

Silicatein

Von evolutionär uralten Schwammge- nen zu biotechnologischen Materialien

MATTHIAS WIENS, WERNER E. G. MÜLLER

INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES-
GUTTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Conventional synthetic methodologies mostly bar access to the fabrication of innovative silica- or metal oxide-based materials with an expanded property spectrum. However, nature represents an inexhaustible source of inspiration for the synthesis of multifunctional materials with tailored attributes. Particularly the low-energy catalytic pathways of poriferan biosilicification, with the enzyme silicatein at their heart, have been inspiring recent biotechnological approaches.

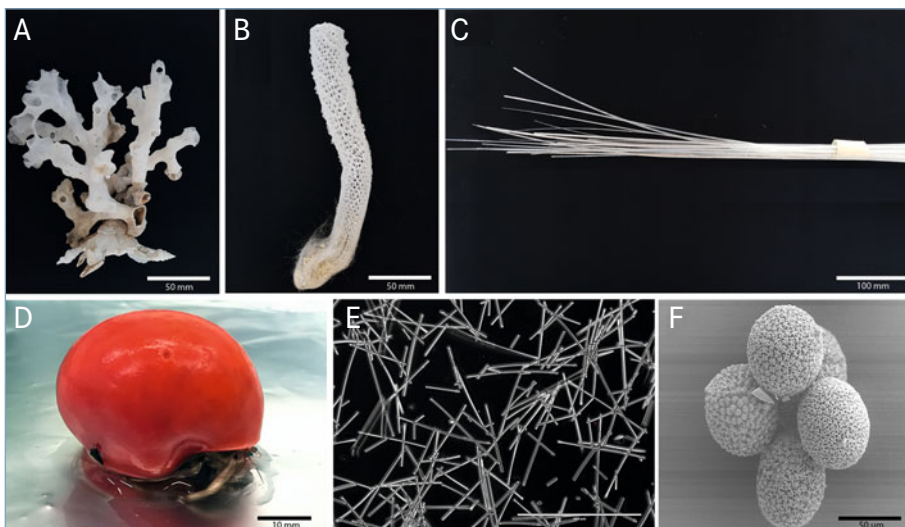
DOI: 10.1007/s12268-021-1619-z
© Die Autoren 2021

Die Herstellung multifunktionaler Materialien auf der Basis von Siliziumdioxid (SiO_2) ist im Rahmen konventioneller Produktionstechniken kostenintensiv und verläuft gewöhnlich unter extremen Produktionsbedingungen. Umso verblüffender sind die Hornkiesel- und Glasschwämme (Tierstamm Porifera), die über ein Skelett aus biogenem Glas (Biosilica) verfügen. Über

Jahrtausenden der Evolution haben Schwämme die im Tierreich einzigartige Fähigkeit entwickelt, enzymkatalysiert und unter milden Bedingungen hydratisiertes Silica zu bilden. Die resultierenden Nanopartikel werden von den Schwämmen zu vielschichtigen, hierarchisch-strukturierten Skelettelementen (Glasnadeln, Spicula) assembliert. Ausgewachsene Spicula haben eine genetisch

festgelegte Morphologie und sind nicht immer, wie der Name vermuten lässt, nadelförmig. Ihre Länge liegt je nach Schwammart im Bereich von Mikrometern bis zu Metern, bei einem bis zu strohhalm-dicken Durchmesser (Abb. 1). Das biogene Glas (Biosilica), aus dem die Spicula bestehen, ist ein bioorganisch-anorganisches Hybridmaterial aus amorphem SiO_2 und Proteinen. Es sind dessen vielfältige Eigenschaften, die für Materialforscher so interessant sind. Beispielsweise sind sie außerordentlich flexibel und können fast verknottet werden, bevor sie bersten [1]. Außerdem verfügen Spicula über vorzügliche lichtleitende Eigenschaften, vergleichbar mit denen industrieller Glasfasern [2]. Schließlich fördert Biosilica die Mineralisationsaktivität knochenbildender Zellen des menschlichen Körpers und kann so zur Regeneration von Knochendefekten beitragen [3]. Neben den vielfältigen Materialeigenschaften des Biosilica ist auch seine enzymbasierte Synthese unter physiologischen Bedingungen sehr attraktiv. In Schwämmen beginnt diese Synthese intrazellulär mit der Bildung eines Proteinfilaments, das aus dem Enzym Silicatein und dem Gerüstprotein Silintaphin besteht [4, 5]. Silicatein katalysiert die Polykondensation von Kieselsäure zu Biosilica-Nanopartikeln, die sich konzentrisch um das Proteinfilament anordnen. Jeweils alternierende Schichten aus Silicatein/Silintaphin und Biosilica vermitteln dann das Dickenwachstum der Spicula, die ab einer bestimmten Größe in den extrazellulären Raum entlassen werden. Die resultierenden Glas-skelette der Schwämme sind im Tierreich genauso einzigartig wie ihre enzymkatalysierte Bildung.

Mit der erfolgreichen Herstellung von rekombinantem Silicatein in gentechnisch veränderten Bakterien wurde die Entwicklung neuartiger Hybridmaterialien (Werkstoffe aus mehreren Komponenten unterschiedlicher Eigenschaften) möglich. Unterstützt wurde diese Entwicklung durch molekularbiologische Modifikationen des Enzyms mit Protein-Tags. Solch angefügte Affinitätssequenzen erlauben die Immobilisierung des



▲ **Abb. 1:** Skelette und Spicula der Glasschwämme. **A**, *Farrea* sp. **B**, *Euplectella aspergillum*. **C**, *Monorhaphis chuni*. **D**, Während die Schwammarten A–C Bewohner der Tiefsee sind, lebt *Suberites domuncula* (Einsiedlerschwamm) in flachen Gewässern. **E**, **F**, Mikroskalige Glasnadeln der Hornkieselschwämme *S. domuncula* (**E**) und *Geodia cydonium* (**F**) verdeutlichen die Vielfalt filigraner Glasstrukturen der Schwämme.

rekombinanten Silicateins auf Oberflächen, ohne einen etwaigen Verlust seiner Funktionalität. So konnten, vermittelt durch die katalytische Aktivität des immobilisierten Enzyms, Oberflächen mit Biosilica beschichtet werden, wodurch Materialien neuartige Funktionalitäten erhielten. Überraschend war die Entdeckung, dass Silicatein auch Substrate umsetzt, die nicht im Lebensraum eines Schwamms vorkommen. So ist das Enzym in der Lage, verschiedene Präkursoren zu nicht biologischen Oxiden umzusetzen, z. B. Titandioxid (TiO_2) [6].

Mikrokontaktdruck und Selbstassemblierung rekombinanter Schwammproteine

Der Transfer von Molekülen durch das lithographische Verfahren des Mikrokontaktdrucks ist ein häufiges Verfahren zur Modifizierung und Strukturierung von Oberflächen. Hierfür werden Stempel aus elastischem Polymer und mit mikrostrukturierter Oberfläche eingesetzt. Nach ihrem Beladen

mit den zu transferierenden Molekülen („Tinte“) werden die Stempel auf der Zieloberfläche plaziert. Damit das aufgedruckte Muster beständig ist, müssen die Moleküle der Tinte schnell und fest an die Oberfläche binden. Sollen auf diese Weise Enzyme auf eine Oberfläche gedruckt werden, muss zusätzlich gewährleistet sein, dass deren katalytische Aktivität infolge der Oberflächenimmobilisierung nicht verlorengeht.

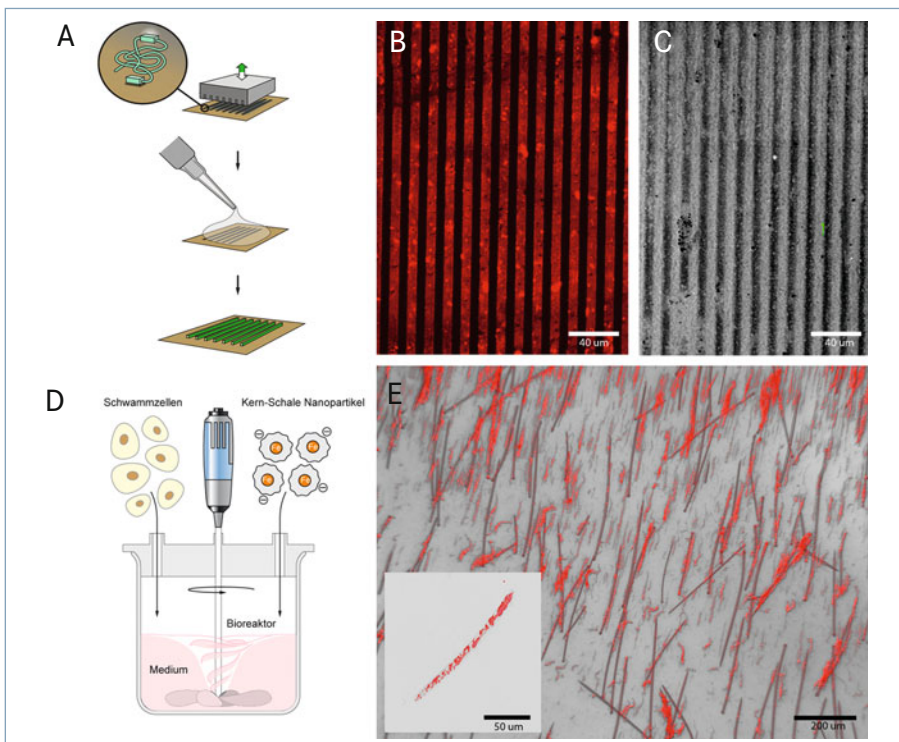
Für eine Anwendung im Mikrokontaktdruckverfahren wurde rekombinantes Silicatein hergestellt, das im Vergleich zum Wildtyp einen terminalen Protein-Tag trug. Dieser bestand aus Aminosäureresten mit hoher Bindungsaffinität zu Goldoberflächen. Nach dem Mikrokontaktdruck mit dem getaggen Silicatein wurde die bedruckte Oberfläche mit einem TiO_2 -Präkursor inkubiert. Durch die katalytische Aktivität des Silicateins entstanden daraus innerhalb kurzer Zeit überall dort Mikrostrukturen aus TiO_2 , wo sich das aufgedruckte Silicatein befand (**Abb. 2 A–C**). TiO_2 ist ein Halbleiter und Photokatalysator,

der in der Lage ist, bei Lichtbestrahlung organische Materialien zu zersetzen. Diese Eigenschaft wird z. B. für die Selbstreinigung von TiO_2 -beschichteten Oberflächen oder auch zur Luftreinigung genutzt. Die photokatalytische Wirksamkeit der infolge des Mikrokontaktdrucks mit Silicatein erhaltenen TiO_2 -Mikrostrukturen wurde durch den Abbau eines gelösten Farbstoffs, der beispielsweise die Verschmutzung von Wasser simulierte, bestätigt [7].

Durch den Mikrokontaktdruck des Silicateins wurde die zukünftige Struktur des Photokatalysators zwar schnell und zuverlässig bestimmt, allerdings nur in Form einer zweidimensionalen Oberflächenbeschichtung. Inspiriert von den biologischen Vorgängen der Spiculabildung wurde daher ein alternativer Ansatz entwickelt, der die Bildung dreidimensionaler Strukturen mit photokatalytischer Aktivität erlaubte. In diesem Ansatz wurde der Prozess der Selbstassemblierung genutzt, um analog der biologischen Bildung der Axialfilamente aus Silicatein und Silintaphin

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Strategien zur Herstellung neuartiger biotechnologischer Materialien. Mikrokontakt-druck von getaggttem Silicatein auf eine Goldoberfläche und anschließende Bildung von TiO_2 -Mikroleisten. **A**, Prozessschema. **B**, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme des gedruckten Silicateins. **C**, elektronenmikroskopische Aufnahme des mikrostrukturierten TiO_2 -Photokatalysators. **D**, Kultivierung von Primmorphen im Bioreaktor in Anwesenheit von fluoreszierenden, magnetischen Kern-Schale-Nanopartikeln. **E**, Aus Primmorphen extrahierte, fluoreszierende Spicula, die sich im Magnetfeld ausrichten.

filamentöse Templates für den Photokatalysator zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein neuer Protein-Tag mit Bindungsaffinität zu TiO_2 entwickelt. Nach der Selbstassemblierung von getaggttem Silicatein und Silintaphin wurden die resultierenden Proteinfilamente wieder mit dem TiO_2 -Präkursor inkubiert. Die anschließend durch die enzymatische Aktivität des Silicatein *in situ* gebildeten Nanopartikel blieben an der Oberfläche der Filamente haften. Wie auch im vorherigen Mikrokontakt-druckverfahren bestätigte der abschließende Abbau eines Farbstoffs die photokatalytische Wirksamkeit der Beschichtung [8].

Sowohl Mikrokontakt-druck als auch Selbstassemblierung von Silicatein und Silintaphin sind also Möglichkeiten, enzymatisch aktive Mikrotemplates zu entwickeln. Durch die biokatalytische Aktivität des getaggtten Silicateins können dann die gebildeten Nanopartikel immobilisiert werden. So lassen sich unter milden Bedingungen beschichtete bioorganisch-anorganische Hybridmaterialien mit einer neuartigen Kombination von Eigenschaften herstellen. Diese Materialien könnten z. B. als Bauele-

mente im Bereich der Optoelektronik oder Biosensorik eingesetzt werden.

Einsatz von Schwammzellen für die Entwicklung neuartiger Hybridmaterialien

Rekombinante Schwammproteine sind fundamental für die Entwicklung und *in vitro*-Fabrikation neuer Materialien unter milden Bedingungen. Die Morphologie der Materialien ist dabei zwangsläufig durch die Kombination einzelner Proteine auf eine zweidimensionale Beschichtung von Oberflächen bzw. auf dreidimensionale filamentöse Templates beschränkt (s. o.). In einem kürzlich entwickelten Ansatz wurden die in Schwämmen natürlicherweise vorkommenden Synthesewege der Spiculabildung mit nicht-biogenen, nanoskaligen Bausteinen kombiniert, um wachsenden Spicula *in vivo* neue Funktionalitäten zu verleihen [9]. Der Hintergrund dieses Ansatzes der synthetischen Biologie war, dass Schwämme nicht nur dazu neigen, fremdes Material (z. B. Sandkörner) in ihrer extrazellulären Matrix zu deponieren, um so ihre Skelettstruktur zu verstärken

[10]. Sie können auch nicht-biogene Partikel in ihre Zellen aufnehmen [11]. Unbekannt war allerdings, ob fremdes Material während der Spiculabildung in die wachsenden Nadeln eingebaut werden kann. Daher wurden Schwammzellen in einem Bioreaktor in Anwesenheit von Kern-Schale-Nanopartikeln kultiviert. Da bis heute keine immortalisierte Schwammzelllinie etabliert werden konnte, wurden hierfür Primmorphen eingesetzt: Bei dieser besonderen Form der 3D-Zellkultur entstehen kugelige Zellaggregate durch den Zusammenschluss dissoziierter Primärzellen. Das Ergebnis dieser Selbstorganisation enthält proliferierende und differenzierte Schwammzellen mit der Fähigkeit zur Spiculabildung. In einem Bioreaktor wurde daher dem Kulturmedium während der Primormorphbildung Kern-Schale-Nanopartikel zugesetzt. Diese bestanden aus einem Magnetkern, einer umgebenden Schicht eines Fluorophors und einer negativ geladenen Polysaccharidhülle. Innerhalb kurzer Zeit wurden die Partikel durch die Schwammzellen effektiv aufgenommen und lagerten sich dann mit zunehmender Inkubationszeit an die Oberflächen wachsender Spicula an. Hier bildeten sie schließlich eine stabile, multifunktionale Beschichtung, die dazu führte, dass die aus den Zellen extrahierten Spicula fluoreszierten und sich im Magnetfeld ausrichteten (**Abb. 2 D, E**). Diese Studie hat beispielhaft gezeigt, dass in lebenden Schwammzellen wachsende Spicula als Template für die Synthese von bioorganisch-anorganischen Hybridmaterialien mit neuartigen Oberflächenfunktionalitäten genutzt werden können.

Danksagung

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Europäischen Forschungsrat ERC für ihre Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Wang X, Schloßmacher U, Jochum KP et al. (2010) Silica-protein composite layers of the giant basal spicules from *Monorhaphis*: Basis for their mechanical stability. *Pure Appl Chem* 82: 175–192
- [2] Aizenberg J, Sundar VC, Yablon AD et al. (2004) Biological glass fibers: correlation between optical and structural properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3358–3363
- [3] Wiens M, Wang X, Schroeder HC et al. (2010) The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 31: 7716–7725
- [4] Shimizu K, Cha J, Stucky GD et al. (1998) Silicatein: Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6234–6238
- [5] Wiens M, Bausen M, Natalio F et al. (2009) The role of the silicatein-alpha interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials* 30: 1648–1656

[6] Brutchey RL, Morse DE (2008) Silicatein and the translation of its molecular mechanism of biosilicification into low temperature nanomaterial synthesis. *Chem Rev* 108: 4915–4934

[7] Wiens M, Link T, Elkhooly TA et al. (2012) Formation of a micropatterned titania photocatalyst by microcontact printed silicatein on gold surfaces. *Chem Commun* 48: 11331

[8] Gardères J, Elkhooly TA, Link T et al. (2016) Self-assembly and photocatalytic activity of branched silicatein/silintaphin filaments decorated with silicatein-synthesized TiO₂ nanoparticles. *Bioprocess Biosyst Eng* 39: 1477–1486

[9] Markl JS, Müller WEG, Sereno D et al. (2020) A synthetic biology approach for the fabrication of functional (fluorescent magnetic) bioorganic–inorganic hybrid materials in sponge primmorphs. *Biotechnol Bioeng* 117: 1789–1804

[10] Bavestrello G, Benatti U, Cattaneo-Vietti R et al. (2003) Sponge cell reactivity to various forms of silica. *Microsc Res Tech* 62: 327–335

[11] Funayama N, Nakatsukasa M, Hayashi T et al. (2005) Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, Ef annexin. *Dev Growth Differ* 47: 243–253

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Matthias Wiens
Institut für Physiologische Chemie
Universitätsmedizin der Johannes
Gutenberg-Universität
Duesbergweg 6
D-55128 Mainz
wiens@uni-mainz.de

AUTOREN



Matthias Wiens

Jahrgang 1969. 1997–2002 Diplom und anschließende Promotion im Fach Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Seit 2002 Projektleiter und Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin Mainz.



Werner E. G. Müller

Professor an der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Seine Arbeiten fokussieren sich auf Prozesse an der Schnittstelle zwischen Molekularbiologie, Biochemie und Tissue Engineering. Mit dem ERC Advanced Investigator Grant und Bundesverdienstkreuz 1. Klasse ausgezeichnet.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer