



Игорь Эдуардович Памирский – к.б.н., с.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки. Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Благовещенск
Igor E. Pamirsky – PhD, Senior Scientist, Institute of Geology and Nature Management FEB RAS, Blagoveshensk



Кирилл Сергеевич Голохваст – к.б.н., доцент кафедры нефтегазового дела и нефтехимии, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток; ВФ ДНЦ ФПД СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения
Kirill S. Golokhvast – PhD, Associate Professor, Department of Oil and Gas Deal, Engineering School, Far Eastern Federal University; Researcher of Laboratory of Medical Tcology, Institute of Medical Climatology and Rehabilitation SB RAMS

УДК 573.3+577.22

СИЛАФФИНЫ – МАТРИЧНЫЕ БЕЛКИ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ ДИАТОМОВЫХ

SILAFFINS – MATRIX PROTEINS OF BIOMINERALIZATION OF DIATOMS

Данный обзор посвящен силаффинам, недавно открытым матричным пептидам и белкам, участвующим в формировании кремниевого панциря диатомовых водорослей. Приводится подробное описание номенклатуры, химической природы, механизма действия, а также практического применения силаффинов. Статья включает интересные иллюстрации из оригинальных работ.

Ключевые слова: **силаффины, биоминерализация, диатомовые водоросли.**

This review is devoted to silaffins, recently opened the template peptides and proteins involved in the formation of silica shells of diatoms. Detailed description of the nomenclature, chemical nature, mechanism of action, as well as practical application silaffins are shown. The article includes interesting illustrations of the original works.

Key words: **silaffins, biomineralization, diatoms.**

Диатомовые – самая большая группа (10 тыс. видов) одноклеточных эукариотных микроводорослей, которые присутствуют практически в каждой водной среде. Возраст диатомовых 90–280 млн. лет. Они являются доминирующей группой фитопланктона океанов и составляют примерно 20–25 % общей биологической первичной продукции на Земле (Scala, Bowler, 2001; Kröger, 2007;). Каждый из видов диатомовых обладает кремнеземным панцирем, который содержит регулярно расположенные щели (или поры) размером от 10 до 1000 нм (Poulsen et al., 2003). В основе клеточной стенки (эпитеки и гипотеки) диатомовых находятся частицы диоксида кремния (SiO_2 , кремнезем) от 10 до 100 нм в диаметре. Материалом для формирования кремнезема служит ортокремниевая кислота $\text{Si}(\text{OH})_4$, которая обычно присутствует в окружающей среде в концентрациях от десятков до сотен ммоль на литр и поступает в клетку при помощи белков – транспортеров кремния. В клетке кремниевая кислота превращается в аморфный гидратированный кремнезем при участии специальных пептидов и белков (силацидины, силаффины).

Химическая природа силаффинов

Силаффины – хорошо растворимые в воде пептиды и белки семейства фосфопротеинов. Впервые обнаружены в клеточной стенке диатомовых (Kröger et al., 1999). Всего известно девять различных силаффинов: четыре силаффина пептида natSil-1A₁, natSil-1A₂, natSil-1B (15, 18 и 33 аминокислотных остатка соответственно) и natSil-2 (первичная структура силаффина не установлена, но известен аминокислотный состав) и пять силаффинов полипептидов tpSil1H/2H, или silaffin-1H/2H (по 501 Ам), tpSil2p, или silaffin-1L/2L (по 485 Ам), и tpSil3, или silaffin-3 (231 Ам). На сегодняшний день идентифицированы только четыре гена силаффинов – один SIL1 из *Cylindrotheca fusiformis* и три tpSil1 (Sil1), tpSil2 (Sil2) и tpSil3 (Sil3, или TPSIL2) из *Thalassiosira pseudonana* (Frigeri et al., 2006; Kröger, 2007). Все силаффины богаты серином и лизином и в процессе внутриклеточного созревания подвергаются значительной и очень схожей посттрансляционной модификации (рис. 1) (Kröger, 2007; Sumper, Kröger, 2004).

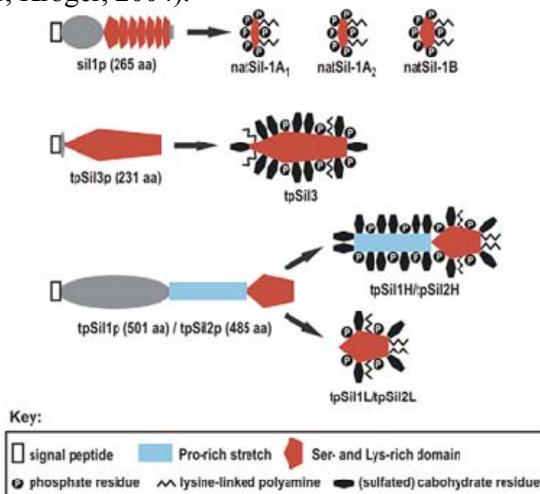


Рис. 1. Схематичные структуры силаффинов (по : (Kröger, 2007)). Силаффины синтезируются в виде предшественников белков (sil1p, tpSil1p, tpSil2p, tpSil3p; буква p на конце обозначает «предшественник»), содержащих N-терминальный сигнальный пептид для совместного поступления в эндоплазматическую сеть. В большинстве случаев дополнительные полипептидные участки (серые овалы) удаляются во время созревания белка

Силаффины 1A1 и 1A2 содержат в общей сложности четыре остатка лизина (все посттрансляционно изменены). В 1A2 остатки лизина сгруппированы в две пары, в которых ε-аминогруппы первых остатков связаны с линейными полиаминами, состоящими из 5–11 N-метилированных единиц пропиламина, тогда как вторые остатки преобразуются в ε-N,N-диметиллизины. 1A1 содержит только одну пару лизинов аналогичную 1A2. Вторая пара отличается тем, что первый лизин идентифицируется как ε-N,N,N-триметил-5-гидроксилизин, содержащий четвертичные группы аммония, второй остаток связан с длинной цепью полиамина (Kröger et al., 2001). Структуры этих силаффинов показаны на рис. 2 и 3.

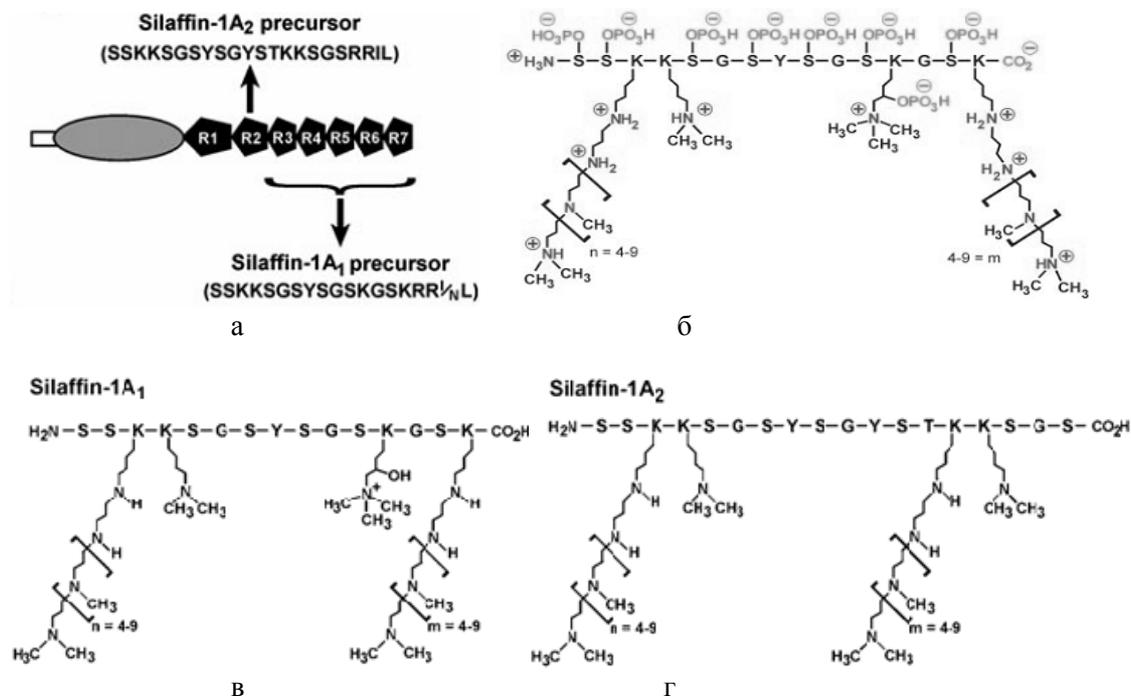


Рис. 2. Структуры силаффинов и их предшественника. Аминокислотные последовательности показаны в формате FASTA: а – Схематическое изображение предшественника silIpr (Kröger et al., 2001). Черные пятиугольники обозначают элементы, из которых образуются силаффины. Повторяющиеся звенья R3-R7 обведены фигурной скобкой. Звено R1 соответствует силаффину 1B. Белая полоса обозначает сигнальный пептид, серый овал – кислый пропептид. б – Нативная форма силаффина 1A1 (по: (Kröger et al., 2002)). Наличие остатков фосфорной кислоты подтверждено ЯМР-спектроскопией. Распределение зарядов внутри молекулы показано ориентировочно (рН около 5); в, и, г – структуры силаффинов 1A1 и 1A2 с модифицированными остатками лизина (по: (Kröger et al., 2001))

Силаффины tpSil-1H, -2H, -1L, -2L, и -3 (аббревиатура «L» в обозначает изоформу с низкой молекулярной массой «low», а «H» – с высокой молекулярной массой «high») не имеют общей гомологичной последовательности (рис. 4), но аналогичны по аминокислотному составу и посттрансляционной модификации. Отсутствие сохранения последовательности среди силаффинов может означать, что их функция не зависит от конкретной укладки, и скорее требует каких-то определенных посттрансляционных модификаций на уровне третичной структуры (Kröger, 2007; Kröger, Poulsen, 2008). Силаффины *T. pseudonana* очень кислые, гликозилированные и сульфатированные фосфопротеины, напоминающие natSil-2 из *C. fusiformis* (Poulsen, Kröger, 2004).

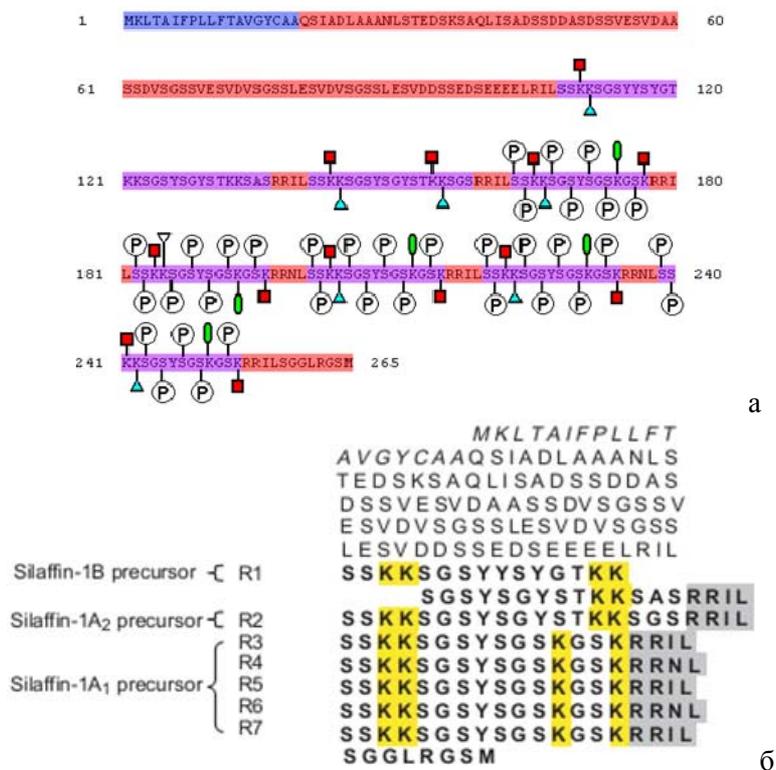


Рис. 3. Первичная структура предшественника sil1p: а – аминокислотная последовательность показана в формате FASTA. Силаффины выделены фиолетовым цветом (natSil-1B 108–136 Ам, natSil-1A2 141–158 Ам, natSil-1A1 163–177, 182–196, 201–215, 220–234 и 239–253 Ам), сигнальный пептид – синим. Р в круге – фосфорилированные остатки серина, красные квадраты ϵ -N-поли(метиламинопропил)лизин, голубые треугольники – ϵ -N,N-диметиллизин, зеленые овалы – ϵ -N,N,N-триметил-5-гидроксилизин; б – сигнальный пептид выделен курсивом. Остатки лизина выделены желтым цветом, С-концевые последовательности RR(N/I)L – серым (по: (Wong et al., 2004))

Посттрансляционные изменения затрагивают большую часть аминокислотных остатков, что делает химические структуры зрелых силаффинов чрезвычайно сложными. Кроме того этап модификации О-фосфорилирования серина, треонина, гидроксилизина и гидроксипролина включает стадии моногидроксилирования (лизин, пролин), дигидроксилирования (пролин), гликозилирования, сульфатации (углеводные фрагменты) и алкилирования ϵ -аминогрупп остатков лизина. Лизин-связанные алкильные группы могут быть представлены одной – тремя метильными группами или более сложными пропиленимин-несущими молекулами (рис. 5). Последняя модификация тесно связана с длинноцепочечными полиаминами (LCPA – long-chain polyamines), которые состоят из линейных олигопропилениминных цепей, соединенных с пропилендиамином, путресцином (являются сильными токсичными веществами) или спермидином. Атомы азота LCPA метилированы в различной степени, а в некоторых случаях присутствует терминальный или внутренний четвертичный азот (Gröger, Lutz, Brunner, 2008; Kröger, 2007).

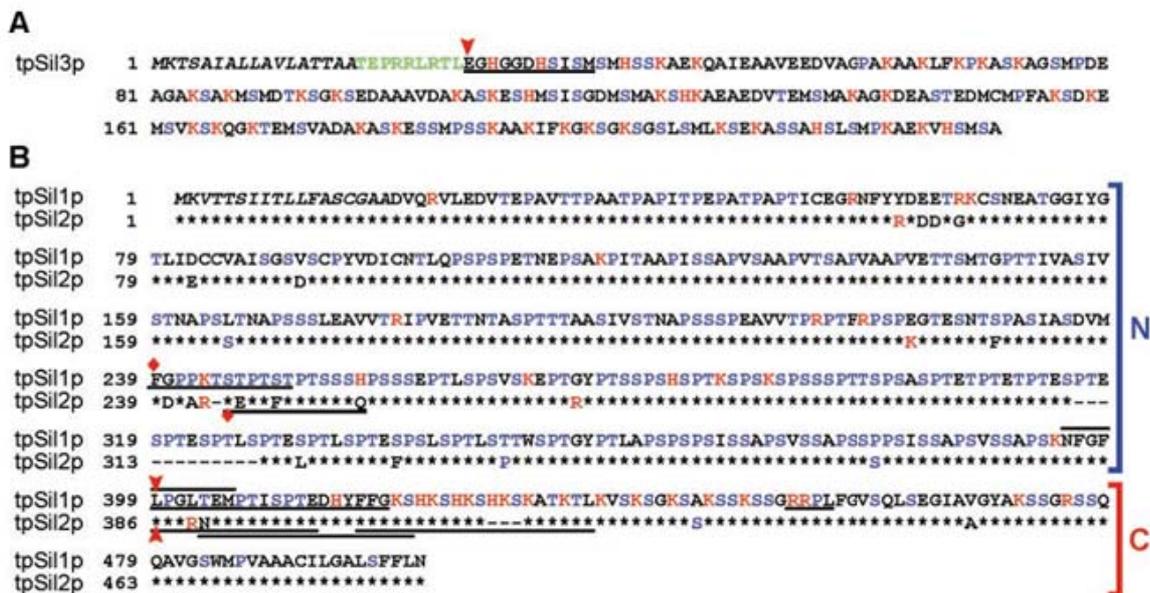


Рис. 4. Предшественники длинноцепочечных силаффинов *T. pseudonana* (по: (Poulsen, Kröger, 2004)). Серин, пролин и треонин отмечены синим цветом, лизин, аргинин и гистидин – красным. Сигнальные пептиды приведены черным курсивом, N-терминальные аминокислотные последовательности, полученные триптическим секвенированием, подчеркнуты; а – tpSil3p (это предшественник tpSil3). N-концевые аминокислоты tpSil3 отмечены красной стрелкой. Пропептид tpSil3 изображен зеленым цветом; в – альтернативной обработкой tpSil1p выделены tpSil1L и tpSil1H, а для tpSil2p – tpSil2L и tpSil2H. N- и C-концевые участки tpSil1 и tpSil2 обозначаются скобками справа. Идентичные аминокислоты tpSil1 и tpSil2 обозначены черными звездочками. N-концевые участки tpSil1L и tpSil2L отмечены красными стрелками. N-концевые фрагменты (35 кДа) tpSil1/2H отмечены ромбами

Наиболее типичный tpSil-3 включает 15 тетрапептидов K-(A/S/Q)-XK. Для 14 из них характерна шаблонная модификация остатков лизина. Например, для семи из таких мотивов N-терминальный лизин модифицируется двумя аминопропиловыми единицами (остаток 4,8-диазооктанила), тогда как C-концевой лизин превращается в ε-N,N-диметиллизин. Другие шесть мотивов содержат лизин, включающий четвертичную группу аммония. В целом все структуры схематично представлены на рис. 6. Влиянию, определяющему морфогенез кремнезема вышеуказанных пептидных доменов силаффинов, посвящена работа (Wieneke et al., 2011).

Такой модификационный код показывает связь конкретных видов кремнезема и генетической регуляции кремнеземообразования. В некоторой степени этот сценарий напоминает принцип модификации гистонов, так называемый гистоновый код, который влияет на процессы самосборки, вызывающей структурные переходы хроматина (Sumper et al., 2007).

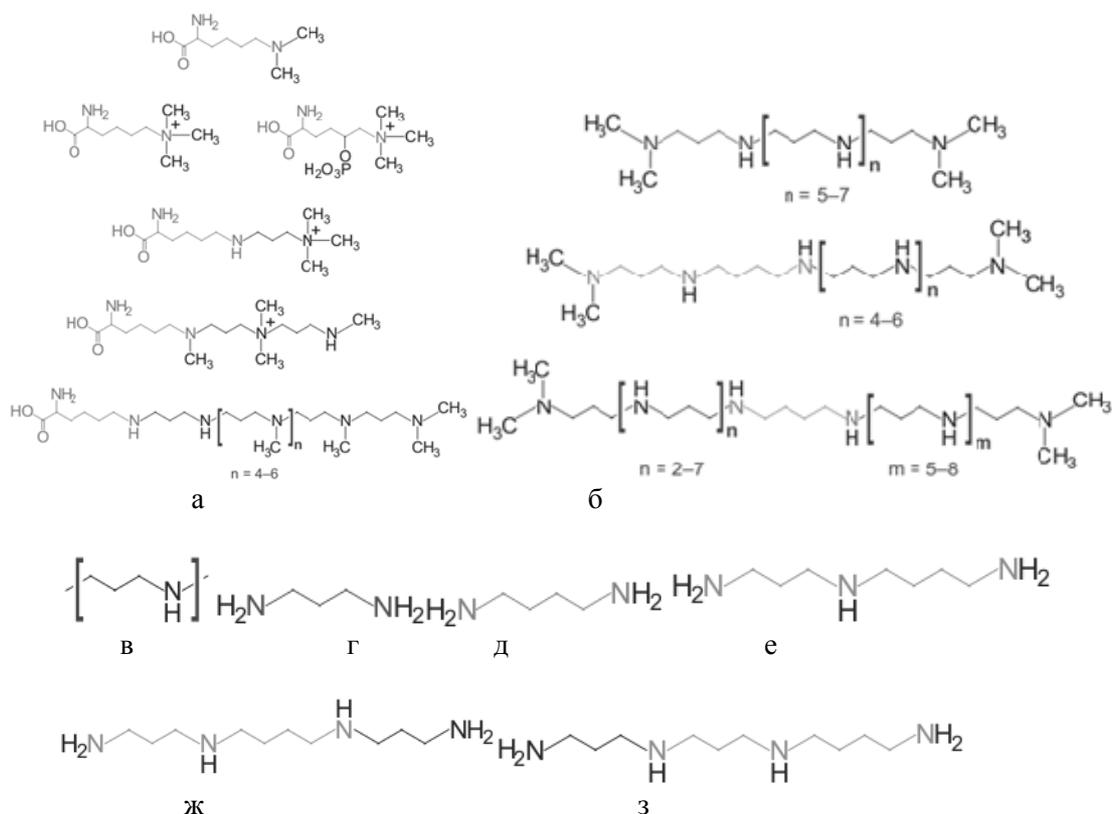


Рис. 5. Структурные формулы модифицированных остатков лизина силаффина, типичных LCPA и биогенных аминов, связанных с LCPA: а – модификации лизина (ϵ -N,N-диметиллизин, фосфорилированный ϵ -N,N,N-триметил-5-гидроксилизин, ϵ -N,N-диметиламинопропиллизин и ϵ -N,N-тетраметиламинопропиллизин) (по: Kröger (2007)); б – модификации лизина, помеченного CD2H-группами, из работы Sumper и соавторов (2007); в – общие химические структуры LCPA (по: (Poulsen, Kröger, 2004; Kröger, 2007)) и типичные представители LCPA разных видов диатомовых (по: (Sumper, Brunner, 2008)); г – пропилендимин лежит в основе LCPA д – пропилендиамин; е) – путресцин. е – спермидин; ж – спермин; з – термоспермин (по: (Kröger, Poulsen, 2008))

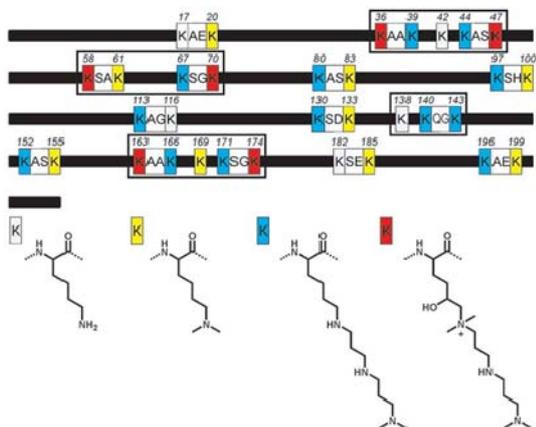


Рис. 6. Характер и распределение модификаций лизина в tpSil-3 (по: (Sumper et al., 2007)). Черная линия – полипептидная цепь с отмеченными позициями остатков лизина. Тип модификации лизина обозначается цветовым кодом, соответствующие химические структуры показаны отдельно

Механизм формирования биоминерала

Силаффины способны осаждать кремнезем *in vitro* (рис. 7). Силаффины 1A1 и 1A2 практически одинаково осаждают кремнезем (9,0–11,9 нмоль Si на 1 нмоль пептида) при разных значениях pH, однако при снижении pH до 5 1A1 показывает несколько низкую активность (рис. 7, 8, 9). На уровне разрешения СЭМ никаких морфологических различий между кремнеземом, осажденным данными пептидами, не отмечено (Kröger et al., 2001).

Применение мягкого способа выделения нативных силаффинов (вместо фтористого водорода, разрушающего O-гликозидные и фосфорноэфирные связи, использовали фторид аммония при pH = 5) позволило установить важную роль остатков фосфорной кислоты в составе пептидов (Kröger et al., 2002). Фосфатный буфер, обычно используемый в подобных экспериментах, был заменен на ацетатный буфер, в котором NatSil-1A (смесь нативных силаффинов 1A1 и 1A2) сохраняет способность осаждать кремнезем из раствора кремниевой кислоты. Через 10 мин инкубации среднее количество кремнезема составляло около $86,5 \pm 6$ нмоль на 1 нмоль пептида (рис. 10, 11). Осадок состоял из отдельных (редко взаимосвязанных) наносфер диаметром от 400 до 700 нм. При тех же условиях силаффин 1A (смесь силаффинов 1A1 и 1A2) кремний не осадил, при добавлении в раствор фосфатов деятельность пептида восстановилась (менее выражена, чем у нативного пептида).

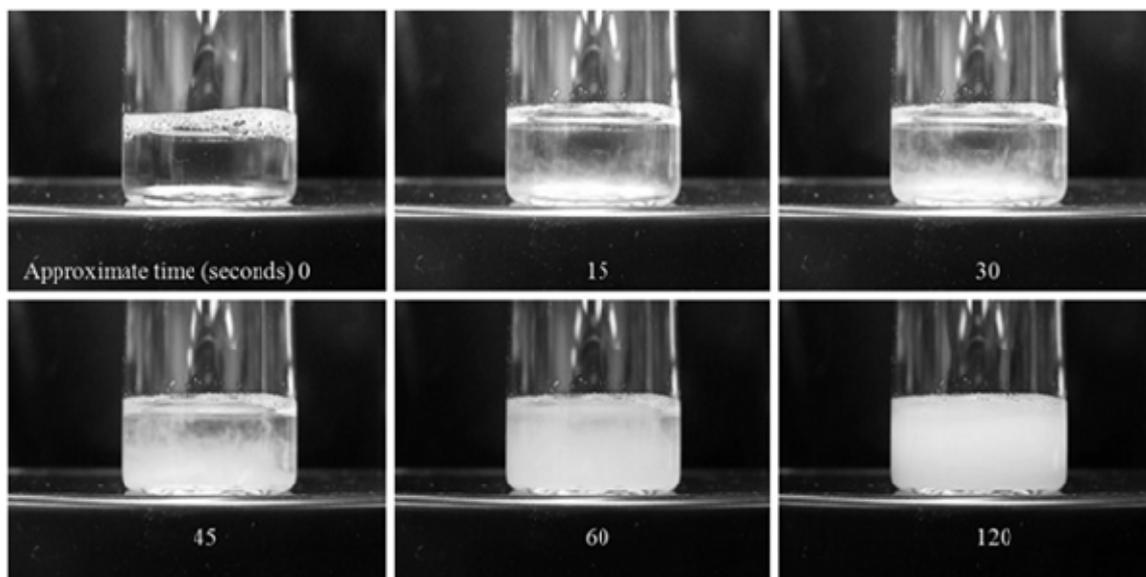


Рис. 7. Замедленная киносъемка образования кремнезема (по: (Johnson, Luckarift, 2011)). Смесь включает 0,8 мл буфера окварцевания (раствор включает 520 мл 0,1 М двухосновного фосфата калия в концентрации 17,4 г/л и 480 мл 0,1 N NaOH в концентрации 4 г/л) и 0,1 мл раствора пептида R5 (100 мг/мл)

Уровень активности данных силаффинов сопоставим только при высоких концентрациях фосфата, что определяет фосфат как ограничивающий фактор. Таким образом, многочисленные группы фосфатов в natSil-1A служат внутренним источником анионов, необходимых для формирования кремнезема диатомовых водорослей.

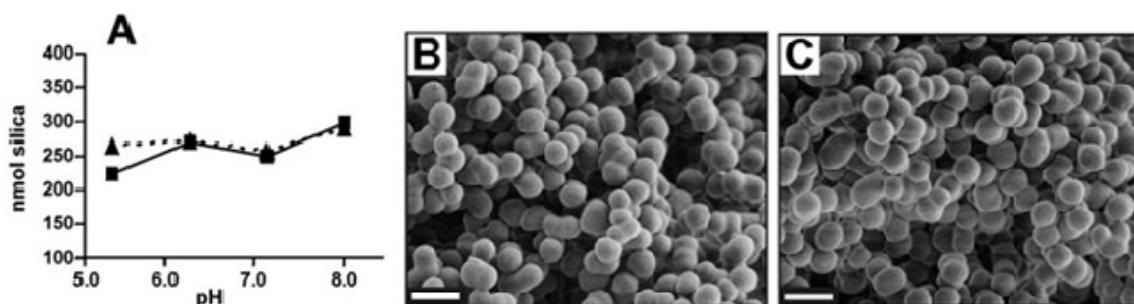


Рис. 8. Осаждение кремнезема в присутствии силаффинов 1A1 и 1A2 (по: (Kröger et al., 2001)): А – Зависимость пептид-индуцированного кремнеземообразования от pH. Сплошная линия (квадраты) показывает результат действия силаффина 1A1, пунктирная линия (треугольники) – силаффина 1A2. На фотографиях (СЭМ) – кремнезем, осажденный (pH=6,4; 3 мг пептида на мл) пептидами 1A1 (B) и 1A2 (C)

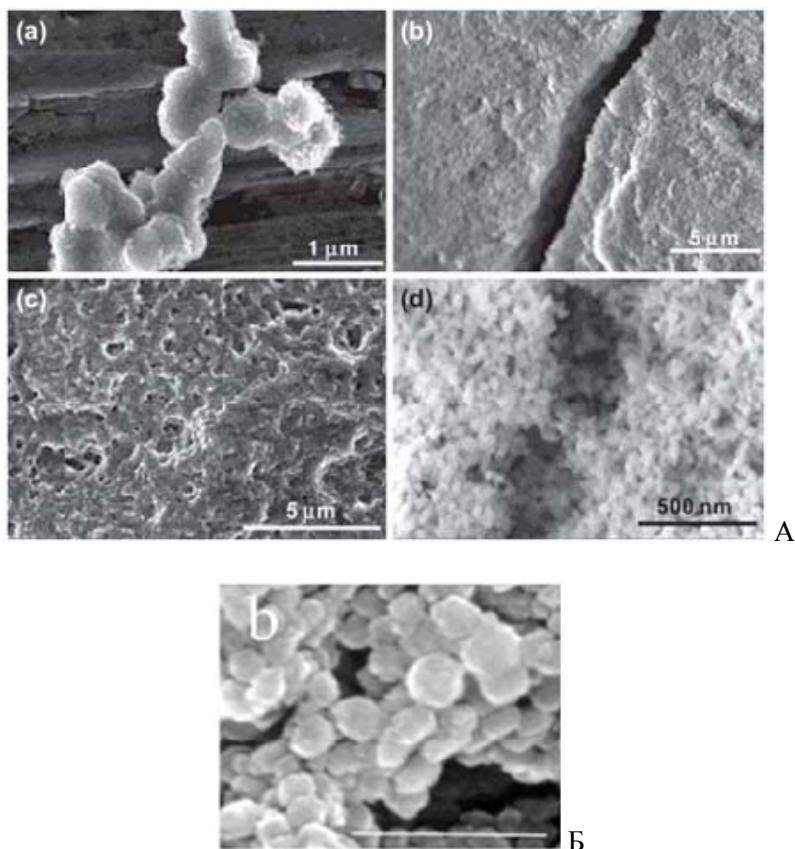


Рис. 9. Пептидопосредованное осаждение кремнезема: А: (а) – осаждение кремнезема в присутствии пептида R5; (b) – в присутствии пептида R5 с добавлением глицерина (60 % от объема); (с) в присутствии пептида R5 с добавлением сахарозы (60 % от объема) (по: (Wong et al., 2004)); (d) – увеличение изображения (b) (размер частиц диоксида кремния составляет от 45 до 114 нм в диаметре); Б – осаждение кремнезема в присутствии пептида R5 (по: (Patwardhan, Clarson 2002))

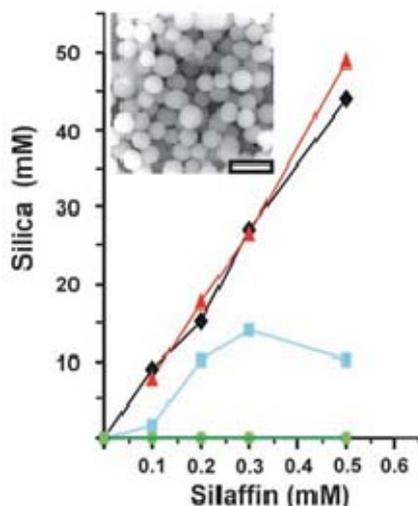


Рис. 10. Осаждение кремнезема силаффинами (по: (Kröger et al., 2002)). Диаграмма отражает взаимосвязь количества силаффинов и количества осажденного кремнезема в 50 мМ ацетате натрия при pH = 5,5. Черная линия (ромбы) – natSil-1A; зеленая (точки) – силаффин 1A; красная (треугольники) – силаффин 1A при добавлении 30 мМ фосфата; синяя (квадраты) – силаффин 1A при добавлении 3 мМ фосфата. Вставка – микрофотография (СЭМ, бар = 1 μm) осадка кремнезема через 10 мин после внесения 0,3 мМ natSil-1A

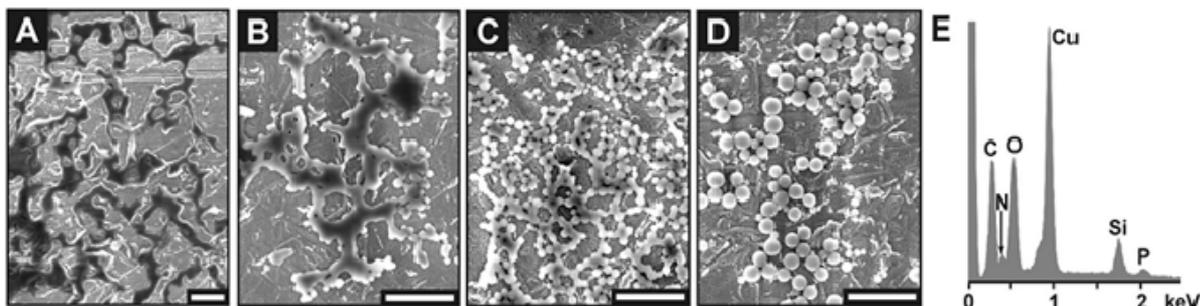


Рис. 11. Анализ морфогенеза кремнезема в динамике *in vitro* (по: (Kröger et al., 2002)). Изображения (СЭМ, бар = 2 μm) структуры кремнезема, полученные через 3,5 (A), 4,5 (B), 5 (C) и 8 (D) минут после добавления natSil-1A в буферный раствор кремниевой кислоты (50 мМ ацетата натрия, pH 5,5); химический состав кремнезема А (E); Элементы C, N и P сигнализируют о наличии natSil-1A. Сильный сигнал Cu обусловлен держателем образца (медная сетка)

ЯМР-исследованиями установлено, что цвиттерионная структура силаффинов обуславливает электростатические взаимодействия между пептидами и способствует их самоорганизации в крупные агрегаты, формирующие своего рода шаблон для осаждения кремнезема. Это объясняет неспособность силаффина, лишённого фосфорных остатков (цвиттерионной структуры), осаждать кремнезем (Kröger et al., 2002).

На процессы осаждения кремнезема в присутствии коротких силаффинов влияют и другие факторы (рис. 12). Отдельные работы были направлены на изучение способности пептидов R1, R2 и R5 осаждать кремнезем *in vitro* (Patwardhan et al., 2007; Whitlock et al., 2008; Wong et al., 2004).

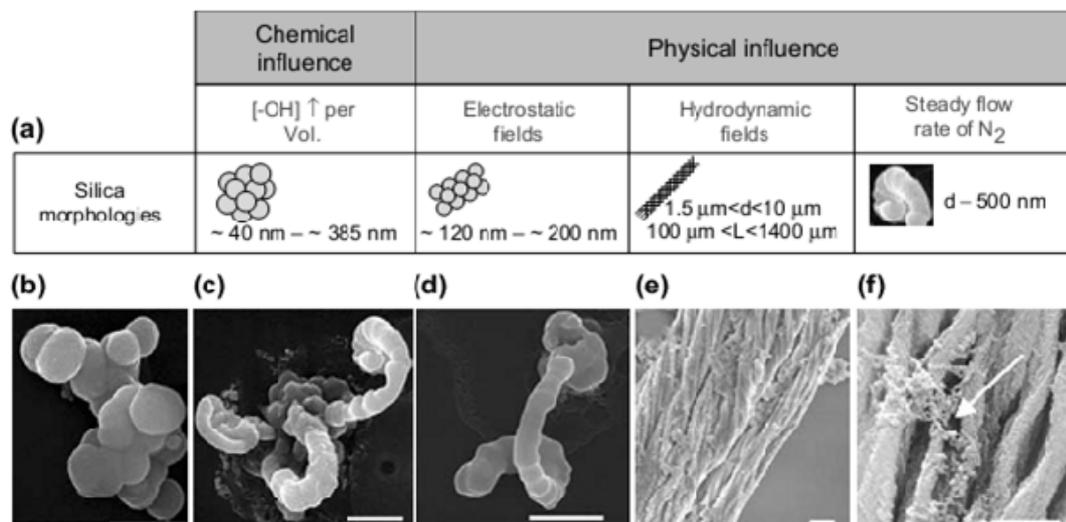


Рис. 12. Влияние физических и химических факторов на R5-иницируемый кремнеземолиз (по: (Wong et al., 2004)): а – морфология кремнезема в зависимости от применяемых химических и физических воздействий на пептид R5, где d – диаметр, L – длина; б-ф – СЭМ-фотографии кремнезема, сформированного под действием пептида R5; б – сферические структуры кремнезема, полученных в статических условиях; с-д – арочные морфологии, полученные путем пропускания газообразного азота через реакционную смесь; е-ф – фибриллярные морфологии с несколькими уровнями линейной организации, полученные при помощи механического сдвига в реакционной смеси. Грубые сферические агломераты кремнезема показаны белой стрелкой (f). Бар = 1 μm

Предполагают, что осаждение кремнезема под действием силаффинов 1A1 и 1A2 зависит главным образом от полиаминов модифицированных остатков лизина. Это согласуется с выводом, что длинноцепочечный полиамин путресцин диатомовых может осаждать диоксид кремния в виде наносфер, а синтетические силаффины с немодифицированными остатками лизина не в состоянии осаждать кремний при $\text{pH}=7$ в пробирке (рис. 13). Для LCRA и его биомиметических аналогов полиаллиламинов было показано, что активность образования кремнезема зависит от наличия фосфата (или других полианионов), который вызывает микроскопическое разделение на полиамин-фосфат-насыщенную (микрокапли) и водную фазы (рис. 14). Добавление к раствору кремниевой кислоты приводит к быстрому затвердеванию микрокапель и ускорению образования кремнезема. Примечательно, что соединения четвертичного аммония используются в техническом производстве цеолитов для структурирования силикатных структур в пределах нанометровых размеров (Kröger et al., 2001).

Такие структурные особенности показывают, что полиамины и силаффины вместе оказывают синергический эффект на морфологию осаждаемого кремния (Kröger et al., 2000). Тесные ассоциации силаффинов и LCRA способны физически связывать кремнезем за счет электростатических взаимодействий многочисленных аминогрупп силаффинов и LCRA с кремнием или ковалентной связи с диоксидом кремния. Ассоциации силаффинов и LCRA оказывают сильное влияние на формирование диоксида кремния *in vitro*. (Kröger, 2007). Так смесь из трех силаффинов и полиаминов *H. angularis* образуют гибридную структуру кремния (рис. 14), в которой отсутствуют большие сферы (диаметром от 800 нм до 1 μm), характерные для полиамин-индуцированных осадков, и довольно плоские частицы.

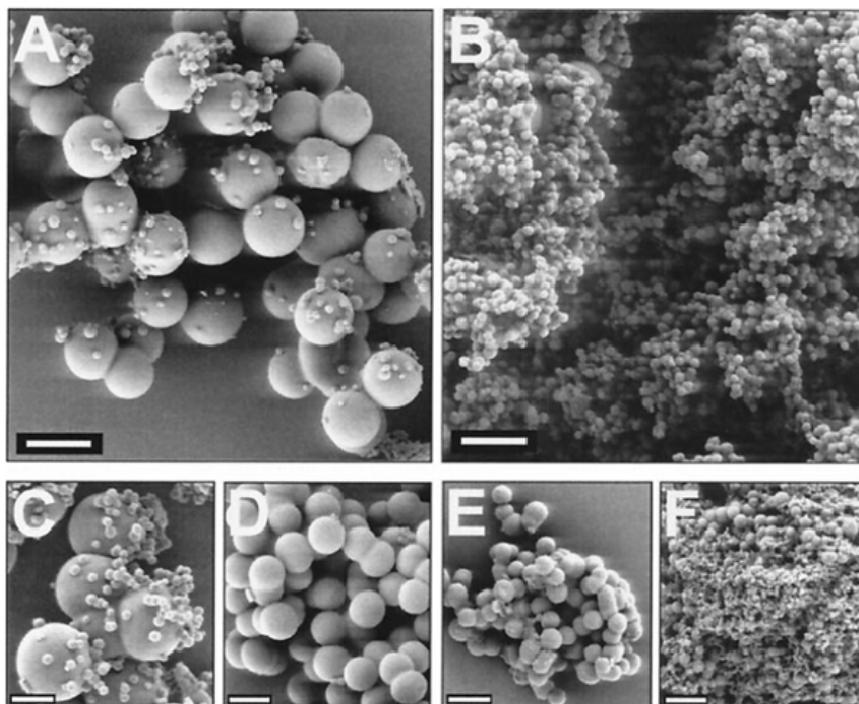


Рис. 13. Кремнезем, осажденный полиаминами *H. angularis* (по: (Kröger et al., 2000)). Полиамины с молекулярной массой от 1000–1250 Да (А), 600–750 Да (В); С) и F) – кремнеземообразование в присутствии естественной смеси полиаминов (молекулярная масса 600–1250 Да) при разных pH (С – pH=5,4; D – pH=6,3; E – pH=7,2; F – pH=8,3). Концентрация полиаминов в каждом растворе 0,85 мг/мл. Бар = 1 мкм (А, В), Бар = 500 нм (С–F)

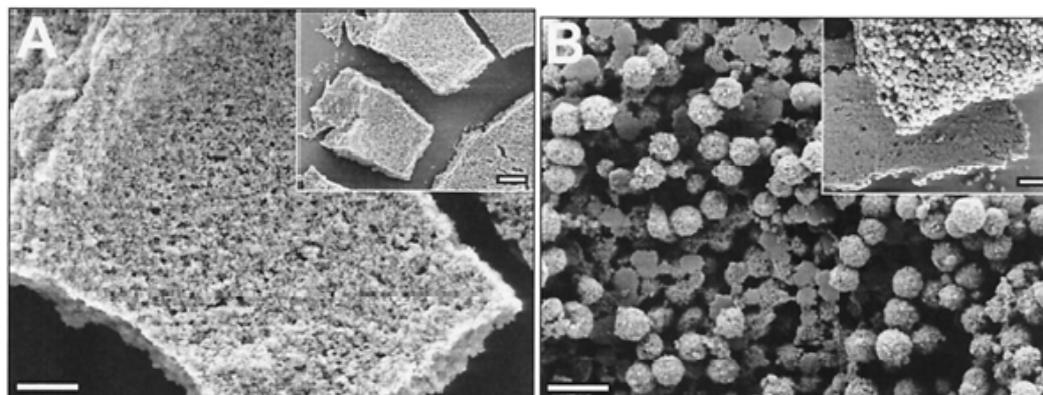


Рис. 14. Влияние полиаминов *H. angularis* и силаффинов на морфологию кремнезема (по: (Kröger et al., 2000)). А – Силаффины в концентрации 3 мг/мл. В – смесь силаффинов (3 мл/мл) и полиаминов (0.85 мг/мл). Бар = 500 нм (на вставках бар = 1 мкм)

В работе Поулен с соавт. (2003) показано, что natSil-2 неспособен осаждать кремнезем из раствора кремниевой кислоты в пробирке, в то время как смесь natSil-2 и ЛСРА быстро осаждает кремнезем в этих условиях. Исследователи считают, что индуцирующее действие natSil-2 на ЛСРА-зависимое осаждение кремнезема может быть связано с

поливалентными неорганическими анионами этого белка (фосфаты, сульфаты и углеводные остатки в молярном соотношении 1:1:7,8; углеводные остатки представлены галактозой, рамнозой, глюкуроновой кислотой, фукозой, глюкозамином и монометилдиоксигексозой в соотношении 9:7:6:2:1:2); предполагают, что формирование кремнезема вызвано связыванием молекул поликатионных LCPA с многочисленными отрицательно заряженными сайтами natSil-2. Обилие глюкуроновой кислоты значительно повышает плотность отрицательного заряда. Вероятно, полианионный natSil-2 электростатически экранирует поликатионные цепи LCPA и natSil-1A, а полиамины, как известно, способны осаждать кремнезем. Такая же ситуация должна быть характерна и для natSil-1A, потому что эта молекула ковалентно связана с фрагментами LCPA и несколькими фосфатными группами. Авторы подчеркивают, что natSil-2 препятствует работе natSil-1A, демонстрируя его ингибиторную способность в осаждении кремнезема (рис. 15).

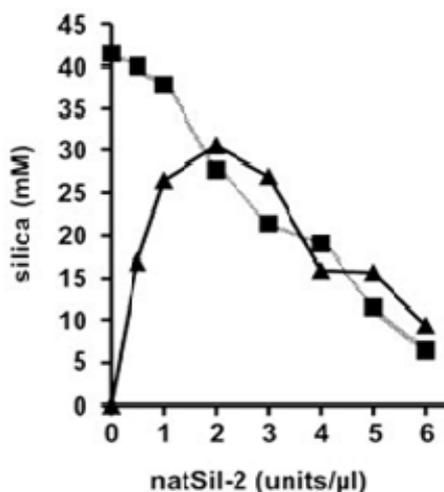
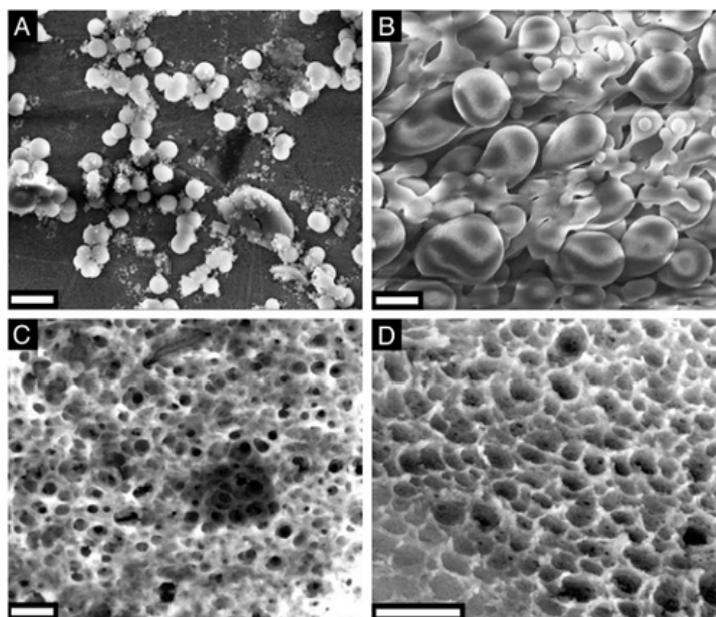


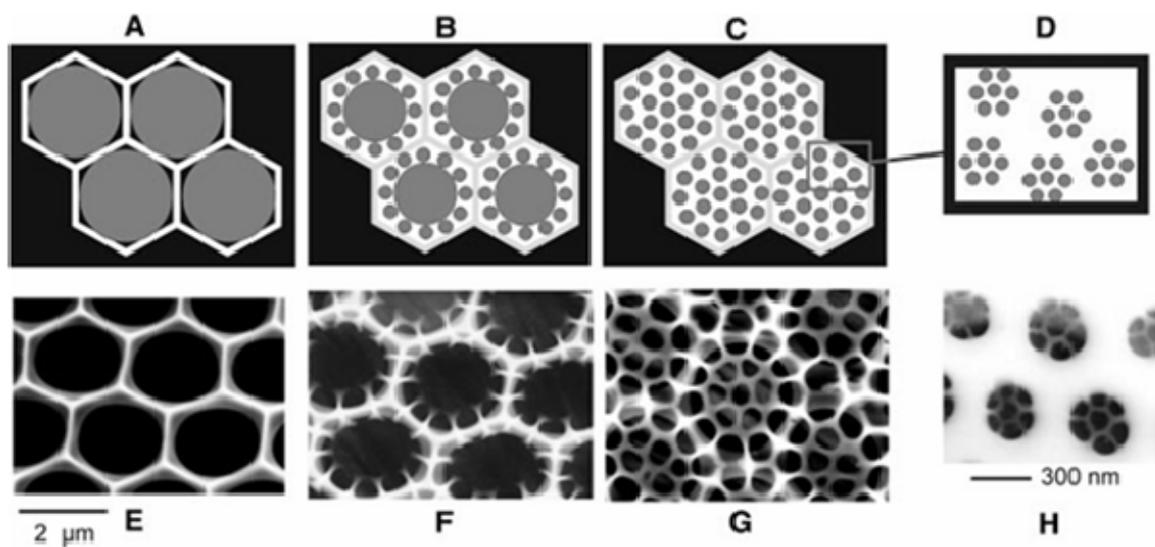
Рис. 15. Влияние natSil-2 на осаждение кремнезема смесью natSil-1A и LCPA (по: (Poulsen et al., 2003)). Осаждение проводилось в нормальных условиях при постоянной концентрации LCPA (0,6 мкг/мл; треугольники) или natSil-1A (0,3 мМ; квадраты)

Отсутствие активности natSil-2 было показано не только при осаждении, но и при дальнейшем морфогенезе кремнезема. При низких и высоких концентрациях natSil-2 и natSil-1A были получены полидисперсные сферы (диаметр 100–1000 нм; рис. 16) и крупные взаимосвязанные сферические и грушевидные частицы кремнезема (см. рис. 16 В). Эти структуры больше, но структурно похожи на сферы кремнезема, образованные чистым natSil-1A (диаметр 400–700 нм). Полученные структуры содержали многочисленные беспорядочно расположенные поры (см. рис. 16 С, D), диаметр которых (100–1000 нм) характерен для кремнезема диатомовых.

Исследователи полагают, что морфогенез пористой структуры кремнезема смесями natSil-2 и natSil-1A (или LCPA) является механистически схожим с синтезом мезопористого кремнезема (диаметр пор обычно 2–50 нм), поверхностно-активными веществами и блоками сополимеров, способных к самосборке или кооперативной агрегации. Они считают: если фазы силаффинов действительно выступают в качестве органической матрицы для кремнезема, то размеры поры кремнезема должны отражать шаблон такой матрицы. Методом динамического рассеяния света было показано, что молекулы natSil-2 обра-



a



б

Рис. 16. Кремнезем, полученный смесями natSil-1A и natSil-2 (а), и схематическое изображение модели разделения фаз (б); а – СЭМ (бар = 2 $\mu\text{м}$). А – 0,5 ед./л natSil-2 к 0,3 мМ natSil-1A; В – 5 ед./л natSil-2 к 0,3 мМ natSil-1A; С – 2 ед./л natSil-2 к 0,3 мМ natSil-1A; D – 1,6 единицы/л natSil-2 к 0,2 мМ natSil-1A (по: (Poulsen et al., 2003)); б – СЭМ (бар = 2 $\mu\text{м}$). (Е-Н) этапы формирования клапаны *C. wailesii*. А – монослой плотноупакованных капель, содержащих полиамин, расположенных в ВОК; В и С – последовательное образование меньших капель (около 300 нм); D – дисперсия капель до размера 50 нм, которые регулируют заключительную стадию отложения кремния. Кремний выпадает в осадок только в водной фазе (белые участки). Повторяющееся разделение фаз производят иерархические узоры (по: (Sumper, 2002))

зуют очень большие агрегаты (диаметр до 90 нм), а молекулы natSil-1A около 16 нм (Kröger et al., 2002). Таким образом, поры кремнезема размером до 100 нм могут быть напрямую связаны с размером агрегатов natSil-2, кроме того, электростатические взаимодействия между агрегатами natSil-2 и natSil-1A могли бы приводить к образованию совместных агрегатов большего размера и создавать соответствующую пористую структуру кремния. Тем не менее экстремальные концентрации данных силаффинов приводят к образованию органических матриц с разной структурностью, которые не в состоянии управлять формированием пористого кремнезема (Poulsen et al., 2003).

Сегодня при помощи компьютерного моделирования предпринимаются попытки объяснить механизм самосборки силаффинов (Eby et al., 2011; Lenoci, Camp, 2006). Исследуя подобным образом антимикробный пептид KSL (KKVVFVKVFK), группа ученых пришла к выводу, что он имеет сходные механизмы сборки с силаффином R5 (последовательность катионных и гидрофобных остатков пептида R5 и KSL почти идентична).

Посттрансляционная модификация делает длинноцепочечные силаффины отрицательно заряженными. Эти кислые силаффины могут вызвать образование кремнезема из кремниевой кислоты в условиях *in vitro* только при слиянии с LCPA в супрамолекулярные ансамбли (процесс разделения фаз, см. рис. 16), которые и формируют кремнезём даже в отсутствие фосфата. В данных условиях структура кремнезема зависит от типа используемых силаффинов (рис. 17, 18): сферы диаметром от 230 ± 25 нм до $2,6 \pm 1,7$ мкм (tpSil-1/2L), плотные пластины толщиной от около 50 до 500 нм и длиной до нескольких десятков микрометров и полидисперсные сферы диаметром от 900 нм до 4,2 мкм (tpSil3), пористые пластины размером от 20 до 200 нм (tpSil-1/2H; natSil-2) (Poulsen, Kröger, 2004; Kröger, 2007).

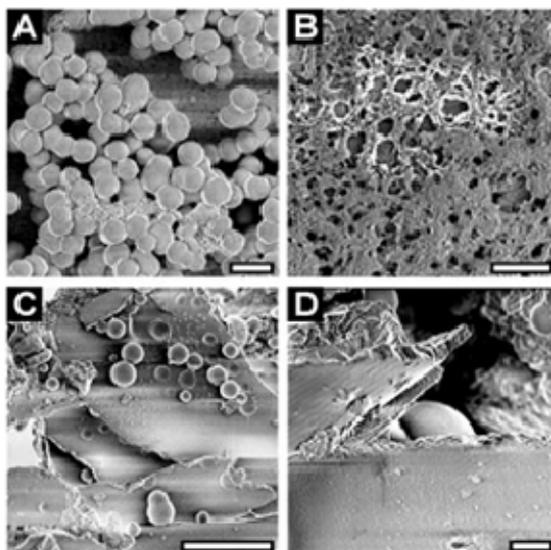


Рис. 17. Морфогенез кремнезема в присутствии смесей силаффинов и LCPA (по: (Poulsen, Kröger, 2004)). СЭМ. А) 20 μm tpSil1/2L (бар = 1 μm); В – 3.5 μm tpSil1/2H (бар = 0,5 μm); С – 20 μm tpSil3 (бар = 10 μm); D – 30 μm tpSil3 (бар = 1 μm)

Результаты исследования силаффинов породили «гипотезу о силаффиновой матрице», согласно которой взаимодействие силаффинов с LCPA внутри ВОК приводит к накоплению наноструктурированных органических матриц, структура которых контролируется

силаффинами. Силаффиновые матрицы, как представляется, действуют и как индуктор, и как шаблон для отложения кремния, препятствуя осаждению кремнезема в силаффин-богатых (но ЛСРА-бедных) участках и стимулируя осаждение кремнезема в ЛСРА-богатых (но силаффин-бедных) областях (Kröger et al., 2007). Однако на сегодняшний день неясно, как может быть предотвращено случайное распространение ЛСРА и силаффинов в целях стабилизации наноструктурированных силаффиновых матриц (Kröger, 2007).

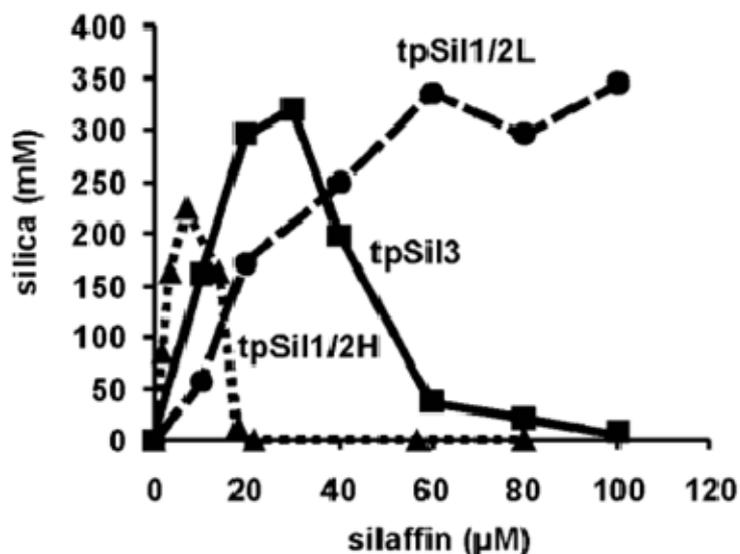


Рис. 18. Зависимость размера частиц кремнезема от типа смеси силаффина-ЛСРА (по: (Poulsen, Kröger, 2004)). Время реакции 10 мин., концентрация ЛСРА – (0,75 г/л); tpSil1/2H (треугольники), tpSil1/2L (точки); tpSil3 (квадраты). Каждая точка данных представляет собой среднее значение из трех независимых измерений.

Сампер М. и Брунер Е. (Sumper, Bruner, 2006) представили другую модель морфогенеза кремнезема, которая основана на повторяющихся дисперсиях плотноупакованных ЛСРА-фосфатных микрокапель, выступающих как шаблоны для осаждения кремния. Это «ЛСРА-фосфатная модель» базируется на демонстрации того, что пористые структуры могут быть получены в пробирке с использованием биомиметических фосфат-полиаллиламинных систем. Хотя данная модель может иметь значение для выявления закономерностей морфогенеза кремнезема с гексагональными порами у видов *Coscinodiscus*, которые, как представляется, не имеют силаффинов, она не дает объяснения роли силаффинов, которые, вероятно, присутствуют в большинстве других видов диатомовых (Kröger, 2007). Продолжая рассуждать Kröger задается вопросом: если процессы фазового разделения образования диоксида кремния до нано- и микроструктур в просвете ВОК зависят от соотношения силаффина/ЛСРА, то что определяет общую форму структуры кремнезёма? В электронно-микроскопических исследованиях формирования кремнезема всегда отмечают связь ВОК (силикалеммы) с мембраной, предполагая, что ВОК действует на форму образования кремния (Pickett-Heaps et al., 1990). Цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты) тесно связан с цитозольной поверхностью силикалеммы и воздействует на ее функции, что приводит к aberrациям в форме кремнезема (Pickett-Heaps et al., 1990; Van de Meene, Pickett-Heaps, 2002).

Робинсон Д. и Салливан К. (Robinson, Sullivan, 1987) предположили, что цитоскелет может также играть роль в образовании наноструктур кремнезема, влияя на формирование зародышей кремнезема в просвете ВОК через трансмембранные белки силикалеммы. Эта идея вписывается в модель на основе «гипотезы о силаффиновой матрице», согласно которой цитоскелет-связанные трансмембранные белки могли бы взаимодействовать с силаффинами и тем самым стабилизировать наноструктурированную силаффиновую матрицу (рис. 19). Подтверждение справедливости данной модели требует идентификации белков силикалеммы, которые до сих не получены из-за отсутствия способа выделения ВОК, однако полная расшифровка генома *T. Pseudonana* открыла альтернативные подходы для выявления данных белков (Kröger, 2007).

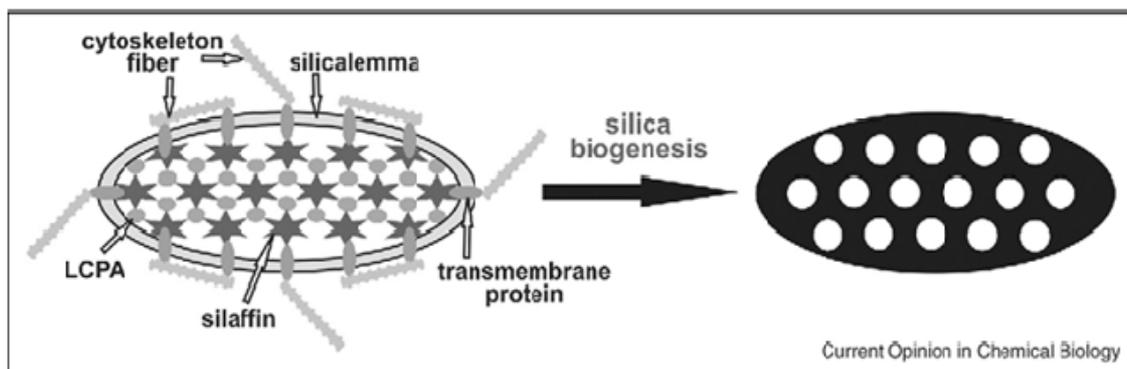


Рис. 19. Схематическое изображение «гипотезы о силаффиновой матрице» (по: (Kröger, 2007)).

Внутри ВОК силаффины и LCPA самостоятельно собираются (отдельная фаза) в наноструктурированную органическую матрицу. Матрица стабилизируется трансмембранными белками, которые с внутренней стороны ВОК взаимодействуют с силаффинами, а с цитозольной стороны – с цитоскелетом, управляющим расположением трансмембранных белков

Считается, что участие полиаминов в отложении кремния указывает на то, что этот процесс требует взаимодействия (через водородные связи) аминогрупп и групп Si-OH. Интересно, что tpSil1/2H, наиболее гликозилированные силаффины, оказывают наибольший тормозящий эффект на LCPA-зависимый кремнеземолиз. Такое ингибирование может быть следствием связывания водорода LCPA с многочисленными гидроксильными группами силаффина, что в итоге затрудняет взаимодействие LCPA и молекул кремниевой кислоты. Остатки дигидроксипролина tp-Sil1/2H могут участвовать в этом непосредственно, связывая вициальные гидроксильные группы LCPA, или косвенно, путем предоставления дополнительных сайтов гликозилирования (Poulsen, Kröger, 2004).

Практическое применение силаффинов

Силаффины привлекают большое внимание исследователей из-за способности инициировать и регулировать осаждение кремнезема при комнатной температуре и давлении. Перспективным направлением практического применения подобных белков является разработка методов производства кремниевых структур с заданными наноструктурными формами и свойствами. Синтезированный при помощи силаффинов кремнезем является привлекательным материалом для широкого применения в таких областях, как макромоле-

кулярная сепарация, химическое зондирование, доставка лекарств, имплантология, катализ, микрофлюидика, технологии лабораторных чипов (Choi et al., 2011; Cole et al., 2006; Broderick et al., 2007; Brott et al., 2001; Dickerson et al., 2005; Kharlampieva et al., 2009; Kharlampieva et al., 2010; Luckarift et al., 2004; Nam et al., 2009; Sewell, Wright, 2006). Материалы на основе этого кремнезема отлично зарекомендовали себя в качестве катализаторов деградации пестицидов, электрохимических датчиков газа NO, оптических датчиков при использовании методики комбинационного рассеяния света (Raman scattering) (Kröger, 2007), а также матрицы для иммобилизации ферментов (Marner et al., 2008, 2009; Poulsen et al., 2007). При создании искусственных кремнеземных матриц на основе силаффинов и их фрагментов были синтезированы химерные протеины, которые способны непосредственно осаждать кремнезем в пробирке (Foo et al., 2006; Marner et al., 2008; Nam et al., 2009; Wong et al., 2006). При помощи подобных химерных белков проводится не только синтез кремнезема, но и осуществляются попытки регулировать остеогенез (Mieszawska et al., 2010). Показана возможность использования силаффинов как биомаркеров экологического состояния водоемов (Carvalho et al., 2011).

Список литературы

1. Broderick M., Neville F., Gibson T., Millner P. Practical nanobiotechnology: Functional nanoparticle production using silaffin R5 peptide // *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 131. P. 11.
2. Brott L.L., Naik R.R., Pikas D.J., Kirkpatrick S.M., Tomlin D.W., Whitlock P.W., Clarson S.J., Stone M.O. Ultrafast holographic nanopatterning of biocatalytically formed silica // *Nature*. 2001. Vol. 413(6853). P. 291-293.
3. Carvalho R.N., Burchardt A.D., Sena F., Mariani G., Mueller A., Bopp S.K., Umlauf G., Lettieri T. Gene biomarkers in diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated marine surface sediments // *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 101. P. 244-253.
4. Choi O., Kim B.C., An J.H., Min K., Kim Y.H., Um Y., Oh M.K., Sang B.I. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within biomimetic silica nanoparticles induced by a fusion enzyme // *Enzyme and Microbial Technology*. 2011. Vol. 49. P. 441-445.
5. Cole K.E., Ortiz A.N., Schoonen M.A., Valentine A.M. Peptide- and long-chain polyamine-induced synthesis of micro- and nanostructured titanium phosphate and protein encapsulation // *Chemistry of Materials*. 2006. Vol. 18. P. 4592-4599.
6. Dickerson M.B., Naik R.R., Sarosi P.M., Agarwal G., Stone M.O., Sandhage K.H. Ceramic nanoparticle assemblies with tailored shapes and tailored chemistries via biosculpting and shape-preserving inorganic conversion // *J. Nanoscience and Nanotechnology*. 2005. Vol. 5. P. 63-67.
7. Eby D.M., Johnson G.R., Farmer B.L., Pandey R.B. Supramolecular assembly of a biomineralizing antimicrobial peptide in coarse-grained Monte Carlo simulations // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. Vol. 13. P. 1123-1130.
8. Foo C.W.P., Patwardhan S.V., Belton D.J., Kitchel B., Anastasiades D., Huang J., Naik R.R., Perry C.C., Kaplan D.L. Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103. P. 9428-9433.
9. Frigeri L.G., Radabaugh T.R., Haynes P.A., Hildebrand M. Identification of proteins from a cell wall fraction of the diatom *Thalassiosira pseudonana* - Insights into silica structure formation // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006. Vol. 5. P. 182-193.
10. Gröger C., Lutz K., Brunner E. Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization // *Cell Biochem Biophys*. 2008. Vol. 50. P. 23-39.
11. Kharlampieva E., Jung C.M., Kozlovskaya V., Tsukruk V.V. Secondary structure of silaffin at interfaces and titania formation // *Journal of Materials Chemistry*. 2010. Vol. 20. P. 5242-5250.

12. *Kharlampieva E., Slocik J.M., Singamaneni S., Poulsen N., Kroger N., Naik R.R., Tsukruk V.V.* Protein-Enabled Synthesis of Monodisperse Titania Nanoparticles On and Within Polyelectrolyte Matrices // *Advanced Functional Materials*. 2009. Vol. 19. P. 2303-2311.
13. *Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M.* Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology // *PNAS*. 2000. Vol. 97(26). P. 14133-14138.
14. *Kröger N., Deutzmann R., Sumper M.* Silica-precipitating Peptides from Diatoms. The chemical structure of silaffin-1a from *Cylindrotheca fusiformis* // *J. Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276. N. 28. P. 26066 -26070.
15. *Kröger N., Deutzmann R., Sumper M.* Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation // *Science*. 1999. Vol. 286. P. 1129-1132.
16. *Kröger N., Lorenz S., Brunner E., Sumper M.* Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis // *Science*. 2002. Vol. 298. P. 584-586.
17. *Kröger N., Poulsen N.* Biochemistry and molecular genetics of silica biomineralization in diatoms. In *Handbook of Biomineralization*. Ed. E. Baeuerelein Weinheim: Wiley-VCH. 2007. Vol 1. P. 43-58.
18. *Kröger N., Poulsen N.* Diatoms - From Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology // *Annu. Rev. Genet.* 2008. Vol. 42. P. 83-107.
19. *Kröger N.* Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007. Vol. 11. P. 662-669.
20. *Lenoci L., Camp P.J.* Self-assembly of peptide scaffolds in biosilica formation: Computer simulations of a coarse-grained model // *J. American Chemical Society*. 2006. Vol. 128. P. 10111-10117.
21. *Luckarift H.R., Spain J.C., Naik R.R., Stone M.O.* Enzyme immobilization in a biomimetic silica support // *Nat Biotechnol.* 2004. Vol. 22(2). P. 211-213.
22. *Marner W.D., Shaikh A.S., Muller S.J., Keasling J.D.* Morphology of Artificial Silica Matrices Formed via Autossilification of a Silaffin/Protein Polymer Chimera // *Biomacromolecules*. 2008. Vol. 9(1). P. 1-5.
23. *Marner W.D., Shaikh A.S., Muller S.J., Keasling J.D.* Enzyme Immobilization via Silaffin-Mediated Autoencapsulation in a Biosilica Support. *Biotechnology Progress* 2009. Vol. 25. P. 417-423.
24. *Mieszawska A.J., Nadkarni L.D., Perry C.C., Kaplan D.L.* Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration // *Chem Mater*. 2010. Vol. 22(20). P. 5780-5785.
25. *Nam D.H., Won K., Kim Y.H., Sang B.I.* A novel route for immobilization of proteins to silica particles incorporating silaffin domains // *Biotechnol Prog.* 2009. Vol. 25(6). P. 1643-1649.
26. *Patwardhan S.V., Clarson S.J.* Silicification and Biosilicification. Part 4. Effect of Template Size on the Formation of Silica // *J. of Inorganic and Organometallic Polymers*. 2002. Vol. 12. Nos. ¾. P. 109-116.
27. *Patwardhan S.V., Shiba K., Schroder H.C., Muller W.E.G., Clarson S.J., Perry C.C.* The Interaction of 'Silicon' with Proteins: Part 2. The Rold of Bioinspired Peptide and Recombinant Proteins in Silica Polymerization // *Science and Technology of Silicones and Silicone-Modified Materials*. 2007. Vol. 964. P. 328-347.
28. *Pickett-Heaps J., Schmid A.M.M., Edgar L.A.* The cell biology of diatom valve formation. In *Progress in Phycological Research*. Ed. F.E. Round, D.J. Chapman. Bristol Biopress. 1990. Vol. 7. P. 1-169.
29. *Poulsen N., Berne C., Spain J., Kroger N.* Silica immobilization of an enzyme through genetic engineering of the diatom *Thalassiosira pseudonana* // *Angewandte Chemie-International Edition*. 2007. Vol. 46. P. 1843-1846.
30. *Poulsen N., Kröger N.* Silica Morphogenesis by Alternative Processing of Silaffins in the Diatom *Thalassiosira pseudonana* // *J. Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279. N. 41. P. 42993-42999.
31. *Poulsen N., Sumper M., Kröger N.* Biosilica formation in diatoms: Characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis // *PNAS*. 2003. Vol. 100. N. 21. P. 12075-12080.
32. *Robinson D.H., Sullivan C.W.* How do diatoms make silicon biominerals? // *TIBS* 1987. Vol. 12. P. 151-154.
33. *Scala S., Bowler C.* Molecular insights into the novel aspects of diatom biology // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001. Vol. 58. P. 1666-1673.

34. *Sewell S.L., Wright D.W.* Biomimetic synthesis of titanium dioxide utilizing the R5 peptide derived from *Cylindrotheca fusiformis* // *Chem. Mater.* 2006. Vol. 18. P. 3108-3113.
35. *Sumper M.* A phase separation model for the nanopatterning of diatom biosilica // *Science.* 2002. Vol. 295. P. 2430-2433.
36. *Sumper M., Brunner E.* Learning from diatoms: nature's tools for the production of nanostructured silica // *Adv Funct Mater.* 2006. Vol. 16. P. 17-26.
37. *Sumper M., Hett R., Lehmann G., Wenzl S.* A code for lysine modifications of a silica biomineralizing silaffin protein // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46. P. 8405-8408.
38. *Van de Meene A.M.L., Pickett-Heaps J.D.* Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundstrom // *J. Phycol.* 2002. Vol. 38. P. 351-363.
39. *Whitlock P.W., Patwardhan S.V., Stone M.O., Clarson S.J.* Synthetic Peptides Derived from the Diatom *Cylindrotheca fusiformis*: Kinetics of Silica Formation and Morphological Characterization. In: *Polymer Biocatalysis and Biomaterials II*, H. N. Cheng and R. A. Gross, Eds., Oxford University Press. 2008. Vol. 999. Chapter 26. P. 412-433.
40. *Wieneke R., Bernecker A., Riedel R., Sumper M., Steinem C., Geyer A.* Silica precipitation with synthetic silaffin peptides // *Org. Biomol. Chem.* 2011. Vol. 9. P. 5482-5486.
41. *Wong P.F.C., Patwardhan S.V., Belton D.J., Kitchel B., Anastasiades D., Huang J., Naik R.R., Perry C.C., Kaplan D.L.* Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins // *PNAS.* 2006. Vol. 103. P. 259428 -259433.