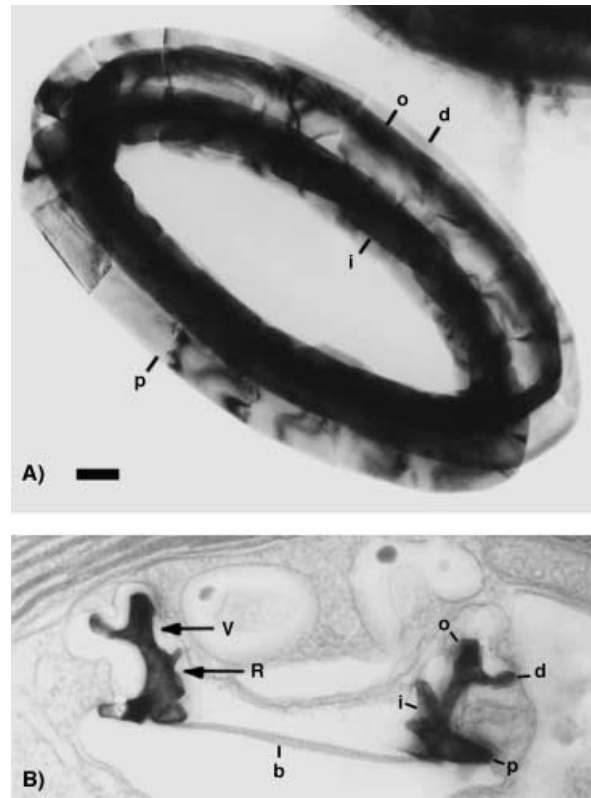


Abbildung 12. A) TEM-Aufnahme eines isolierten, reifen Coccolithen von *Pleurochrysis*, dessen Ebene um etwa 30° geneigt ist. B) Dünnschnitt, der den Querschnitt eines reifen Coccolithen von *Pleurochrysis* in seiner Vesikel vor der Sekretion in die Coccosphäre zeigt. Die V- und R-Kristalleinheiten befinden sich auf dem Rand der Basalplatte (b). Der äußere Schild (d), der innere Schild (i) und äußere Röhre (o) als Elemente des Mineralringes sind im Bild bezeichnet. Die Länge des Balkens entspricht 100 nm. (Von Lit. [81b] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien).

thophore verbindet, mit b) einer aufwändigen Zuckergradienten-Zentrifugation, die dank der etwas höheren Dichte der Coccolithvesikeln möglich ist, c) der möglichen Unterscheidung der Coccolithvesikeln von den äußeren Coccolithen und d) der selektiven Auflösung dieser freien äußeren Coccolithe, hat erstmals zur Gewinnung gereinigter Coccolithvesikeln geführt (Abbildung 14 A, B).

Ähnlich der Magnetosommembran aus dem magnetischen Bakterium *M. gryphiswaldense*^[55] wurden in SDS-PAGE bei der Analyse der gereinigten Coccolithvesikeln eine ganze Reihe von Polypeptiden nachgewiesen (hier etwa 20). Diese große Zahl findet vor allem ihre Erklärung in der jetzt gesicherten Anwesenheit einer Vakuolen(V)-ATPase, deren Gesamtkomplex in vielen Arten zwischen 12 und 13 Untereinheiten hat.^[84]

Aus den Polypeptiden, deren apparentes Molekulargewicht nahe den wichtigsten Untereinheiten des V_1 (A-E)- und des V_0 (a, c)-Teils liegen, konnten zwei identifiziert werden. Es ist zum einen die Untereinheit B, die mit dem monoklonalen Antikörper 2E7, der gegen die entsprechende Untereinheit B aus Hafer gewonnen worden war,^[85] spezifisch reagierte. Auf

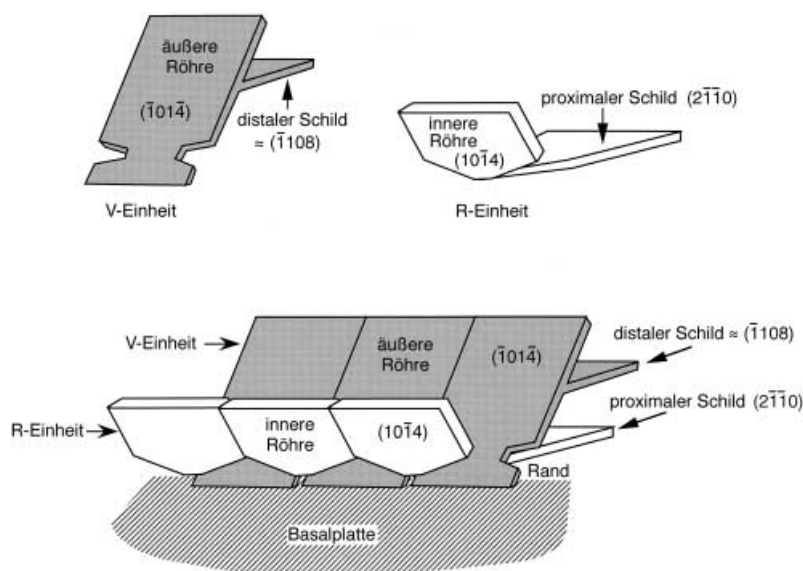


Abbildung 13. Schematische Darstellung der V- und R-Kristalleinheiten und ihre genau eingepasste und gegenseitig eingerastete (interlocking) Struktur auf dem Rand des Coccoliths von *Pleurochrysis* als Ansicht aus dem Inneren des Coccolithen. Der Einfachheit wegen sind die Kristallelemente dargestellt, als bestünden sie aus dünnen Platten. Die Kristallflächen, die dem äußeren und inneren Schild, der äußeren und inneren Röhre entsprechen, wurden identifiziert. (Von Lit. [81b] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien).

der Basis des gleichen Antikörpers wurden die isolierten und gereinigten Vesikeln sichtbar gemacht (Abbildung 14 A).^[82]

Zum anderen konnte die „16-kDa-Untereinheit“, die in begründeter Analogie zur c-Untereinheit der ATP-Synthase Proteolipid genannt wurde,^[84b] durch Klonen und Sequenzieren darin bestätigt werden, dass ihr ORF ein abgeleitetes Molekulargewicht von 16,2 kDa hat. Ihr apparentes Molekulargewicht betrug jedoch 24 kDa. Durch Immunblotting und Immunfluoreszenzmikroskopie konnte bestätigt werden, dass dieses 24-kDa-Protein dem 16,2-kDa-Protein entspricht

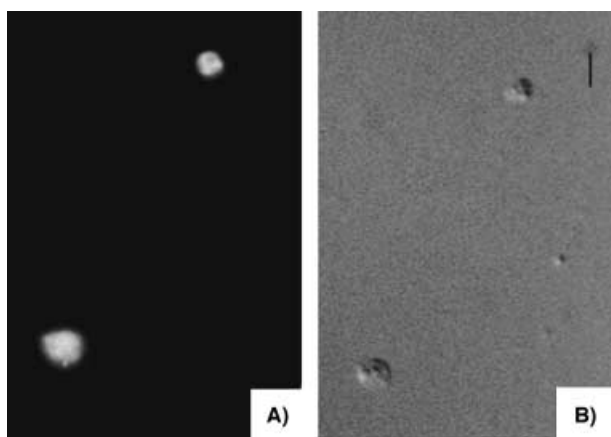
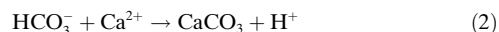


Abbildung 14. Immunfluoreszenzmikroskopie von Coccolithvesikeln. Isolierte, aldehydfixierte Vesikeln wurden monoklonalen und sekundären Antikörpern 2E7 exponiert, die zuvor mit FITC-Fluorochrom markiert worden waren. Die Vesikeln wurden durch Epifluoreszenz (A) und durch Normaski Optics (B) sichtbar gemacht. Die Länge des Balkens entspricht 1 μm . (Von Lit. [82a] mit freundlicher Genehmigung von E. L. Gonzalez).

und offensichtlich posttranslational modifiziert worden war.^[86]

4.4.2. Protonen-, Hydrogencarbonat- und Calciumionentransporte der Coccolithvesikeln

Die Bildung von Calciumcarbonat führt in den Coccolithvesikeln zur Freisetzung von vielen Protonen. Je nach dem, ob Hydrogencarbonat [Gl. (2)] oder Kohlendioxid [Gl. (3)] in die Vesikeln transportiert werden, sind dies ein oder zwei Protonen pro Molekül. Sowohl die Coccolithphor-Zelle als auch die magnetische Bakterienzelle müssen in einer definierten Mikroumgebung ihrer Vesikeln einen bestimmten pH-Wert aufweisen, der zur Kristallkeimbildung, zum Kristallwachstum und zum ausgereiften Endprodukt führt, dem Coccolith bzw. dem Magnetitkristall spezifischer Kristallmorphologie und Größe (Abschnitt 3.4).



In der Coccolithphor-Zelle wurden umfangreiche ATPase-Aktivitäten gefunden,^[87] beispielsweise in der Plasmamembran durch eine Ca^{II} -abhängige ATPase des P-Typs sowie an den Coccolithvesikeln durch eine V-ATPase. Da die Coccolithvesikeln aus dem *trans*-Golgi-Netz hervorgehen (Abbildung 15), hat Letzterer ebenfalls V-ATPasen.^[84b] An gereinigten isolierten Coccolithvesikeln konnte ein ATP-abhängiger Protonentransport nachgewiesen werden, der durch Nitrat gehemmt wird. Dadurch ließ sich auch die Funktion der zuvor identifizierten V-ATPasen bestätigen.^[86] Mit einem Antikörper gegen ihre Untereinheit c des V_0 -Teils konnte die V-ATPase darüber hinaus auf den Coccolithvesikeln lokalisiert werden. Jedoch wurden die Protonen, anders als erwartet, in die Vesikeln und nicht aus ihnen heraus gepumpt. Diese Orientierung der V-ATPase entspricht derjenigen, wie sie in sekretorischen Vesikeln, die auch aus dem *trans*-Golgi-Netz entstehen, in allen eukaryotischen Zellen vorkommen.^[84b] Es ist deshalb eine offene Frage, wie die Protonen aus den Vesikeln transportiert werden. Ein Antiporter, der beispielsweise zwei Protonen nach außen und ein Calciumion nach innen transportiert, ist bisher nicht bekannt.

Über den molekularen Mechanismus des Transports von HCO_3^- oder CO_2 , allgemein als gelöster anorganischer Kohlenstoff (dissolved inorganic carbon, DIC) bezeichnet, ist wenig bekannt. Jedoch scheint die Freisetzung der Protonen bei der Calcitbildung eine wesentliche Voraussetzung für den Kohlenstoffkonzentrationsmechanismus (carbon concentrating mechanism, CCM) in den Chloroplasten zu sein, der entgegen der niedrigen Konzentration an DIC im Ozean eine höhere Photosyntheserate ermöglicht als sie dieser niedrigen Konzentration entsprechend zu erwarten ist.^[88]

Auch der Mechanismus des Ca^{II} -Transportes in die Coccolithvesikeln ist bis heute weitgehend unbekannt. Die

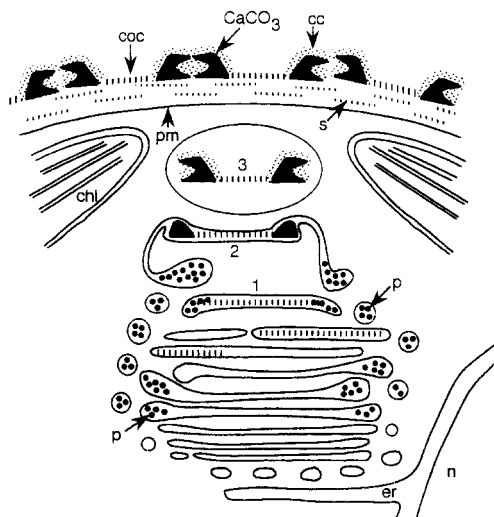


Abbildung 15. Schematische Darstellung der Bildung von Coccolithen im Golgi-Apparat von *Pleurochrysis*. Eine Coccolithvesikel wird vor (1), während (2) und nach (3) der Mineraldeposition gezeigt. PS1/PS2-Ca-Komplexe werden in den mittleren Golgi-Zisternen gebildet. Diese Komplexe sind als einzelne 25-nm-Partikel (p) vor und während der Mineralbildung (1 und 2) vorhanden. Nach Ende des Mineralisationsprozesses (3 und Coccosphäre) sind die Kristallflächen von einer amorphen Polyanionhülle (cc) umgeben. Coccolith-Basalplatte (schraffierte Markierung), Coccolithe (coc), nichtmineralisierte Basalplatten (s), Chloroplasten (chl), Endoplasmatisches Reticulum (er), Zellkern (n), Plasmamembran (pm). (Von Lit. [97] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien).

Hoffnung, dass eine der beiden Ca^{II} -abhängigen ATPasen – also des P(Plasmamembran)- oder V(Vakuolen)-Typs, welche die verbreitete ATPase-Aktivität in *Pleurochrysis* repräsentieren, – mit dem Ca^{II} -Transport verbunden sein könnte, hat sich bisher weder für die Plasmamembran noch für die Coccolithvesikeln erfüllt.^[82] Hingegen hat sich die Annahme konkretisiert, dass Calciumionen auch anstelle einer Diffusion durch das Cytosol in Vesikeln immobilisiert in die Coccolithvesikeln transportiert werden. Denn Calciumionen bilden in *Pleurochrysis* 25-nm-Partikel, indem sie mit den Polysacchariden PS1 und PS2 Komplexe bilden.^[89] Eine große Zahl dieser Partikel, Coccolithosomen genannt,^[89] entstehen in den mittleren Golgi-Zisternen und werden wahrscheinlich in kleinen Vesikeln aus den Golgi-Membranen zur und in die äußerste *trans*-Golgi-Zisterne geschleust. Sie sind sowohl während der Calcitkeimbildung als auch während des gesamten Kristallwachstums in diesen Coccolithvesikeln vorhanden (Abbildung 15).

4.4.3. Bildung eines Heterococcolithen in einer Coccolithvesikel

Bevor die Kristallbildung beginnt, lagern sich viele Coccolithosomen enthaltende Vesikeln auf dem äußeren Rand der Basalplatte an (Abbildung 16A). Dieser Rand ist von einem schmalen Band eines besonderen organischen Materials bedeckt, das Coccolithband genannt wird. In Ansammlungen von Coccolithosomen entstehen die ersten Kristallite (Abbildung 16B), wobei jeweils eine Kristallitecke

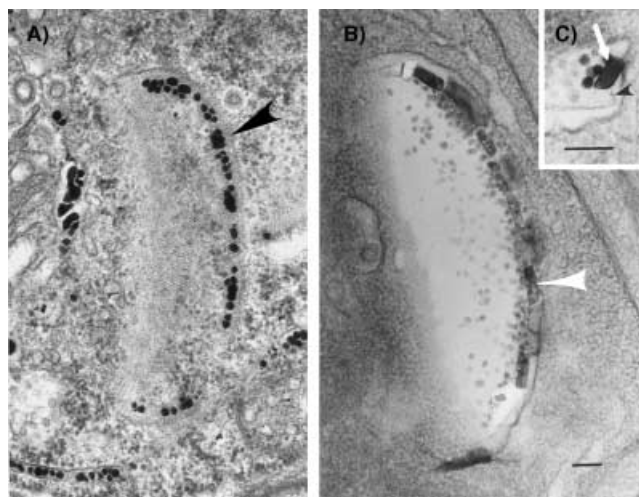


Abbildung 16. Dünnschnitte von einander folgenden, frühen Zuständen der Mineralisation von *Pleurochrysis* mit Blickrichtung auf den Coccolithrand: A) Basalplatte mit dunklen, polyanionreichen Partikeln (Coccolithosomen), die mit deren Rand assoziiert sind (Pfeilspitze). B) Basalplatte, auf deren Rand (Pfeilspitze) ein Ring kleiner, rechteckiger Kristalle zwischen den polyanionreichen Partikeln entstanden ist. Schnitte ohne Negativkontrastierung. C) Querschnitt, der einen kleinen Kristall (Pfeil) über der Basalplatte zeigt. Er ist offensichtlich mit einem schmalen Band aus organischen Material (coccolith ribbon) verbunden, das sich am äußeren Rand der Basalplatte befindet. Die Länge beider Balken entspricht 100 nm. (Von Lit. [81a, b] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien).

in Kontakt zu dem Coccolithband (Abbildung 16C) steht und dort jeden werdenden Kristall fest verankert. Aus den Kristalliten bildet sich anschließend ein Ring aus 24 kleinen Kristallen, Parallelepipeden, die bezogen auf ihre kristallographische *c*-Achse alternierend eine radiale R- oder vertikale V-Orientierung zeigen (Abbildung 17A). Eine einzige Falte des Coccolithbandes, die parallel zum Rand der Basalplatte verlaufen würde, kann dazu führen, dass Kristalle ähnlicher Struktur auf jeder der beiden Seiten der Falte mit verschiedener Orientierung entstehen.^[81b] Die Reifung der Kristalle zu ihren komplexen Strukturen beginnt bei der V-Einheit (Abbildung 17B) mit der Ausdehnung einer (10 $\bar{1}$ 4)-Fläche, die die plattenartige Oberfläche des äußeren Röhrenelements bildet (Abbildung 17C), und endet mit der Struktur paralleler Platten, die für reife Coccolithe charakteristisch ist. Die detaillierte kristallographische Analyse^[81b] wird hier jedoch nicht diskutiert.

Der Prozess der Mineralisation wird offensichtlich durch das auffällige Anschwellen^[89] der Coccolithvesikel gestoppt (Abbildung 15), wobei wahrscheinlich das Ionenprodukt des Calciumcarbonats durch das Einströmen von Flüssigkeit so stark erniedrigt wird, dass keine Ausfällung mehr möglich ist. Für *Pleurochrysis* endet das Kristallwachstum auch mit der Dissoziation der polyanionreichen Partikel, den Coccolithosomen. Daneben werden die restlichen Calciumionen und zahlreiche Polyanionen freigesetzt, wobei Letztere auf den Kristalloberflächen eine Schutzschicht bilden.^[90] Daraufhin wird der reife Coccolith durch Exozytose an die Oberfläche der Algen, die Coccolithosphäre, transportiert.

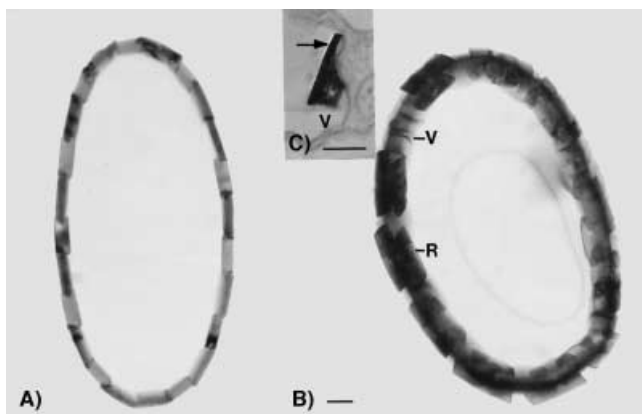
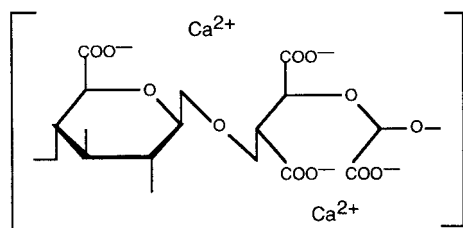


Abbildung 17. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines isolierten Protococcolithen von *Pleurochrysis*. Er besteht aus einem Ring von 24 kleinen Kristallen in Form von rechteckigen Parallelepipeden. Die Kristalle haben alternierend die Orientierung der V- und R-Elemente. B) Ein isolierter, noch unreifer Coccolith in einer späteren Entwicklungsstufe. Die R-Elemente haben die Struktur doppelter Parallelogramme, die sich zu den inneren Röhren- und proximalen Schildelementen entwickeln werden. C) Querschnitt eines Coccoliths ähnlicher Entwicklungsstufe, der ein noch unreifes V-Element auf dem Rand der Coccolithbasalplatte zeigt. Die Länge aller Balken entspricht 100 nm. (Von Lit. [81a, b] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh und des Springer Verlags, Wien)

4.5. Schritte zur Klärung des Bildungsmechanismus komplexer Kristalle in den Coccolithvesikeln von *Pleurochrysis carterae*

Seit langem wird angenommen, dass stark saure Makromoleküle eine wichtige Rolle in der Biomineralisation von Eukaryoten spielen. Hierbei haben diejenigen Makromoleküle besonderes Interesse erregt, die viele Calciumionen binden können und in hohen Konzentrationen an Mineralisationszentren einiger Gewebe vorkommen.^[91,92] So sind Proteine, Phosphophoryne genannt, die mit dem Zahnbein (Dentin) der Vertebraten assoziiert sind, reich an Asparaginsäure und Phosphoserin.^[93] Sie bilden, wie auch eines der sauren Polysaccharide, in Gegenwart von Calciumionen 25-nm-Partikel.^[94] Am Perlmutter von Muschelschalen, das wegen seiner Härte und Bruchfestigkeit besonders intensiv untersucht wird, lassen sich an der wachsenden Zahl der sequenzierten Proteine und an deren verschiedenen möglichen Aktivitäten^[95] die großen Schwierigkeiten abschätzen, die mit der Klärung des Mechanismus der Biomineralisation eines Vielzelllers verbunden sind. Deshalb haben die Arbeiten an eukaryotischen Einzellern an Bedeutung gewonnen. Vor allem die wegweisenden Untersuchungen von Marsh et al. an *Pleurochrysis carterae*^[81a,96] haben zum ersten Mal in einem Einzeller die Lokalisierung einer Kristallkeimbildung, hier des Calcits, und eines ungewöhnlichen Kristallwachstums



ermöglicht. Die Isolierung von sauren Polysacchariden,^[90a] die Herstellung der zugehörigen Antikörper^[89,96] sowie die Mutantenanalyse^[83,96] dieser Polysaccharide verbunden mit morphologischen Studien haben hierzu beigetragen.

4.5.1. Die sauren Polysaccharide PS1, PS2 und PS3

Aus den Coccolithen von *Pleurochrysis* wurden die drei sauren Polysaccharide PS1, PS2 und PS3 extrahiert und gereinigt.^[90a] Im Polyacrylamidgel ohne SDS wanderten PS1 und PS3 als relativ begrenzte Banden, die einen engen Bereich von Molekulargewichten zu repräsentieren scheinen. Die Tatsache, dass PS2 dagegen über das ganze Gel hinweg eine Leiter von vielen diskreten Banden bildet, weist auf eine breite Variation des Polymerisationsgrades hin. PS2 ist das häufigste Coccolithpolyanion in *Pleurochrysis*. Das Gewichtsverhältnis von PS2/PS1 ist 77:22. Der geringe, aber sehr wichtige Anteil^[96] von PS3 liegt bei etwa 2%.

PS2 ist im Wesentlichen aus dem sich wiederholenden Motiv $[-\rightarrow 4)D\text{-Glucuronat}(\beta 1\rightarrow 2)\text{meso-Tartrat}(3\rightarrow 1)\text{Glyoxalat}(1-)]_n$ zusammengesetzt (Formel des Calciumsalzes von PS2; von Lit. [89,90a] mit freundlicher Genehmigung von M. E. Marsh), das bisher in keinem anderen Polysaccharid nachgewiesen wurde. Mit seinen vier Carboxylatgruppen oder vier negativen Ladungen pro Motiv ist PS2 zudem das sauerste Polyanion, das für eine Mineralspeicherung bisher beschrieben wurde.^[90,97] Die Primärstrukturen von PS1 und PS3 sind noch unbekannt. PS1 ist ein Polyuronid, das überwiegend aus Glucuronsäure und Galacturonsäure im Verhältnis 1:3 besteht.^[90] PS3 ist ein Galacturonmannan mit signifikanten Mengen an Sulfatestergruppen.^[81a]

Das Schicksal von PS1 und PS2 konnte mithilfe gut charakterisierter Antikörper und Immungoldmarkierung an Dünnschnitten durch TEM während des gesamten Mineralisationsvorgangs, d. h. vor Beginn der Kristallkeimbildung bis nach dem Ende des Kristallwachstums, verfolgt werden.^[89] Die vielen detaillierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen können hier aus Platzgründen nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse, die auch im Zusammenhang mit den noch folgenden Mutationsexperimenten diskutiert werden, sollen jedoch kurz zusammengefasst werden (schematische Darstellung, Abbildung 15).

Die Polysaccharide PS1 und PS2 werden in den mittleren Zisternen des Golgi-Apparates synthetisiert. Dort bilden sie zusammen mit Calciumionen zahlreiche etwa 25 nm große Partikel, die Coccolithosome genannt werden. Vesikeln, die eine Reihe dieser Partikel enthalten, entstehen an den Rändern der mittleren Zisternen. Die PS1/PS2-Ca-Partikel werden anschließend in diesen kleinen Vesikeln zu den Coccolithvesikeln transportiert, mit denen sie verschmelzen.^[81a] Die Coccolithvesikeln enthalten eine ovale Basalplatte, auf deren Rand sich die PS1/PS2-Ca-Partikel festsetzen. Daraufhin beginnt dort in Gegenwart der Mineralisierungsprozess, in dessen Verlauf diese Partikel und somit auch die Polyanionen PS1 und PS2 von der Kristallkeimbildung bis kurz vor Ende des Kristallwachstums anwesend sind. In der Endphase der Coccolithreifung erhalten die Kristalle eine Polysaccharidhülle aus PS1 und PS2, die während der Wachstumsphase auf ihnen nicht nachweisbar ist.

Bis vor kurzem konnten keine gut charakterisierten Antikörper zur Lokalisierung von PS3 durch Immungoldmarkierung hergestellt werden. Allerdings konnte schon durch Pulse-Chase-Experimente mit radioaktivem Carbonat, Sulfat und Calcium in kinetischen Experimenten^[97] gezeigt werden, dass die zelluläre Halbwertszeit von PS3 mehr als dreimal so lang ist als die von PS1 und PS2. Demnach wird PS3 auf eine Weise synthetisiert und sezerniert, die sich von derjenigen für PS1 und PS2 unterscheidet.^[81a,97]

4.5.2. Mutanten von *Pleurochrysis*, die jeweils eines der sauren Polysaccharide nicht synthetisieren

Von *Pleurochrysis* konnten über 100 spontane und chemisch-induzierte Mutanten isoliert werden. Die entsprechenden Polysaccharide wurden nach Puls-Markierung mit ¹⁴C-Carbonat und ³⁵S-Sulfat aus den Zellen isoliert und durch Autoradiographie von Gelen bestimmt.

Die Coccolithe einer *ps1*-Mutante, die chemisch durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) induziert wurde und kein PS1 mehr exprimiert, sind offensichtlich in jeder Hinsicht dem Wildtyp-Coccolith ähnlich.^[81] Das bedeutet, dass PS1 bei der Bildung dieser Coccolithe, welche die Morphologie des Wildtyps haben, sehr wahrscheinlich keine Rolle spielt.

Die Hypothese, dass PS2 ein funktionelles Intermediat der Calcitbiomineralisation in *Pleurochrysis* ist, konnte durch drei unabhängige Mutanten gestützt werden.^[83] Zwei dieser *ps2*-Mutanten entstanden spontan, eine dritte wurde chemisch durch MNNG induziert. Alle drei sind phänotypisch identisch und exprimieren kein PS2. Der Mineralgehalt einer jeden dieser Mutanten ist geringer als 5% des Gehaltes des Wildtyps, was auch bedeutet, dass die meisten ihrer Coccolithe nicht mineralisiert sind. Es ist jedoch für die Funktionsanalyse der *ps2*-Mutanten außerordentlich wichtig, dass sie das wenige Calciumcarbonat nicht nur wie der Wildtyp auf dem Rand der Basalplatte als Calcit deponieren, sondern es auch bei reiferen Kristallen für die Bildung der V- und R-Strukturen der Wildtypkristalle verwenden. PS2 hat also keinen Einfluss auf die Kristallmorphologien dieser spezifischen Kristallform. Außerdem weist die hier nur reduzierte Calcitmineralisation auf dem Coccolithrand in Abwesenheit von PS2 darauf hin, dass PS2 nicht unbedingt zur Kristallkeimbildung notwendig ist und dass die PS1/PS2-Ca-Partikel offensichtlich nicht die einzige Calciumquelle für die Coccolithbildung sind.

In welcher Weise trägt nun PS2 zur Bildung der ungewöhnlichen, ambossartigen Calcitkristalle bei? Auf einem schmalen Band aus organischem Material (Abbildung 16C) werden im Wildtyp viele PS1/PS2-Ca-Partikel auf dem äußeren Rand der Basalplatte gebunden (Abbildung 16A). Dies führt zu einem Anstieg der lokalen Konzentration von polyanionengebundenen Calciumionen auf 6 molL⁻¹,^[90b] bevor die Kristallbildung beginnt.^[89] Anders als bei der *ps2*-Mutante beschleunigen die PS1/PS2-Ca-Partikel im Wildtyp offensichtlich die Geschwindigkeit der Calcitkristallkeimbildung. Es ist aber noch offen, ob der PS1/PS2-Ca-Komplex seine Wirkung durch seine Struktur, also als Teil eines zu postulie-

renden Kristallkeimbildungskomplexes, oder durch seine Pufferkapazität für Calciumionen ausübt.

Die Mutantenanalyse, der Königsweg zum Verständnis der Mechanismen komplexer biologischer Systeme, hat – wie zuvor beschrieben – schon erste Hinweise auf den Mechanismus der Kristallkeimbildung geliefert. Das besondere Potenzial dieser Methode wurde bereits in der beschriebenen *ps3*-Mutante sichtbar,^[81a] die durch MNNG induziert und als *ps3*⁻¹ bezeichnet wurde.^[96] Denn wenn PS3 nicht mehr exprimiert wird, entstehen auch nicht die komplexen, ambossähnlichen Calcitkristalle, sondern nur noch die einfach orientierten, welche den rechteckigen Parallelepipeden der Wildtyp-Protococcolithe ähneln (Abbildung 17A). Vor kurzem wurde unter 500 neuen Mutanten von *Pleurochrysis* eine zweite, *ps3*⁻² genannte Mutante nachgewiesen, die auch den Protococcolithphänotyp zeigt und kein PS3 exprimiert. Außerdem gelang es, monospezifische Anti-PS3-Antikörper herzustellen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass PS3, anders als PS1 und PS2, zwischen der Membran der Coccolithvesikel und der Kristalloberfläche lokalisiert ist und dass es direkt das Wachstum und die Formung der Calcitkristalle zu ihren komplexen, ambossähnlichen Morphologien beeinflusst (M. Marsh, persönliche Mitteilung).^[96]

5. Bildung nanostrukturierter Zellwände aus amorpher Polykieselsäure in Diatomeen

5.1. Vorkommen von Diatomeen

Diatomeen sind eukaryotische Einzeller, Algen der Klasse Bacillariophyceae. Die Zahl der heute bekannten lebenden Arten beträgt etwa 100 000.^[98] Sie werden sowohl im Meer- als auch im Brack- und Süßwasser gefunden. Diese Kieselalgen sind der dominierende Teil des Phytoplanktons und setzen zusammen mit anderen marinen Organismen wie Silicoflagellaten, Radiolarien und Schwämmen durch die Bildung ihrer Kieselsäureskelette jährlich die außergewöhnliche Menge von 6.7 Gigatonnen (Giga = 10⁹) Silicium biogen um.^[99] Die ältesten fossilen Kieselalgen könnten nach neueren Schätzungen nicht früher als vor 266–238 Ma (Millionen Jahren) existiert haben.^[100] Da der Fund der bisher ältesten fossilen Diatomeen in das frühe Jura (vor 185 Ma) datiert wurde,^[101] sollten die Diatomeen entsprechend der hierzu entwickelten rRNA-Uhr zwischen 266–238 Ma und 185 Ma entstanden sein. Trotzdem steht noch immer die Frage im Raum, ob diese einzelligen Kieselalgen nicht doch innerhalb der Kambrischen Explosion der Biomineralisation^[4a,11,12,14] (Abschnitt 1) etwa vor 525–510 Ma entstanden sein könnten, also noch weit vor der permo-triassischen Grenze um 250 Ma. Nach dieser Zeitgrenze sind etwa 96% aller marinen Arten, 70% der terrestrischen Vertebraten und viele Hauptgruppen der terrestrischen Pflanzen neben anderen Faktoren durch den gewaltigsten, bekannten kontinentalen Vulkanismus der Erdgeschichte vernichtet worden.^[100,102] Im Gegensatz zu den Coccolithophoren^[78] sind also bisher keine fossilen Diatomeen gefunden worden, die der permo-triassischen Massenvernichtung entgangen sind und eine neue Altersschätzung ermöglichen (Abschnitt 4.1).

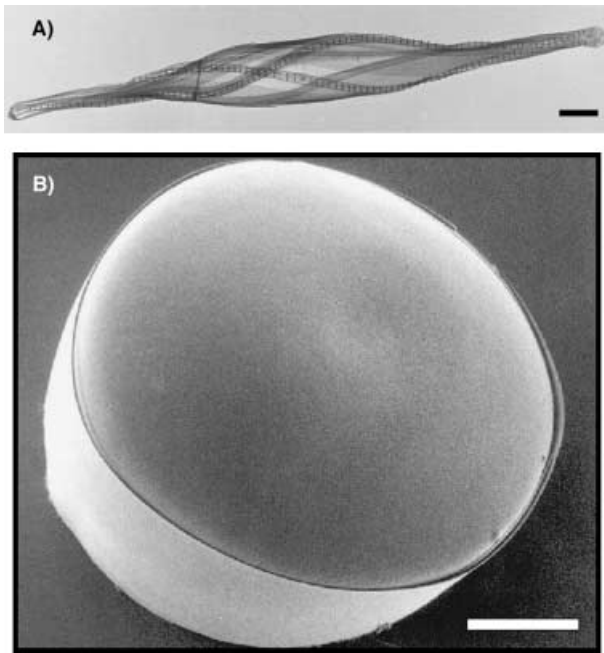


Abbildung 18. Morphologien von Diatomeenzellwänden: A) TEM-Aufnahme von *Cyldrotheca fusiformis*. Die Länge des Balkens entspricht 2,5 μm . B) SEM-Aufnahme von *Coscinodiscus granii*. Die Länge des Balkens entspricht 50 μm . (Von Lit. [109] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper).

5.2. Struktur der Diatomeen

Diatomeen kann man leicht an ihren charakteristisch ornamentierten Zellwänden erkennen, die aus amorpher Polykieselsäure, aus Opal, bestehen. Eine solche Kieselshale wird auch als Frustulum bezeichnet. Da die Morphologien artspezifisch sind, ist eine genetische Steuerung dieser biogenen Strukturbildungen sehr wahrscheinlich.

Die Baupläne der Diatomeen (Klasse Bacillariophyceae) ermöglichen es, diese Algenklasse in zwei Ordnungen^[98] zu unterteilen. So sind die Kieselshalen der *Pennales* langgestreckt und bilateral-symmetrisch (lanzettförmig oder elliptisch). Als Beispiel ist hier *Cyldrotheca fusiformis* gezeigt (Abbildung 18A), die seit etwa zehn Jahren als Modellorganismus für Biomineralisationsprozesse molekularbiologisch untersucht wird.^[103,104] Die Kieselshalen der *Centrales* dagegen sind oft radial-symmetrisch, jedoch mit vielen Abweichungen. Eine nahezu vollkommen zentrale Diatomea ist *Cosconodiscus granii* (Abbildung 18B).

Die Zellwände aller Diatomeen (Frustula) bestehen aus der Hypotheka, der Schachtel, und der Epitheka, dem Deckel (Abbildung 19). Die Epitheka ihrerseits besteht aus zwei Teilen, der flachen Oberseite, die Epivalva (obere Schachtel) genannt wird, und aus einer ringförmigen Seitenwand, die aus einem oder mehreren Gürtelbändern besteht. Diese Zweiteilung gilt genauso für die Hypotheka, die also in Hypovalva und die unteren Gürtelbänder geteilt ist, mit dem Unterschied, dass die Gürtelbänder des Deckels diejenigen der Schachtel überlappen.^[98] Auf diese Weise zeigt sich der Protoplast vollständig umhüllt und geschützt. Diese Vorstellung wird dadurch verstärkt, dass organische Schichten die

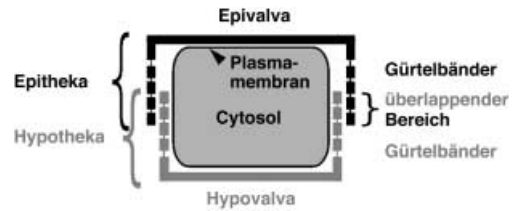


Abbildung 19. Struktur der Diatomeenzellwand (nach Lit. [109] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper).

Kieselshalen (Valva) und Gürtelbänder wahrscheinlich präzise aneinanderfügen. Außerdem sind alle silifizierten Komponenten durch eine Hülle (casing) aus organischem Material geschützt, vermutlich gegen eine Desilifizierung.^[105]

Wie durch Kraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) an lebender, hydratisierter *Pinnularia viridis* (Nitzsch) gezeigt werden konnte,^[106] sind deren Frustula von einem dicken, schleimartigen Material bedeckt, dessen Schicht nur in unmittelbare Umgebung der Raphenspalte^[107] unterbrochen ist (Abbildung 20A). (Raphen sind wahrscheinlich für die schnelle, gleitende Bewegung von Kieselalgen verantwortlich; max. etwa 20 $\mu\text{m s}^{-1}$).^[108]

Da die Zellen ständig mit ihrer Umgebung in Verbindung stehen müssen, sind die Valva und in geringem Maße die Gürtelbänder mit einer Vielzahl von Öffnungen wie Poren,

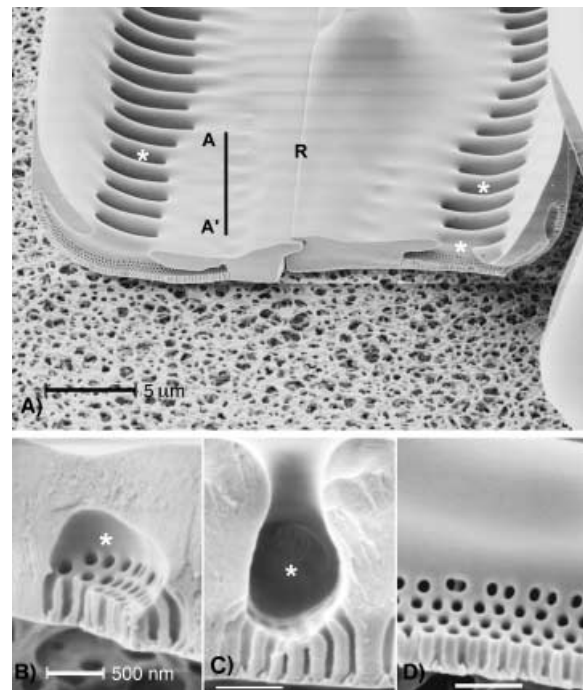


Abbildung 20. Aufnahmen mit dem Feld-Emissions-Rasterelektronenmikroskop (FESEM) von *Pinnularia sp.*: A) Querschnitt eines aufgebrochenen Deckels (Valva) mit Blick auf die Oberfläche, die dem verborgenen Cytoplasma zugewandt ist. B, C) Die verborgenen Kammern (Sternchen) resultieren aus einem Bruch entlang der AA'-Achse, die in (A) markiert ist. D) Die starke Vergrößerung des in (A) eingerahmten Bereichs zeigt winzige Poren, die in präzisen Mustern angeordnet sind. Die Länge des Balkens entspricht in (A) 5 μm , in (B)–(D) 500 nm. (Von Lit. [105c] mit freundlicher Genehmigung von R. Wetherbee).

Schlitzten und anderen versehen, welche die notwendigen Austauschreaktionen ermöglichen. Zugleich bilden diese Öffnungen die faszinierenden Ornamente der Kieselalgen (Abbildung 20B–D).

5.3. Biomineralisation der Zellwand in Polykieselsäure ablagernden Vesikeln

Ausgedehnte elektronenmikroskopische Untersuchungen an zahlreichen verschiedenen Diatomeen beider Ordnungen, Pennales und Centrales, haben verschiedene morphologische Stufen der Biomineralisation erfasst,^[105a] die hier in einer schematischen Darstellung zusammengefasst sind (Abbildung 21).^[109] Ähnlich den Coccolithophoren, deren Biomineralisation in spezialisierten Vesikeln, den Coccolithvesikeln, stattfindet (Abbildung 15), gibt es auch in Diatomeen spezielle Vesikel,^[105a] die Polykieselsäure ablagernden Vesikeln (silica deposition vesicles, SDVs). Untersuchungen an verschiedenen anderen eukaryotischen Einzellern (Protisten) lassen den Schluss zu, dass die Biomineralisation der Polykieselsäure (silica; $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) bei den Diatomeen in der SDV erfolgt.^[110] Die ornamentierte Kieselshale (frustulum) wird in den SDVs gebildet, deren Membran, Silicalemma genannt, aus einer typischen Lipiddoppelschicht besteht. Die Ursachen für die artspezifischen Verzierungen der Kieselshalen sind deshalb in den SDVs, ihren Komponenten und deren Strukturen zu suchen.

5.3.1. Kieselensäuretransport und Zellwandsynthese

Für die Bildung der Kieselensäurewand in Diatomeen konnten schon Transportproteine der cytoplasmatischen

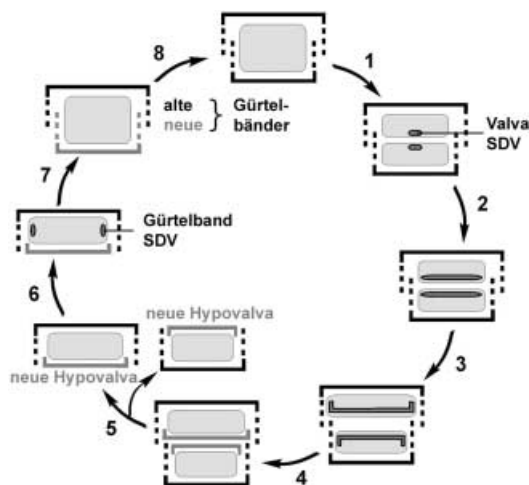


Abbildung 21. Zellzyklus der Diatomeen: 1) Cytokinese (Teilung des Cytoplasmas) und Bildung einer Polykieselsäure ablagernden Vesikel (SDV) für eine Valva (Kieselshale) in jedem Tochterprotoplast; 2, 3) Ausdehnung der SDV und Bildung einer neuen Hypovalva in jeder SDV; 4) Excytose der Inhalte (Hypovalven jeder SDV); 5) Trennung der Tochterzellen; 6) Bildung der SDV für das erste Gürtelband; 7) aufeinanderfolgende Bildung und Sekretion der Gürtelbänder; 8) DNA-Reduplikation. (Von Lit. [109] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper).

Membran, die Kieselensäuretransporter (SITs), charakterisiert und sequenziert werden.^[103,111,112] Damit wurden die ersten Proteine beschrieben, die Silicium, dessen vorherrschende Form im Seewasser undissoziierte Kieselensäure $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ ist, spezifisch binden und in die Zellen befördern. Dieser Transport ist gekoppelt mit und wird gesteuert durch Inkorporierung der Kieselensäure in die Zellwand^[112] – eine Kopplung, die auch in magnetischen Bakterien zwischen dem Transport von Fe^{III} -Ionen und der Bildung der Magnetitkristalle besteht (Abbildung 9 A, B).

Die Kieselensäure muss im Cytoplasma unter offensichtlich erschwerten strukturellen Bedingungen, die sich von denen in magnetischen Bakterien und auch in Coccolithophoren unterscheiden, den Weg zu ihrer Ablagerung, d.h. zum Aufbau der Hypotheka in der SDV, finden. Denn die neue Kieselensäurewand wird erst nach der Cytokinese, der Teilung des Cytoplasmas, und vor der Zellteilung gebildet (Abbildung 21). Die Tochterzellen bleiben dann in dem Bereich in enger Nachbarschaft, in dem die beiden SDVs die neuen Hypovalven bilden (Abbildung 22), – ein Bereich, der damit

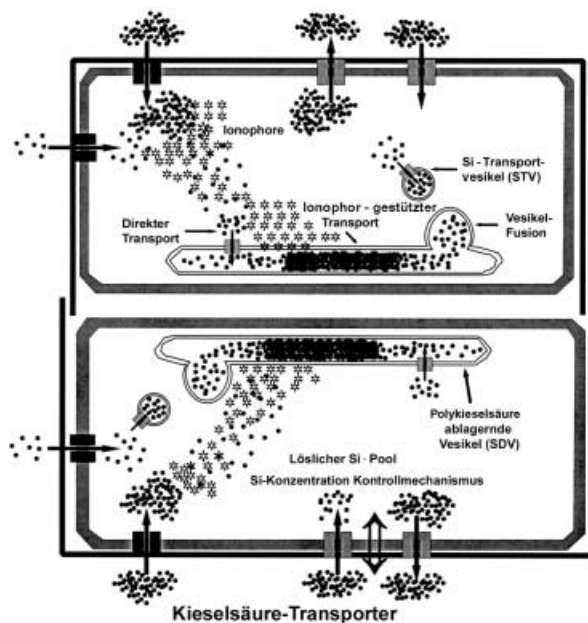


Abbildung 22. Schematische Darstellung der Polykieselsäureaufnahme, ihres intrazellulären Transports und ihrer Ablagerung in einer sich teilenden Zelle. Das Schema zeigt diese drei Aktivitäten nach der Trennung des Cytoplasmas (Cytokinese) in zwei Tochterzellen, die sich während der Synthese ihrer Kieselensäurewände noch in der Kieselshale, der Epi- und Hypotheka, der Mutterzelle befinden. Die schwarzen äußeren Linien entsprechen der Kieselensäurewand der Mutterzelle. Die Plasmamembran jeder der beiden Tochterzellen werden durch das jeweilige große Rechteck symbolisiert, dessen Umrandung schraffiert ist. Andere Komponenten sind markiert. Schwarze Punkte repräsentieren Kieselensäure. Die untere Tochterzelle zeigt die drei Hauptkomponenten des Transports in die Zelle und der Polykieselsäurebildung: die Kieselensäuretransporter, den Pool der gelösten Polykieselsäure und die SDVs. Die obere Tochterzelle zeigt drei mögliche Wege des intrazellulären Transports in die SDVs: den direkten Transport durch intrazelluläre Kieselensäure transportierende Proteine, den Ionophor-gestützten Transport mithilfe der ionophoretischen Aktivitäten des Silicats, und den Transport durch die Polykieselsäure transportierende Vesikel (STV). (Von Lit. [112a] mit freundlicher Genehmigung von M. Hildebrand).

von dem extrazellulären Raum abgeschirmt ist. Die Kieselsäure kann daher nur dort über die cytoplasmatische Membran transportiert werden, wo Letztere noch mit der Umgebung in Verbindung steht. Da viele Diatomeen ihre Kieselsäurewände innerhalb von ein bis zwei Stunden bilden,^[113] müssen große Mengen an Kieselsäure durch das Cytoplasma geschleust werden ohne zu polymerisieren.

Die Kieselsäureaufnahme der Diatomeenzellen folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik mit dem Parametern $K_M = 0.2\text{--}7.7 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 1.2\text{--}950 \text{ fmol Si Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$.^[114] Der Transport von $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ ist in marinen Diatomeen mit Natriumionen gekoppelt, und zwar in Form eines Natrium/Kieselsäure-Symporters.^[103,111] Wird die Kieselsäureaufnahme an Diatomeenzellen untersucht, die längere Zeit unter Substratmangel gezüchtet wurden und deren intrazelluläre Speicher dann weitgehend leer sind, wird $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ nach Zugabe in das Medium mit maximaler Geschwindigkeit und unter Wiederauffüllung der Speicher aufgenommen. Eine massive Erhöhung des Kieselsäuretransportes findet in ähnlicher Weise statt, wenn die DNA-Synthese beginnt.^[115] Auf dieser Grundlage wurden aus *C. fusiformis* cDNA-Bibliotheken angelegt und fünf cDNAs mit identischen gemeinsamen Sequenzen identifiziert und sequenziert (SIT 1–5).^[112a] Da für die abgeleiteten Proteine weder in Prokaryoten noch in Eukaryoten signifikante Homologien nachgewiesen wurden, repräsentieren SIT 1–5 eine neuartige Klasse von Transportern,^[112a] obwohl sie eine Signatursequenz (AX₃LX₃GR) für Natriumsymporter bei den Aminosäuren 216–225 (Abbildung 23) haben.^[116] Die Transmembrandomaine ist mit 87–99% Aminosäureidentität hoch konserviert, wie aus dem Vergleich der fünf SITs hervorgeht,^[112a] und ist sehr

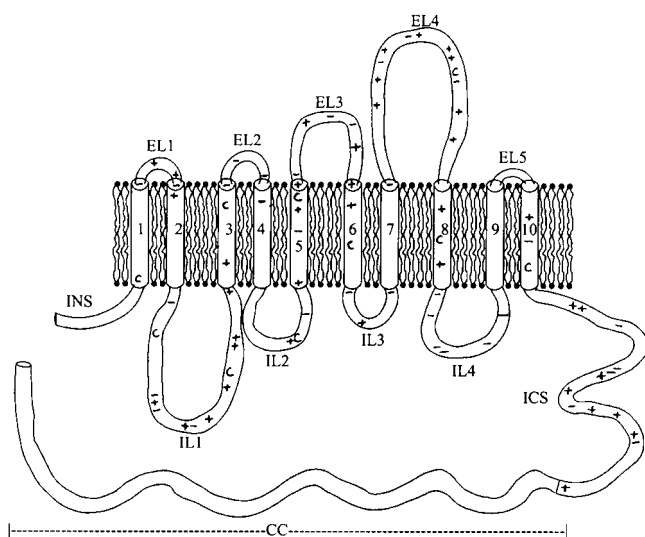


Abbildung 23. Topologisches Modell der Kieselsäuretransporter (SITs) aus *C. fusiformis* auf der Grundlage von SIT4 in einer Lipiddoppelschichtmembran. Unten das Zellinnere. IL = intrazelluläre Schleifen, EL = extrazelluläre Schleifen, INS = intrazelluläres Aminosegment, ICS = intrazelluläres Carboxylsegment, CC = superspiralisierte Regionen (coiled coil). (+) und (–) ordnen die geladenen Aminosäuren ein, C die Cysteinreste. (Nach Lit. [112a] mit freundlicher Genehmigung von M. Hildebrandt).

wahrscheinlich der Bereich, in dem die undissoziierte Kieselsäure durch die Membran transportiert wird.

Da die C-terminale Domäne in anderen Transportern wahrscheinlich deren Aktivität steuert,^[117] wird angenommen, dass die fünf SITs in verschiedenen Bereichen der cytoplasmatischen Membran jeweils andere Aktivitäten entfalten (Abbildung 23).^[111b] In den intrazellulären Speichern, die von diesen Kieselsäuretransportern je nach Bedingung aufgefüllt werden, können bis zu 50% des gesamten Siliciums als lösliche Kieselsäure vorliegen.^[118] Nicht nur variieren die Konzentrationen an löslicher Kieselsäure von 19–340 mmol L⁻¹,^[112] sondern sie werden auch weit über die Sättigungsgrenze der jeweiligen Löslichkeit für Kieselsäure aufrechterhalten.^[119]

Zwei Mechanismen wurden hierfür vorgeschlagen: Erstens wurde auf der Grundlage von Versuchen, in denen 80% der löslichen Kieselsäure durch Trichloressigsäure gefällt werden konnten, vorgeschlagen, dass organische, Kieselsäure bindende Komponenten die Polymerisation verhindern.^[120] Die Kapazität dieser Komponenten kann zusätzlich das Ausmaß der Kieselsäurespeicher bestimmen. Kieselsäure-Ionophore konnten aus *Nitzschia alba* durch organische Lösungsmittel extrahiert, aber nicht charakterisiert werden. Diese Ionophoraktivitäten wurden an Zellen, die unter Kieselsäuremangel kultiviert wurden, auf das Sechsfache induziert. Dieser Hinweis auf einen direkten Zusammenhang mit dem Kieselsäuremetabolismus hat zu der Annahme geführt, dass Ionophore dazu dienen, hohe intrazelluläre Konzentrationen an unpolymerisierter Kieselsäure zu wahren.^[121] So binden und lösen Catechol und seine Derivate, z. B. Catecholamine wie Epinephrin, Kieselsäure schnell. Diese Verbindungsklasse wird von Bakterien in Form der Catecholsiderophore synthetisiert, um bei Eisenmangel extrazellulär Fe^{III} unter aeroben Bedingungen zu binden oder aus Fe^{III}-Oxiden zu lösen.^[122] In den Catecholsiderophoren sind 2,3-Dihydroxybenzoesäuregruppen an 1,4-Diaminobutan (Putrescin) oder *N*-(3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutan (Spermidin) gebunden – beides Amine, die in den später beschriebenen, aus der Diatomeenzellwand isolierten Verbindungen, den Silaffinen, eine wesentliche Rolle spielen (Abschnitt 5.3.3). Jedoch wurde bei der Biomineralisation von Magnetit durch magnetische Bakterien ein Ionophor sezerniert, das das angebotene Fe^{III} in Lösung hält, kein Siderophor ist und die Eisenaufnahme stimuliert.^[63,65] Die chemische Struktur dieser Verbindung ist auch unbekannt (Abschnitt 3.4).

Zweitens wird als alternativer Mechanismus vorgeschlagen, dass die Kieselsäure intrazellulär durch kleine Vesikeln transportiert wird, in denen sie löslich oder unlöslich gespeichert ist.^[123–125] Diese Vesikeln wurden von Schmid und Schulz^[123] als Kieselsäuretransportvesikeln (silicon transport vesicles, STVs) bezeichnet. Sie befinden sich gemäß mehrerer elektronenmikroskopischen Untersuchungen in der Nähe von aktiven SDVs.^[123,125,126]

Diese STVs entsprechen den gut charakterisierten, kleinen Transportvesikeln der Coccolithophore (Abschnitt 4.5.1). Die Größe der STVs gleicht derjenigen der Polykieselsäurepartikel, die sich an die wachsenden Kieselsäureschalen anlagern. Dies weist darauf hin, dass diese Partikel als

Bausteine eingesetzt werden. Ihre Größe wird wahrscheinlich durch polyaminmodifizierte Polypeptide, Silaffine genannt, oder durch deren Polyamine allein (Abschnitt 5.3.3) bestimmt. Solche Polykieselsäurepartikel wurden bereits in *Pinnularia viridis* durch AFM nachgewiesen mit erstaunlich geringer Variation der Größe: in den Valven mit 44.8 ± 0.7 nm und in den Gürtelbändern mit 40.3 ± 0.8 nm.^[106] Ob die STVs Kieselsäure enthalten, wurde bisher nicht durch Röntgen-Mikroanalyse^[127] untersucht.

5.3.2. **Polykieselsäure ablagernde Vesikeln**

Schon früh wurde erkannt, dass nicht nur in Diatomeen, sondern auch in anderen eukaryotischen Einzellern die Morphogenese kieselsäurehaltiger Strukturen in Polykieselsäure ablagernden Vesikeln stattfindet.^[105a,110,128] Trotzdem ist deren Entstehung in Diatomeen noch immer ein Gegenstand kontroverser Diskussionen, vor allem wegen der Vielzahl der verschiedenen Vesikeln. Doch gibt es einige Hinweisen darauf, dass die SDVs sowohl in zentralen Diatomeen^[123,126,129] als auch in pennaten Diatomeen^[130] aus dem Golgi-Apparat hervorgegangen sind. Die Analogie zu den Coccolithvesikeln (Abschnitt 4) unterstützt diese Befunde (Abbildung 15).

Ein methodisch wichtiger Schritt gelang mit der Einführung des kationischen, lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 123 (R123), der sich entsprechend dem elektrochemischen Potential in den SDVs anreichert und dort einen sauren pH-Wert anzeigt.^[131] R123 wird auch in aktiv polymerisierende Polykieselsäure eingebaut, und dieser Prozess kann quantitativ verfolgt werden.^[105c,112a,131]

Die außerordentlich umfangreichen, bisher überwiegend morphologischen Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop legen die Annahme nahe, dass Kieselsäure entweder durch Ionophor-gestützte Diffusion^[121] (Abbildung 22) oder durch STVs^[123,126] schon als Partikel bestimmter Größe zum Ort der Morphogenese, den SDVs, geleitet wird (Abschnitt 5.2.2). Jedoch gelang es bisher wegen der schwierigen Beseitigung der Kieselsäureschale nicht, die SDVs zu isolieren, um den Kieselsäuretransport über das Silicalemma zu untersuchen.

5.3.3. **Proteine der Diatomeenzellwand: Frustuline, Pleuraline, Silaffine**

Bei einem Vergleich der Zellwände der Diatomeen mit denen der Coccolithophoren, deren komplexen Strukturen entweder aus amorpher Polykieselsäure oder aus kristallinem Calciumcarbonat bestehen, fällt auf den ersten, analogiesuchenden Blick auf, dass wesentlich mehr organische Komponenten bei der Aufarbeitung der Diatomeenzellwand gefunden werden als bei der Aufarbeitung der Coccolithophorenzellwand. Dieser Unterschied kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass Diatomeenzellwände im Gegensatz zu den Coccolithen Poren und Schlitz durch einen Ornamentierungsvorgang haben, der Mikromorphogenese genannt wird.^[105c,121] Während die drei Polysaccharide PS1, PS2 und PS3 der Coccolithophorzelle am einfachsten durch Behandlung mit Trichloressigsäure, aber auch mit EDTA

gewonnen werden können,^[90a] muss die Diatomeenzellwand mit wasserfreiem Fluorwasserstoff behandelt werden, um die sehr fest gebundenen und inkorporierten Komponenten freizusetzen.^[104,105b,132,133] Drei Gruppen von Proteinen konnten aus der Zellwand von *C. fusiformis* isoliert und charakterisiert werden: Frustuline,^[104,105b,132] Pleuraline,^[133] und Silaffine.^[134]

Frustuline sind überall auf der Zellwand zu finden und bilden offensichtlich bis in die Innenräume hinein einen schützenden Proteinmantel (Abschnitt 5.3.1; auch Lit. [106]), der mit EDTA, einem Komplexbildner für Calciumionen, vollständig abgelöst werden kann.^[104,105b,132] In beiden Eigenschaften ähneln die Frustuline den Polysacchariden PS1 und PS2, die ebenfalls die Calcitkristalle der Coccolithe mit einem Schutzmantel überziehen sowie durch EDTA freigesetzt werden (Abschnitt 4.5.1). Außerdem kommen die Frustuline in *C. fusiformis* als eine Familie von vier überwiegend glycosylierten Proteinen in apparenten Molekulargewichten von 75–200 kDa gemeinsam vor.^[104,105b,132] Die Frustuline fallen unter anderem durch fünf bis sechs Wiederholungen von Domänen auf, die reich an Säuren und Cystein sind.

Pleuraline, die zweite Familie von Proteinen der Diatomeenzellwand aus *C. fusiformis*, konnten nur durch die Auflösung der Kieselsäurezellwand mit Fluorwasserstoff gewonnen werden, weshalb sie früher HEPs (HF-extractable proteins) genannt wurden.^[133] Drei Pleuraline, Pleuralin-1 (200 kDa), Pleuralin-2 (180 kDa) und Pleuralin-3 (150 kDa), wurden isoliert und sequenziert (Abbildung 24A). Wie die Frustuline enthalten diese Proteine Wiederholungen von speziellen Domänen, hier den PSC-Domänen (Prolin-Serin-Cystein-Domänen).

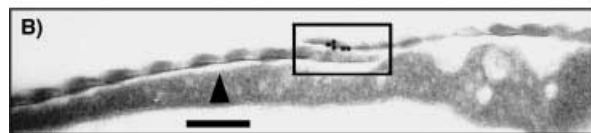
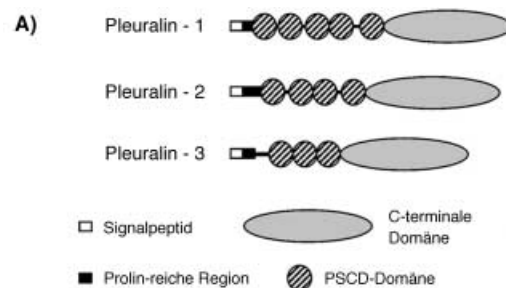


Abbildung 24. A) Schematische Darstellung der Primärstrukturen aller drei Pleuraline. B) Immungoldmarkierung eines Dünnschnitts von *C. fusiformis*. Die TEM-Aufnahme zeigt die überlappende Region der Gürtelbänder (eingerahmt). Der schwarze Pfeil zeigt auf die Plasmamembran und in Richtung des extrazellulären Raums. Die beiden Reihen ovaler Strukturelemente außerhalb des Protoplasten verkörpern die Gürtelbänder der Hypotheka (links) und der Epitheka (rechts). Zur indirekten Immungoldmarkierung wurde ein Anti-Pleuralin-1-Antikörper eingesetzt. Die Länge des Balkens entspricht 200 nm. (Modifiziert nach Lit. [109,133b] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper und N. Kröger).

Die wichtige Entdeckung der bisher einzigen Signalsequenz an Proteinen der Biomineralisation, an den Pleuralinen, die für einen Eintritt in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist, weist auf einen Zusammenhang oder eine Analogie zwischen Biomineralisation in Eukaryoten und dem sekretorischen Transportweg von Proteinen, der Exocytose, hin. Diese Analogie wird durch die Biomineralisation der Coccolithe von *Pleurochrysis carterae* gestützt, bei der nahezu alle bisher beschriebenen Vorgänge im Golgi-Apparat vor sich gehen (Abbildung 15); aber kein Protein, sondern ausnahmslos saure Polysaccharide wurden bisher dabei nachgewiesen.

Durch Immungoldmarkierung konnten alle Pleuraline an einer spezifischen Stelle der Diatomeenzellwand entsprechend ihrer Zellzyklus-abhängigen Entwicklung identifiziert werden. Als Erstes wurde durch diese Methode die eindeutig unterschiedliche Proteinzusammensetzung der beiden Theka, Epi- und Hypotheka, bestimmt. Bei der Zellteilung binden die Pleuraline an die neu geformten Gürtelbänder der Hypotheka, während sie zuvor noch an denen der Epitheka nachgewiesen worden waren (Abbildung 24 B). Dieser Vorgang läuft parallel zu der gleichzeitigen Umwandlung der bisherigen Hypotheka in die Epitheka der Tochterzelle^[133] (Abbildung 21). Offensichtlich ist dieses entwicklungs-gesteuerte Zusammenwirken der Pleuraline mit der Diatomeenzellwand einbezogen in die Hypotheka-Epitheka Differenzierung.

Die Silaffine bilden die dritte Familie von Proteinen der Diatomeenzellwand in *C. fusiformis*. Sie konnten wie die Pleuraline ebenfalls nur im Aufschluss mit wasserfreiem Fluorwasserstoff nachgewiesen werden. Es sind drei Polypeptide von niedrigem Molekulargewicht: Silaffin-1A (4 kDa), Silaffin-1B (8 kDa), und Silaffin-2 (17 kDa). Mithilfe der N-terminalen Aminosäuresequenz von Silaffin-1B konnte das entsprechende *sil1*-Gen geklont werden. Das darin kodierte Protein *sil1p* zeigt wie die Frustuline^[104,105b,132] und Pleuraline (Abbildung 24 A) eine Reihe sich wiederholender Sequenzen (Abbildung 25 A), die als R1–R7 bezeichnet werden. Anders als die Frustuline und Pleuraline wird *sil1p* aber nicht in dieser repetitiven Struktur von der Zelle genutzt, sondern es wird proteolytisch gespalten. Hierbei werden die R1- bis R7-Einheiten als einzelne Peptide freigesetzt, R1 entspricht der Vorstufe von Silaffin-1B, während R2–R7 den Vorstufen der Isoformen von Silaffin-1A entsprechen^[134] (Abbildung 25 A).

Die aktiven Peptide, die Silaffine, entstehen in der Zelle durch eine einzigartige, posttranslationale Modifizierung von vier Lysinresten ihrer Vorstufen, die in Letzteren in zwei Paaren oder in einem Paar und zwei einzelnen Resten vorliegen (Abbildung 25 A). Diese Modifizierung ist eine Alkylierung von je zwei Lysinen durch lineare Polyamine, die aus fünf bis zehn methylierten Propylaminen bestehen, und durch ϵ -N,N-Dimethylierung der beiden anderen Lysine. In den Silaffin-1A₁-Isoformen ist eines dieser Dimethyllysine durch ein δ -Hydroxy- ϵ -N,N,N-trimethyllysin ersetzt.^[134,136] (Abbildung 25 B).

Die besondere Eigenschaft der Silaffine, in vitro Polykieselsäure zu bilden, weist darauf hin, dass sie wahrscheinlich beim Aufbau der Kieselsäurezellwand eine entscheidende

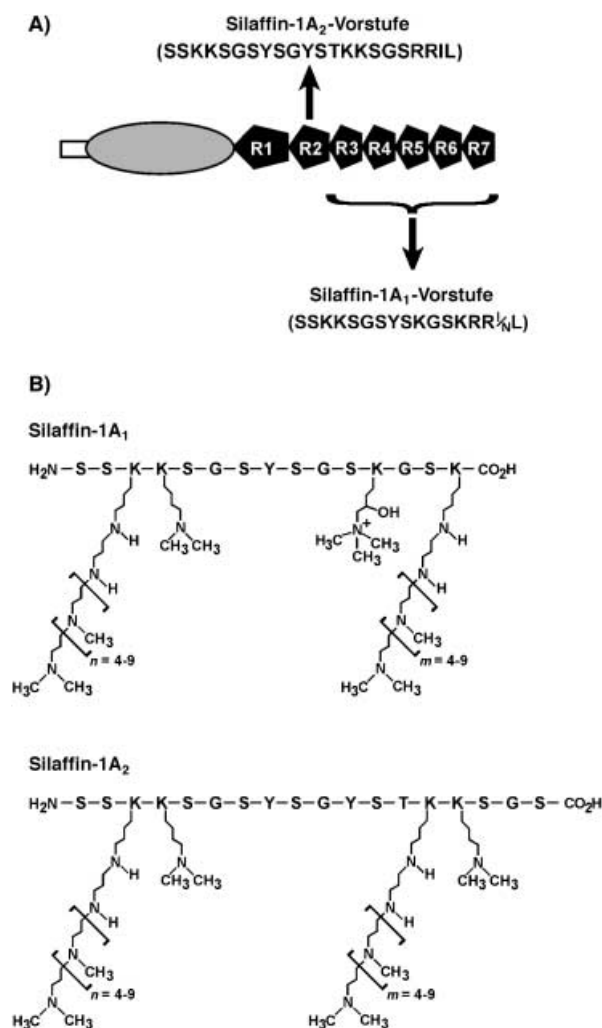


Abbildung 25. Entstehung der Silaffin-1A Isoformen: A) Schematische Struktur der Vorstufe aller Silaffine, des Polypeptids *sil1p*. Die schwarzen Fünfecke zeigen die sich wiederholenden Elemente R1–R7, aus denen alle Silaffine entstehen. Die Aminosäuresequenzen der Elemente R2 wie auch R3–7 liegen in Klammern vor. Aus Element R1 entsteht Silaffin-B. Der weiße Balken stellt die Signalsequenz dar, die graue Ellipse die stark saure Prosequenz.^[134b] B) Chemische Strukturen von Silaffin-1A₁ und Silaffin-1A₂. Die Strukturen der Seitenkette sind nur für die modifizierten Lysinreste gezeigt. (Von Lit. [134b] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper und N. Kröger sowie von The American Society for Biochemistry and Molecular Biology).

de Rolle spielen. Während in Abwesenheit von Silaffinen eine Orthokieselsäurelösung, die frisch aus Tetramethylorthokieselsäureester in 1 mM Salzsäure zu einer Endkonzentration von 1 M hergestellt wurde, mindestens einige Stunden stabil ist, kann sowohl jedes Silaffin als auch die Mischung der Silaffine aus dieser Kieselsäurelösung in Sekunden Polykieselsäure fällen. Obwohl die Menge Polykieselsäure praktisch der zugegebenen Menge an einzelnen Silaffinen oder ihres Gemisches proportional ist (Abbildung 26 A), entstehen sphärische Partikel mit sehr unterschiedlichen Durchmessern. So induziert Silaffin-1A die Bildung von Partikeln mit Durchmessern von 500–700 nm (Abbildung 26 B), während das natürliche Gemisch aus Silaffin-1A, Silaffin-B und Silaffin-2 viel kleinere Partikel (Durchmesser < 50 nm) her-

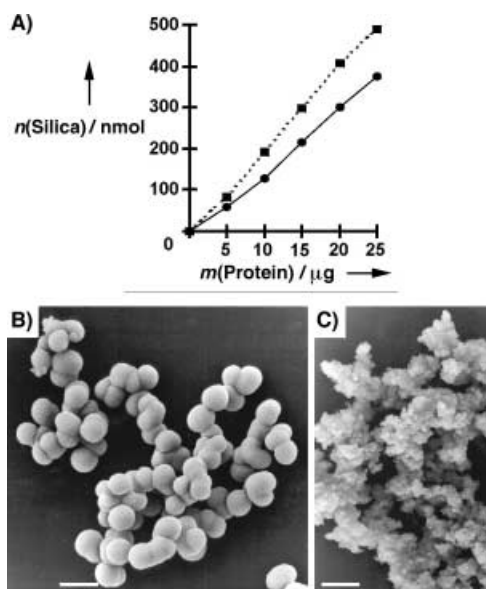


Abbildung 26. Silaffin-induzierte Polykieselsäure-Fällung: A) Beziehung zwischen den Silaffin-Konzentrationen (μg Protein in 0.1 M Kieselsäurelösung) und der Menge an Polykieselsäure (nmol), die aus der Kieselsäurelösung gefällt wird. Punktierte Linie: Silaffin-Gemisch. Durchgezogene Linie: Reines Silaffin-1A. B, C) SEM-Aufnahmen von Polykieselsäure, gefällt (B) durch Silaffin-1A und (C) durch das natürliche Silaffin-Gemisch. Der Durchmesser der Partikel ist 500–700 nm (B) und < 50 nm (C). Die Länge des Balkens entspricht 1 μm . (Modifiziert von Lit. [109] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper und N. Kröger).

vorbringt. Dieser Zusammenhang zwischen verschiedenen Silaffinen und Partikelgröße, der auch für die Materialwissenschaften von großem Interesse sein kann, hat zu noch detaillierteren Untersuchungen geführt. So wurden die vollständigen chemischen Strukturen des Silaffin-1A₁ und Silaffin-1A₂ geklärt, die aus 15 bzw. 18 Aminosäureresten aufgebaut sind (Abbildung 25 B).^[134] Sie unterscheiden sich nur durch die Modifizierung ihrer jeweils vier Lysinreste durch den δ -Hydroxy- ϵ -N,N,N-trimethyl-Rest; das quartäre Ammoniumion wurde bisher nur in Silaffin-1A₁ nachgewiesen.^[134,136] Dieser Unterschied hat jedoch auch bei einer Variation des pH-Werts von 5–8 praktisch keinen Einfluss auf die Menge an gefällter Polykieselsäure, auch nicht auf den Durchmesser der gebildeten sphärischen Partikel.^[134]

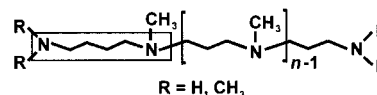
Da außerdem das unmodifizierte Peptid pR5 in saurer Lösung unterhalb von pH 6 keine Polykieselsäurefällung hervorrufen kann,^[134] die Polykieselsäureablagerung in vitro aber in saurem Plasma der SDVs stattfindet, spielen die Polyaminseitenketten im biologischen System hierbei offensichtlich eine entscheidende Rolle.

5.3.4. Artspezifische Polyamine, Struktur und In-vitro-Produktion von Polykieselsäure-Nanopartikeln

Bisher wurden nahezu alle Untersuchungen an *C. fusiformis*, dem Modellorganismus der Diatomeenforschung, ausgeführt. Da die Bildung der Valven mit ihren Poren, Schlitzen und anderen Öffnungen in den SDVs (Abbildungen 19, 20 A–C) zu artspezifischen Strukturen führt, ist es

wahrscheinlich, dass jede Art andere Silaffine oder Silaffin-ähnliche Moleküle hat.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden organische Zellwandkomponenten von sechs verschiedenen Diatomeen aus unterschiedlichen Arten isoliert.^[135a] Schon in einer speziellen SDS-PAGE, die auch Verbindungen niedriger Molekulargewichte zu trennen imstande ist,^[137] wurde die Annahme bestätigt, dass, bezogen auf *C. fusiformis* jede der fünf anderen Arten eine jeweils spezifische Silaffin-Zusammensetzung hat.^[135a] Zusätzlich wurden hierbei Verbindungen nachgewiesen, deren Molekulargewichte kleiner als 3.5 kDa sind und die mit Ausnahme von *C. fusiformis* bei allen anderen Diatomeen entweder eine oder die Hauptkomponente zu sein scheinen. Nach Reinigung und massenspektrometrischer Analyse wurden für jede Art eine andere Zahl von Polyaminen mit jeweils verschiedenen Molekulargewichten bestimmt. Alle Substanzen sind lineare Polyamine, die aus N-Methylaminopropyl- oder Aminopropyl-Einheiten zusammengesetzt sind, also einen unterschiedlichen Methylierungsgrad aufweisen. Wie bei der Polyaminsynthese von Bakterien und Eukaryoten^[135b] bilden Ornithin (2,5-Diaminopentansäure) und sein Decarboxylierungsprodukt Putrescin (1,4-Diaminobutan) die Basis der Alkylierung mit Aminopropylresten. Diese beiden wie auch die Aminogruppe des endständigen Aminopropylrestes können verschieden methyliert sein. Eine schematische Darstellung der vereinfachten Polyaminstruktur ist gezeigt. Die Aminopropylgruppen und



Ornithin sind hier nicht eingefügt, Putrescin ist eingerahmt. (Mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper und N. Kröger).

Die Annahme, dass auch diese Polyamine neben den Silaffinen Hauptkomponenten der biologischen Polykieselsäurebildung sind, ließ sich auch durch In-vitro-Experimente bestätigen. Aus *Nitzschia angularis* konnten die meisten Polyamine isoliert werden.^[135a] Ihre Molekulargewichte variieren zwischen 600–1250 Da. Sie wurden in Abhängigkeit vom Molekulargewicht bei verschiedenen pH-Werten auf ihre Fähigkeit untersucht, Polykieselsäure zu fällen. So werden mit Polyaminen von 1000–1250 Da bei pH 5 sphärische Polykieselsäurepartikel von überwiegend 0.8–1 μm gebildet (Abbildung 27 A), mit Polyaminen von 600–700 Da hingegen nur 100–200 nm große sphärische Polykieselsäurepartikel (Abbildung 27 B). Ein enger Zusammenhang zwischen der Morphologie von Polykieselsäurepartikeln und dem pH-Wert wird sichtbar, wenn in Gegenwart des natürlichen Polyamingemisches von *N. angularis* der pH-Wert der Kieselsäurelösung erhöht wird. Mit steigendem pH-Wert verringert sich der Partikeldurchmesser von 700 nm auf 50 nm (Abbildung 27 C–F). Ein zusätzliches Potenzial zur Strukturbildung haben drei Silaffine von *N. angularis*, wie aus der Bildung von blockartigen Strukturen in vitro abzuleiten ist,^[135] die auch in vivo als Areolae(Honigwaben)-Wände vorkommen.^[138] Werden die Silaffine mit den Polyaminen von

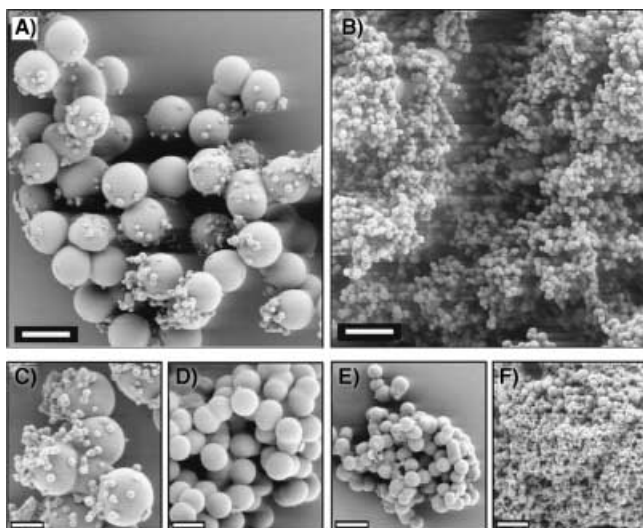


Abbildung 27. Polykieselsäurepräzipitate, die durch Polyamine aus *Nitzschia angularis* induziert wurden. Es wurden Polyamine mit Molekulargewichten von 1000 bis 1250 Da (A) und 600 bis 750 Da (B) verwendet. Die natürlichen Gemische aus Polyaminen ($M_w = 600\text{--}1250$ Da) wurden eingesetzt, um die pH-Abhängigkeit der Polyamin-induzierten Polykieselsäure-Fällungen zu untersuchen: (C) pH 5.4, (D) pH 6.3, (E) pH 7.2, (F) pH 8.3. Die Polyaminkonzentration in jeder Lösung war 0.85 mg ml^{-1} . Die Länge des Balkens entspricht $1\text{ }\mu\text{m}$ in (A) und (B), 500 nm in (C), (D), (E) und (F). (Von Lit. [135a] mit freundlicher Genehmigung von M. Sumper und N. Kröger und von The National Academy of Science USA).

N. angularis kombiniert, werden diese blockartigen Strukturen variiert, indem eine flache Seite mit abgeflachten Polykieselsäurepartikeln entsteht.^[135]

Vor kurzem gelang es, ein SP41-Protein (SP41 für scale protein, 41 kDa) zu isolieren aus den silicathaltigen Plättchen und Stacheln von *Mallomonas splendens*, einer photosynthetischen Chrysophyceae (Goldbraune Alge), die eine nahe Verwandte der Diatomeen ist. Mithilfe von polyklonalen Anti-SP41-Antikörpern konnte während der Biogenese der Plättchen und Stacheln erstmals gezeigt werden, dass SP41 zusammen mit Polykieselsäure in speziellen SDVs deponiert wird.^[139] Hiermit steht ein ganzes Arsenal von Verbindungen zur Verfügung, um den Zusammenhang zwischen Kieselsäurepolymerisation, Partikelgröße, Struktur- und Ornamentbildung zu untersuchen.

Aus den Strukturuntersuchungen,^[105a,138] der Isolierung organischer Substanzen aus den Diatomeenzellwänden^[109,135,139] und den chemischen Synthesen zur Herstellung anorganischer Materialien aus Polykieselsäure mit definierter Porosität – unter Nutzung organischer, geformter Substrate^[140–144c] – wurden eine Reihe von Modellen zur Bildung der komplizierten Diatomeenstrukturen vorgeschlagen.^[105a,145] Diese gehen entweder von vorgeformten Strukturen nach der Mould-Prepattern-Hypothese^[145e,f] oder von Phänomenen der Phasentrennung aus.^[146] Sumper hat ein einfaches Modell zur Phasentrennung bei der Bildung von Honigwabenzellen-ähnlichen Strukturen entworfen,^[146a] wie sie in Diatomeen häufig vorkommen und auch durch chemische Synthesen^[144b,c] entstehen. Dieses Modell beschreibt in den SDVs

wiederholte Phasentrennungen, wodurch Emulsionen von Mikro- und nachfolgend Nanotropfen als Zentren der Polykieselsäureablagerungen entstehen. Volkmer et al.^[146b] konnten solche Phasentrennungen zeitaufgelöst bei der Bildung strahlenförmiger Kieselshalen mit einem In-situ-Videomikroskop verfolgen. Lipophile detergentstabilisierte Tropfen mit limitierten Mengen eines gemischten Titan-Siliciumoxides entwickelten in einem dynamischen Dissipationsprozess, d. h. in einer spontanen Bildung immer kleinerer Tropfen, die Fähigkeit, eine anorganische Matrix zu bilden und zu formen. Allerdings wurden bisher immer stachelartige und keine Honigwabenzellen-ähnliche Formen gefunden. Die Wahl des Gemischs von anionischen und kationischen oberflächenaktiven Substanzen ist entscheidend für den Erfolg solcher Versuche. Außerdem konnten van Blaaderen et al. zeigen, dass auch kolloidale Kristalle, dreidimensionale periodische Strukturen aus kleinen, suspendierten kolloidalen Partikeln, in Größen entstehen können, die vom periodischen Abstand der Vertiefungen in einer Polymerschicht abhängen.^[147a] Dieses Verfahren wurde kolloidale Epitaxie genannt.^[147b]

Seit langem wird die Notwendigkeit oder Nützlichkeit von Siliciumverbindungen in biologischen Systemen diskutiert.^[148a] Vor allem stellt sich die Frage, ob die Biomineralisation von Polykieselsäure den Diatomeen einen ökologischen Vorteil bietet. Verschiedene Vorschläge wurden gemacht, welche Funktion die Kieselsäurezellwand der Diatomeen haben könnte, z. B. als UV-Filter oder als eine Art Schutzpanzer gegen Zooplankton (eukaryotische Einzeller, die kein Chlorophyll haben). Jedoch konnten alle bisherigen Vorschläge experimentell nicht bestätigt werden.

Milligan und Morel hingegen konnten zeigen, dass die Polykieselsäure der Diatomeenzellwand ein aktiver pH-Puffer ist.^[148b] Diatomeen haben an ihren Oberflächen extrazelluläre Carboanhydrasen, die die Reaktion zwischen HCO_3^- und CO_2 katalysieren. Die hohe katalytische Geschwindigkeit dieses Enzyms erfordert einen pH-Puffer, der schnell Protonen bindet oder zur Verfügung stellt. In Versuchen an Zellen von *Thalassiosira weissflogii* oder in Gegenwart von isolierten Zellwänden aus Polykieselsäure mit isolierter löslicher Carboanhydrase (vom Rind) konnte die Pufferwirkung von Polykieselsäure verifiziert werden: Die Polykieselsäure beschleunigte die Reaktion des Enzyms. Es wurde postuliert, dass die erhöhte Freisetzung von CO_2 durch die extrazelluläre Carboanhydrase Teil des kohlenstoffkonzentrierenden Mechanismus (carbon concentrating mechanism; CCM) ist. Durch ihn wird die CO_2 -Konzentration in der Umgebung des wichtigsten carboxylierenden Enzyms, der Ribulose-1,5-Diphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCO), und damit die Photosynthesegeschwindigkeit gesteigert, obwohl die Konzentration von CO_2 im Meerwasser nur 1/100 der für die volle Aktivität des Enzyms benötigten ist.

So kann der globale Zyklus von Silicium, im Wesentlichen die Biomineralisation von Polykieselsäure, mit dem von Kohlenstoff, also der Photosynthese, in Diatomeen gekoppelt sein. Ein direkter Beweis könnte mit der Diatomeenart *Phaeodactylum tricorutum* geführt werden, die als silifizierter und nicht-silifizierter Morphotyp isoliert werden kann. Der silifizierte Morphotyp sollte bevorzugt Kohlenstoff fixieren.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Durch die Methoden der Molekularbiologie werden derzeit in der Biomineralisation rasch viele neuartige Erkenntnisse gewonnen. Was lange äußerst schwer erreichbar schien, den Mechanismus einer Biomineralisation wenigstens ansatzweise zu verstehen, ist Marsh et al. bei den einzelligen Coccolithophoren (Kalkalgen) bereits gelungen. Hierbei ist eine Art Mehrkomponentenkomplex sichtbar, in dem die Fixierung einer ersten Kristallitkante verbunden ist mit einer Ansammlung aus 25 nm großen PS1/PS2-Ca-Partikeln, die polyaniongebundene Calciumionen in hoher Konzentration freisetzen. Dabei werden die ersten Kristalle als kleine Rechtecke gebildet. Das saure Polysaccharid PS3, das sowohl in Verbindung mit der Coccolithvesikelmembran als auch mit den obigen Kristallen steht, induziert anschließend das Wachstum des jeweiligen Vorgängerkristalls zu der ungewöhnlichen Ambossstruktur von *Pleurochrysis*.^[96] (Abbildung 12)

Leider wurde bisher kein Coccolithophor-Genom sequenziert. Bei den magnetischen Bakterien hingegen sind bereits zwei Genomsequenzen seit April 2001 bekannt. Dies hat dazu beigetragen, dass nach den umfangreichen Arbeiten von Schüler et al. an Proteinen der Magnetosommembran nicht nur diese Proteine in zwei Genclustern, sondern auch eine Reihe von Proteinfamilien dort in ähnlicher Anordnung nachweisbar sind (Abbildung 8). Deshalb ist es jetzt möglich, durch Ausschalten einzelner Gene den Mechanismus der Magnetitkristallbildung in den Magnetosomvesikeln zu untersuchen. Außerdem könnten jetzt die zugehörigen Leerve-sikeln isoliert und untersucht werden.

Auch hat die Existenz der Magnetosomvesikeln Kirschvink et al. dazu angeregt, eine umfassende und zu Diskussionen stimulierende Hypothese der Biomineralisation zu formulieren, wonach die Evolution die Gene der bakteriellen Magnetitbiomineralisation durch Verdopplung, Mutation, Anpassung und Variation bis zur Knochenbildung nutzt.^[14] Jedoch haben die Arbeiten von Schüler gezeigt, dass bisher alle Gene von Proteinen aus der Magnetosommembran ausschließlich in magnetischen Bakterien vorkommen. Bisher wurden keine Homologe in anderen Organismen gefunden.^[55]

Die Analogie der Coccolithbildung zum Transport von Proteinen durch Endoplasmatisches Reticulum (ER) und Golgi-Apparat zur Exozytose hat in diesem Aufsatz zu der Arbeitshypothese geführt, dass die Magnetosomvesikeln als vielleicht erste intracytoplasmatische Vesikeln in Bakterien die prokaryotischen Vorstufen des Endomembransystems von ER und Golgi-Apparat sein könnten. Die Entstehung der Magnetosommembran ist nicht geklärt, Endozytose steht gegen De-novo-Synthese. Auffällig ist das Fehlen der Endomembranen in frühen Eukaryoten, den Diplomonaden.^[149] Endosymbiotische Ereignisse solcher frühen Protisten mit einem magnetischen Bakterium könnten zur Entstehung der Endomembranen geführt haben.

Die bisher beschriebenen Teile der Biomineralisationsprozesse sind offensichtlich zu kompliziert, um, als Ganzes isoliert, in vitro eingesetzt zu werden. Der Einsatz von Teilen, wie schon durch Polyamine und Silaffine gezeigt (Abschnitt 5), ist für den Chemiker von großem Interesse, aber

erst die methodische Vereinfachung und Modifizierung dieser Substanzen kann neuartige Gebiete öffnen. Als wahrscheinlich Erste nutzten Stone et al.^[150] das polykationische Vorstufenpeptid pR5 des Silaffin-1A₁, das nicht modifiziert ist und bei physiologisch saurem pH-Wert keine Polykieselsäure fällt (aber bei neutralem pH-Wert). Dieses Peptid wurde in ein Gemisch aus einem hydrophilen und einem lipophilen Acrylat durch Photopolymerisation eingefügt, wobei durch ein holographisches Verfahren dem Polymer ein Hologramm mit einer Periodizität von 1.33 μm eingeprägt wurde (Abbildung 28 A, C). Das Peptid wurde offensichtlich in der H₂O-angereicherten Senke fixiert, denn bei langsamer Zugabe von ca. 0.1M [Si(OH)₄] bildete sich eine zweidimensionale Anordnung von Polykieselsäurepartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 452 nm (± 81 nm) in der Periodizität des Hologramms (Abbildung 28 B, D).

In einer faszinierenden Analogie zu den Untersuchungen an Oberflächen von Halbleitern und Metallen^[151] haben Stone et al.^[152] eine kombinatorische Phagen-Bibliothek in die biomimetische Materialwissenschaft eingeführt, um Pep-

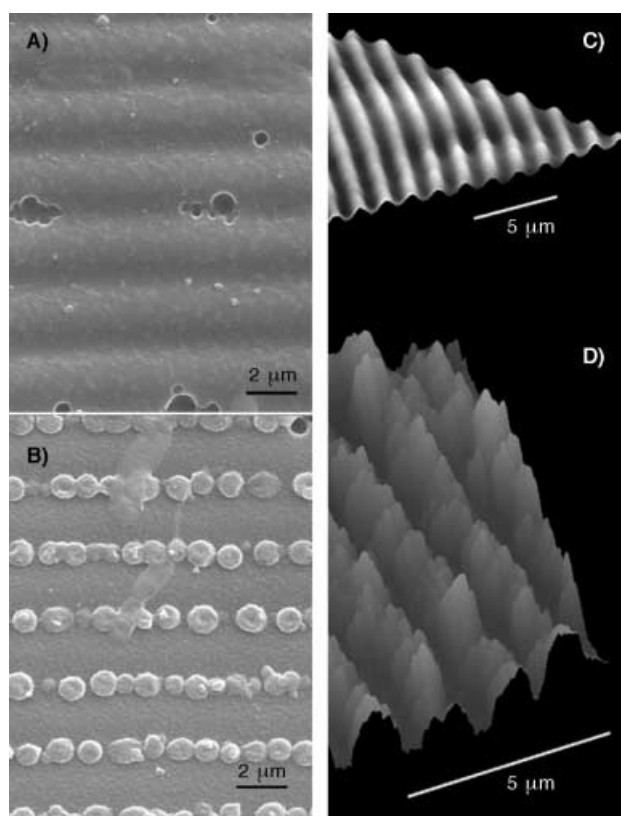


Abbildung 28. Zweidimensionale Anordnung von Reihen aus Polykieselsäure-Nanopartikeln, die in einem Hologramm, einem Gitter, das zuvor durch ein holographisches Verfahren in einem außergewöhnlich klaren und farblosen Polymerisat erzeugt worden war, gebildet wurden: SEM-Aufnahmen A) des Kontrollhologramms, nachdem es mit gelöster Kieselsäure behandelt worden war und B) der Polykieselsäure-Nanostruktur, die durch Reaktion der Polykieselsäure mit dem peptidmodifiziertem Hologramm entstanden ist. C) Kraftmikroskopie (AFM)-Bilder des Kontrollpolymers vor und D) die Hybridstruktur nach der Kiesel-säurebehandlung. (Modifiziert von Lit. [150] mit freundlicher Genehmigung von M. O. Stone).

tide zu entdecken, die Polykieselsäure fällen. So wurden viele Peptide aus zwölf Aminosäuren als Fusionsproteine mit einem Phagenhüllprotein exprimiert. Das Peptid mit der höchsten Ausbeute an sphärischen Partikeln enthielt ein Serin und fünf Histidine. Die Menge Kieselsäure war, wie auch schon bei den Silaffinen (Abbildung 25), proportional der Menge an Peptidphagenpartikeln,^[152] sodass solche Polykieseläurepartikel ein Gemisch aus organischer und anorganischer Substanz sind.

Der zuvor beschriebene Versuch von Stone et al.^[150] unterscheidet sich hiervon und ist zugleich eine neue Methode, sphärische Polykieselsäurepartikel herzustellen. Denn aus dem hydrophilen Teil des Polymers können nur Teile des pR5-Peptides herausragen, die wahrscheinlich die Fällung der Polykieselsäure katalysieren. Die entstehenden Partikel enthalten demnach nur geringe Mengen an organischer Substanz und sind deshalb kein Kompositmaterial. Der Vergleich beider Methoden kann zur Klärung der Frage beitragen, was den Durchmesser der Partikel bestimmt und wie man eine Präparation enger Durchmesservariation erhält. Dies ist im besten Sinne angewandte Chemie.

Addendum

Ein wichtiger Fortschritt auf dem Weg zur Morphogenese biogener Polykieselsäure wurde von M. Sumper et al. beschrieben.^[146c] Ammoniumfluorid wurde anstelle von wasserfreier Fluorwasserstoffsäure eingesetzt, um Silaffine (Abschnitt 5.3.3) unter milden Bedingungen aus den Kieselsäurewänden zu extrahieren. Dabei wurden die nativen Silaffine erhalten, deren Serinreste komplett phosphoryliert sind. In Silaffinmolekülen sind damit nur positive Ladungen durch die Modifizierung mit Polyaminen vorhanden, sondern durch die Phosphorylierungen auch negative Ladungen. Diese Zwitterionen können sich selbst anlagern, wobei sie wahrscheinlich ein Templat bilden, das Kieselsäurefällungen zu großen Einheiten fördert.

Ich danke Dr. Dirk Schüler (Bremen), Prof. Mary E. Marsh (Houston, TX) und Dr. Susan Glasauer zusammen mit Prof. T. J. Beveridge (Guelph, CA), dass sie mir noch kurz vor der Vollendung dieses Aufsatzes die Preprints ihrer Veröffentlichungen zur Verfügung stellten. Kritische Hilfe habe ich durch die Kollegen Prof. Lars-Oliver Essen (Marburg), Prof. Nicolai Petersen (München), Dr. Dirk Schüler (Bremen) und Dr. Michael Winklhofer (Southampton, UK) erhalten, die das Manuskript freundlicherweise durchgesehen haben. Sehr herzlich danke ich Prof. Dieter Oesterhelt, dass er mir in meinem aktiven Ruhestand so lange die Gelegenheit bot, als Gast seiner Abteilung in einzigartiger Ruhe mich diesem Aufsatz und mehr widmen zu können. Der Aufsatz wäre nicht zustande gekommen ohne die unschätzbare Unterstützung meiner Frau Cornelia und meines Sohnes Felix, die beide als Computerspezialisten fast alles möglich machten bis zur Ausgestaltung der vielen Abbildungen.

Eingegangen am 18. Februar 2002 [A519]

- [1] M. R. Walter in *Earths Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution* (Hrsg.: J. W. Schopf), Princeton University Press, Princeton **1983**, S. 187–213.
- [2] a) T. J. Beveridge, in *Metal Ions and Bacteria* (Hrsg.: T. J. Beveridge, R. J. Doyle), Wiley, New York **1989**, S. 1–29; b) F. G. Ferris, W. Shotyk, W. S. Fyfe in *Metal Ions and Bacteria* (Hrsg.: T. J. Beveridge, R. J. Doyle), Wiley, New York **1989**, S. 415–442.
- [3] a) K. Hausmann, B. P. Kremer, *Extremophile, Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*, VCH, Weinheim, **1995**; b) K. O. Stetter, *FEMS Microbiol. Rev.* **1990**, *75*, 117–124.
- [4] a) H. A. Lowenstam, *Science* **1981**, *211*, 1126–1131; b) D. A. Bazylinski, R. B. Frankel in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 25–46; c) B. Devouard, M. Pósfai, X. Hua, D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, P. R. Busek, *Am. Mineral.* **1998**, *83*, 1387–1398; d) K. L. Thomas-Keppta, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, S. J. Clemett, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson, Jr., C. S. Romanek, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 4049–4081.
- [5] a) R. P. Blakemore, *Science* **1975**, *190*, 377–379; b) R. B. Frankel, R. P. Blakemore, R. S. Wolfe, *Science* **1979**, *203*, 1355–1356.
- [6] D. Balkwill, D. Marata, R. P. Blakemore, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 1399–1408.
- [7] a) N. Petersen, T. von Döbeneck, H. Vali, *Nature* **1986**, *320*, 611–615; b) J. F. Stolz, S.-B. R. Chang, J. L. Kirschvink, *Nature* **1986**, *321*, 849–850; c) S.-B. R. Chang, J. L. Kirschvink, *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* **1989**, *17*, 169–195; d) E. I. Friedmann, J. Wierzbos, C. Ascaso, M. Winklhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2176–2181; e) D. Schüler, Dissertation, Technische Universität München, **1994**; f) D. Schüler, E. Baeuerlein in *Transition Metals in Microbial Metabolism* (Hrsg.: G. Winkelmann, C. J. Carrano), Harwood Academic, Amsterdam, **1997**, S. 159–185.
- [8] S. W. F. Grant, *Am. J. Sci.* **1990**, *290A*, 261.
- [9] A. H. Knoll, S. B. Carroll, *Science* **1999**, *284*, 2129.
- [10] F. J. Ayala, A. Rzhetsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 606.
- [11] H. A. Lowenstam, L. Margulis, *Biosystems* **1980**, *12*, 27.
- [12] S. Bengtson, Y. Zhao, *Science* **1992**, *257*, 367.
- [13] K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization*, Academic Press, San Diego, **1989**.
- [14] J. L. Kirschvink, J. W. Hagedorn in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 139–149.
- [15] S. J. Gould, E. S. Vrba, *Paleobiology* **1982**, *8*, 4.
- [16] F. F. Torres de Araujo, M. A. Pires, R. B. Frankel, C. E. M. Bicudo, *Biophys. J.* **1986**, *50*, 375–378.
- [17] S. Mann, N. H. C. Sparks, M. M. Walker, J. L. Kirschvink, *J. Exp. Biol.* **1988**, *140*, 35–49.
- [18] a) M. M. Walker, C. E. Diebel, C. V. Haugh, P. M. Pankhurst, J. C. Montgomery, C. R. Green, *Nature* **1997**, *390*, 371–376; b) C. E. Diebel, R. Proksch, C. R. Green, P. Neilson, M. M. Walker, *Nature* **2000**, *406*, 299–302.
- [19] a) E. Holtkamp-Rötzler, G. Fleissner, M. Hanzlik, N. Petersen, *Ann. Geophys.* **1997**, *15* (Suppl. IC), 117; b) M. Hanzlik, Ch. Heunemann, E. Holtkamp-Rötzler, M. Winklhofer, N. Petersen, G. Fleissner, *BioMetals* **2000**, *13*, 325–331; c) D. Acosta-Avalos, E. Wajnberg, P. S. Oliveira, I. Leal, M. Farina, D. S. Esquivel, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 2687–2692.
- [20] a) J. L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink, B. J. Woodford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7683; b) J. Dobson, P. P. Grassi, *Brain Res. Bull.* **1996**, *39*, 255–259; c) P. P. Schultheiss-Grassi, R. Wessiken, J. Dobson, *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 212–216; d) P. P. Schultheiss-Grassi, J. Dobson, *BioMetals* **1999**, *12*, 67–72.

- [21] T. J. Beveridge, in *Bacteria in Nature* (Hrsg.: J. S. Pointdexter, E. R. Leadbetter), Plenum Press, New York, **1989**, S. 1–65.
- [22] *Allgemeine Mikrobiologie*, (Hrsg.: H. G. Schlegel) 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1992**, S. 14.
- [23] a) F. G. Ferris in *Metal Ions and Bacteria* (Hrsg.: T. J. Beveridge, R. J. Doyle), Wiley, New York, **1989**, S. 295–323; b) D. Fortin, T. J. Beveridge in *Biomining* (Hrsg.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 7–22.
- [24] a) T. J. Beveridge, *Int. Rev. Cytol.* **1981**, 72, S. 229–317; b) W. Baumeister, G. Lembcke, G. Dürr, B. Phipps in *Electron Crystallography of Organic Molecules* (Hrsg.: J. R. Freyer, D. L. Dorset), Kluwer Academic, Dordrecht, **1990**, S. 283–296; c) M. Engelhardt, J. Petres, *J. Struct. Biol.* **1998**, 125, 276–302; d) T. J. Beveridge, P. H. Pouwels, M. Sara, A. Kotiranta, K. Lonnatmaa, K. Kari, E. Kerosuo, M. Haapasalo, E. M. Egelseer, I. Schocher, U. B. Sleytr, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 20, 99–149; e) U. B. Sleytr, P. Messner, D. Plum, M. Sara, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1099–1120; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1035–1054.
- [25] M. Sumper, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 906, 69–79.
- [26] C. J. Daughney, J. B. Fein, N. Yee, *Chem. Geol.* **1998**, 144, 161–176.
- [27] M. M. Urrutia, T. J. Beveridge, *Chem. Geol.* **1994**, 116, 261–280.
- [28] D. Fortin, T. J. Beveridge, *Geomicrobiol. J.* **1997**, 14, 1–21.
- [29] S. Schultze-Lam, G. Harauz, T. J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7971–7981.
- [30] S. Mann in *Biomimetic Materials Chemistry*, VCH, New York **1996**, S. 1–40.
- [31] a) M. Mertig, R. Kirsch, W. Pompe, H. Engelhardt, *Eur. Phys. J. D* **1999**, 9, 45–48; b) S. R. Hall, W. Shenton, H. Engelhardt, S. Mann, *ChemPhysChem.* **2001**, 3, 184–186.
- [32] G. Southam, T. J. Beveridge, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, 58, 4527–4530.
- [33] a) D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 51, 730–750; b) S. Silver, *Ann. Rev. Microbiol.* **1996**, 50, 753–789.
- [34] a) H. E. Jones, P. A. Trudinger, L. A. Chambers, N. A. Pylotiotis, *Z. Allg. Microbiol.* **1976**, 16, 425–435; b) M. Vainshtein, N. Suzina, V. Sorokin, *Syst. Appl. Microbiol.* **1997**, 20, 182–186.
- [35] a) S. Glasauer, S. Langley, T. J. Beveridge, *Science*, **2001**, 295, 117–119; b) U. Schwertmann, R. M. Cornell, *Iron Oxides in the Laboratory*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [36] a) R. B. Frankel, R. B. Blakemore, *Iron Biominerals*, Plenum Press, New York, **1991**; b) S. Mann, R. B. Frankel in *Biomining, Chemical and Biochemical Perspectives* (Hrsg.: S. Mann, J. Webb, R. J. P. Williams), VCH, Weinheim **1989**, S. 389–426.
- [37] S. Spring, R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, H. van Gemerden, N. Petersen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 2397–2403.
- [38] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, B. R. Heywood, S. Mann, J. W. King, P. L. Donaghay, A. K. Hanson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 3232–3239.
- [39] H. Petermann, Berichte Fachbereich Geowissenschaften Univ. Bremen, Nr. 56, Bremen, **1994**; Fahrten M16/2, M20/2, M23/1, M23/2 des Forschungsschiffs Meteor.
- [40] a) M. Farina, H. Lins des Barros, D. M. S. Esquivel, J. Danon, *Biol. Cell.* **1983**, 48, 85–88; b) E. F. De Long, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, *Science* **1993**, 259, 803–806.
- [41] K. H. Schleifer, D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig, M. Köhler, *Syst. Appl. Microbiol.* **1991**, 14, 379–385.
- [42] R. P. Blakemore, D. Maratea, R. Wolfe, *J. Bacteriol.* **1979**, 140, 720–729.
- [43] D. Schüler, S. Spring, D. A. Bazylinski, *Syst. Appl. Microbiol.* **1999**, 22, 466–471.
- [44] C. R. Woese, *Microbiol. Rev.* **1987**, 51, 221–271.
- [45] a) R. Amann, R. Rosello-Mora, D. Schüler in *Biomining* (Hrsg.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 47–59; b) O. Strunk, O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckmann, B. Nonhoff, M. Lenke, A. Ginhart, A. Vilbig, T. Ludwig, A. Bode, K. H. Schleifer, W. Ludwig, <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB>, Department für Mikrobiologie, Technische Universität München, Deutschland, **1999**; c) W. Ludwig, O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, K. H. Schleifer, *Electrophoresis* **1998**, 19, 554–568; d) R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Microbiol. Rev.* **1995**, 59, 143–169.
- [46] D. A. Bazylinski, A. J. Garrett-Reed, R. B. Frankel, *Microsc. Res. Tech.* **1994**, 27, 389–401.
- [47] R. F. Butler, S. K. Banerjee, *J. Geophys. Res.* **1975**, 80, 4049–4058.
- [48] Y. A. Gorby, T. J. Beveridge, R. P. Blakemore, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 834–841.
- [49] D. Schüler, M. Köhler, *Zentralbl. Mikrobiol.* **1992**, 147, 150–151.
- [50] D. Schüler, E. Bäuerlein, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 156–162.
- [51] a) M. Gassmann, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **1996**; b) E. Bäuerlein, D. Schüler, R. Reszka, S. Päuser, DE 19716732 **1997**; E. Bäuerlein, D. Schüler, R. Reszka, S. Päuser, PCT/DE 98/00668 **1998**; E. Bäuerlein, D. Schüler, R. Reszka, S. Päuser, US 6251365 **2001**.
- [52] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomining*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- [53] a) Y. Okuda, K. Denda, Y. Fukumori, *Gene* **1996**, 171, 99–102; b) D. Schüler, E. Bäuerlein, D. A. Bazylinski, *Abstracts of the General Meeting of the ASM*, Miami, USA, **1997**, S. 332.
- [54] D. Schüler, in *Biomining* (Hrsg.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 109–118.
- [55] a) K. Grünberg, C. Waver, B. M. Tebo, D. Schüler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 4573–4582; b) D. Schüler, C. Waver, K. Grünberg, *Jahrestagung der VAAM*, **2001**, Oldenburg, Abstract KSB 11.
- [56] G. L. Blatch, M. Lasse, *Bioassays* **1999**, 21, 932–934.
- [57] Y. Fukumori in *Biomining* (Hrsg.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 93–107.
- [58] I. T. Paulsen, M. H. Saier, *J. Membr. Biol.* **1997**, 156, 99–103.
- [59] O. H. Nies, S. Silver, *J. Ind. Microbiol.* **1995**, 14, 186–199.
- [60] http://www.jgi.doe.gov/temweb/JGI_microbial/html/index.html.
- [61] M. J. Pallen, B. W. Wren, *Mol. Microbiol.* **1997**, 26, 209–221.
- [62] L. Lenz, B. Dere, M. Bevan, *Immunology* **1996**, 5, 63–72.
- [63] D. Schüler, E. Bäuerlein, *Arch. Microbiol.* **1996**, 166, 301–307.
- [64] a) J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26723–26726; b) G. Winkelmann in *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates* (Hrsg.: G. Winkelmann), CRC Press, Boca Raton, **1991**, S. 65–106.
- [65] C. Nakamura, T. Sakaguchi, S. Kudo, I. G. Burgess, K. Sude, T. Matsunaga, *Appl. Biochem Biotechnol.* **1993**, 39/40, 169–171.
- [66] A. Hartmann, V. Braun, *Arch. Microbiol.* **1981**, 130, 353–356.
- [67] a) T. S. Magnuson, A. L. Hodges-Myerson, D. R. Lovely, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 185, 205–211; b) D. R. Lovely, J. D. Coates, D. A. Saffarini, D. J. Lonergan in *Transition Metals in Microbial Metabolism* (Hrsg.: G. Winkelmann, C. J. Carrano), Harwood Academic, Amsterdam, **1997**, S. 187–215; c) S. A. B. Knight, E. Lesuisse, R. Stearman, R. D. Klausner, A. Dencis, *Microbiology* **2000**, 148, 29–40; d) M. Fontecave, J. Covès, J. L. Pierre, *BioMetals* **1994**, 7, 3–8; e) L. C. Paoletti, R. P. Blakemore, *Curr. Microbiol.* **1998**, 17, 339–342.
- [68] a) Y. Noguchi, T. Fujiwara, K. Yoshimatsu, Y. Fukumori, *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 2142–2147; b) M. Abe, Y. Tamaura, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1983**, 22, L511; c) T. Yamazaki, H. Oyanagi, T. Fujiwara, Y. Fukumori, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 665–671.

- [69] a) D. Schüler, R. Uhl, E. Baeuerlein, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *132*, 139–145; b) E. Baeuerlein in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 61–79.
- [70] D. Grimm, A. J. Koster, U. Ziese, D. Typke, W. Baumeister, *J. Microsc.* **1996**, *183*, 60–68.
- [71] R. P. Blakemore, N. A. Blakemore in *Iron Biominerals* (Hrsg.: R. Frankel, R. P. Blakemore), Plenum Press, New York, **1991**, S. 51–67.
- [72] R. E. Dunin-Borkowski, M. R. McCartney, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. Pósfai, P. R. Busek, *Science* **1998**, *282*, 1868–1870.
- [73] a) D. A. Bazylinski, R. B. Frankel in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 36–37; b) R. B. Frankel, D. Bazylinski, M. S. Johnson, B. L. Taylor, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 994–1000.
- [74] R. Wiltschko, W. Wiltschko, *Magnetic orientation in animals, Zoophysiology*, Vol. 33, Springer, Berlin, **1995**.
- [75] J. C. Weaver, T. E. Vaughan, D. Astumian, *Nature* **2000**, *405*, 707–709.
- [76] a) V. P. Shcherbakov, M. Winklhofer, *Eur. Biophys. J.* **1999**, *28*, 380–392; b) M. Winklhofer, *Modelle hypothetischer Magnetfeldrezeptoren auf der Grundlage biogenen Magnetits*, M. Leidorf GmbH, Rahden, **1999**; c) M. Winklhofer, E. Holtkamp-Rötzler, M. Hanslik, G. Fleissner, N. Petersen, *Eur. J. Mineral.* **2001**, *13*, 659–669.
- [77] a) J. C. Green, K. Perch-Nielsen, P. Westbroek in *Handbook of Protoctista* (Hrsg.: L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman), Jones & Bartlett, Boston, **1990**, S. 293–317; b) C. van den Hoek, H. M. Jahns, D. G. Mann, *Algen*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1993**, S. 167–179.
- [78] a) H. Trappan, *Paleobiology in Plant Protists*, Freeman, San Francisco, **1980**; b) A. S. Jafar, *Neues Jahrb. Geol. Palaeontol., Abh.*, **1983**, *166*, 218–258.
- [79] a) P. R. Brown, *Calcareous Nanofossils Biostratigraphy*, British Micropaleontology Society Series, Chapman & Hall, London, **1998**; b) L. Cros, A. Kleijne, A. Zeltner, C. Billiard, J. R. Young, *Mar. Micropaleontol.* **2000**, *39*, 1–34; c) J. R. Young, S. A. Davis, P. R. Brown, S. Mann, *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 195–215.
- [80] J. D. Rowson, B. S. C. Leadbeater, J. C. Green, *Br. Phycol. J.* **1986**, *21*, 359–370.
- [81] a) M. E. Marsh in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 251–268; b) M. E. Marsh, *Protoplasma* **1999**, *207*, 54–66; c) I. R. Young, I. M. Didymus, P. R. Brown, N. Prins, S. Mann, *Nature* **1992**, *356*, 516–518; d) P. van der Wal, E. W. de Jong, P. Westbrock, W. C. de Bruijn, A. A. Hulder-Stapel, *J. Ultrastruct. Res.* **1983**, *85*, 139–158.
- [82] a) E. L. Gonzalez, in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 269–282; b) Y. Araki, PhD thesis, University of California, Los Angeles, **1997**.
- [83] M. E. Marsh, D. P. Dickinson, *Protoplasma* **1997**, *199*, 9–17.
- [84] a) M. E. Finbow, M. A. Harrison, *Biochem. J.* **1997**, *324*, 697–712; b) N. Nelson, *Organellar Proton-ATPases*, Springer, Heidelberg, **1995**.
- [85] J. M. Ward, A. Reinders, H.-T. Hsu, H. Sze, *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 161–169.
- [86] P. L. A. M. Corstjens, Y. Araki, E. L. Gonzales, *J. Phycol.* **2001**, *37*, 71–78.
- [87] a) Y. Araki, E. L. Gonzalez, *J. Phycol.* **1998**, *34*, 79–88; b) D.-K. Kwon, E. L. Gonzalez, *J. Phycol.* **1994**, *30*, 689–695.
- [88] A. A. Israel, E. L. Gonzalez, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1996**, *137*, 243–250.
- [89] M. E. Marsh, *Protoplasma* **1994**, *177*, 108–122.
- [90] a) M. E. Marsh, D. K. Chang, G. C. King, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20507–20512; b) P. van der Wal, E. W. de Jong, P. Westbrock, W. C. de Bruijn, in *Environmental Biogeochemistry*, Vol. 35 (Hrsg.: R. Hallberg), Swedish Research Council, Stockholm, **1983**, S. 251–258.
- [91] a) S. L. Lee, A. Veis, T. Gloneck, *Biochemistry* **1977**, *16*, 2971–2979; b) W. G. Stetler-Stevenson, A. Veis, *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *40*, 97–102.
- [92] M. E. Marsh, R. L. Sass, *J. Exp. Zool.* **1983**, *226*, 193–203.
- [93] M. T. Dimuzo, A. A. Veis, *Calcif. Tissue Res.* **1978**, *25*, 169–178.
- [94] M. E. Marsh, *Biochemistry* **1989**, *28*, 339–345.
- [95] a) H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9657–9660; b) B. L. Smith, T. Schäffer, M. Viani, J. B. Thompson, N. A. Frederick, J. Kindt, A. M. Belcher, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nature* **1999**, *399*, 761–763; c) M. Kono, N. Hayashi, T. Samata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *269*, 213–218; d) A. M. Belcher, E. E. Gooch in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 221–249; e) K. Mann, I. M. Weiss, S. André, H.-J. Gabius, M. Fritz, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5257–5264; f) I. M. Weiss, W. Göring, M. Fritz, K. Mann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 244–249.
- [96] M. E. Marsh, A. L. Ridall, P. Azadi, P. J. Duke, *J. Struct. Biol.* **2003**, *139*, 39–45.
- [97] M. E. Marsh, *Protoplasma* **1996**, *190*, 181–188.
- [98] a) C. van den Hoek, D. G. Mann, H. M. Jahns, *Algae*, Cambridge University Press, Cambridge, **1998**; b) F. E. Round, R. M. Crawford in *Handbook of Protoctista* (Hrsg.: L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman), Jones & Bartlett, Boston, **1990**, S. 574–596.
- [99] a) R. Tacke, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3197–3200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3015–3018; b) P. Tréguer, D. M. Nelson, A. J. van Bennekom, D. J. DeMaster, A. Leynaert, B. Quéguiner, *Science* **1995**, *268*, 375–379.
- [100] a) L. K. Medlin, W. H. C. F. Kooistra, R. Gersonde, P. A. Sims, U. Welbrock, *Nova Hedwigia* **1997**, *65*, 1–11; b) W. H. C. F. Kooistra, L. K. Medlin, *Mol. Phylogenet. Evol.* **1996**, *6*, 391–407.
- [101] A. Rothpletz, *Z. Dtsch. Geol. Ges.* **1986**, *48*, 854–914.
- [102] a) D. H. Erwin, *Rev. Ecol. Syst.* **1990**, *21*, 69–91; b) D. H. Erwin, *Nature* **1994**, *367*, 231–236; c) P. R. Renne, Z. Zichao, M. A. Richards, M. T. Black, A. R. Basu, *Science* **1995**, *269*, 1413–1416; d) G. J. Retallack, *Science* **1995**, *267*, 77–80.
- [103] M. Hildebrand, D. R. Higgins, K. Busser, B. E. Volcani, *Gene* **1993**, *132*, 213–218.
- [104] N. Kröger, C. Bergsdorf, M. Sumper, *EMBO J.* **1994**, *13*, 4676–4683.
- [105] a) J. D. Pickett-Heaps, A.-M. M. Schmid, L. A. Edgar in *Progress in Phycological Research*, Vol. 7 (Hrsg.: F. E. Round, D. J. Chapman), Biopress, Bristol, **1990**, S. 2–168; b) N. Kröger, M. Sumper, *Protist* **1998**, *149*, 213–219; c) R. Wetherbee, S. Crawford, P. Mulvaney in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 189–206.
- [106] A. S. Crawford, J. M. Higgins, P. Mulvaney, R. Wetherbee, *J. Phycol.* **2001**, *37*, 543–554.
- [107] C. van den Hoek, D. G. Mann, H. M. Jahns, *Algen*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1993**, S. 115.
- [108] L. A. Edgar, J. D. Pickett-Heaps in *Progress in Phycological Research*, Vol. 3, Biopress, Bristol, **1984**, S. 47–88.
- [109] N. Kröger, M. Sumper in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 151–170.
- [110] R. W. Drum, H. S. Pankratz, *J. Ultrastruct. Res.* **1964**, *10*, 217–223.
- [111] a) M. Hildebrand, B. E. Volcani, W. Gassmann, J. I. Schröder, *Nature* **1997**, *385*, 688–689; b) M. Hildebrand, K. Dahlin, B. E. Volcani, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, *260*, 480–486.
- [112] a) M. Hildebrand in *Biomineralization* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 171–188; b) H. L. Conway,

- P. J. Harrison, C. O. Davies, *Mar. Biol.* **1976**, 35, 187–199; c) H. L. Conway, P. J. Harrison, *Mar. Biol.* **1977**, 43, 33–43.
- [113] M. A. Brzezinski, R. J. Olson, S. W. Chisholm, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1990**, 67, 83–96.
- [114] V. Martin-Jezequel, M. Hildebrand, M. A. Brzezinski, *J. Phycol.* **2000**, 36, 821–840.
- [115] C. W. Sullivan, *J. Phycol.* **1977**, 13, 86–91.
- [116] a) J. Reizer, A. Reizer, M. J. Saier, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1197, 133–166; b) Y. Deguchi, I. Yamoto, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 21704–21708.
- [117] a) T. Caspari, R. Stadler, N. Sauer, W. Tanner, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3498–3502; b) A. D. Due, Q. Zhinchao, J. M. Thomas, A. Buchs, A. C. Powers, J. M. May, *Biochemistry* **1995**, 34, 5462–5471; c) H. Katagiri, T. Asano, H. Ishihara, K. Tsukuda, J.-L. Lin, K. Inukai, M. Kikuchi, Y. Yazaki, Y. Oka, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 22550–22555.
- [118] C. W. Sullivan, *J. Phycol.* **1979**, 15, 210–216.
- [119] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, Wiley, New York, **1979**.
- [120] a) D. Werner, *Arch. Microbiol.* **1966**, 55, 278–308; b) F. Azam, B. B. Hemmingsen, B. E. Volcani, *Arch. Microbiol.* **1974**, 97, 103–114.
- [121] P. Bhattacharyya, B. E. Volcani, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 114, 365–372.
- [122] H. Drechsel, G. Winkelmann in *Transition Metals in Microbial Metabolism* (Hrsg.: G. Winkelmann, C. J. Carrano), Harwood Academic, Amsterdam, **1997**, S. 1–51.
- [123] A.-M. Schmid, D. Schulz, *Protoplasma* **1979**, 100, 267–288.
- [124] M. Lee, C.-W. Li, *Bot. Bull. Acad. Sin.* **1992**, 33, 317–325.
- [125] J. D. Pickett-Heaps, A. M. Schmid, L. A. Edgar in *Progress in Phycological Research, Vol. 7*, Biopress, Bristol, **1990**, S. 127–133.
- [126] a) C.-W. Li, B. E. Volcani, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **1984**, 304, 519–528; b) C.-W. Li, B. E. Volcani, *Protoplasma* **1985**, 124, 10–29; c) D. Schulz, G. Drebes, H. Lehmann, R. Jank-Ladwig, *Eur. J. Cell. Biol.* **1984**, 33, 43–51.
- [127] C. W. Mehard, B. E. Volcani, *Cell Tissue Res.* **1976**, 166, 255–263.
- [128] a) B. E. F. Reimann, J. C. Lewin, B. E. Volcani, *J. Phycol.* **1966**, 2, 74–84; b) A. M. Schmid, M. A. Borowitzka, B. E. Volcani in *Cytomorphogenesis in Plants* (Hrsg.: O. Kiermayer), *Cell. Biol. Mon.* **1981**, 8, 63–97; c) R. M. Crawford, A. M. Schmid in *Biomining in Lower Plants and Animals* (Hrsg.: B. S. C. Leadbeater, R. Riding), The Systematics Association special volume **1986**, 30, 291–314.
- [129] E. Schnepf, G. Deichgräber, G. Drebes, *Plant Syst. Evol.* **1980**, 135, 265–277.
- [130] a) B. E. F. Reimann, *Exp. Cell Res.* **1964**, 34, 605–608; b) E. F. Stoermer, H. S. Pankratz, C. C. Bowen, *Am. J. Bot.* **1965**, 52, 1067–1078; c) J. Coombs, I. A. Lauritis, W. M. Darly, B. E. Volcani, *Z. Pflanzenphysiol.* **1968**, 59, 124–152; d) P. A. Dawson, *J. Phycol.* **1973**, 9, 353–365.
- [131] a) C. W. Li, S. Chu, M. Lee, *Protoplasma* **1989**, 151, 158–163; b) M. A. Brzezinski, D. J. Conley, *J. Phycol.* **1994**, 30, 45–55; c) E. G. Vrieling, W. W. C. Gieskes, T. P. M. Beelen, *J. Phycol.* **1999**, 35, 548–559.
- [132] N. Kröger, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 259–264.
- [133] a) N. Kröger, G. Lehmann, R. Rachel, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 99–105; b) N. Kröger, R. Wetherbee, *Protist* **2000**, 151, 263–273.
- [134] a) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, 286, 1129–1132; b) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 26066–26070.
- [135] a) N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14133–14138; b) D. R. Morris, L. J. Marton, *Polyamines in Biology and Medicine*, Dekker, New York, **1981**.
- [136] T. Nakajima, B. E. Volcani, *Biochem. Biophys. Commun.* **1970**, 39, 28–33.
- [137] H. Schägger, G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 368–379.
- [138] A. M. M. Schmid, B. E. Volcani, *J. Phycol.* **1983**, 19, 387–402.
- [139] T. F. Schultz, L. Egerton-Warburton, S. Crawford, R. Wetherbee, *Protist* **2001**, 152, 315–327.
- [140] a) C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, 359, 710–712; b) S. Mann, G. A. Ozin, *Nature* **1996**, 382, 313–318; c) H. P. Lin, C. H. Mou, *Science* **1996**, 273, 765–767; d) H. Yang, N. Coombs, G. A. Ozin, *Nature* **1997**, 386, 692–695.
- [141] a) S. S. Kim, W. Z. Zhang, T. J. Pinnavia, *Science* **1998**, 282, 1302–1305; b) P. T. Tauer, T. J. Pinnavia, *Science* **1996**, 271, 1267–1269.
- [142] a) F. Caruso, R. A. Caruso, H. Möhwald, *Science* **1998**, 282, 1111–1114; b) B. T. Holland, C. F. Blanford, T. Do, A. Stein, *Chem. Mater.* **1999**, 11, 795–805.
- [143] a) J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, T. J. Demning, *Nature* **2000**, 403, 289–292; b) C. Göltner, S. Henke, M. C. Weißenberger, M. Antonietti, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 633–636; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 613–616; c) D. Y. Zhao, J. J. Feng, Q. S. Huo, N. Melosh, G. H. Frederickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, 279, 548–552; d) M. Templin, A. Frank, A. DuChesne, H. Leist, Y. M. Zhang, R. Ulrich, V. Schädler, U. Wiesner, *Science* **1997**, 278, 1795–1798.
- [144] a) P. Schmidt-Winkel, W. W. Lukens, Jr., P. Yang, D. I. Margolese, I. S. Lettow, J. Y. Ying, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 686–696; b) S. Schacht, Q. Huo, I. G. Voigt-Martin, G. D. Stucky, F. Schüth, *Science* **1996**, 273, 768–771; c) A. Imhof, D. J. Pine, *Nature* **1997**, 389, 948–951.
- [145] a) E. G. Vrieling, T. P. M. Beelen, R. A. van Santen, W. W. C. Gieskes, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1613–1616; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1543–1546; b) A. R. Hemsley, P. C. Griffith, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* **2000**, 358, 547–564; c) R. Gordon, R. W. Drum, *Int. Rev. Cytol.* **1994**, 150, 243–372; d) J. Parkinson, Y. Brechet, R. Gordon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1452, 89–102; e) A. M. M. Schmid, *Protoplasma* **1994**, 181, 43–60; f) A. M. M. Schmid, R. K. Eberwein, M. Hesse, *Protoplasma* **1996**, 193, 144–173.
- [146] a) M. Sumper, *Science* **2002**, 295, 2430–2433; b) D. Volkmer, S. Tugulu, M. Fricke, T. Nielsen, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 60–64; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 115, 58–61; c) N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper, *Science* **2002**, 298, 584–586.
- [147] a) A. van Blaaderen, R. Ruel, P. Wiltzins, *Nature* **1997**, 385, 321–324; b) A. McPherson, *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**.
- [148] a) E. Epstein, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, 50, 641–644; b) A. J. Milligan, F. M. M. Morel, *Science* **2002**, 297, 1848–1850.
- [149] R. D. Adam, *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 447–475.
- [150] L. L. Brott, R. R. Naik, D. J. Pikas, S. M. Kirkpatrick, D. W. Tomlin, P. W. Whitlock, S. J. Clarkson, M. O. Stone, *Nature* **2001**, 413, 291–293.
- [151] a) S. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 269–274; b) S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, 405, 665–668.
- [152] R. R. Naik, L. L. Brott, S. J. Clarkson, M. O. Stone, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2002**, 2, 95–100.