



БИОГЕННЫЙ КРЕМНЕЗЕМ — МАТЕРИАЛ НОВОГО ТЫСЯЧЕЛИТИЯ



В. МЮЛЛЕР, С.И. БЕЛИКОВ, Х.-Х. ШРЁДЕР

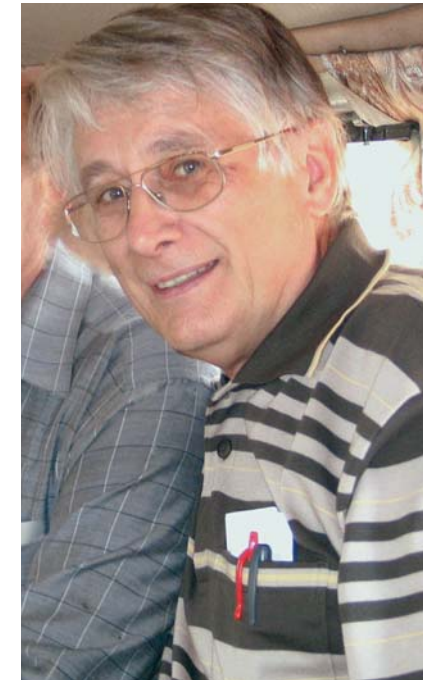
Впервые о богатстве Сибири природными ресурсами — главным образом драгоценными металлами — западному миру поведал в 1844 г. немецкий ученый и путешественник А. Гумбольдт. В наше время этот обширный край ассоциируется не только с золотом и платиной, но и с алмазами, газом, нефтью... И все-таки основными богатствами земли сибирской являются не исчерпаемые запасы бездушного металла, но уникальные возобновляемые ресурсы — животные и растения



ШРЁДЕР Хайнц-Христоф — доктор философии и доктор медицины, профессор, сотрудник Отделения прикладной молекулярной биологии Института физиологической химии Университета Майнца (Германия). Лауреат премий по теоретической медицине, геронтологии, нанобиотехнологии и др.



БЕЛИКОВ Сергей Иванович — кандидат химических наук, доктор биологических наук, заведующий лабораторией аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН (Иркутск)



МЮЛЛЕР Вернер — доктор философии, профессор, руководитель Отделения прикладной молекулярной биологии Института физиологической химии Университета Майнца (Германия). Лауреат премий по патофизиологии, геронтологии, за исследования проблем рака



1771 г., П.С. Паллас



Живое богатство таит в себе самое древнее и самое глубокое на земле озеро — Байкал, гордость земли сибирской. Одними из самых необычных его обитателей являются пресноводные губки. Уже из первых описаний этих животных (Pallas, 1771; Georgi, 1775; Middendorf, 1867; Dybowski, 1880) стало понятно, что они представляют собой настоящие сокровища природы, хранящие базисные загадки естествознания.

Что касается практического использования губок, то под названием «бодяга» они традиционно применялись в медицине для ускорения заживления синяков и в качестве косметических отшелушивающих масок, обеспечивающих «естественный румянец». И вот совсем недавно губки были заново «открыты» как неисчерпаемый источник драгоценного сырья — биогенного кремнезема, имеющего огромный потенциал для производства силиконовых, т.е. кремнийорганических материалов.

Этот материал будущего в виде удивительных живых созданий в изобилии представлен в озере Байкал. Чтобы стимулировать исследования биогенного кремнезема на самом современном уровне, была создана объединенная группа исследователей, куда вошли ученые из Иркутска (Лимнологический институт СО РАН, руководимый акад. М. А. Грачевым) и Германии (Высокотехнологический центр BIOTECmarin, возглавляемый проф. В. Мюллером).

Филогенетическое древо губок

Тип Porifera является первой таксономической группой, отделившейся от общего ствола многоклеточных животных (Müller, 2001). Все классы Porifera являются, по сути, живыми ископаемыми, а также уникальными объектами для молекулярно-биологических исследований

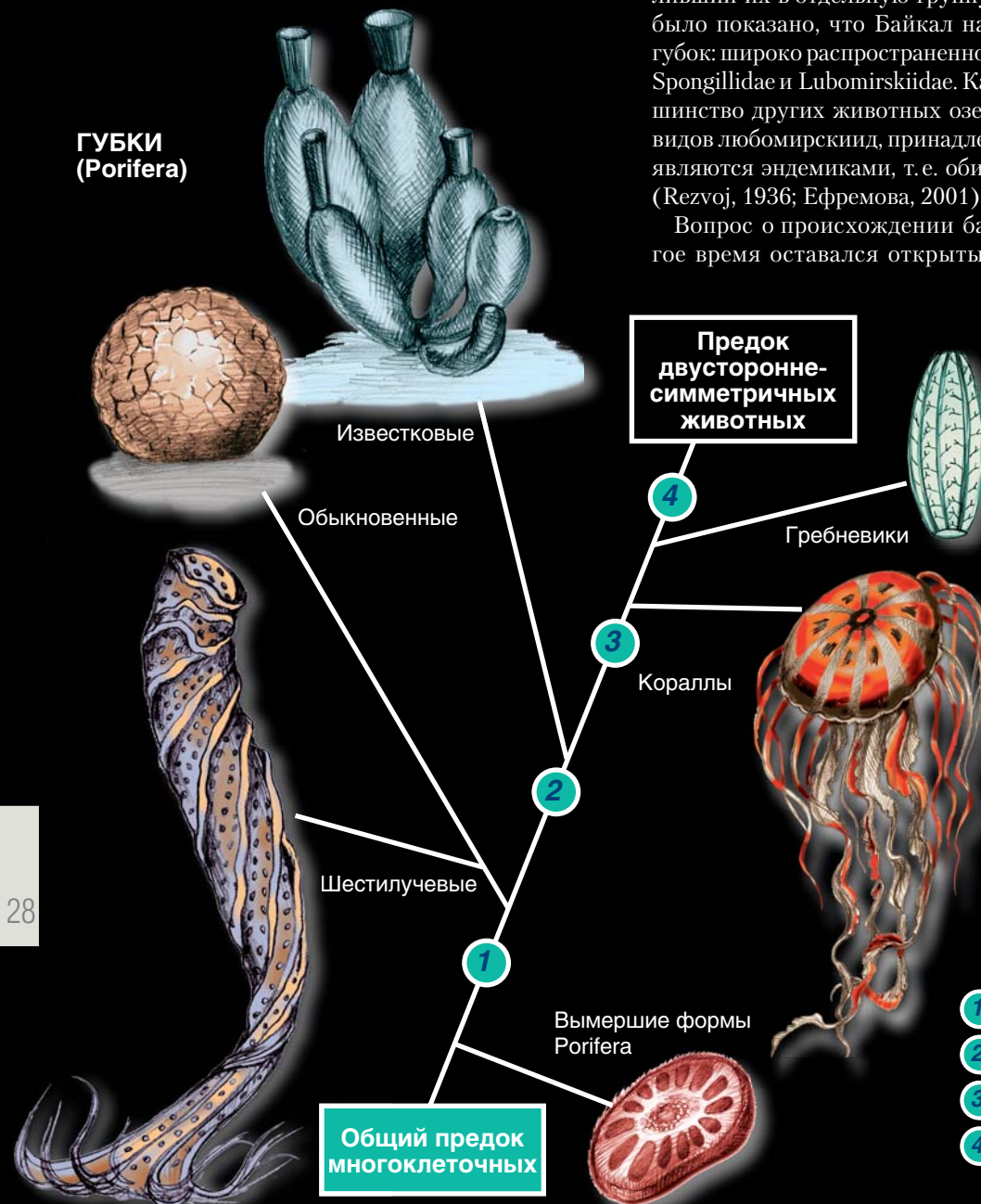
Эволюция байкальских губок

В 1771 г. ученый и путешественник П. Паллас впервые описал байкальскую губку как слизистое животное с мягкой тканью величиной более 1,5 фута. Он назвал ее *Spongia baicalensis*, причем эта разновидность рассматривалась как родственник пресноводной губки из европейских водоемов.

Затем детальные исследования байкальских губок провел ссыльный поляк В. Дыбовский (1880), выделивший их в отдельную группу Lubomirskia. Позднее было показано, что Байкал населяют два семейства губок: широко распространенное в водоемах семейство Spongillidae и Lubomirskiidae. Как и подавляющее большинство других животных озера, все 13 байкальских видов любомирскиид, принадлежащие четырем родам, являются эндемиками, т.е. обитают только в Байкале (Rezvoj, 1936; Ефремова, 2001).

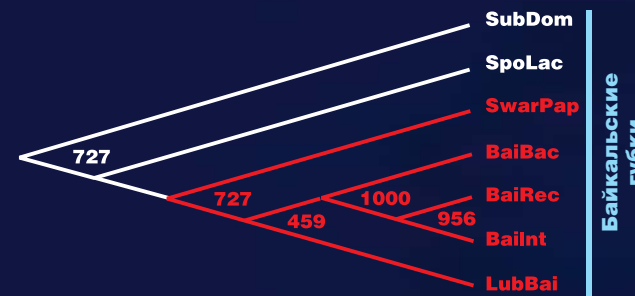
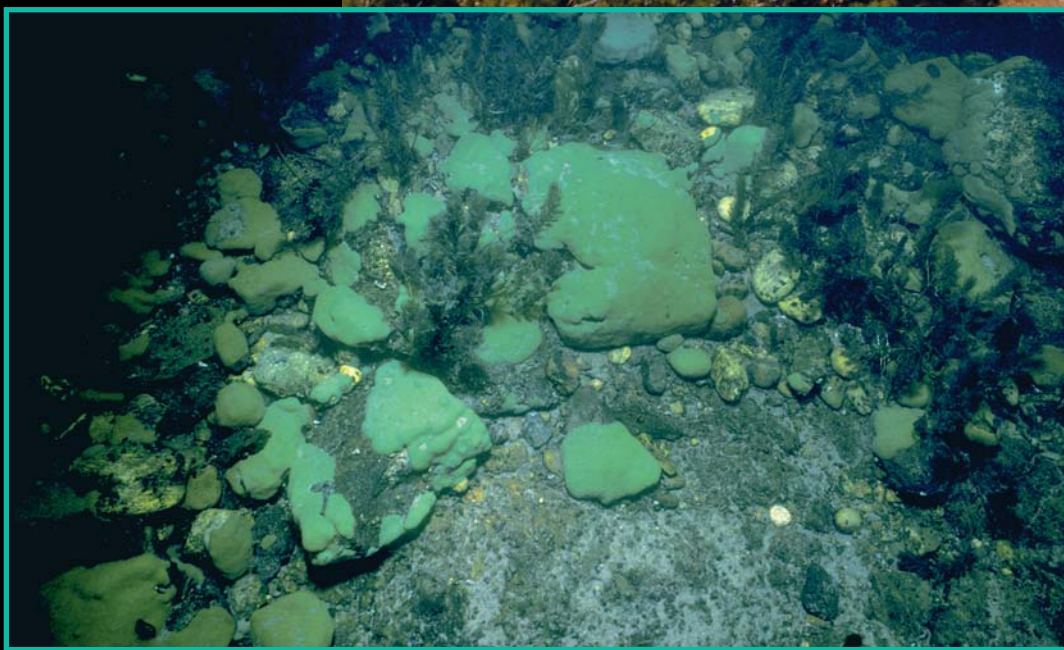
Вопрос о происхождении байкальских губок долгое время оставался открытым. Некоторые ученые

ГУБКИ (Porifera)



Появление:

- 1 кремневого скелета;
- 2 известкового скелета;
- 3 радиальной симметрии;
- 4 спинно-брюшной полярности



Филогенетический анализ, основанный на данных молекулярного секвенирования интронов гена тубулина.

SubDom — морская губка *S. domuncula*;
 SpoLac — космополитная губка *S. lacustris*;
 LubBai, BaiInt, BaiBac, BaiRec, SwarPap — эндемичные байкальские губки *L. baicalensis*, *B. intermedia*, *B. bacillifera*, *B. recta*, *S. papyracea*

Погрузившись с аквалангом в холодную байкальскую воду (6–8°C), мы встречаемся с фантастическим миром, созданным доминирующим среди байкальских губок видом — кремневой *Lubomirskia baicalensis*. На небольшой глубине этот вид имеет подушкоподобную форму, а на больших глубинах растут настоящие плотные леса из высоких виллообразных ветвей



предполагали, что губки произошли от разных морских таксономических групп (Dybowski, 1882; Annandale, 1913; Rezvoj, 1936; Martinson, 1940). Согласно другой точке зрения губки произошли от одного общего предка и лишь затем «разошлись» уже в самом озере (Efremova, 1994). Разрешить данный вопрос на основе обычных морфологических, эмбриологических и гистологических данных было невозможно.

Это удалось сделать только с помощью молекулярно-филогенетических методов анализа. Конкретнее — путем сравнения нуклеотидного состава определенных генов у губок, принадлежащих к сем. Lubomirskiidae, с космополитной пресноводной губкой сем. Spongillidae и с морской губкой сем. Suberitidae. В результате удалось доказать, что байкальская «группировка» является монофилетичным, т.е. происходящим от одного предка, образованием (Schroder et al. 2003). Выяснилось, что хотя в среднем эволюция видов происходит достаточно медленно, в определенных экологических условиях — как это было на Байкале — они могут эволюционировать очень быстро.

Лучшим модельным объектом для прикладных и эволюционных исследований, способствующих распутыванию генетических основ роста и происхождения Porifera, оказался первый обнаруженный на Байкале вид губок — хлорофиллсодержащая кремневая *Lubomirskia baicalensis*. Этот вид поселяется на каменистых субстратах и доминирует в освещенной зоне озера. Широко распространенная губка легко доступна ныряльщикам и аквалангистам.

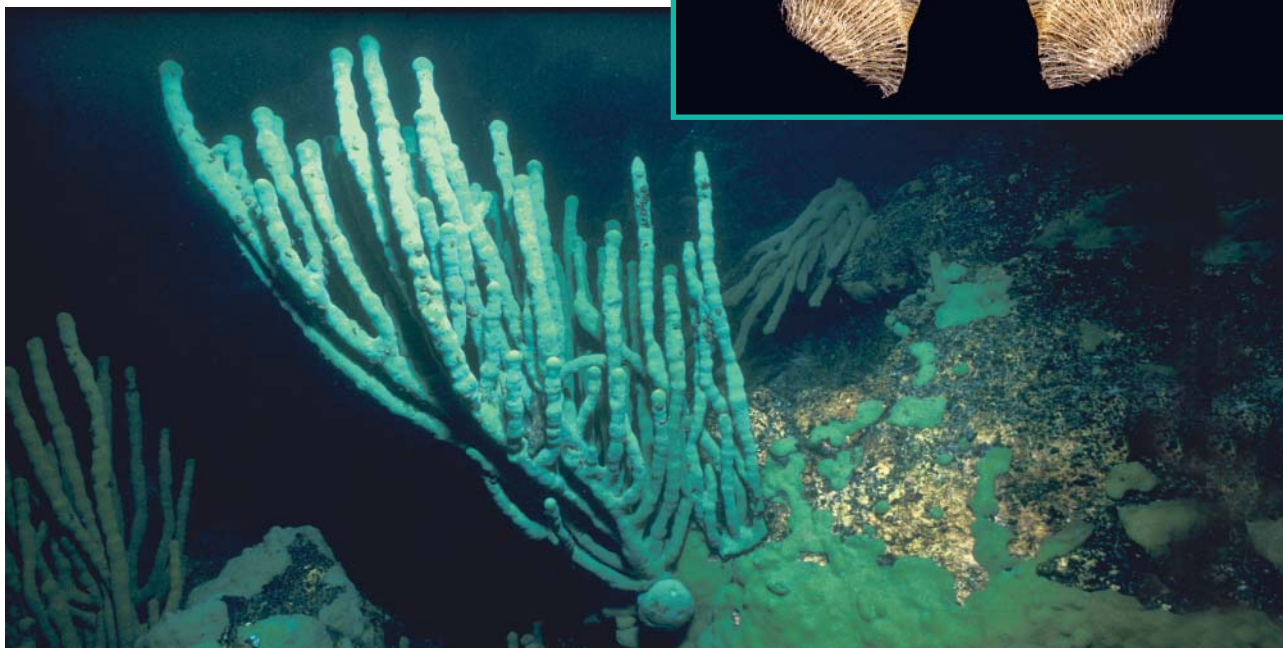
Формы этого изящного и пропорционально сложенного животного очень разнообразны: от пальцеподобной

до ламинированной корковой. Уже на глубине 2 м губки зеленым «бархатом» покрывают камни; на глубине 5 м над инкрустированным основанием губок начинают подниматься дихотомически ветвящиеся отростки. Еще глубже — на глубинах более 10 м — растут настоящие подводные леса из любомирскиид, отдельные особи которых достигают высоты одного метра. Незабываемый сюрреалистический пейзаж!

Скелет из иголок

Как и у многих других многоклеточных, форма тела губки поддерживается скелетом. Еще в начале XIX в. было обнаружено, что некоторые таксоны губок содержат кремневые скелетные элементы, в то время как другие имеют известковый остов, на основании чего губки и были разделены на разные классы (Nardo, 1833).

В классе *обыкновенных губок* (Demospongiae, к которым принадлежат также байкальские губки) скелетные



Скелетный каркас *L. baicalensis* состоит из высокоупорядоченных нитей рогоподобного белка *спонгина*, связывающего кремневые скелетные элементы. На продольном разрезе ветвей видно, что пучки спикул образуются, начиная от верхушки предыдущего модуля. Формы концов ветвей различны и зависят от фазы роста: они выглядят как вершина на поверхности вновь развивающегося модуля (1), как шапочка (2, 3), как массивный купол (4)

элементы, так называемые *спикулы*, формируются из *кремнезема* — полимера кремниевой кислоты. Кремний — наиболее часто встречающийся элемент земной коры, широко представленный в микроорганизмах, одноклеточных и многоклеточных организмах (в растениях и животных).

В последние годы метаболизм кремния в спикулах губки был в значительной степени объяснен (Cha et al. 1999; Krasko et al. 2000; Müller et al. 2003). Оказалось, что формирование кремневого скелета является чрезвычайно комплексным процессом. Образование спикул начинается в специализированных клетках — *склероцитах*, в которых кремнезем начинает откладываться вокруг центральной нити.

Синтез спикул происходит быстро: зародыши спикул (*микросклеры*) длиной 100 мк образуются в течение 40 часов. Их формирование является генетически контролируемым процессом. Зародыш спикулы достигает почти полной длины в теле материнской клетки, а затем выходит из нее и достраивается до нужного размера другими специализированными клетками.

Формы и размеры спикул чрезвычайно многообразны, особенно у морских губок. Спикулы пресноводных губок напоминают заточенные с двух сторон карандаши. Скелет байкальской губки *L. baicalensis* состоит из колючих мегасклер, размеры которых значительно варьируют, молодые же спикулы являются гладкими.

Сам скелетный каркас губок высокоупорядочен. Рост организма у *L. baicalensis* происходит «звездообразно». Это означает, что внутри тела можно выделить зоны

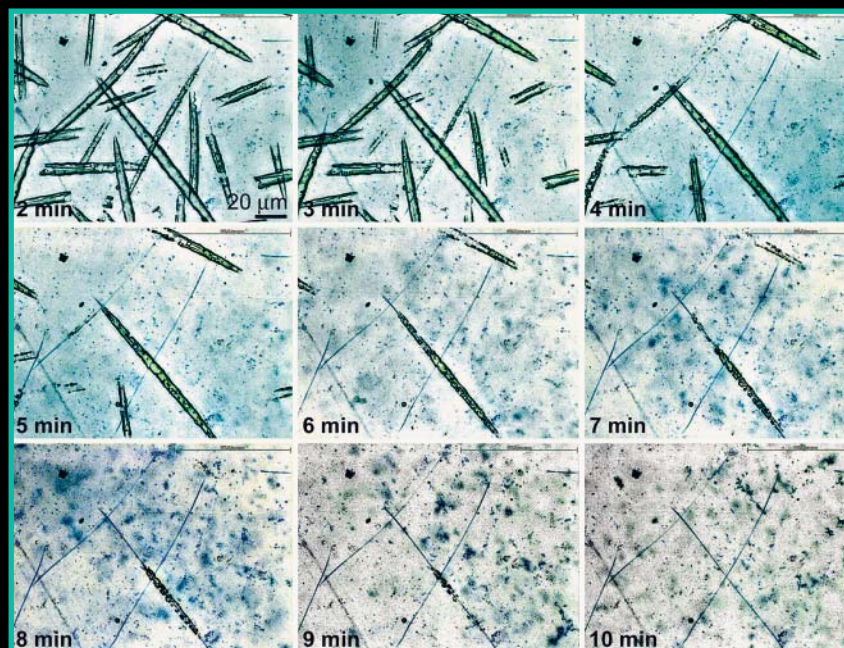
роста, созданные высокоупорядоченным расположением спикул и разграниченные зонами покоя.

Согласно нашим данным, при достижении соответствующих концентраций кремниевой кислоты в клетках запускается работа ряда генов, кодирующих разнообразные белки, в том числе *силикатеин*, обладающий ферментативной активностью (Krasko et al. 2002). Он определяет отложение аморфного диоксида кремния и, следовательно, само формирование спикул.

Располагается силикатеин в осевом канале спикул и может быть выделен в чистом виде ступенчатой обработкой губок плавиковой кислотой. Установление факта, что именно этот фермент является стержнем осевого канала спикул, явилось главным шагом в понимании процесса формирования скелета губок на молекулярном уровне (и, забегая вперед, — в создании биотехнологии получения кремнезема).

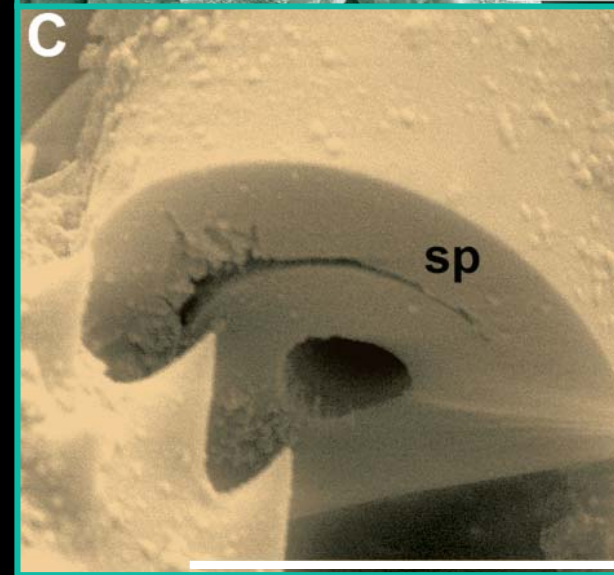
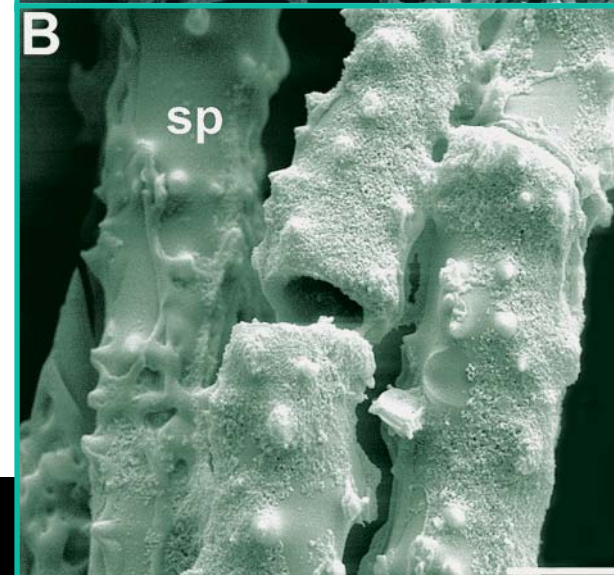
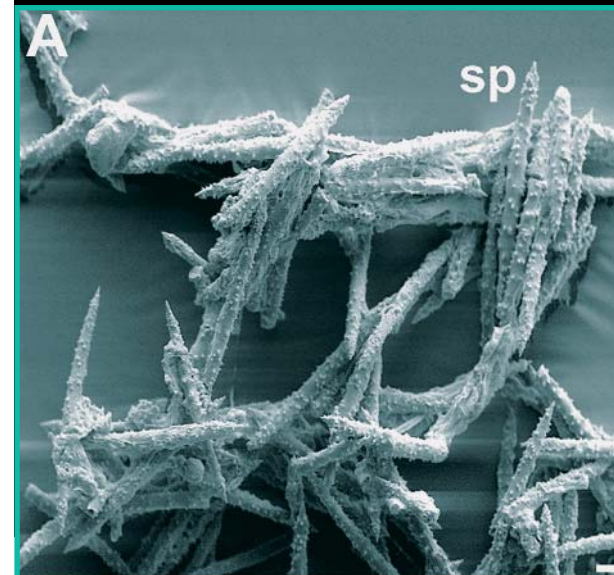
Нужно отметить, что фермент силикатеин располагается не только в центральном канале спикул, но и на их периферии, вокруг внешних концентрических слоев кремнезема. В процессе образования спикул силикатеин синтезирует вокруг себя кварцевую оболочку диаметром до 2–3 мк. Образовавшиеся спикулы вытесняются из клеток и растут уже во внеклеточном пространстве в противоположных направлениях благодаря силикатеину, наслоенному на поверхность спикул.

Окончательно сформировавшиеся спикулы могут достигать диаметра 10 мк и более. Кстати сказать, весь процесс роста у губок чрезвычайно напоминает процесс образования костей у позвоночных животных.



В плавиковой кислоте полимеризованный кремний спикул *L. baicalensis* растворяется. Осевые нити (диаметра 1 мк), освобождающиеся от кремневой оболочки, окрашены ярко-синим красителем для белка

А, В — Кремневые спикулы, формирующие скелет на внешней поверхности губки. Сканирующая электронная микроскопия (С, D) Поперечные разрезы спикул, на которых виден осевой канал (масштаб 10 мк)

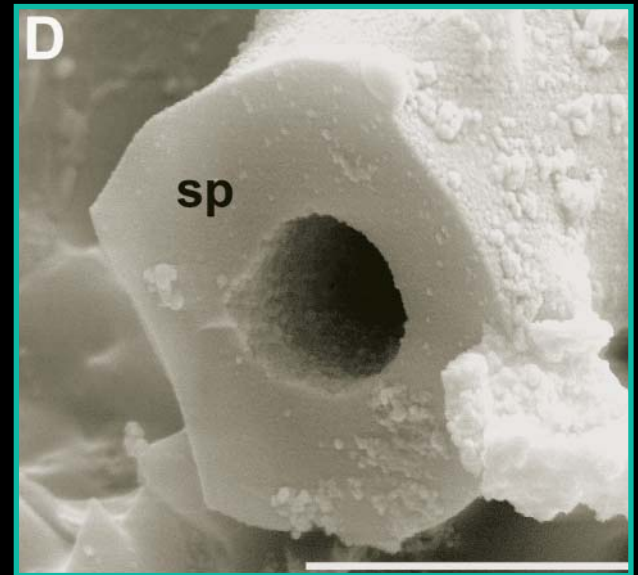


Силикатеин из... кишечной палочки

Процесс образования спикул может происходить не только в целостном организме губок, но и в так называемых *примморфах*, т. е. в клеточной культуре губок. Кремнийчувствительные гены (в том числе и ген, кодирующий силикатеин) активируются, если примморфы выращивать при 60 мкМ концентрации кремнийсодержащего соединения.

Осевая нить, как упоминалось выше, состоит из силикатеина. Если осевые нити, т. е. силикатеин, инкубировать с мономерными эфирами кремниевой кислоты, последние полимеризуются и на нитях откладывается кремнезем. Наблюдение за этим ферментативно контролируемым процессом — настоящим мощным биохимическим реактором — просто завораживает! Нужно отметить, что для химических реакций полимеризации кремния обычно требуются высокие (около 1000 °С) температуры, тогда как благодаря такому биологическому катализатору, как силикатеин, реакции проходят в обычных комнатных условиях.

Откуда же можно получить достаточно большие количества силикатеина, необходимые для нужд биотехнологов? Несмотря на то что байкальские губки растут относительно быстро — по крайней мере, на 1 см в год, — достичь этого можно только с помощью генно-инженерных технологий, т. е. переносом соответствующего гена в чужеродный организм, например в бактерию. Что и было нами сделано.



Ген силикатеина байкальской губки *L. baicalensis* был выделен, идентифицирован и клонирован в обыкновенной *кишечной палочке*, где он успешно заработал в новом «чуждом» окружении (Kaluzhnaia et al. 2005). Полученный в результате рекомбинантный белок обладал ферментативной активностью, подобной активности силикатеина из осевых каналов спикул губки: катализировал отложение биогенного кремнезема.

На технологию получения «гено-инженерного» силикатеина был получен патент (Müller et al. 2004). Кроме того, при изучении метаболизма кремневых спикул был идентифицирован еще один белок, «обратный» силикатину — фермент *силиказа*, способный деполимеризовать (растворять) аморфный кремнезем с образованием свободной кремниевой кислоты.

Рекомбинантную силиказу также удалось получить и доказать ее ферментативную способность растворять кремнезем (Schröder et al. 2003). Безусловно, что и этот фермент ожидает большое «биотехнологическое» будущее.

Сцементировано кремнием!

Интересно, что байкальские кремнистые губки издавна использовались местным населением для полировки серебряной и медной посуды (Pallas, 1787), как чистящий материал. Сегодня же диапазон применения биогенного кремния простирается от покрытия искусственной кости до создания различных тканевых имплантатов.

Необходимость в биогенном кремнеземе огромна. Нужно от-

метить, что на сегодняшний день данные о способностях спикул губок ферментативно синтезировать, равно как и разрушать (с помощью силикатеина и силиказы соответственно) биогенный кремнезем еще не получили должной оценки. Но они однозначно свидетельствуют о больших потенциальных возможностях использования биокатализаторов для получения силиконовых материалов в оптике и электронике, в биомедицине и биокатализе и других областях.

Силикатеин, например, может быть использован в составе медицинских композитов различного назначения, в том числе для контролируемой доставки лекарств в организме, а также для многих других целей. На сегодняшний день силикатеины по праву входят в число наиболее перспективных материалов третьего тысячелетия.

Строительным блоком осевой нити спикул является силикатеин. Длинные волокна имеют диаметр около 1 мк и длину до 100 мк, что соответствует длине спикул. Сканирующий электронный микроскоп

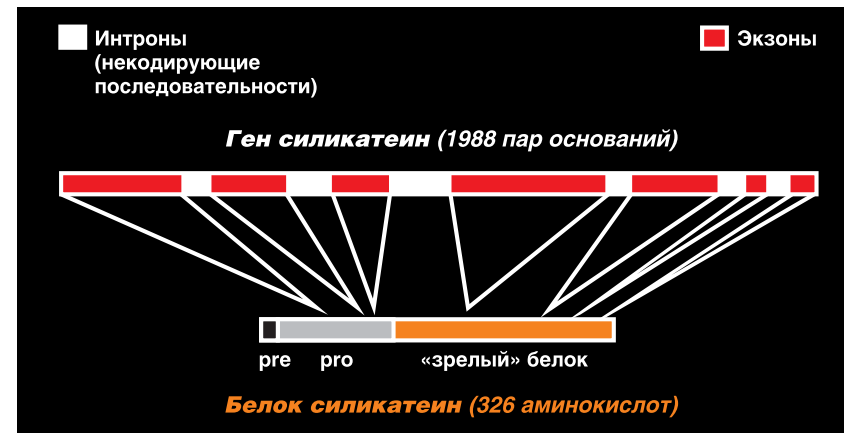
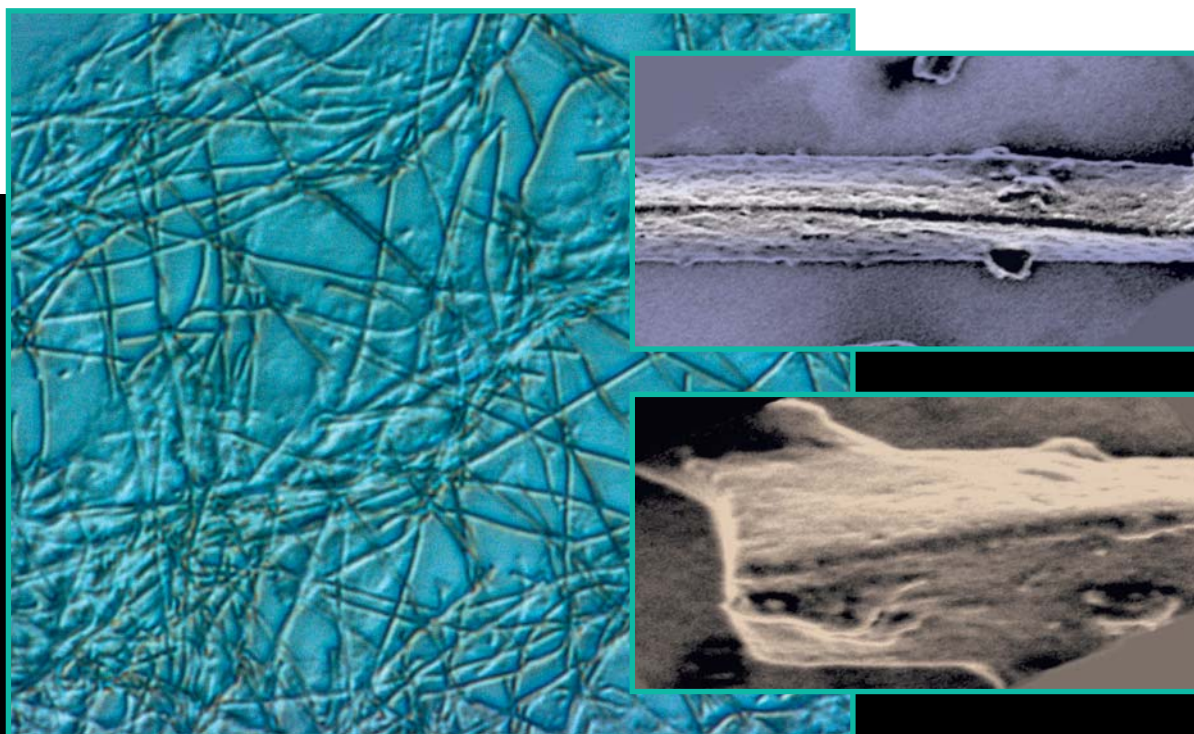


Схема структуры фермента силикатеина и его гена. Серым и черным цветом выделены аминокислотные последовательности, отщепляемые в процессе созревания белка

Литература

Itskovich V. B., Belikov S. I., Efremova S. M., Masuda Y. *Phylogenetic relationships between Lubomirskiidae, Spongillidae and some marine sponges according partial sequences of 18S rDNA* // *Memoire of the Queensland Museum* 1999, № 44. P. 275–280.

Schröder H. C., Efremova S. M., Itskovich V. B., Belikov S. I., Masuda Y., Krasko A., Müller I. M., Müller W. E. G. *Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal* // *J. Zool Syst Evol Research*, 2003, № 41. P. 80–86.

Kaluzhnaia O. V., Belikov S. I., Schröder H. C., Wiens M., Giovine M., Krasko A., Müller I. M., Müller W. E. G. *Dynamics of Skeleton Formation in the Lake Baikal Sponge Lubomirskia baicalensis. Part II. Molecular Biological Studies* // *Naturwissenschaften*; 2005, № 92(3). P. 134–138.

Достижения в биотехнологии кремния обязаны своим происхождением научному триумвирату, который составили молекулярные биологи из Майнца, лимнологи из Иркутска и, наконец, главный партнер — само Озеро, уникальный биотоп, в котором благодаря растворенному кремнию сохранились и эволюционировали одни из самых древних и удивительных водных животных.

Именно Байкал, пресноводное сибирское «море», послужил устойчивой основой современного русско-немецкого сотрудничества

в русле давних, в том числе академических, традиций. Еще в XVIII в. известный немецкий натуралист и путешественник, участник Второй Камчатской экспедиции И. Гмелин (1751) писал: «В России нет ни одного города, куда бы не приезжали люди и не привозили свои товары для обмена».

Времена изменились, но ученые из Германии и теперь, подобно Гмелину, приезжают в Россию и далекую Сибирь — уже не для разведки «земли неизвестной», но для совместной работы в области высоких технологий.

Если силикатеин инкубировать вместе с мономерным кремнием, то на его нитях благодаря ферментативной активности начинает откладываться полимерный кремнезем. Этот процесс можно легко наблюдать в световой микроскоп

