

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Adam Šmída

Silicifikace rozsivek z buněčného, evolučního a ekologického hlediska

Silicification of diatoms from a cellular, evolutionary and ecological point of view

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Jana Kulichová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 8. 2020

.....

Poděkování

Velké díky patří mé školitelce, Janě Kulichové, za laskavý přístup, smysl pro detail, a především velkou trpělivost.

Abstrakt

Rozsivky jsou významnou skupinou protist a již od dob svého popsání na konci 18. století upoutávají lidskou pozornost svými rozmanitými křemičitými schránkami. Výzkum mechanismu vzniku morfologicky variabilních schránek co do tvaru a ornamentace je víceméně znám na ultrastrukturní úrovni, avšak studium silicifikace buněčných stěn na molekulární úrovni byl metodicky umožněn až poměrně v nedávné době. Poznatky o syntéze křemičité schránky v oblastech molekulární biologie a genomiky lze dále využít pro pochopení obecného buněčného zacházení s organickým křemíkem a objasnění evolučního významu a vývoje tohoto fenoménu.

Klíčová slova: biomineralizace, LPCAs, nanostruktura, SDV váček, silafiny, silicifikace, transportéry křemíku, rozsivky

Abstract

Diatoms are a significant protist group. They've been getting a lot of attention because of their various silica cell walls since their discovery at the end of the 18th century. Even though the mechanism of the morphologically variable cell wall synthesis is well known in terms of shape and ornamentation, only recently it has been enabled to investigate the diatom silicification on the molecular basis. The knowledge of the silica cell wall synthesis can then be used to understand general aspects of biosilica handling and to enlighten the possible evolutionary substance and the progress of this phenomenon.

Key words: biomineralisation, diatoms, long chain polyamins, nanostructure, silaffins, silica transporters, silica deposit vesicle, silicification

OBSAH

1	Úvod	1
2	Příjem křemíku	3
2.1	Forma a vlastnosti křemíku.	3
2.2	Silikonové transportéry	3
2.3	Prvotní funkce SIT a evoluce příjmu křemíku	5
2.4	Homology SIT	6
2.5	SIT napříč skupinou eukaryota	7
3	Ukládání křemíku	8
3.1	SDV	8
3.2	Vliv cytoskeletu	9
4	Organické komponenty frustuly / morfogeneze nanostruktur	10
4.1	Silafiny	10
4.2	LCPAs.	12
4.3	Vytváření nanostruktury	13
4.4	Nanostruktura a salinita	14
5	Další organické složky spojené s frustulou	14
5.1	Frustuliny	14
5.2	Pleuraliny	14
5.3	Chitin	15
6	Potenciál využití znalostí mechanismu vytváření schránky	16
7	Závěr	17
8	Reference	18

1 Úvod

Rozsivky jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy s kosmopolitním rozšířením. Jsou všudypřítomné v planktonu i bentosu oceánů, sladkovodních prostředích, v půdě nebo ve vlhkých terestrických habitatech (Lee, 2018). Četnost skupiny se odhaduje okolo 10^5 druhů (Mann & Vanormelingen, 2013). Až na výjimky několika druhů z rodů *Nitzschia* nebo *Hantzschia* obsahují fotosyntetický pigment a živí se autotrofně. Díky jejich vysoké rychlosti dělení a schopnosti tvořit kolonie i při nízkých hladinách živin jsou schopné dominovat fytoplanktonu. Díky vysokému zastoupení v mořích jsou rozsivky jedny z hlavních producentů kyslíku na planetě, jejichž každoroční výroba organického uhlíku vyprodukovaná fotosyntézou se vyrovná součtu produkce všech terestrických deštných pralesů (Nelson et al., 1995). Na takto vyprodukovaném organickém uhlíku je v mořích závislá řada organismů z vyšších stupňů trofické pyramidy (Strom et al., 2001). Malá část organické hmoty přesto unikne konzumaci a dopadne na mořské dno, kde se stává součástí sedimentu. Horniny vzniklé z odumřelých částí rozsivek lze často používat jako cenné indikátory abiotických podmínek, které panovaly v daném území při vzniku sedimentů (Stoermer & Smol, 2001). Analýza druhové skladby rozsivek se také využívá ve vodním hospodářství, kde lze určit kvalitu vody podle abundance druhů rozsivek ze vzorku z řeky či vodní nádrže (Lobo et al., 2016).

Svým protoplastem se rozsivky nikterak zásadně neliší od ostatních eukaryotických řas. Jejich unikátním znakem je buněčná stěna tvořící schránku tak zvanou frustulu. K její stavbě používají oxid křemičitý, materiál hojně využívaný pro biomineralizaci napříč všemi hlavními skupinami eukaryot (Knoll & Kotrc, 2015). U některých druhů rozsivek je křemík zastoupen v 60 % z celkové sušiny (Lund, 1965). Schránka je druhově specifická a skládá se ze dvou částí, z horní valvy a nepatrně menší dolní valvy. Obě valvy jsou navíc doplněny vlastní sadou několika pleurálních proužků, které vyplňují prostor mezi valvami. Celá schránka do sebe velmi těsně zapadá, tudíž proudění materiálu přes stěnu se děje převážně skrze póry a štěrby v samotných komponentech schránky (Round et al., 1990).

S životem s křemičitou schránkou, jejíž poloviny do sebe zapadají podobně jako Petriho misky, se vyvinula pozoruhodná strategie rozmnožování. Většinou se tak děje asexuálně, kdy se po cytokinezi oddělí jednotlivé valvy mateřské buňky a obě si dosyntetizují spodní část schránky. Díky tomuto unikátnímu mechanismu se vždy jedna z dceřiných buněk zmenší oproti původní mateřské a dochází k postupnému zmenšování velikosti v rámci populace (Jewson, 1992). Vegetativní dělení pak dojde do určité fáze, kdy je dosaženo limitní velikosti, a k obnovení velikosti je potřeba reprodukce sexuální (Edlund & Stoermer, 1997).

Kromě křemíku obsahuje buněčná stěna také organický materiál, který formuje tenkou vrstvu elementů schránky a pomáhá je držet pospolu. Okraje buněk se při pozorování světelným mikroskopem jeví rozostřené, což je způsobeno vrchní vrstvou polysacharidů, kterou pravděpodobně sekretují všechny rozsivky. Míra produkce se liší napříč druhy. Může napomáhat při adhezi k substrátu či k napojení na další jedince, a tím vytvářet kolonie (Round et al., 1990).

Lze předpokládat, že rozsivky vděčí za svou současnou úspěšnost z velké části právě evolučnímu vývoji schránky. Dokázaly vyvinout nesčetné variace přizpůsobení se svým biotopům. Pevná a odlehčená architektura schránky tvořena převážně křemíkem pomáhá mechanicky chránit protoplast proti nežádoucím vlivům prostředí i patogenům nebo útoku predátorů (Pančić et al., 2019). Experimenty ukázaly vysokou pevnost v tlaku – srovnatelnou s hutnou kostní tkání (20GPa) – a opětovné nabytí původního tvaru bez plastické deformace (Hamm et al., 2003). Obdobná poréznost napříč druhy nabádá k hypotéze o záměrném nepropouštění částic většího průměru než jsou bakterie či viry. Mírou silicifikace mohou buňky ovlivnit svou denzitu a tím měnit svou polohu ve vodním sloupci (Raven & Waite, 2004). Rozsivky si tvarováním plazmalemy kolem vnitřní strany schránky napomáhají přežít v oligotrofních vodách. Zvyšují tím poměr povrchu membrány k objemu samotné buňky a rostou efektivněji absorpcí živin z prostředí. Rozsivce se tak dostává výhody nad jinými jednobuněčnými organismy, které často formují energeticky méně výhodný tvar – kouli (Round et al., 1990). V neposlední řadě schránka disponuje určitými optickými vlastnostmi, které mění rysy paprsku světla (De Stefano et al., 2007; Fuhrmann et al., 2004). Mohly by tak získat lepší kontrolu nad dostupností světla, která je v oceánu často velmi limitující.

Tato rešerše se zabývá hospodařením s křemíkem u rozsivek. Popisuje jeho cestu od příjmu buňkou z okolí po zakomponování do buněčné stěny pomocí interakcí s makromolekulami. Znalosti o buněčných procesech jsou doplňovány ekologickým a evolučním kontextem. Cílem bakalářské práce bude propojit již známé poznatky o vzniku schránek rozsivek s novými poznatky z oblasti molekulární biologie a genomiky.

2 PŘÍJEM KŘEMÍKU

2.1 Forma a vlastnosti křemíku.

Sušina rozsivky je převážně tvořena křemíkem a je přímo závislá na jeho dostatečné koncentraci v okolním prostředí. V zemské kůře je křemík hojně zastoupený ve formě oxidu křemičitého (SiO_2) a po rozpuštění ve vodě se z něho nejčastěji stává kyselina orthokřemičitá ($\text{Si}(\text{OH})_4$) (Iler, 1979). Její dostupnost má v moderních oceánech silný dopad na distribuci a výskyt rozsivek, jelikož právě ony nejvíce přispívají k syntéze bigenního křemíku (Tréguer et al., 1995). Její rozpustnost je v neutrálním pH limitována hranicí okolo 2 mM. Míra koncentrace křemíku se však mění jak s polohou stanoviště, tak s hloubkou vodního sloupce. U hladiny často dochází k vyčerpání $\text{Si}(\text{OH})_4$ a směrem ke dnu koncentrace pomalu roste až k hodnotě 160 μM (Nelson & Goering, 1978).

Při vegetativním dělení je vytvoření valvy pro sebe i dceřinou buňku povinný krok, který je pevně spojený s životním cyklem buňky. Přesto, že rozsivky následují klasický průběh eukaryotického buněčného cyklu, depozice křemíku je jeho nedílnou součástí a při jeho deprivaci dochází k pozastavení cyklu (Round et al., 1990). Na rozdíl od ostatních eukaryotických buněk, u rozsivek se dceřiné buňky po cytokinezi hned neodpojí. Po čas zahájení a vytváření nové dceřiné hypovalvy v SDV jsou stále spojené frustulou původní buňky. Až po exocytóze nové křemičité desky dojde k jejich odpojení. Zatímco tento element schránky má dané své místo vzniku v buněčném cyklu rozsivky, syntéza postranních pásků se druh od druhu liší (Round et al., 1990).

Amorfní křemík vzniká složitou anorganickou polymerizací, při které se na sebe napojují jednotlivé monomery $\text{Si}(\text{OH})_4$. Výsledkem jsou kulovité částice koloidního křemíku o velikosti několika desítek nanometrů. Ty se při nízkém pH na sebe navzájem napojují, a tím vzniká rozsáhlá a hustě větvená makromolekula tvořící gelovou síť (Iler, 1979). Právě takovou síť lze pozorovat jako jednu z častých morfologií křemíku při výstavbě schránky a je to jeden z prvních kroků přeměny rozpustného křemičitanu v rigidní strukturu – opál. Podobného efektu, kdy se vytváří gelové sítě, lze dosáhnout snížením pH uvnitř buněk rozsivek (Hildebrand et al., 2006).

2.2 Silikonové transportéry

Samotná nenabitá molekula kyseliny křemičité je schopná volně procestovat přes membránu pomocí difuze. Stane se tak ale pouze v prostředí s vysokou koncentrací kyseliny v roztoku.

¹ Přesné chemické vysvětlení procesu polymerizace je mimo rámec této rešerše.

Jelikož se v běžném vodním prostředí hodnoty koncentrace Si(OH)_4 pohybují mnohem níže, musí si buňky pomoci membránovými přenašeči (Tréguer et al., 1995). Při detailním sledování mořské rozsivky *Cylindrotheca fusiformis* byly rozpoznány geny, které se exprimovaly při nedostatku křemíku v roztoku a zároveň jejich přepis buňka zastavila při doplnění koncentrace živin na úroveň, kdy je molekula Si(OH)_4 schopna projít přes membránu volně difuzí (Hildebrand et al., 1998). Jednalo se o rodinu genů, která svou DNA sekvencí nebyla zatím podobná ostatním známým genům. Všechny studované geny obsahovaly 10 transmembránových úseků – motiv vyskytující se běžně u proteinů lokalizovaných na membráně, kde se podílejí na transportu molekul do buňky nebo do buněčných kompartmentů (Hildebrand et al., 1997). Tyto proteiny byly označeny za přenašečové a pojmenovány jako silikonové transportéry (SIT).

Důležitou doménou SIT proteinu je značně konzervovaný transmembránový úsek tvořený deseti smyčkami. Předpokládá se, že hlavní roli hrají úseky aminokyselin obsahující cystein, který je známý svou vazbou na křemík (Lewin, 1954). C-terminální doména transportérů je méně konzervovaná napříč druhy, ale i na tomto konci proteinu se zachovává určitá pravděpodobnost tvaru. Je zde vyšší výskyt coiled-coil struktury, což naznačuje možnost interakce s jinými proteiny nebo s dalšími SIT. Již na začátku 80. let minulého století byla zaznamenána nezbytnost sodíku v médiu pro transport křemíku (Bhattacharyya & Volcani, 1980). Při absenci sodných iontů v roztoku totiž nedocházelo k navázání křemíku vůbec, ale při absenci křemíku se sodík na přenašeč vázal. Lze tvrdit, že je tento přenos aktivně poháněn gradientem sodných iontů a SIT se chovají jako symportery v poměru 1:1 s Si(OH)_4 (Bhattacharyya & Volcani, 1980; Knight et al., 2016). U sladkovodních rozsivek se pravděpodobně se sodíkem transportuje ještě draslík (Sullivan, 1976).

Hypotézu o SIT symporteru podporuje studie provedená na populaci druhu rozsivky *Cyclotella meneghiniana*, která byla kultivována v médiích se stejným obsahem rozpuštěného křemíku s jedinou změnou v obsahu NaCl (Tuchman et al., 1984). I zde se projevil fakt, že dostupnost sodných iontů ovlivňuje silicifikaci. V mořském prostředí byla kinetika příjmu mnohem účinnější a rychlost růstu populace se blížila maximu i při velmi nízkých jednotkách koncentrace křemíku v médiu ($0,05 \mu\text{M}$), které byly na hranici detekčního limitu chemické analýzy.

² Jedná se o strukturu proteinu, kdy jsou do sebe stočené dva či více alfa helixů (Liu et al., 2006).

2.3 Prvotní funkce SIT a evoluce příjmu křemíku

Není zcela jasné, jakou roli tyto proteiny prvotně hrály. Koncentrace biogenního křemíku se od kambria až po konec druhohor v mořích udržovala na mnohonásobně vyšší úrovni – asi 1000 μM (Conley et al., 1989). Při takových hodnotách se křemík dostává do buňky volnou difuzí. Původní využití SIT proteinu by mohl paradoxně být pro pohyb molekuly Si(OH) opačným směrem – z buňky ven. Vysoký obsah křemíku totiž iniciuje jeho samovolnou polymerizaci, a to pro buňku může znamenat riziko (Iler, 1979). Volný křemík by se v cytoplazmě navázal na proteiny a výrazně narušil buněčný metabolismus (Martin-Jézéquel et al., 2000).

Pro objasnění počátku příjmu křemíku je nutné dohledat fosilní záznamy počátků celé skupiny a zasadit je do kontextu environmentálních podmínek, které byly za jejich existence. Datovat samotný vznik rozsivek není snadné, jelikož fosilie z období staršího než křída jsou často neúplné a jejich interpretace by mohla být chybná. Fosilní záznamy schránek rozsivek naznačují, že předci rozsivek pocházeli z moří (Kooistra et al., 2007). Důkazem jsou pro to bohatá ložiska křemičitých schránek a jejich úlomků z období spodní křída (110 Mya) (Gersonde & Harwood, 1990). Převážně se jednalo o centrické druhy s vysokou mírou křemíku ve schránce, které jsou již z velké části v současnosti vyhynulé. Od tohoto období došlo k několika významným zvýšením hladiny oceánu a zaplavením pevniny (Sims et al., 2006). Při těchto událostech, které často trvaly i několik milionů let, měly mořské druhy možnost osídlit a postupně se adaptovat na sladkovodní život. Opakovaně se tvořila a zanikala nová tělesa sladkých vod. Uvádí se, že pro vytvoření nového druhu stačí rozsivkám 4000 let (Theriot et al., 1992). To jim dává dostatek času se adaptovat na nové prostředí a postupně ho kolonizovat.

Kvůli skupinám organismů mineralizujícím křemík jako jsou radiolaria, silikoflageláti a křemičité houby klesla u hladiny koncentrace dostupného křemíku. Současná hodnota se pohybuje okolo 2 μM nejspíše již od kenozoika. Křemičité houby, které nejsou limitovány dostupností světla, reagovaly na úbytek křemíku přesunutím do hlubin, kde o něj není taková kompetice. Radiolaria, stejně jako rozsivky, zase upustily od vyšších nároků na dostupnost křemíku (Lazarus et al., 2009). Současná průměrná hodnota dostupného křemíku v oceánech se nápadně shoduje s minimem růstové hodnoty rozsivek, což nabízí tvrzení, že rozsivky nejen regulují dostupnost tohoto prvku v ekosystému, ale zároveň také limitují samy sebe a svou úspěšnost (Yool & Tyrrell, 2003).

Otázku, jak silicifikace vlastně začala a k čemu prvotně sloužila, nelze snadno zodpovědět. Křemík v podobě hydroxylovaného křemene se považuje za povrch hrající klíčovou roli při vzniku života (Hench, 1989). Takový substrát vytváří příznivé podmínky pro polymerizaci a agregaci biomerů. Jedna z teorií (Medlin, 2002) hovoří o využití dostupného rozpuštěného křemíku v okolí jako o anorganickém enzymu zastupujícím bioaktivní povrch, který mohl pomáhat buňce s metabolickými procesy. Pokud křemík prošel dál endomembránovým systémem až do vakuoly, mohl zde vlivem nízkého pH začít polymerizovat. V amorfním stavu křemík již nebyl pro buňku aktivním povrchem a byl exocytován ven přes membránu, na místo současné křemičité schránky. Podoba prvotních exocytovaných struktur mohla být ve formě křemičitých šupin a to u klidových stádií buňky (Mann & Marchant, 1989). Hypotézu podporuje fakt, že existují druhy centrických rozsivek, u kterých se vyskytují křemičité šupiny, a to v buněčné stěně auxospory – jedná se o speciální formu buňky rozsivky spojovanou často se sexuálním rozmnožováním (Round et al., 1990). Šupiny jsou v tomto stádiu uspořádané radiálně a centricky. Připomínají architekturu valvy vegetativní buňky rozsivky. Mohlo by se jednat o artefakt původního uspořádání křemíku po exocytóze, přičemž se šupiny přetvarovaly na dvě valvy a sérii bočních pásků během evoluce (Mann & Marchant, 1989).

2.4 Homology SIT

Rosivky si vyvinuly hned několik druhů transmembránových přenašečů křemíku. Na cytoplazmatické membráně rozsivek bylo objeveno nejméně pět homologů takovýchto přenašečů (Hildebrand et al., 1997). Přesto, že se liší svojí kapacitou přenosu i lokací, jsou všechny homology exprimovány koordinovaně ve stejný čas (Hildebrand et al., 1998). Využitím analýzy fragmentů DNA byla ověřena přítomnost homologů SIT v dalších druzích rozsivek. Testu byly podrobeny různé fylogeneticky blízké i vzdálené druhy žijící v moři i ve sladké vodě (Thamatrakoln et al., 2006). Přítomnost vícero genů SIT byla potvrzena ve všech druzích. Tím se utvrzuje hypotéza, že SIT přenašeče byly přítomné již u evolučně nejstarších linií rozsivek.

Důvodů, proč se rozsivka nespokojí jen s jedním přenašečem, může být několik. Změny menších úseků aminokyselin u homologů mohou vyústit ve změně afinity či přenosu silikátu. Jeden typ by mohl mít nízkou afinitu s vyšší kapacitou. Tento typ je vhodný pro prostředí, kde je křemíku dostatek. Zatímco druhý typ transportéru s opačnými vlastnostmi by se uplatnil v roztoku s nízkou koncentrací křemíku, kde je potřeba vysoká citlivost na vychytávání dané molekuly (Hildebrand et al., 1998). Při důkladnějším zkoumání exprese genů transportérů lze pozorovat o několik řádů nižší výskyt mRNA genu pro SIT3. Byla navržena hypotéza o

potenciálním senzoru křemíku, pomocí kterého by buňka vyhodnocovala, zdali je dostatek materiálu v jejím okolí na výstavbu schránky (Thamatrakoln & Hildebrand, 2007). Provedená studie nicméně nevyklučuje funkční nadbytečnost některých genů.

Míra exprese není jediná možnost, jak může rozsivka regulovat příjem křemíku z prostředí. Často dochází k přemístování již existujících proteinů a přenašeče cyklují mezi plazmatickou membránou a vnitrobuněčnými kompartmenty podle aktuální potřeby křemíku (Thamatrakoln & Hildebrand, 2007).

Pozdější studie začaly dělit homology SIT dle rekonstrukce fylogeneze. Přenašečové klády C a D byly detekovány ve všech skupinách rozsivek, zatímco klád A je monofyletický a specifický pouze pro rozsivky penátní (Durkin et al., 2016). Klád B byl umístěn na bázi větvení a je považován za prvotní přenašeč, který se pravděpodobně vyvinul ještě při vysoké koncentraci křemíku v mořích. Za takových environmentálních podmínek rozsivka nevyžadovala aktivní příjem silikátu z okolí a SIT protein mohl hrát roli až při transportu přes membránu vnitřních specializovaných kompartmentů, kde se křemík ukládá (Durkin et al., 2016). Tvrzení, že přenašeče SIT B byly prvotní, navíc posiluje nálezná DNA sekvence u sinice *Synechococcus*, která je podobná sekvenci proteinů SIT (Baines et al., 2012). Přestože není objasněno, k čemu tento protein sinici slouží, obsahuje 5 obdobných transmembránových úseků. V buňce sinice byla také pozorována vysoká koncentrace křemíku. Mohlo by se jednat o gen, jehož předchůdce byl přenesen z bakterie na předka superskupiny SAR a odtud pak mezi rozsivky.

2.5 SIT napříč skupinou eukaryota

Naopak jiný výzkum favorizuje hypotézu, že geny křemičitých transportérů měl již poslední předek eukaryot a horizontální genový přenos označuje za méně pravděpodobný (Marron et al., 2016). Rozsivkové geny SIT se totiž objevují také v eukaryotických vzdálených skupinách Haptofyta a Choanoflagelata (Durak et al., 2016; Marron et al., 2013). Naznačuje, že jejich původ zasahuje hluboko do vývojových větví eukaryot a později docházelo jak k jejich duplikacím³, tak k hromadným ztrátám i u příbuzných vývojových větví⁴. Příčinou masivní ztráty genů by mohla být společná změna environmentálních podmínek v podobě poklesu koncentrace rozpuštěného křemíku v mořích na přelomu druhohor a třetihor. Druhy, které neměly svůj životní cyklus s křemíkem těsně spjatý, od silicifikace upustily a geny pro přenašeč ztratily. Nicméně, pokles koncentrace rozpuštěného křemíku znamenal pro rozsivky ještě větší

³ Pravděpodobně duplikací přenašeče křemíku výše zmíněné sinice *Synechococcus* vznikl přenašeč rozsivek, haptofyt a choanoflagelátů.

⁴ Příkladem je rod *Bolidomonas*, který ač je rozsivkám sesterskou skupinou, křemičitou schránku si nevytváří (Guillou et al., 1999).

nárůst diverzity a stávají se hlavními kontroléry koncentrace Si(OH) . Do té doby ovládali koncentraci mřížovci společně s křemičitými houbami (Siever, 1992).

Za poslední dekádu získaly transportéry křemíku značnou část pozornosti. SIT jsou první objevené proteiny reagující specificky na křemík a další výzkum přenašečů u rozsivek může nabídnout vzhled do obecné problematiky interakce proteinů s tímto prvkem.

3 UKLÁDÁNÍ KŘEMÍKU

3.1 SDV

Cesta intracelulárního transportu od transmembránových přenašečů do nitra buňky ještě není objasněna. Ať už putuje cytoplazmou pomocí proteinů nebo volnou difuzí, skladuje se ve váčcích, tzv. SDV (silica deposition vesicles). Membrána obepínající tento váček se nazývá silikalema. Každý komponent frustuly – valvy a pleurální pásy – se vytváří ve svém samostatném SDV váčku. Probíhá tu prvotní polymerizace křemíku, kdy je váček malý a zabírá jen zlomek místa v buňce (Round et al., 1990). Při navyšování množství křemíku ve váčku se začíná rozpínat. Ontogeneze tvaru vznikajícího váčku je druhově specifická a liší se v závislosti na typu křemičitého komponentu. Jsou zde jisté trendy postupů morfologického vývoje schránky u rozsivek podobného tvaru. Nemusí být ale pravidlem. U valvy centrické rozsivky se SDV často vytváří ve středu budoucí desky. Tvaruje se do tělesa podobného malému disku s žebrovitými výběžky a radiálně se rozpíná. Vytvoří se tak základní povrch určující strukturu v rovině x a y. V ní už jsou předurčeny unikátní útvary, například prekuzory otvorů pro sekreci chitinových fibril (fultoportulae). V tomto mezistádiu není ještě schránka dostatečně silifikovaná a je velmi ohebná. Přidáváním dalších vrstev se navyšuje její okraj a získává tak robustnost. U penátních rozsivek je proces obdobný, jen se nejprve jako forma valvy vytváří podlouhlé trubičkovité SDV. Posléze dojde k jeho zploštění a vytváří se po stranách zpeřený vzor (Round et al., 1990).

Důvodem oddělení výstavby komponentů schránky od protoplazmy je možnost výrazně změnit kyselost prostředí. Je známo, že snížení hodnoty pH je významným spouštěčem srážení křemíku (Iler, 1979). Rozsivka je schopna si post-translačně upravit proteiny důležité pro

silicifikaci, aby v kyselém kompartmentu fungovaly (Nils Kröger et al., 2002). Vyšší pH cytoplazmy oproti SDV váčku zamezuje případnému srážení křemíku přímo v cytoplazmě.

Při bližším pohledu za pomoci skenovací elektronové mikroskopie lze pozorovat opakující se detailní vzory na vnitřní i vnější straně schránek. Jedná se o perforace nebo štěrby vyplňující prostor mezi žebry. Umožňují průchod molekul skrze schránku a zároveň slouží jako boční propojení jednotlivých žebër. Schránka tak získává podporu a zároveň díky otvorům a mezerám je odlehčená. Výstavba probíhá nejen dvojrozměrně, ale i do hloubky (Schmid et al., 1981). U rozsivky rodu *Thalassiosira* se jednotlivé štěrby oddělí stěnami s půdorysem ve tvaru šestistěnu – struktura připínající konstrukci včelích pláství (Obr. 1).



Obr. 1– Schéma morfogeneze valvy rozsivky *Thalassiosira pseudonana* (Round et al., 1990)

3.2 Vliv cytoskeletu

Konečná forma elementu frustuly je ovlivněna nesčetnými vlivy, které působí zevnitř i vně váčku. Další důvod, proč je pro rozsivku vhodné vytvářet křemičité struktury v oddělených kompartmentech, může být snadná manipulace pomocí cytoskeletu (Pickett-Heaps et al., 1990). Cytoskelet umožňuje organizovat a udržovat rozestavení organel na dlouhé vzdálenosti. Je tomu tak i v případě syntézy schránky. Bylo vypořádáno, že centralizaci zárodku SDV váček mají na starosti mikrotubuly (Pickett-Heaps et al., 1990), jelikož při použití cytoskeletárních inhibitorů byla narušena správná funkce mikrotubulů a vytvářely se valvy deformované nebo výrazně odlišně tvarované (Cohn et al., 1989). Mikrotubuly se nacházejí podél žebrovitých výběžků. Váčku dodávají pevnost a účastní se jeho celkového tvarování (Van de Meene & Pickett-Heaps, 2002). Aktinová vlákna se zase nacházejí přímo v místě aktivní silicifikace. Nejspíše pomáhají tvarovat váček na detailnější úrovni působením na tvar jeho membrány – a tedy i na samotnou křemičitou hmotu, kterou silikalema těsně obepíná. Aktin je lokalizovaný ve vznikající valvě i v postranních proužcích, které valvy spojují, a naznačuje tím svou nepostradatelnost při formaci schránky (Mark Hildebrand et al., 2009). Mohl by se také podílet na expanzi a morfogenezi SDV podobně jako se podílí na údržbě cisteren Golgiho aparátu –

zde zachovává zploštělý tvar a zamezuje vzdouvání a vlnění způsobené akumulací vysokých koncentrací osmolytů. Podobný stres by mohl panovat v SDV váčcích, které jsou napěchované křemíkem (Tesson & Hildebrand, 2010).

Aby si rozsivky dokázaly své schránky vytvářet rychle a s vysokou přesností, musí formace složitých komponentů schránky podléhat určité hierarchii. V materiálové vědě existuje základní koncept který se týká primární úrovně kontroly nad výstavbou struktur (Tesson & Hildebrand, 2010). Výše popsaná úloha cytoskeletu při syntéze schránky by se dala označit za přístup top down, kdy je použita makrostruktura na vytvoření menších detailů. Opačný přístup bottom up používá sestavování malých molekul k formování větších struktur. Právě takových molekul, které interagují s křemíkem bylo objeveno u rozsivek již několik. Jejich existence byla odhadnuta dopředu, jelikož podle naměřených vysokých hodnot koncentrací křemíku v buňce bylo zřejmé, že se křemík musí vázat na jiné molekuly a vytvářet s nimi komplexy (Lewin et al., 1958).

4 ORGANICKÉ KOMPONENTY FRUSTULY/ MORFOGENEZE NANOSTRUKTUR

Mimo transport a uložení křemíku v SDV ovlivňují výrazně morfogenezi a konstrukci rozsivek proteiny a jiné makromolekuly. Právě v jejich přítomnosti se křemík začíná srážet a přetvářet na pevnou strukturu.

4.1 Silafiny

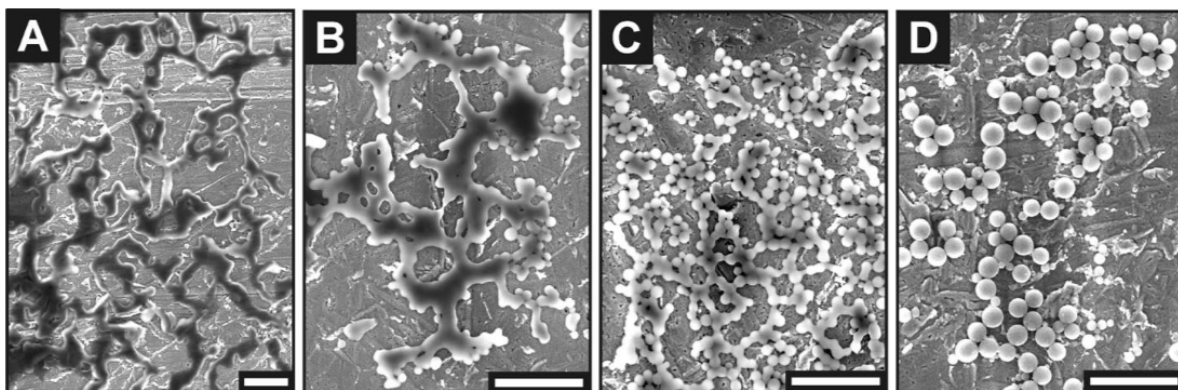
První z objevených proteinů, které přímo asistují při formaci křemíku, jsou silafiny (podle anglického high affinity to silica) izolované z rozsivky *Cylindrotheca fusiformis* (Nils Kröger et al., 1999). Jedná se o opakující sekvenci 15–22 peptidů obohacených o lysin a serin. Zjištění kompletní struktury silafinů předcházela rozsáhlá chemická analýza, jelikož obsahují četné a neobvyklé post-translační modifikace (Nils Kröger et al., 1997, 1999). Nejčastěji jsou úseky s lysinem modifikované metylací a přidáním polyaminů. Serin zase prochází fosforylací (Nils Kröger et al., 2002). Tyto modifikace silafinům propůjčují pozitivní i negativní náboj v různých částech molekuly, díky kterému se dokáží samovolně seskupovat pomocí elektrostatických interakcí (Sumper & Brunner, 2006). Vzniknou tím velké agregáty, které jsou nezbytné pro biomineralizaci křemíku. Analýza genu kódující silafin naznačuje, že se nejprve vytvoří velký repetitivní protein a je dále proteolyticky štěpen (Poulsen & Kröger, 2004).

Při mezidruhovém porovnání silafinů se ukázalo, že jejich sekvence překvapivě nejsou napříč druhy nijak vysoce konzervované (Poulsen & Kröger, 2004). Žádný z identifikovaných silafinů

rozsivky *Thalassiosira pseudonana*, nevykazují sekvenční homologii s *Cylindrotheca fusiformis*. Konzervované, a tedy funkčně esenciální, se zdá být pouze složení specifických aminokyselin a jejich modifikace (Sumper & Brunner, 2006), jelikož silafiny zbavené fosfátů nevyvolávají tvorbu křemičitých struktur *in vitro* (Nils Kröger et al., 2002). Nefunkční byly také silafiny bez polyaminů, které ztratily schopnost srážet křemík v acidickém prostředí SDV váčků.

Funkce samotných silafinů a jejich podíl na morfogenezi křemíku byl studován při pokusech *in vitro* u rozsivky *Cylindrotheca fusiformis* (Nils Kröger et al., 2002). Pozorován byl roztok křemíku pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a byly zhotoveny snímky v několika minutových rozmezích. Po přidání jednoho ze silafinů označeného jako natSil-1A do roztoku křemíku docházelo k rapidní polymerizaci molekul $\text{Si}(\text{OH})_4$. Jejich vyražené množství bylo přímo úměrné množství silafinu v reakci. Jako první struktury se objevily rozsáhlé ploché větvené sítě, které nejevily žádné známky pravidelnosti či souměrnosti (Obr. 2 A). Během dalších 2 minut na okrajích plochých sítí začaly pučet koulavité výběžky (Obr. 2 B, C), které se v pozdějších fázích úplně osamostatnily a vytvořily tvar koule o průměru 400–700 nm (Obr. 2 D). Je patrné, že tuto morfologii rozsivky používají při stavbě schránky, jelikož podobné kulovité tvary křemíku lze pozorovat při detailních SEM snímcích vnitřních ploch vzniklých rozlomením schránek (Wetherbee et al., 2005).

Zatím všechny prostudované silafiny jsou vysoce fosforylované a bez jiných dalších modifikací mají katalytickou funkci. Při navyšování koncentrace v roztoku mají souvislý stimulační efekt na srážení křemíku (Nils Kröger et al., 2002). Pokud se v sekvenci objevují bohaté úseky hydroxyaminokyselin, které jsou glykosylované, mají proteiny regulativní funkci a mohou podporovat či inhibovat formaci křemíku v závislosti na jejich koncentraci. U modelové centrické rozsivky *T. pseudonana* žádný z jejích izolovaných silafinů neměl *in vitro* schopnost formovat křemík, jelikož jim chybí dlouhé řetězce polyaminů na lysinech. Pro správně srážení křemíku je nutná přítomnost dalších molekul – long chain polyamins (LCPAs).



Obr. 2 SEM snímky časosběrné analýzy morfogeneze křemíku za přidání silafinu natSil-1A v roztivce *Cylindrotheca fusiformis*. (A) 3,5 min, (B) 4,5 min, (C) 5 min a (D) 8 min. pH = 5,5. Měřítka, 2 µm. (Nils Kröger et al., 2002)

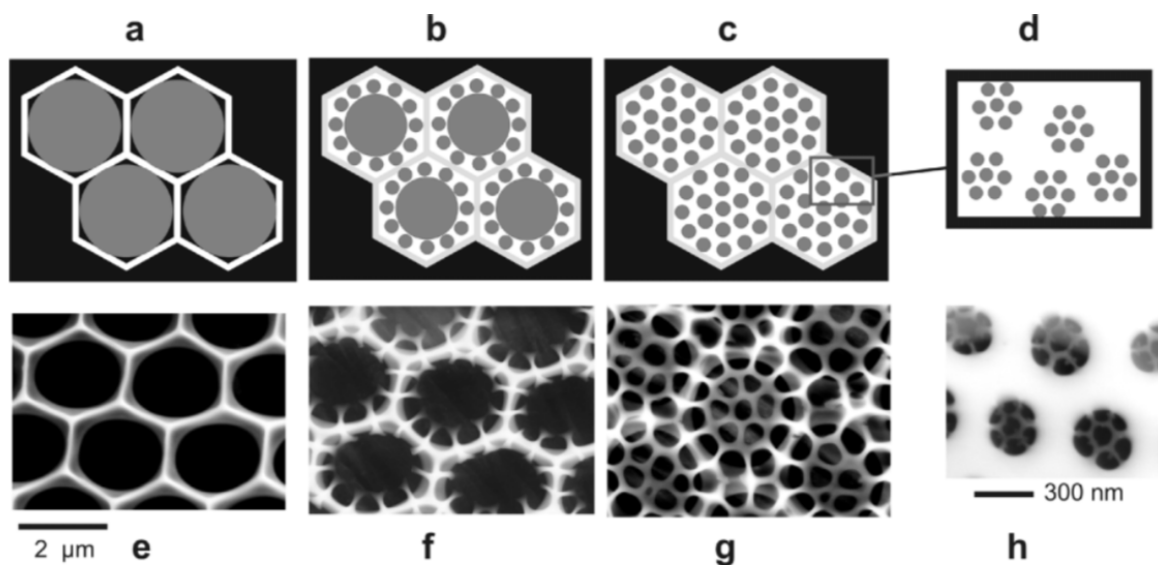
4.2 LCPAs.

Jsou to nepostradatelné komponenty při silicifikaci všech rozsivek a jsou nejhojnějšími zástupci organické složky ve schránce (Nils Kröger et al., 1999). Byly poprvé indentifikovány u rozsivky *Cylindrotheca fusiformis*. Tyto dlouhé lineární molekuly jsou zasazené do struktury křemíku a obsahují opakující se skupiny propylaminů a jejich různé modifikace. Před jejich identifikací v rozsivkách byly LCPAs identifikovány výhradně v bakteriích a archeích, převážně extrémofilech. Napříč skupinami rozsivek jsou LCPAs druhově specifické a liší se stupněm metylace, délkou postranních řetězců a pozicí sekundárních a terciálních aminů (Sumper & Brunner, 2008). Variace této molekuly může být součástí příčiny, proč jsou vzory křemičité schránky druhově specifické.

Zajímavé je ještě nedávné zjištění o interakci LCPAs s membránou SDV vaku, ve kterém se křemík v buňce ukládá (Gräb et al., 2016). Interagují s negativně nabitými molekulami fosfolipidové dvojvrstvy. Váží se na ni a dokáže je na sebe překládat, kdy vytvoří přeložení membrány na sebe samou. Několika nanometrové mezery mezi nimi vyplňují právě LCPAs, které jsou známé svou schopností stabilizovat lipidové membrány pomocí elektrostatických interakcí. Nabízí se tedy hypotéza, že tyto dlouhé molekuly pomáhají stabilizovat a kontrolovat expanzi SDV vaku podobně jako buněčný cytoskelet.

4.3 Vytváření nanostruktury

Silafiny a LCPAs hrají ve srážení křemíku klíčovou roli. Křemičité nanopartikule různých velikostí, které spolu vytváří ve in vitro experimentech, jsou ale ještě strukturně vzdálené od detailně vzorované schránky. Hypotézu o mechanismu výstavby nanostruktury valvy nabízí studie na příkladu rozsivky rodu *Coscinodiscus* (Sumper & Brunner, 2006). Vzory perforací na jejich valvě lze interpretovat jako menší šestistěny symetricky poskládané do jednoho velkého šestistěnu. Takovou hierarchickou strukturu je možné podle navržené hypotézy vytvořit za přítomnosti sítě organických kulovitých částic, které slouží jako matrice (Obr. 3). Kulovité částice tvořené silafiny a LCPAs jsou ve zploštělém SDV váčku na sebe natěsno seskupené do jedné vrstvy a ve zbylém prostoru probíhá srážení křemíku. Tento volný prostor nápadně připomíná tvar včelí plástve (Obr. 3a). Následně se snížení koncentrace přítomných fosfátů⁵ ve váčku, organické částice zmenší a změní se tak i volný prostor pro vysrážení křemíku. Tímto mechanismem lze postupně vytvořit nejdetailnější struktury jako jsou síťka v jednotlivých pórech schránky (Obr. 3 d, h.).



Obr. 3 – Zjednodušené schéma znázorňující možnou morfogenezi nanostruktur perforací valvy rozsivky *Coscinodiscus* (a-d) doplněné o snímky SEM (e-h). Šedá barva na schématu znázorňuje sférické tvary tvořené organickými molekulami. Bílá barva představuje volný prostor, ve kterém dochází ke srážení amorfního křemíku. (Sumper & Brunner, 2006)

⁵ Například silafiny je mají post-translačně přidané na serinech.

4.4 Nanostruktura a salinita

Při důkladnějším zkoumání nanostruktur schránky je zřejmé, že externí ionické síly mají vliv na formaci schránky a je možné, že se společně s příjmem křemíku dostávají do SDV váčků ionty z mořské vody. Toto tvrzení podporuje fakt, že transportéry SIT jsou pravděpodobně symportéry. Společně s Si(OH)_4 proniká do buňky také sodný iont.

Jedna z chemických vlastností křemíku v nízké salinitě spočívá ve vytváření malých partikulí, které k sobě těsněji přiléhají a vyplňují mezi sebou mezery (Boehm, 1980). Jelikož tyto partikule jsou základní stavební jednotkou všech dílů schránky, jejich velikost se také odráží na celkové morfologii a schránka se stane hutnější. Změny se nejvíce projeví na strukturách malých rozměrů jako jsou například póry. Při pokusech s *Thalassiosira punctigera* se průměry pórů o několik desítek nanometrů zmenšily (Vrieling et al., 2007). Některé póry, které již v prostředí s vyšší salinitou měly minimální průměr, dokonce i zmizely.

V místech vzdálených od pobřeží, kde se hodnota salinity běžně pohybuje okolo 30 psu, rozsivky produkují více hydratované schránky s méně kondenzovaným křemíku. Na rozdíl sladkovodní a brakické druhy mají schránky hutné a méně hydratované (Vrieling et al., 2007). Je možné, že byl tímto směrem vyvíjen selekční tlak na mořské rozsivky a byly zvýhodněny ty, které dokázaly prosperovat i v prostředí s nižším obsahem křemíku. Naopak v sladkovodních prostředí klesá koncentrace obvykle jen v průběhu léta.

Výjimkou u mořských druhů je bentos, kde k limitaci křemíku nedochází a zpravidla zde nalezneme schránky s vyšším obsahem křemíku

5 DALŠÍ ORGANICKÉ SLOŽKY SPOJENÉ S FRUSTULOU

5.1 Frustuliny

Další organickou složkou v křemičité schránce jsou frustuliny. Byly jedny z prvně objevených proteinů, které byly spojovány se silicifikací (Kröger et al., 1994). Později se ukázalo, že vytváří celistvý proteinový obal po celém povrchu frustuly. Pravděpodobně se vytváří až po ukončení silicifikace a hrají spíše roli v ochraně frustuly než při její biogenezi.

5.2 Pleuraliny

Některé proteiny se účastní syntézy jen v určitém regionu schránky. Pleuraliny jsou proteinové komponenty asociované v místě sekání horní a spodní části schránky a slouží zde jako jejich pojítka. Přesněji je to v úseku, kde starší svrchní polovina schránky – složená z komponentů horní valvy a jejich napojených pleurálních pásků – překrývá nově dosyntetizovanou menší. V každé fázi vývoje postranních elementů musí být schránka pevně spojena, aby udržovala

celistvost a chránila protoplast před vnějšími vlivy. Jen ve výjimečných případech, jako je rozmnožování, je integrita narušena – při vegetativním dělení a při sexuální reprodukci (Round et al., 1990).

Díky svému vysoce anionickému náboji, mohou být pleuraliny extrahovány až za použití kyseliny fluorovodíkové. Asociace by mohla být nadále posílněna vzájemnými kovalentními vazbami mezi molekulami nebo dalšími organickými složkami na povrchu frustuly. Podle nedávných studií bylo navrženo schéma, ve kterém se pleuraliny napojují mezi povrchové frustuliny a křemík pojící silafiny (De Sanctis et al., 2016). Pokusy s imuno-elektronovým mikroskopem potvrdily, že pleuraliny nejsou začleňovány cestou pomocí pleurálních SDV vesikulů. Do mezery mezi pleurálními páskami se dostává pravděpodobně běžnou sekretorickou drahou, která je společná pro všechny eukaryotické organismy (Nils Kröger & Wetherbee, 2000). U rodu *Pinnularia* byly pozorovány kalózové vrstvy na okraji spodních pleurálních pásků, které mizely při oddělení dceřiných buněk při vegetativním dělení (Waterkeyn & Bienfait, 1989). Mohlo by se jednat o další strukturu sloužící jako těsnění postranních pruhů. Spolu s pleuraliny by vytvářely organický komplex fungující jako spínač pro rozvolnění nebo utěsnění frustuly.

5.3 Chitin

Spousta organických molekul přítomných ve frustule hraje při výstavbě schránky nepřímou roli. Je tomu tak například v případě chitinu. Je to jeden z nejhodněji se vyskytujících polysacharidů v oceánech a geny pro jeho syntetický aparát nalezneme napříč eukaryoty, bakteriemi i archei. Chitinovou syntázu lze běžně nalézt v rozsivkách, často i v několika variantách (Durkin et al., 2009).

Chitin se zdá být evolučně úzce napojený na procesy s křemíkem. Vyskytuje se u planktonních rozsivek ve formě dlouhých tenkých řetězců, které procházejí skrze křemičitou schránku specializovanými trubičkami či póry zvanými fultoportulae (Mark Hildebrand et al., 2006). Chitinová vlákna jsou uspořádána ve vysoce krystalické formě v β -konfiguraci, kde všechny polymery leží paralelně a nevážou na sebe další molekuly (Dweltz et al., 1968). Podobné výběžky byly zaznamenány u rozsivek taktéž z křemičitanu, nicméně chitin se může jevit jako praktičtější materiál díky jeho pružnosti a nižší pravděpodobnosti ulomení (Karp-Boss & Jumars, 1998). Taková vlákna například pomáhají rozsivkám se na sebe napojit a tvořit vlákna. Při detailnějším studiu se objevily molekuly chitinu také v samotné schránce. Tvořily zde hustě větvenou navzájem propojenou síť (Brunner et al., 2009). Podobné struktury tvoří silafiny a LCPAs, chitin by tedy mohl sloužit jako organické lešení pro molekuly vážící amorfní křemík

podobně, jako se tak děje během biomineralizace u organismů s vápenatou schránkou (Arias & Fernández, 2008).

6 POTENCIÁL VYUŽITÍ ZNALOSTÍ MECHANISMU VYTVÁŘENÍ SCHRÁNKY

Rozsivky svou schránkou zaujaly vědce nejen v odvětví biologie. Pozornosti se těší také u odborníků na nanomateriály, jež podobné detailní struktury využívají například při sestavování biosenzorů (Gale et al., 2009). Pro svou nenáročnou kultivaci, tvarovou plasticitu a pravidelnost jsou rozsivky vhodnými adepty stát se levnou továrnou na nanomateriály. Podmínky pro syntézu, kterých lze experimentálně docílit s velkými energetickými nároky, si rozsivka jednoduše vytvoří ve svých SDV váčcích. Znalosti stavby schránky by mohly ulehčit sestavování miniaturních komponentů, které jsou za hranicemi schopností současné technické výroby. Jelikož křemičitá struktura vychází z genetických predispozic rozsivky, syntézy požadovaného upraveného tvaru schránky by se mohlo docílit pomocí modifikace sekvencí genů proteinů, které přímo ovlivňují rysy schránky (Hildebrand, 2008).

Ovlivnit lze nejen tvar ale také složení materiálu (Rorrer et al., 2005). Často se jednalo o variace kovů nebo polokovů vylepšující mechanické vlastnosti schránky, především odolnost a použitelnost v mnohých nanotechnologických účelech. Proběhl úspěšný pokusy metabolicky inkorporovat do křemíku vysoce odolný a lehký titan (Jeffryes et al., 2008). Nejprve se kultivované buňky nechaly vyhladovět na křemík, poté se do média opět doplnil společně s TiO₂. Titan se do schránky inkorporoval převážně do struktur vytvářených v posledních fázích silicifikace schránky. Nejvyšší koncentrace uloženého titanu se nacházely kolem pórů. Přestože pro plnohodnotné využití schránky jako polovodiče by bylo zapotřebí větší poměr titanu k celkové konstrukci, výsledná schránka se morfologicky nijak nelišila od schránky čistě křemičité. Jedná se o první případ, kdy byl použit živý organismus k vytvoření polovodičové struktury pomocí tzv. self-assembly – samovolného složení bez pomoci vnějších sil.

7 ZÁVĚR

Ačkoliv zájem o silicifikaci rozsivek neopadá a nadále jsou intenzivně studovanou skupinou, řada klíčových mechanismů při formaci křemičité schránky ještě stále není objasněna. Překvapivě je tomu tak například u cesty molekuly křemíku do SDV váčku. Také stále neobjasněné jsou naměřené koncentrace křemíku v buňce mimo SDV. Ty často přesahují hodnoty saturace rozpustného křemíku a pravděpodobně se křemík bude vázat na určité transportní proteiny. Ty jsou ale zatím neidentifikované. Nicméně, již se současnými znalostmi mechanismů silicifikace, lze tvrdit, že je to jev velmi složitý a vyžaduje komplexní znalosti molekulární biologie i genomiky. Právě využití dat ze sekvencí genomu má velký potenciál při hledání nových objevů. Nesmí se ale zapomínat zohledňovat ekologický a evoluční kontext. Morfogeneze je druhově specifická a lze se domnívat, že je řízena geneticky. Každý druh by tedy vlastnil různé mutace nebo regulační variace genů účastnících se výstavby schránky. Taková data bohužel ještě nejsou dostupná.

8 REFERENCE

- Arias, J. L., & Fernández, M. S. (2008). Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based Biomineralization. *Chemical Reviews*, 108(11), 4475–4482. <https://doi.org/10.1021/cr078269p>
- Baines, S., Twining, B., Brzezinski, M., Krause, J., Vogt, S., Assael, D., & McDaniel, H. (2012). Significant silicon accumulation by marine picocyanobacteria. *Nature Geoscience*, 5, 886–891. <https://doi.org/10.1038/ngeo1641>
- Bhattacharyya, P., & Volcani, B. E. (1980). Sodium-dependent silicate transport in the apochlorotic marine diatom *Nitzschia alba* (Na^+ gradient/ Na^+ , K^+ -ATPase/membrane vesicles) (Vol. 77, Issue 11).
- Boehm, H.-P. (1980). *The Chemistry of Silica. Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*. Von R. K. Iler. John Wiley and Sons, Chichester 1979. XXIV, 886 S., geb. £ 39.50. *Angewandte Chemie*, 92(4), 328–328. <https://doi.org/10.1002/ange.19800920433>
- Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S., & Van Pée, K. H. (2009). Chitin-based organic networks: An integral part of cell wall biosilica in the diatom *thalassiosira pseudonana*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(51), 9724–9727. <https://doi.org/10.1002/anie.200905028>
- Cohn, S. A., Nash, J., & Pickett-Heaps, J. D. (1989). The effect of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/BF01322985>
- Conley, D. J., Kilham, S. S., & Theriot, E. (1989). Differences in silica content between marine and freshwater diatoms. *Limnology and Oceanography*, 34(1), 205–212. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.1.0205>
- De Sanctis, S., Wenzler, M., Kröger, N., Malloni, W. M. M., Sumper, M., Deutzmann, R., Zadavec, P., Brunner, E., Kremer, W., & Kalbitzer, H. R. R. (2016). PSCD Domains of Pleuralin-1 from the Diatom *Cylindrotheca fusiformis*: NMR Structures and Interactions with Other Biosilica-Associated Proteins. *Structure*, 24(7), 1178–1191. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.04.021>
- De Stefano, L., Rea, I., Rendina, I., De Stefano, M., & Moretti, L. (2007). Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*. *Optics Express*, 15(26), 18082. <https://doi.org/10.1364/oe.15.018082>
- Durak, G. M., Taylor, A. R., Walker, C. E., Probert, I., De Vargas, C., Audic, S., Schroeder,

- D., Brownlee, C., & Wheeler, G. L. (2016). A role for diatom-like silicon transporters in calcifying coccolithophores. *Nature Communications*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms10543>
- Durkin, C. A., Koester, J. A., Bender, S. J., & Armbrust, E. V. (2016). The evolution of silicon transporters in diatoms. *Journal of Phycology*, 52(5), 716–731. <https://doi.org/10.1111/jpy.12441>
- Durkin, C. A., Mock, T., & Armbrust, E. V. (2009). Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryotic Cell*, 8(7), 1038–1050. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-09>
- Dweltz, N. E., Colvin, J. R., & McInnes, A. G. (1968). Studies on chitan (β -(1 → 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitan from x-ray diffraction and electron microscope observations. *Canadian Journal of Chemistry*, 46(9), 1513–1521. <https://doi.org/10.1139/v68-248>
- Edlund, M. B., & Stoermer, E. F. (1997). Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. In *Journal of Phycology* (Vol. 33, Issue 6, pp. 897–918). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00897.x>
- Fuhrmann, T., Landwehr, S., El Rharbi-Kucki, M., & Sumper, M. (2004). Diatoms as living photonic crystals. *Applied Physics B*, 78(3), 257–260. <https://doi.org/10.1007/s00340-004-1419-4>
- Gale, D. K., Gutu, T., Jiao, J., Chang, C.-H., & Rorrer, G. L. (2009). Photoluminescence Detection of Biomolecules by Antibody-Functionalized Diatom Biosilica. *Advanced Functional Materials*, 19(6), 926–933. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801137>
- Gersonde, R., & Harwood, D. M. (1990). Lower Cretaceous diatoms from ODP Leg 113 Site 693 (Weddell Sea). Part 1: vegetative cells. *Proc., Scientific Results, ODP, Leg 113, Weddell Sea, Antarctica*. <https://doi.org/10.2973/odp.proc.sr.113.127.1990>
- Gräb, O., Abacilar, M., Daus, F., Geyer, A., & Steinem, C. (2016). 3D-Membrane Stacks on Supported Membranes Composed of Diatom Lipids Induced by Long-Chain Polyamines. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02575>
- Guillou, L., Chrétiennot-Dinet, M. J., Medlin, L. K., Claustre, H., Loiseaux-de Goër, S., & Vault, D. (1999). *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *Journal of Phycology*, 35(2), 368–381. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520368.x>
- Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maiert, C., Prechtelt, K., & Smetacek, V. (2003). Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical

- protection. *Nature*, 421(6925), 841–843. <https://doi.org/10.1038/nature01416>
- Hench, L. L. (1989). Bioceramics and the origin of life. *Journal of Biomedical Materials Research*. <https://doi.org/10.1002/jbm.820230703>
- Hildebrand, M., Dahlin, K., & Volcani, B. E. (1998). Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: Sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Molecular and General Genetics*, 260(5), 480–486. <https://doi.org/10.1007/s004380050920>
- Hildebrand, Mark. (2008). Diatoms, Biomineralization Processes, and Genomics. *Chemical Reviews*, 108(11), 4855–4874. <https://doi.org/10.1021/cr078253z>
- Hildebrand, Mark, Kim, S., Shi, D., Scott, K., & Subramaniam, S. (2009). 3D imaging of diatoms with ion-abrasion scanning electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 166(3), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.014>
- Hildebrand, Mark, Volcani, B. E., Gassmann, W., & Schroeder, J. I. (1997). A gene family of silicon transporters [5]. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/385688b0>
- Hildebrand, Mark, York, E., Kelz, J. I., Davis, A. K., Frigeri, L. G., Allison, D. P., & Doktycz, M. J. (2006). Nanoscale control of silica morphology and three-dimensional structure during diatom cell wall formation. *Journal of Materials Research*, 21(10), 2689–2698. <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0333>
- Iler, R. K. (1979). *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*. Wiley. <https://books.google.cz/books?id=Dc0RAQAIAAJ>
- Jeffryes, C., Gutu, T., Jiao, J., & Rorrer, G. L. (2008). Metabolic insertion of nanostructured TiO₂ into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp. by a two-stage bioreactor cultivation process. *ACS Nano*, 2(10), 2103–2112. <https://doi.org/10.1021/nm800470x>
- Jewson, D. H. (1992). Size reduction, reproductive strategy and the life cycle of a centric diatom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 336(1277), 191–213. <https://doi.org/10.1098/rstb.1992.0056>
- Karp-Boss, L., & Jumars, P. A. (1998). Motion of diatom chains in steady shear flow. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.8.1767>
- Knight, M. J., Senior, L., Nancolas, B., Ratcliffe, S., & Curnow, P. (2016). ARTICLE Direct evidence of the molecular basis for biological silicon transport. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11926>
- Knoll, A. H., & Kotrc, B. (2015). Protistan Skeletons: A Geologic History of Evolution and Constraint. In C. Hamm (Ed.), *Evolution of Lightweight Structures: Analyses and*

- Technical Applications (pp. 1–16). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9398-8_1
- Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Medlin, L. K., & Mann, D. G. (2007). The Origin and Evolution of the Diatoms. Their Adaptation to a Planktonic Existence. In *Evolution of Primary Producers in the Sea* (pp. 207–249). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50012-6>
- Kröger, N., Bergsdorf, C., & Sumper, M. (1994). A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *The EMBO Journal*, 13(19), 4676–4683. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06791.x>
- Kröger, Nils, Deutzmann, R., & Sumper, M. (1999). Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286(5442), 1129–1132. <https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1129>
- Kröger, Nils, Lehmann, G., Rachel, R., & Sumper, M. (1997). Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. *European Journal of Biochemistry*, 250(1), 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00099.x>
- Kröger, Nils, Lorenz, S., Brunner, E., & Sumper, M. (2002). Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science*, 298(5593), 584–586. <https://doi.org/10.1126/science.1076221>
- Kröger, Nils, & Wetherbee, R. (2000). Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Protist*, 151(3), 263–273. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00024>
- Lazarus, D. B., Kotrc, B., Wulf, G., & Schmidt, D. N. (2009). Radiolarians decreased silicification as an evolutionary response to reduced Cenozoic ocean silica availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812979106>
- Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316407219>
- LEWIN, J. C. (1954). Silicon metabolism in diatoms. I. Evidence for the role of reduced sulfur compounds in silicon utilization. *The Journal of General Physiology*. <https://doi.org/10.1085/jgp.37.5.589>
- Lewin, J. C., Lewin, R. A., & Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of General Microbiology*, 18(2), 418–426. <https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-418>

- Liu, J., Zheng, Q., Deng, Y., Cheng, C. S., Kallenbach, N. R., & Lu, M. (2006). A seven-helix coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15457–15462. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604871103>
- Lobo, E., Heinrich, C., Schuch, M., Wetzel, C., & Ector, L. (2016). Diatoms as Bioindicators in Rivers. In *River Algae* (pp. 245–271). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31984-1_11
- LUND, J. W. G. (1965). THE ECOLOGY OF THE FRESHWATER PHYTOPLANKTON. *Biological Reviews*, 40(2), 231–290. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1965.tb00803.x>
- Mann, D. G., & Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? the number, distributions, and origins of diatom species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(4), 414–420. <https://doi.org/10.1111/jeu.12047>
- Mann, D., & Marchant, H. J. (1989). The origin of the diatom and its life cycle. In *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives* (Vol. 38, pp. 305–321).
- Marron, A. O., Alston, M. J., Heavens, D., Akam, M., Caccamo, M., Holland, P. W. H., & Walker, G. (2013). A family of diatom-like silicon transporters in the siliceous loricate choanoflagellates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756). <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2543>
- Marron, A. O., Ratcliffe, S., Wheeler, G. L., Goldstein, R. E., King, N., Not, F., de Vargas, C., & Richter, D. J. (2016). The Evolution of Silicon Transport in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 33(12), 3226–3248. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw209>
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., & Brzezinski, M. A. (2000). Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. In *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.00019.x>
- Medlin, L. K. (2002). WHY SILICA OR BETTER YET WHY NOT SILICA? SPECULATIONS AS TO WHY THE DIATOMS UTILISE SILICA AS THEIR CELL WALL MATERIAL. *Diatom Research*, 17(2), 453–459. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2002.9705562>
- Nelson, D. M., & Goering, J. J. (1978). Assimilation of silicic acid by phytoplankton in the Baja California and northwest Africa upwelling systems. *Limnology and Oceanography*, 23(3), 508–517. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.3.0508>
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A., & Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Pančić, M., Torres, R. R., Almeda, R., & Kiørboe, T. (2019). Silicified cell walls as a defensive

- trait in diatoms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1901).
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0184>
- Pickett-Heaps, J. D., Schmid, A.-M. M., & Edgar, L. A. (1990). The cell biology of diatom valve formation. In *Progress in Phycological Research* (pp. 1–168). Bristol. Biopress Ltd.
- Poulsen, N., & Kröger, N. (2004). Silica morphogenesis by alternative processing of silaffins in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42993–42999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407734200>
- Raven, J. A., & Waite, A. M. (2004). The evolution of silicification in diatoms: Inescapable sinking and sinking as escape? In *New Phytologist* (Vol. 162, Issue 1, pp. 45–61). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01022.x>
- Rorrer, G. L., Chang, C. H., Liu, S. H., Jeffryes, C., Jiao, J., & Hedberg, J. A. (2005). Biosynthesis of silicon-germanium oxide nanocomposites by the marine diatom *Nitzschia frustulum*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(1), 41–49. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.005>
- Round, F. E. (Frank E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms : biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Schmid, A.-M. M., Borowitzka, M. A., & Volcani, B. E. (1981). Morphogenesis and Biochemistry of Diatom Cell Walls (pp. 63–97). Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8602-2_3
- Siever, R. (1992). The silica cycle in the Precambrian. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(8), 3265–3272. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90303-Z](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90303-Z)
- Sims, P. A., Mann, D. G., & Medlin, L. K. (2006). Evolution of the diatoms: Insights from fossil, biological and molecular data. In *Phycologia* (Vol. 45, Issue 4, pp. 361–402). <https://doi.org/10.2216/05-22.1>
- Stoermer, E. F., & Smol, J. P. (2001). *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge University Press. <https://books.google.cz/books?id=bz6UWRbwzHwC>
- Strom, S. L., Brainard, M. A., Holmes, J. L., & Olson, M. B. (2001). Phytoplankton blooms are strongly impacted by microzooplankton grazing in coastal North Pacific waters. *Marine Biology*, 138(2), 355–368. <https://doi.org/10.1007/s002270000461>
- Sullivan, C. W. (1976). DIATOM MINERALIZATION OK SILICIC ACID. I Si(OH)₄ TRANSPORT CHARACTERISTICS IN NAVICULA PELLICULOSA. *Journal of Phycology*, 12(4), 390–396. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1976.00390.x>
- Sumper, M., & Brunner, E. (2006). Learning from diatoms: Nature’s tools for the production

- of nanostructured silica. *Advanced Functional Materials*.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200500616>
- Sumper, M., & Brunner, E. (2008). Silica Biomineralisation in Diatoms: The Model Organism *Thalassiosira pseudonana*. *ChemBioChem*, 9(8), 1187–1194.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200700764>
- Tesson, B., & Hildebrand, M. (2010). Dynamics of silica cell wall morphogenesis in the diatom *Cyclotella cryptica*: Substructure formation and the role of microfilaments. *Journal of Structural Biology*, 169(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.08.013>
- Thamatrakoln, K., Alverson, A. J., & Hildebrand, M. (2006). Comparative sequence analysis of diatom silicon transporters: Toward a mechanistic model of silicon transport. *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00233.x>
- Thamatrakoln, K., & Hildebrand, M. (2007). Analysis of *Thalassiosira pseudonana* silicon transporters indicates distinct regulatory levels and transport activity through the cell cycle. *Eukaryotic Cell*, 6(2), 271–279. <https://doi.org/10.1128/EC.00235-06>
- Theriot, E., Herbarium, D., Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1992). The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. *Systematic Biology*.
<https://doi.org/10.2307/2992511>
- Tréguer, P., Nelson, D., Bennekom, A., DeMaster, D., Leynaert, A., & Quéguiner, B. (1995). The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate. *Science (New York, N.Y.)*, 268, 375–379. <https://doi.org/10.1126/science.268.5209.375>
- Tuchman, M. L., Theriot, E., & Stoermer, E. F. (1984). Effects of low level salinity concentrations on the growth of *Cyclotella meneghiniana* Kütz. (Bacillariophyta). *Archiv Fur Protistenkunde*. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(84\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(84)80003-2)
- Van de Meene, A. M. L., & Pickett-Heaps, J. D. (2002). Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundstrom. *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x>
- Vrieling, E. G., Sun, Q., Tian, M., Kooyman, P. J., Gieskes, W. W. C., Van Santen, R. A., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2007). Salinity-dependent diatom biosilicification implies an important role of external ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608980104>
- Waterkeyn, L., & Bienfait, A. (1989). Localization and role of beta-1,3-glucans (callose and chrysolaminarin) in the genus *Pinnularia* (diatom). *Cellule*.
- Wetherbee, R., Crawford, S., & Mulvaney, P. (2005). The Nanostructure and Development of Diatom Biosilica. *Biomineralization: Progress in Biology, Molecular Biology and*

Application, 177–194. <https://doi.org/10.1002/3527604138.ch11>

Yool, A., & Tyrrell, T. (2003). Role of diatoms in regulating the ocean's silicon cycle. <https://doi.org/10.1029/2002GB002018>