

# Molekulare Mechanismen der Biomineralsation bei der Bildung von Kalkschalen

Von Gottfried Krampitz\* und Gabriele Graser

Biologische Verkalkungsprozesse (Calcifizierung, Biomineralsation) kommen in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vor. Unter physiologischen Bedingungen entstehen nach gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Prinzipien Biomineralsate, z.B. Knochen, Zähne, Molluskenschalen, Eischalen, Perlen und Korallen. Pathologische Biomineralsate umfassen Nierensteine, Gallensteine, Gefäßablagerungen (Arteriosklerose, Calcinose). Gestörte Biomineralsationsvorgänge (Demineralsation) liegen beispielsweise bei Knochenresorptionen (Osteoporose) und Karies vor. Detaillierte Kenntnisse der molekularen Mechanismen der Biomineralsation könnten helfen, einige Probleme der Orthopädie, Urologie, Herz-Kreislauf-Forschung, Zahnmedizin und Tierproduktion zu lösen. Forschung auf dem Gebiet der Biomineralsation ist immer interdisziplinär. An zwei Beispielen – Molluskenschalen und Eischalen – sollen die für Biomineralsate typischen Interaktionen zwischen Mineralphase und organischer Matrix erläutert werden.

## 1. Einleitung

Biologische Calcifizierungsprozesse sind in der Natur sehr weit verbreitet. Man findet sie in Mikroorganismen, in Pflanzen, im Tierreich und im menschlichen Organismus. Typische Beispiele für Biomineralsate, die unter physiologischen Bedingungen entstehen, sind Knochen, Zähne, Schalenmaterial (Molluskenschalen, Eischalen), Coccothinen, Korallen, Perlen und dergleichen mehr. Die Vielfalt biologischer Verkalkungsprodukte lässt sich am besten durch die Tatsache belegen, daß schätzungsweise 128 000 Molluskenarten existieren. Die meisten von ihnen (Conchifera) produzieren Schalen und Gehäuse aus CaCO<sub>3</sub> mit völlig unterschiedlichen Größen, Formen und Farbmustern<sup>[1]</sup>. Daneben gibt es aber auch pathologische Biomineralsate, z.B. Körpersteine (Niere, Gallenblase) und Ablagerungen bei Arteriosklerose. Demineralsierungsprozesse (Osteoporose, Karies) müssen als entgleiste Biomineralsationsvorgänge angesehen werden.

Unter Biomineralsation versteht man einen Prozeß, in dessen Verlauf lebende Organismen Minerale herstellen, die auskristallisieren und zu Hartteilen zusammengefügt werden. Alle Biomineralsate scheinen sich trotz verschiedener Form und Funktion nach dem gleichen Prinzip zu bilden. Die Hartteile bestehen aus zwei Komponenten: aus organischer und aus anorganischer Substanz. Die organischen Verbindungen sind in der Regel Proteine (z.B. Kollagen, Dentin, Elastin, Conchiolin). Daneben findet man Proteoglycane und Lipide, deren Rolle jedoch weitgehend ungeklärt ist. Die anorganische (mineralische) Komponente liegt in Kristallform vor. Es sind zwar mindestens 20 Skelettkristalle in lebenden Organismen beschrieben worden<sup>[2,3]</sup>, doch kommen nur sehr wenige in nennenswerten Mengen vor: Aragonit, Calcit, Hydroxylapatit und Opal<sup>[3]</sup>. Die übrigen Minerale sind entweder nur spuren-

haft vertreten oder finden sich lediglich in einigen wenigen spezialisierten Arten<sup>[4]</sup>.

Die bisherigen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biomineralsation lassen sich im wesentlichen wie folgt einteilen:

1. Morphologische Studien über die komplizierten Beziehungen zwischen Mineralphase und organischen Makromolekülen (Matrix),
2. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung mineralisierter Gewebe und Mineralien,
3. Forschungen über Ionentransport-Mechanismen in zellulären Systemen und über Mineralablagerungen auf organischen Substraten<sup>[5]</sup>.

Das Verständnis der molekularen Mechanismen biologischer Verkalkungsprozesse ist trotz mannigfacher Anstrengungen noch immer oberflächlich. Vergleichsweise sehr wenig bekannt ist über die Synthese von organischen Makromolekülen, die an Biomineralsationsprozessen beteiligt sind.

Die vielfältigen Aspekte und Probleme der Biomineralsation werden nur durch interdisziplinäre Zusammenarbeit (Chemie, Biochemie, Molekulargenetik, Physikalische Chemie, Physik, Biophysik, Mineralogie, Kristallographie, Geologie, Paläontologie, Biologie, Meeresbiologie, Physiologie, Orthopädie, Zahnmedizin, Herz-Kreislauf-Forschung, Urologie, Tiermedizin, Agrarwissenschaften, Ernährungswissenschaften usw.) bearbeitet und gelöst werden können.

Im folgenden wird am Beispiel der Molluskenschalen und der Eischalen gezeigt, welche Kenntnisse man heute über Feinstruktur und chemische Zusammensetzung biomineralsierter Gebilde hat und wie man sich das Zusammenwirken zwischen organischer Phase und anorganischen Kristallen vorstellt. Besonders ausführlich werden die Eigenschaften der Makromoleküle behandelt, die am Aufbau solcher Gebilde beteiligt sind, sowie ihre Fähigkeit zur Calciumbindung und ihre Funktionen.

[\*] Prof. Dr. G. Krampitz, Dr. G. Graser  
Abteilung für Biochemie, Institut für Anatomie,  
Physiologie und Hygiene der Haustiere, Universität Bonn  
Katzenburgweg 7-9, D-5300 Bonn 1

## 2. Mechanismen der Biomineralsierung

Unsere Vorstellungen von der biologischen Calcifizierung basieren auf der Annahme, daß eine organische Matrix die mineralogischen und kristallographischen Eigenschaften der anorganischen Phase bestimmt. Allerdings gehen die Meinungen über Art und Funktion der Matrix aus einander. Die Matrizen-Hypothese besagt, daß Prozesse der Epitaxie<sup>[\*]</sup> die entscheidende Rolle spielen, während die Kompartiment-Hypothese die Bildung geordneter Matrix-Kompartimente als wesentlichen Faktor ansieht.

### 2.1. Matrizen-Hypothese

Diese Hypothese (vgl. Abb. 1) entwickelte sich aus Untersuchungen calcifizierter Gewebe. Dabei wurde beobachtet, daß Keimbildung und orientiertes Wachstum einer

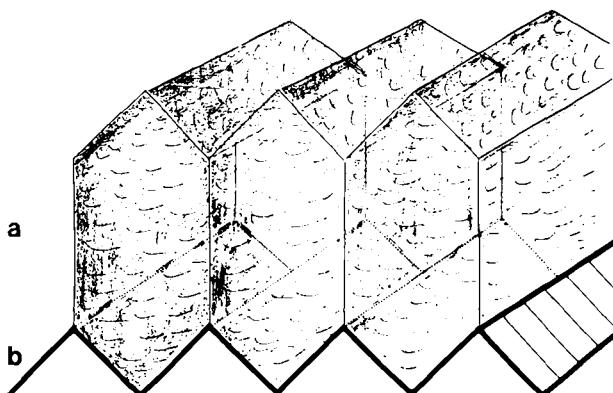


Abb. 1. Matrizen-Hypothese (vereinfachtes Modell). Die reaktive Matrize (b) aus organischem Material dirigiert durch ihre Struktur Art, Form und Größe der aufgelagerten anorganischen Kristalle (a). Dadurch wird ein regelmäßiges Wachstum der Kristalle erreicht.

Substanz auf der Oberfläche einer anderen stattfinden können, wenn beide einige kristallographische Parameter gemeinsam haben. Die Struktur der Substratphase diktiert die Orientierung der überlagerten Phase. Auf die Biomineralsierung angewendet, übernimmt die organische Matrix die Rolle des Substrats, d.h. der dirigierenden Matrize. Keimbildung und Wachstum der anorganischen Biokristalle gehen frei auf der Oberfläche der organischen Unterlage vor sich. Das Gitter des Keims der aufwachsenden Phase soll von den Atomabständen innerhalb aktiver Zentren der organischen Matrize abhängig sein. Damit werden auch die Tracht und zum Teil auch der Habitus der aufwachsenden Biokristalle durch die Matrize bestimmt. Zwar besteht noch keine Klarheit über die Natur der funktionellen Gruppe, die die Keimbildung induziert, doch ist die Matrizen-Hypothese durch ihre Einfachheit attraktiv<sup>[7]</sup>. Zu ihren Gunsten sprechen folgende Befunde an Molluskenschalen<sup>[8]</sup>:

1. Aus dem Verhalten von Fremdtransplantaten scheint sich zu ergeben, daß es bei dieser Invertebratengruppe

[\*] Als Epitaxie bezeichnet man jede Verwachsung zweier chemisch und/oder strukturell verschiedener kristalliner Phasen. Ein epitaktisches System besteht aus einem Wirtskristall (Substrat) und einer aufgewachsenen Gastphase [6].

Calcit-spezifische und Aragonit-spezifische (Conchiolin-)Matrizen gibt<sup>[9, 10]</sup>.

2. Es existiert eine Abhängigkeit der orthorhombischen *b*-Achse des Perlmuttplättchens von der Richtung der Einzelfibrillen der Conchiolin-„Membran“ von Pelecypoden<sup>[11]</sup> und eine Abhängigkeit der *a*-Achse von der Richtung der „trabecular cords“ in den „Membranen“ von *Nautilus pompilius*<sup>[12, 13]</sup>.

### 2.2. Kompartiment-Hypothese

Säulenförmige Großprismen der äußeren Prismenschicht von *Pinna nobilis* und *Mytilis edulis* sind aus kleinen Kristalliten zusammengesetzt, und diese sind allseits von organischen Hüllen umgeben<sup>[14-16]</sup>. Dieser Befund führte dazu, daß man sich einen von organischer Substanz begrenzten Hohlraum („Kompartiment“) dachte<sup>[7, 9]</sup>, in welchem der Kristallit gebildet wird und in welchem die umgebenden organischen Hüllen seinen Habitus prägen. Die Kompartiment-Hypothese (vgl. Abb. 2) verneint die Existenz reaktiver Matrizen<sup>[9]</sup>.

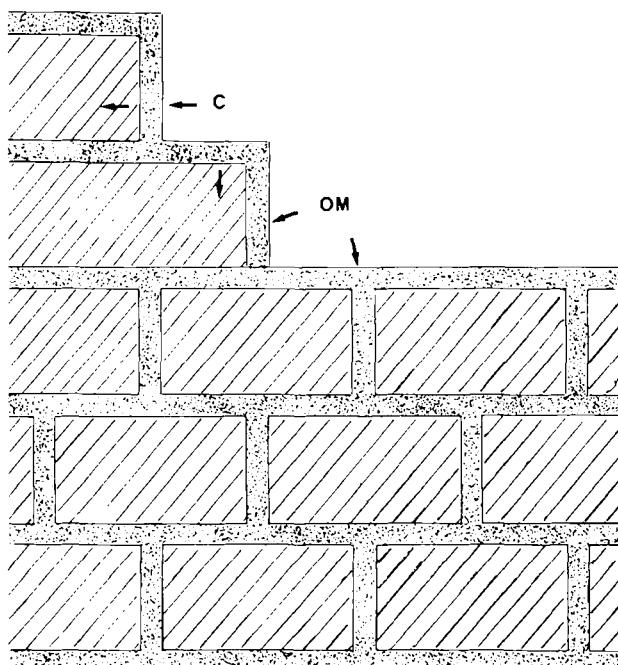


Abb. 2. Kompartiment-Hypothese (vereinfachtes Modell). Der Aufbau dieser Art von Biomineralsaten wird auch als „Ziegelmauer“-Modell bezeichnet, bei dem die Kristalle (C) mit Ziegeln und das organische Material (OM) mit Mörtel verglichen werden. Eine reaktive Matrize wird nicht angenommen. Der Aufwuchs der Kristalle ist unregelmäßig wie z.B. in Perlmutt.

Eine Entscheidung darüber, ob bei Invertebraten oder Vertebraten die Matrizen- oder die Kompartiment-Hypothese zutrifft oder ob beide Hypothesen berücksichtigt werden müssen, kann noch nicht gefällt werden.

### 2.3. Rolle der Zellen bei der Biomineralsierung

Wenn man zelluläre Aspekte der Biomineralsierung diskutiert, wird man sich fragen müssen, welche evolutiven Prozesse zu diesem biologischen Phänomen geführt haben.

Dabei müssen folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden: Das Calcium-Ion gehört zu den pharmakologisch bedeutendsten Ionen. Alle normalen zellulären Prozesse können durch unphysiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unterbrochen werden. Deshalb wird die intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration sehr sorgfältig im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  mol/L einreguliert. In einer überraschenden Vielzahl von Zellen werden calciumreiche Mineralien deponiert.

Da  $\text{Ca}^{2+}$  auf lebende Zellen in Konzentrationen  $> 10^{-6}$  mol/L toxisch wirkt, müssen diese Ionen eliminiert werden. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an: Beim Überführen aus der ionisierten Form in eine nichtionisierte Ca-Verbindung entstehen häufig unlösliche Substanzen. Diese können entweder in der Zelle und ihren Kompartimenten präzipitieren oder als Kristall die Zelle verlassen. In anderen Fällen findet die Präzipitation extrazellulär statt (vgl. Abb. 3). Die extrazelluläre Ablagerung von Ca-Verbindungen ist letzten Endes nichts anderes als ein Entgiftungsprozeß. Es überrascht deshalb nicht, daß sich z. B. in Schalen von Mollusken, aber auch Vogeleischalen, neben  $\text{CaCO}_3$ , verschiedenste Metallverbindungen, allerdings in geringen Anteilen, nachweisen lassen<sup>[17]</sup>.

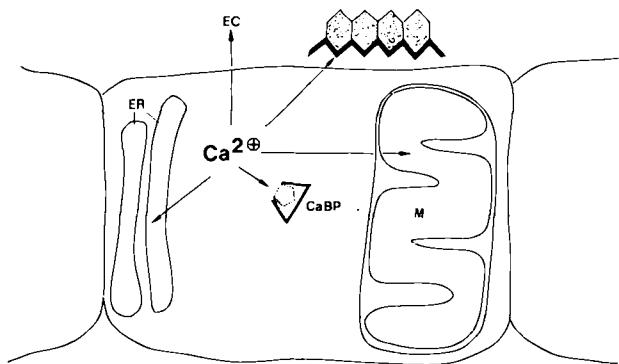


Abb. 3. Biomineralisierung als zellulärer Entgiftungsprozeß. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird im Cytoplasma präzise reguliert. Ein Überschuß an  $\text{Ca}^{2+}$  kann intrazellulär durch Ca-Bindungsproteine (CaBP), Speicherung in Mitochondrien (M) und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie durch Transport in den extrazellulären Raum (EC) entfernt werden. Extrazellulär können unlösliche Ca-Verbindungen auskristallisieren, wenn gleichzeitig eine geeignete Matrize sezerniert wird.

Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß sich während der Evolution zunächst extrazelluläre Calcifizierungsprodukte entwickelt haben. Daß solche „Panzer“ sekundär ein Schutz für Einzeller (Coccolithen), aber auch für Weichtiere sind, leuchtet ohne weiteres ein. Auch die Eischalenbildung kann zugleich als Ausscheidungsmechanismus für  $\text{Ca}^{2+}$  und als Schutz für das verletzbare Ei angesehen werden. Die Evolution vom Exoskelett zum Endoskelett ist dann „nur“ noch ein Schritt von einem starren Panzer zu einem einigermaßen elastischen Stützapparat<sup>[17]</sup>.

Nach heutiger Auffassung finden die Calcifizierungsprozesse in mineralbildenden Zellen statt. Calciumphosphate – zumeist „anorganisches Calciumphosphat“  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  – werden im inneren Kompartiment der Mitochondrien synthetisiert. Amorphes Calciumphosphat geht in der Regel autokatalytisch in Hydroxylapatit über, wenn es nicht innerhalb der Zellen durch  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP stabilisiert wird. Stabilisiertes amorphes Calciumphosphat soll imstande sein, intrazelluläre Membranen zu passieren, um

an anderen Stellen der Zelle oder an deren Oberfläche als Vorstufe für größere und stabile Mineralbildungen (Hydroxylapatit) zu dienen<sup>[18–20]</sup>.

In einzelligen Organismen, z. B. Protozoen (*Spirostomum ambiguum*), ist die Bildung von  $\text{CaCO}_3$  sehr eng mit der Funktion der Vakuolen des Golgi-Apparates assoziiert<sup>[21]</sup>. Im Golgi-Apparat werden kugelförmige Strukturen („spherical clusters“) mit einem Durchmesser von 0.1 bis 1.0  $\mu\text{m}$  aufgebaut, die dann von der Zelle ausgeschieden werden<sup>[22]</sup>. Vermutlich produzieren auch Osteocyten und andere Vertebraten-Zellen während bestimmter Perioden der Zellaktivität ähnliche sphärische Strukturen, die aus Anhäufungen mineralischer Filamente bestehen<sup>[22]</sup>.

## 2.4. Bindung von $\text{Ca}^{2+}$ an Proteine

Calcifizierungsprozesse setzen Konzentrationsmöglichkeiten von  $\text{Ca}^{2+}$  an der organischen Matrix voraus. In diesem Zusammenhang sind Ca-Bindungseigenschaften, vor allem der Matrix-Proteine, diskutiert worden, doch bestehen noch zahlreiche Unklarheiten hinsichtlich der Bindungsstellen. Von den Aminosäuren (und sulfatierten Zuckern), deren Ca-Bindungsfähigkeit bekannt ist, dürften tatsächlich nur wenige in den Ca-Bindungsproteinen aus Biomaterialien von Bedeutung sein. Abbildung 4 gibt einen Überblick.

### 2.4.1. Bindung an Aminosäuren mit freien Carboxygruppen

Für zahlreiche Ca-bindende Proteine aus Biomaterialien ist ein überdurchschnittlich hoher Anteil an Glutaminsäure und Asparaginsäure charakteristisch. Obwohl die Fähigkeit von Aminodicarbonsäuren zur komplexen Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  seit langem bekannt ist, erhebt sich die Frage, ob der hohe Anteil dieser Aminosäuren in Ca-Bindungsproteinen zur Erklärung der Ca-Bindungsfähigkeit ausreicht. Es gibt Proteine, die zwar reich an Asparaginsäure und Glutaminsäure sind, aber kein  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden vermögen<sup>[23]</sup>.

Die Schalen-Matrizes von Mollusken verschiedenen Arten enthalten hohe Anteile an Asparaginsäure, wie die Aminosäuren-Analyse des HCl-Hydrolysats ergab. Daraufhin wurde eine Sequenz (–Asp–X–), postuliert, in der Asparaginsäure und vorwiegend Serin oder Glycin alternierend angeordnet sind und die für die Ca-Bindung maßgeblich sein soll<sup>[24]</sup>. Es ist unklar geblieben, ob es sich in den Matrices tatsächlich um Aspartat handelt oder ob nicht Asparagin vorgelegen hat – Asparagin wird durch HCl in Aspartat und Ammoniak zerlegt. Ein exakter Beweis kann nur durch eine Aminosäuren-Sequenzanalyse geführt werden, die aber bisher noch nicht durchgeführt worden ist. Aus den genannten Gründen ist diese Auffassung deshalb nicht unwidersprochen geblieben<sup>[25–28]</sup>.

Dagegen ist die stark Ca-bindende Aminosäure  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure in zahlreichen Biomaterialien von Vertebraten gefunden worden, z. B. in Knochen<sup>[29]</sup>, Zahnschmelz und Dentin<sup>[30]</sup>, calcifiziertem Epiphysenfugenknorpel<sup>[31]</sup>, calcifizierten Sehnen<sup>[32]</sup>, arteriosklerotischen Plaques und Hautverkalkungen bei Sklerodermie, Dermatomyositis und lokaler Calciphylaxie<sup>[33]</sup>. Außerdem kommt  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure als Baustein von Prothrombin

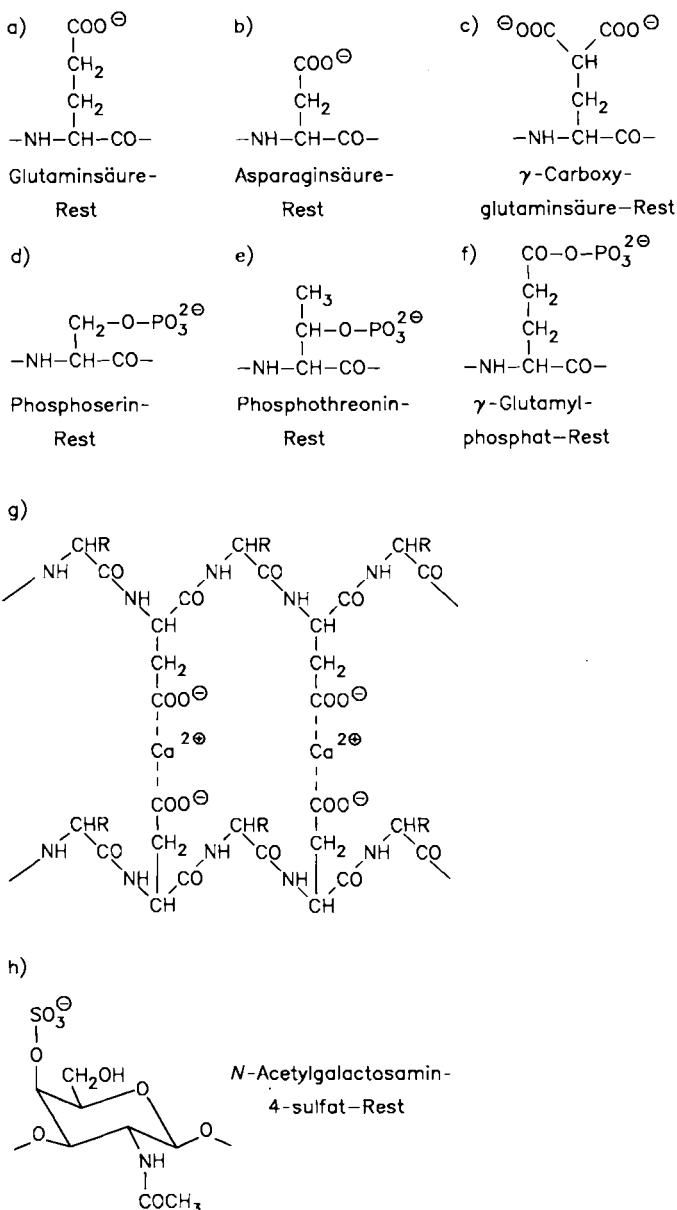


Abb. 4. Zur Ca-Bindung in organischen Matrices. Eine lokale Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  als Voraussetzung für Kristallisationsprozesse wird durch entsprechende Bausteine von Proteinen und Glycoproteinen (oder Proteoglycanen) der Matrices erreicht. Typische Ca-Binder sind in a)-f) dargestellt; es handelt sich um Aminosäuren im Peptidverband, deren Seitenketten negativ geladen sind. Durch häufige Wiederholung dieser Bausteine in der Polypeptidkette kann die Ca-Konzentration erhöht werden. g) deutet die Möglichkeit der Ca-Bindung durch einander gegenüberliegende Asparaginsäure-Reste an. Jedoch ist auch eine Ca-Bindung durch benachbarte Asparaginsäure-Reste denkbar ( $R = H \triangleq$  Glycer-Rest,  $R = \text{CH}_2\text{OH} \triangleq$  Serin-Rest). Für Glutaminsäure-Reste lässt sich eine analoge Situation konstruieren. Die Ca-Bindung durch Aspartat ist im Zusammenhang mit der Bildung von Molluskenschalen diskutiert worden (siehe Text). h) bezieht sich auf den wahrscheinlichen Modus der Ca-Bindung in Vogeleischalen. Im Gegensatz zu den Beispielen a)-g) wird hier eine Ca-Bindung durch sulfatierte Zucker oder Zucker-Derivate diskutiert.

und anderen Proteinen des Blutgerinnungssystems vor<sup>[34,35]</sup>. In calcifizierten Geweben von Invertebraten konnte diese Aminosäure bisher nicht gefunden werden<sup>[36]</sup>.

#### 2.4.2. Bindung an phosphorylierte Aminosäuren

Auch O-Phosphoserin, O-Phosphothreonin und  $\gamma$ -Glutamylphosphat vermögen  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden. Jedoch ist der

Nachweis dieser Aminosäuren bisher nur in Biomineralsen aus Vertebraten gelungen<sup>[30,37]</sup>. In Eischalen und Molluskenschalen scheinen diese Aminosäuren nicht vorzukommen.

Freie SH-, OH-, NH<sub>2</sub>- und CONH<sub>2</sub>-Gruppen von Proteinausteinen sowie die räumlichen Strukturen von Polypeptiden<sup>[38-56]</sup> dürften für die Ca-Bindungsfähigkeit einiger Proteine in Biomineralsen wesentlich sein. Bei der Bildung von Molluskenschalen und Eischalen jedoch spielen sie allenfalls eine untergeordnete Rolle.

#### 2.4.3. Bindung an sulfatierte Zucker

Die Ca-Bindungseigenschaften der Matrices calcifizierter Schalen beruhen primär auf sulfatierten Zuckern<sup>[25,26,57]</sup>, die in Form von Oligo- oder Polysacchariden mit Polypeptiden verknüpft sind<sup>[28,58]</sup>.

### 3. Bedeutung der Matrix in Biomineralsen

Biochemische und mikromorphologische Studien haben die Bedeutung von Matrix-Komponenten als essentielle Faktoren für Biomineralisationsprozesse deutlich unterstrichen. Das Konzept einer organischen Matrix (in jedem Hartteil) basiert auf der Hypothese einer Kontrolle der Ablagerung von unlöslichem, anorganischem Material durch makromolekulare organische Verbindungen (siehe Abschnitt 2.1). Der Ausdruck „Matrix = Uterus“ leitet sich von mater ab und will zum Ausdruck bringen, daß an einer bestimmten Stelle oder in einem definierten Medium etwas entsteht oder gebildet wird. Die Kriterien für eine echte Matrix umfassen:

1. Existenz der Matrix, bevor das Produkt entsteht,
2. Beteiligung der Matrix an dessen Entstehung,
3. nachfolgender räumlicher Einschluß des Produkts durch die Matrix.

Matrices aus Hartteilen sind makromolekulare Polyionen; es handelt sich hauptsächlich um Proteine und Glycoproteine. Gelegentlich treten stark basische Polykationen, aber auch Polyuronsäuren auf<sup>[51]</sup>.

Die Chemie der organischen Matrices von Invertebraten hat erst im letzten Jahrzehnt stärkere Beachtung gefunden. Aus den Befunden lassen sich auch Funktionen der Matrices von Invertebratenschalen ableiten<sup>[59]</sup>:

1. Kristall-Nucleation,
2. Begrenzung des Kristallwachstums,
3. Kristallorientierung,
4. Verbindung von Kristallen und Kristallschichten (beeinflußt physikalisches Verhalten der Schale).

Von einer Vielzahl organischer Matrices wird angenommen, daß sie die Präzipitation von Calcium- und Phosphat-Ionen aus Lösungen<sup>[60-66]</sup> durch „heterogene“ Nucleation initiieren oder beschleunigen<sup>[67-69]</sup>. Da das Mineral normalerweise extrazellulär deponiert wird, kann diese Beobachtung zum Verständnis beitragen, auf welche Weise die Mineralphase gebildet wird und wo sie sich abscheidet. Deshalb ist in Analogie zu Nucleationsphänomenen in der

Organischen Chemie vermutet worden, daß eine solche Organisation der Matrix ein notwendiges Charakteristikum für eine Matrize ist, die die Geschwindigkeit der Kristallbildung beeinflussen kann. Diese Vermutung hat Untersuchungen über die chemische Struktur der Matrices mit dem Ziel initiiert, Beziehungen zwischen Struktur und Calcifizierungsfähigkeit aufzuklären. Trotz aller Bemühungen ist die Rolle der Komponenten von calcifizierenden Matrices noch nicht gesichert<sup>[59]</sup>.

Auch in Molluskenschalen und Eischalen sind organische Matrices nachweisbar. Sie finden sich in der Biokristallschicht, das heißt im eigentlichen Biomineralisat. Wie bereits erwähnt, scheint die Kristallform von CaCO<sub>3</sub> (Calcit, Aragonit, Perlmutt usw.) in erster Linie von der chemischen Struktur der organischen Matrix in der jeweiligen Schicht gesteuert zu werden.

Während die anorganischen Komponenten der Schalen gut untersucht sind, besteht ein erheblicher Informationsbedarf über die chemische Struktur, vor allem über die molekularen Funktionen und über die Synthese der (organischen) Matrix-Komponenten und deren Regelmechanismen. Die organische Matrix von Molluskenschalen und Vogeleischalen lässt sich leicht durch Auflösen der CaCO<sub>3</sub>-Kristalle (z. B. mit EDTA-Lösungen) präparieren. Dabei erhält man eine leicht lösliche und eine in wäßrigen Systemen unlösliche Fraktion. Der Anteil der gesamten Matrix an der Schale beträgt bei Mollusken speziesabhängig zwischen 0.01 und 10%<sup>[70]</sup>.

#### 4. Biomineralisationsvorgänge bei der Bildung von Molluskenschalen

##### 4.1. Lösliche Matrix

Es wird angenommen, daß die lösliche Matrix intrakristallin<sup>[25, 71, 72]</sup> vorkommt, während die unlösliche Matrix interkristallin lokalisiert ist. Der Anteil der löslichen Matrix variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Tierart (14 bis 64% der Gesamtmatrix)<sup>[28]</sup>.

Erst 1972 ist über die Extraktion und zumindest teilweise Reinigung einer löslichen Matrixkomponente aus *Mercenaria mercenaria* berichtet worden<sup>[25]</sup>. Es handelt sich dabei um ein wasserlösliches Glycoprotein ( $M_r$ , ca. 160 kDalton), das gleichmäßig in der Schale verteilt und stark negativ geladen ist (Estersulfat)<sup>[73]</sup>. Die Aminosäuren-Zusammensetzung dieses sulfatierten Glycoproteins entspricht weitgehend der Komposition der unlöslichen Matrix auch anderer Molluskenschalen (siehe<sup>[25, 26, 74, 75]</sup>).

Es besteht nach wie vor Unklarheit über die Anzahl und die relativen Molekülmassen von löslichen Matrixproteinen<sup>[76, 77]</sup>. Neuere eigene Befunde lassen den Schluß zu, daß in Abhängigkeit vom Alter der Schalen sehr unterschiedliche Proteinprofile auftreten können. Die  $M_r$ -Werte reichen von <30 bis >5000 kDalton. In frischen Austernschalen kommen nur zwei Gruppen von löslichen Schalenproteinen vor (5000 und 500 kDalton). Werden diese Proteine mit Natriumdodecylsulfat(SDS)-Lösungen behandelt, dann zerfallen sie in Untereinheiten von ca. 15 kDalton, deren Aminosäuren-Komposition bei allen Mollusken-Arten nahezu identisch ist. Demnach sind die hochmolekularen, löslichen Matrixproteine Aggregate aus nur sehr wenigen Untereinheiten. Auch aus molekulargenetischer Sicht sind Gene, die für 5000-kDalton-Proteine codieren, sehr unwahrscheinlich<sup>[77]</sup>.

Lösliche Matrixproteine binden leicht Ca<sup>2+</sup>. Dies ist verständlich, weil ihr isoelektrischer Punkt (I.P.) bei ca. 2 liegt. Hydrogencarbonat-Ionen zerfallen jedoch unter diesen Bedingungen in CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Infolgedessen können lösliche Matrixproteine nicht als CaCO<sub>3</sub>-Bildner in Betracht kommen. Außerdem gelten Sulfate, auch Estersulfate, als „Kristallgifte“ (z. B. für CaCO<sub>3</sub>-Kristalle). Einen Ausweg aus den Interpretationsschwierigkeiten haben Wheeler et al.<sup>[78]</sup> vorgezeichnet. Die löslichen, sauren Schalenproteine könnten eine Hemmwirkung auf die Schalenbildung ausüben. Durch sie lassen sich „überschüssige“ Ca-Ionen leicht abfangen; sie stehen für die Kristallbildung nicht mehr zur Verfügung. Einmal sezernierte Ca-Ionen können gegen einen steilen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten von den Mucosazellen des Mantelepithels nicht mehr aufgenommen werden. Sie bleiben an Proteine gebunden und sind somit neutralisiert.

Schwierig zu beurteilen sind proteinchemische Studien an fossilen Molluskenschalen. Abgesehen davon, daß sich Schalenproteine durch sehr unterschiedliche Einflüsse im Verlauf sehr langer Zeiträume stark verändert haben können, ist stets unklar, ob es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Komponenten der löslichen oder der unlöslichen Matrix gehandelt hat. Derartige fossile Proteine sind häufig löslich. Auch wenn CaCO<sub>3</sub>-Schichten Schalenproteine bis zu einem gewissen Grade vor Abbauprozessen schützen können, so ist es dennoch sehr fraglich, ob z. B. im Verlauf von 80 Millionen Jahren auch Glycoproteine erhalten geblieben sind<sup>[79]</sup>. In diesem Zusammenhang ist auch die These bekräftigt worden, daß sich die in Schalenproteinen wiederholende Aminosäuren-Sequenz (–Asp–X–)<sub>n</sub> (X = Gly, Ser usw.) im Verlauf der Evolution konserviert habe. Diese These geht von der Annahme aus, daß Asparaginsäure neben Glycin die in Schalenproteinen am häufigsten vorkommende Aminosäure sei. Daraus wird nämlich die Ansicht abgeleitet, die Ca-Bindung in löslichen Schalenproteinen werde durch die β-Carboxygruppe von Asparaginsäure bestimmt.

Dagegen wird von anderen Forschern<sup>[25, 80-82]</sup> die Auffassung vertreten, es handele sich um Asparagin, was durch partielle Sequenzanalyse belegt wird. Im Schalenprotein dürfte sich danach eher die Sequenz (–Asn–X–)<sub>n</sub> wiederholen. Die Ca-Bindung wird dann aber über Estersulfat erklärt.

Bei allen Vorbehalten, die jeglichen Studien an fossilen Peptiden anhaften, läßt sich dennoch erkennen, daß sich in gut konservierten fossilen Austernschalen (*Ostrea cassisima*, *Lopha diluvianus*, *Lopha marshi*) vorherrschende Aminosäuresequenzen erhalten haben. Das deutet auf nur geringe Mutationshäufigkeit der entsprechenden Gene; zugleich wird erkennbar, daß Kalkschalen die in ihnen befindlichen Proteine vor Abbauvorgängen zu schützen vermögen. Lediglich einige wenige Aminosäure-Reste weichen vom Grundmuster ab. Das könnte mit evolutiven, aber auch mit diagenetischen Prozessen zusammenhängen<sup>[81, 82]</sup>.

Neben den typischen löslichen Schalenproteinen konnten in der löslichen Matrix von *Crassostrea gigas*, *Strombus aureus*<sup>[59, 83]</sup> und *Mercenaria mercenaria*<sup>[84]</sup> Polyphenol-Oxidasen nachgewiesen werden. Substrate für diese En-

zyme (Tyrosin und andere phenolische Verbindungen) ließen sich in Schalenmatrices identifizieren. Möglicherweise hängt die Wirkung von Polyphenol-Oxidasen mit Aggregations- oder auch Polymerisationsvorgängen der unlöslichen Matrix zusammen<sup>[83]</sup>.

#### 4.2. Unlösliche Matrix (Conchiolin)

Conchiolin (spanisch Concha = Muschel) ist häufig als eine Gruppe von Proteinen mit einem gelegentlich signifikanten Polysaccharid-Gehalt beschrieben worden. Letzterer scheint speziesabhängig zu sein<sup>[71, 80, 85]</sup>. Die Bezeichnung „unlösliche Matrix“ hat sich im letzten Jahrzehnt zwar eingebürgert, ist aber mißverständlich: Conchiolin kann in eine lösliche Form überführt werden (siehe Abschnitt 5.2.2).

Conchiolin hat eine hohe Affinität für Lipidfarbstoffe (z. B. Sudanschwarz)<sup>[86, 87]</sup>, obwohl auch nach ausgiebiger Extraktion mit Chloroform-Methanol oder Diethylether keine verminderte Anfärbung und keine Lipide in den Extrakten nachweisbar sind<sup>[26]</sup>. Wahrscheinlich beruht die Sudanschwarz-Färbung eher auf einer Farbstoffverteilung als auf einer chemischen Reaktion. Möglicherweise hängt dies mit dem Vorherrschen von aliphatischen Aminosäuren in Conchiolin zusammen.

Conchiolin ist vergleichsweise wenig untersucht worden – vermutlich wegen der Schwierigkeiten, dieses Material unter schonenden Bedingungen in lösliche Proteine (Polypeptide) zu zerlegen. Deshalb haben sich die meisten Studien darauf beschränkt, aus Aminosäure-Daten, IR-Spektren<sup>[88]</sup> und Röntgenbeugungs-Mustern<sup>[85]</sup> Rückschlüsse auf den Aufbau des nativen Conchiolins zu ziehen. Es scheinen antiparallele Faltblatt-Strukturen vorzuherrschen<sup>[85]</sup>. Daneben wird auch von wenig geordneten Strukturen berichtet<sup>[28]</sup>.

Bemühungen, Proteine schrittweise aus Conchiolin zu extrahieren, sind jedoch bereits in Anfängen steckengeblieben<sup>[89]</sup>. Gegen Versuche, Conchiolin-Proteine mit aggressiven Reagentien (NaOH, HCl, HCOOH) aufzulösen<sup>[89, 90]</sup>, bestehen Bedenken, weil mit unerwünschten Nebenreaktionen (Umwandlung von Lysin in Ornithin, Desaminierungsreaktionen, Zufallsspaltungen usw.) zu rechnen ist. Unserer Arbeitsgruppe ist es 1986 erstmalig gelungen, Conchiolin aus Austernschalen mit SDS-haltigen Lösungen reproduzierbar in Untereinheiten zu zerlegen<sup>[76]</sup>. Conchiolin ist demnach nur aus einer relativ geringen Anzahl von Polypeptiden aufgebaut (75 und 40 kDalton). Diese Untereinheiten enthalten jedoch unterschiedliche Anteile an sulfatierten Oligosacchariden. Daraus leiten sich Untereinheiten mit I.P.-Werten zwischen > 9.3 und 3.1 ab. Untereinheiten mit I.P.-Werten > 7.0 binden  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  gleichzeitig und können deshalb als Initiationsfaktoren der Schalenbildung angesehen werden. Conchiolin-Untereinheiten mit I.P.-Werten < 7.0 dürfen zusammen mit löslichen Matrixproteinen eher an der Terminierung der Schalenbildung beteiligt sein. Intaktes Conchiolin aus Austernschalen in wässriger Suspension hat einen I.P. von ca. 8.5 und bindet simultan ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Sulfat- und Phosphat-Ionen behindern diese Bindung<sup>[91]</sup>.

Anti-Conchiolin-Seren reagieren immunologisch mit löslichen Proteinen der Austernschalen, aber auch mit den Proteinen der löslichen und unlöslichen Matrix von Ei-

schalen<sup>[58, 76, 77, 92]</sup>. Das weist auf verwandte Proteinstrukturen von Ei- und Molluskenschalen hin.

#### 4.3. Molekulare Mechanismen der Bildung von Molluskenschalen

Nach allen bislang verfügbaren Informationen über die Schalenbildung bei Mollusken läßt sich folgende Hypothese aufstellen: Die löslichen Matrix-Vorstufen scheinen im Hepatopankreas synthetisiert zu werden. Modifikationsreaktionen der löslichen Matrix-Vorstufen (Polypeptide), das heißt Additionen von Oligo- oder Polysacchariden sowie Sulfatierungen, dürfen erst nach Transport in das Mantelepithel stattfinden. Bei Polypeptiden, die in der löslichen Matrix vorkommen, beträgt  $M_r$  ca. 15 kDalton, während in der unlöslichen Matrix (Conchiolin) Polypeptide mit  $M_r$  ca. 75 und 40 kDalton nachzuweisen sind<sup>[76]</sup>.

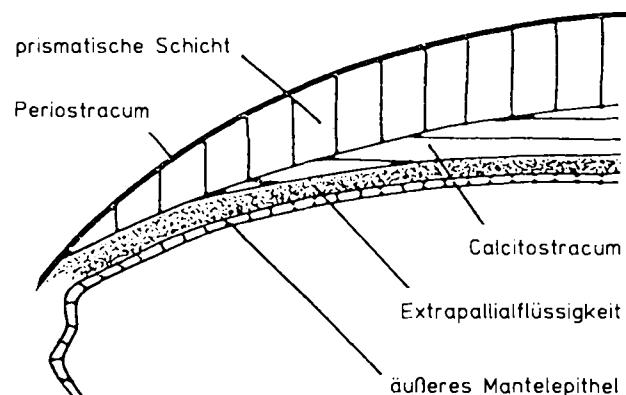


Abb. 5. Aufbau der Molluskenschale. Die prismatische Schicht und das Calcitostracum sind aus Biokristalliten aufgebaut. Das Mantelepithel sezerniert die Extrapallialflüssigkeit (enthält alle Komponenten für den Biomineralisationsvorgang). Das Periostracum ist die äußere, nicht verkalkte Schicht der Molluskenschale.

Abbildung 5 zeigt den Aufbau der Molluskenschale. In den Mucosazellen des Mantelepithels werden Matrix-Untereinheiten gespeichert.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  sowie Conchiolin werden in die Extrapallialflüssigkeit sezerniert. Dabei ist nicht bekannt, ob sich die Aggregation von Conchiolin aus den Untereinheiten bereits in den Mucosazellen vollzieht oder erst nach der Sekretion. Die Zusammensetzung der anorganischen Bestandteile der Extrapallialflüssigkeit von marinen Mollusken weicht von der des Seewassers ab. In der Extrapallialflüssigkeit von Süßwasser-Mollusken ist weniger  $\text{Ca}^{2+}$ , aber mehr  $\text{HCO}_3^-$  enthalten. Weiterhin wird über Schwankungen in der Zusammensetzung dieses Sekrets in Abhängigkeit von den Jahreszeiten und vom physiologischen Zustand des Tieres berichtet<sup>[26]</sup>. Die Gehalte an organischen Komponenten sind bisher kaum untersucht worden.

Es muß angenommen werden, daß Aggregate von Conchiolin in vivo ebenso wie in vitro<sup>[80]</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  gleichzeitig binden. Bei  $\text{pH} > 8.0$  dürfte die  $\text{CaCO}_3$ -Präzipitation in Form von Primärkristallen durch diese simultane Bindung eingeleitet werden. Da die Extrapallialflüssigkeit mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  übersättigt ist, ist es denkbar, daß die weitere Kristallbildung durch kinetische Kräfte angetrieben wird.

Die Termination des Kristallisationsprozesses wird wahrscheinlich durch Komponenten der löslichen Matrix bestimmt. Es handelt sich um Proteoglycane – ähnliche, hoch sulfatierte Makromoleküle, die als Ca-Fänger dienen könnten (siehe Abschnitt 5.4). Auf diese Weise besteht die Möglichkeit,  $\text{Ca}^{2+}$  von der Reaktion mit  $\text{HCO}_3^-$  zu trennen. Eine weitere Funktion dieser Substanzen wird aus einem anderen Zusammenhang verständlich: Proteoglycane vermögen die Bildung von Calciumphosphat-[<sup>93,94</sup>] und von Calciumoxalat-Kristallen[<sup>95,96</sup>] zu inhibieren. Die Hemmwirkung lässt sich durch einfache physikalische Phänomene erklären, die auf Interaktionen von Proteoglycanen mit bereits vorhandenen Kristallen beruhen. Diese Kristalle werden durch Proteoglycane vor einer weiteren Anlagerung von Kristallen abgeschirmt[<sup>93</sup>]. hochmolekulare Proteoglycane sind effektiver als ihre Untereinheiten. Ein Zerfall von hochmolekularen Aggregaten verringert die Hemmwirkung oder hebt sie sogar auf[<sup>97</sup>]. Proteolytische Enzyme lysosomaler Herkunft sollen die Disaggregation hochmolekularer Proteoglycane bewirken, was z. B. zur Calcifizierung von Knorpeln führen kann[<sup>93,98-103</sup>].

Ob beide Hemm-Mechanismen auch bei der Termination der Bildung von Molluskenschalen auftreten, ist bisher noch nicht untersucht worden. Über die Regulation der Synthese von Matrix-Polypeptiden ist ebensowenig bekannt wie über die Kontrolle von Modifikationsreaktionen. Möglicherweise existieren hormonabhängige Regelkreise[<sup>104</sup>].

## 5. Biomineralisationsvorgänge bei der Bildung von Eischalen

### 5.1. Funktion der Eischalen

Kalkige Eischalen findet man bei allen Vogelarten, bei manchen Reptilien, bei Kloakentieren (Monotremata) und bei einigen Gastropoden[<sup>59,70</sup>]. Die verkalkte Eischale schützt den Inhalt des Eies vor mechanischen Effekten während der extrauterinen Inkubation und ermöglicht den Austausch von Wasser und Gasen durch die Poren. Außerdem verhindert die Eischale das Austrocknen des Eies und des wachsenden Embryos bei Tieren, die in ariden Gebieten, vor allem der Tropen und Subtropen, leben. Die relativ dünne Schale ermöglicht aber auch den Wärmeaustausch während der Inkubationsperiode selbst bei sehr niedrigen Außentemperaturen (Pinguine). Schließlich wird die verkalkte Eischale als Ca-Reservoir für den Aufbau des Embryonal-Skeletts angesehen[<sup>105,106</sup>].

Die Vogeleschale lässt sich morphologisch in drei Schichten aufgliedern (Abb. 6):

1. Eischalenhaut (*membrana testacea*),
2. Biokristallschicht,
3. Tegment (cuticula).

#### 5.1.1. Eischalenhaut (*membrana testacea*)

Die Eischalenhaut der Vogeleschale scheint für die Bildung der Biokristallschicht erforderlich zu sein. Unter entsprechenden Versuchsbedingungen wird bei Fehlen der *membrana testacea* (MT) keine Eischale gebildet[<sup>107</sup>]. Im

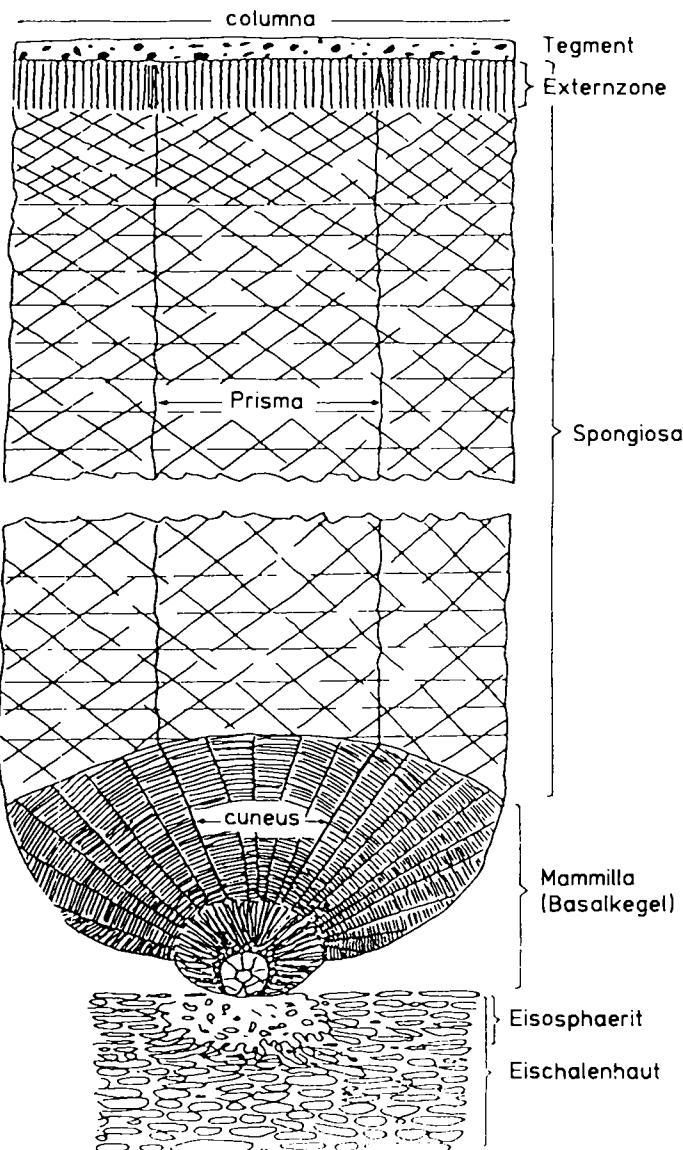


Abb. 6. Aufbau der Eischale. Die Eischalenhaut (*membrana testacea*, MT; netzartiges System cysteinreicher Faserproteine) dient als elastische Unterlage für den Prozeß der Schalenbildung. Die Biokristallschicht umfaßt den Mammilla- und Spongiosa-Bereich einschließlich der Externzone. Das Tegment ist die äußere Schicht der Eischale. Prisma, columna und cuneus bedeuten horizontale Begrenzungen kleiner Baueinheiten (Biokristallite) bzw. von Biokristallen.

allgemeinen wird jedoch die Ansicht vertreten, daß die Initialprozesse der Calcifizierungsvorgänge (Eischalenbildung) in der Mammillarschicht der Schale lokalisiert sind[<sup>105</sup>].

Die MT lässt sich mechanisch in zwei netzartige Schichten zerlegen, deren biologische Funktion vor allem in Filterwirkungen (Mikroorganismen) gesehen wird. Die vorherrschenden Komponenten der MT sind Proteine, die sich nur zu einem geringen Anteil (6%) in wäßrigen Systemen lösen. Bislang bestehen erhebliche Unklarheiten über die Charakteristik der unlöslichen MT-Proteine[<sup>50,108-110</sup>]. Einige Autoren halten sie für Keratin oder Ovokeratin[<sup>111</sup>]. Andere bestreiten dies, weil die unlöslichen MT-Proteine deutliche Unterschiede in ihrer Struktur, ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung[<sup>112</sup>] sowie in ihrem Löslichkeitsverhalten[<sup>113</sup>] gegenüber klassischen Keratinen aufweisen. Manche Forscher betrachten die MT-Proteine als kollagen-

ähnliche Proteine, weil sie Hydroxyprolin und Hydroxylysin enthalten<sup>[114]</sup>. Andere wollen elastinähnliche Proteine in der MT gefunden haben<sup>[115]</sup>.

Solange es nicht gelingt, MT-Proteine unter schonenden Bedingungen in lösliche Untereinheiten zu zerlegen, diese zu fraktionieren und die einzelnen Proteine (Polypeptide) sorgfältig zu untersuchen, werden keine weiteren gesicherten Erkenntnisse erwartet werden können. In diese Richtung zielten Versuche, die Möglichkeit eines Angriffs nukleophiler Reagentien wie CN<sup>-</sup> auf die S-Atome der sterisch zugänglichen Disulfid-Bindungen zu prüfen. Aus Strukturanalysen der Fragmente ( $M_r$  ca. 3 kDalton) konnte geschlossen werden, daß ca. 45% der intakten MT aus cysteinreichen Proteinen aufgebaut sind. Die übrigen Proteine der MT enthalten Anteile an sulfatierten Oligosacchariden<sup>[116]</sup>; Glucose, Mannose, Xylose, Sialinsäure<sup>[112]</sup> und Hexosamine<sup>[110]</sup> sind als deren Bausteine identifiziert worden. Uronsäuren scheinen zu fehlen<sup>[117]</sup>. Außerdem wird über das Vorkommen von Lipiden<sup>[118, 119]</sup> in der MT berichtet (Mono-, Di- und Triacylglycerin, freie Fettsäuren, Cholesterin und Cholesterolester sowie Phospho- und Sphingolipide).

Die MT bindet keine Ca-Ionen und wird deshalb nicht als Faktor der Initialphasen der Calcifizierung angesehen. Wahrscheinlich fungiert das Maschensystem der MT eher als Stütze für die CaCO<sub>3</sub>-Kristalle<sup>[120]</sup>.

Die Synthese von löslichen Vorstufen der MT-Proteine vermuten wir in der Leber und im Isthmus-Abschnitt des Legetrakts<sup>[58]</sup>. Gespeichert werden sie vermutlich im Isthmus, von wo aus die Sekretion und die Aggregation zu Faserstrukturen erfolgt<sup>[70]</sup>. Ergänzend sei hinzugefügt, daß auch lösliche Vorstufen von cysteinreichen Federproteinen in der Leber synthetisiert werden<sup>[121]</sup>.

### 5.1.2. Tegment (cuticula)

Die Vogeleischale ist von einer Cuticula (Tegment) überzogen, die aus zwei Schichten konstruiert ist. Das Tegment frisch gelegter Hühnereier fluoresziert rötlich, was auf „Ooporphyrine“ zurückgeführt wird. Diese Schichten bestehen im wesentlichen aus Glycoproteinen. An der Calcifizierung der Schale sind sie nicht beteiligt.

## 5.2. Organische Matrix von Vogeleischalen

Die Biokristallitschicht der Vogeleischale enthält, ebenso wie die Molluskenschale, organische Verbindungen, die pauschal als organische Matrix bezeichnet werden. Es handelt sich um Protein-Oligo(Poly)saccharid-Komplexe mit einem niedrigen Gehalt an Lipiden und Wasser<sup>[115]</sup>. Als Bausteine der Oligo- oder Polysaccharide sind Glucosamin, Galactosamin, Mannose und Fucose identifiziert worden. Auch über die Präsenz von Chondroitinsulfat A und Dermatansulfat ist berichtet worden<sup>[117]</sup>. Sialinsäure soll nur in geringen Mengen vorkommen<sup>[122]</sup>. Der Nachweis für Matrixproteine in Vogeleischalen beruht im wesentlichen auf Aminosäuren-Analysen nach HCl-Hydrolyse der organischen Matrix.

Die organische Matrix von Eischalen läßt sich nach Auflösen der Mineralphase ebenfalls in eine lösliche und eine wasserunlösliche Fraktion zerlegen.

### 5.2.1. Lösliche Matrix

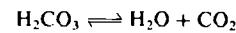
Wegen ihrer guten Löslichkeit in Wasser und wäßrigen Salzlösungen sind die Makromoleküle der organischen Schalenmatrix bevorzugt untersucht worden. Schalen frisch gelegter Eier liefern, ähnlich wie Austernschalen, zwei Gruppen von löslichen proteinhaltigen Makromolekülen (5000 und 500 kDalton). Beide hochmolekularen Aggregate zerfallen in heißer SDS-Lösung in relativ kleine Untereinheiten von ca. 15 kDalton<sup>[77]</sup>. Mit zunehmendem Alter der Eischalen treten in ihnen kleinere Bruchstücke (<30 kDalton) auf. Der I.P. dieser Untereinheiten liegt bei 2.2 und befähigt diese Substanzen zur Ca<sup>2+</sup>-Bindung. Diese typische Untereinheit von 15 kDalton enthält stark sulfatierte Oligosaccharide, die mit einer Polypeptidstruktur verknüpft sind. Funktionell wird die 15-kDalton-Einheit der löslichen Matrix als Terminierungs faktor der Schalenbildung angesehen<sup>[58]</sup>, auch wenn damit nicht alle Beobachtungen erklärt werden können.

Ein weiterer löslicher Bestandteil der Eischalenmatrix ist Carboanhydratase (Carbonat-Dehydratase). Sie kommt in der Hühnereischale in Form von zwei aktiven Isoenzymen ( $M_r$  ca. 28 kDalton) vor. Dieses Enzym katalysiert die reversible Reaktion



Dies ist wahrscheinlich die primäre Funktion dieses Matrix-enzyms, auch wenn zusätzlich eine Esterase-Aktivität nachzuweisen ist<sup>[106, 123, 124]</sup>. Das gleiche Enzym kommt auch in der Schalendrüse von Legehennen vor. Seine Aktivität hängt von der Legetätigkeit ab; während der Mauser wird in der Schalendrüse nur eine geringe Aktivität beobachtet<sup>[125, 126]</sup>, die durch Progesteron beeinflußt wird<sup>[127, 128]</sup>. Das Schalendrüsen-Enzym hängt eng mit der Bildung der Biokristallitschicht der Schale zusammen, denn Acetazolamid und andere Sulfonamide als Inhibitoren der Carboanhydratase verhindern auch die Schalenbildung.

Die Funktionen des Schalendrüsen-Enzyms umfassen wahrscheinlich das Bereitstellen von Hydrogencarbonat für den Calcifizierungsprozeß, aber auch das lokale Auflösen der Schale. Durch dieses Phänomen, das häufig bei bebrüteten Eiern in Form von Resorptionskratern beobachtet wird<sup>[75, 105, 129–131]</sup>, kann Calcium aus der Biokristallitschicht für den Aufbau des Embryonal-Skeletts bereitgestellt werden<sup>[59]</sup>. Denkbar ist aber auch eine Beteiligung von Carboanhydratase am Terminierungsprozeß der Schalenbildung. Wenn Carboanhydratase die Reaktion



katalysiert, steht kein HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mehr für die Bildung von CaCO<sub>3</sub> zur Verfügung. Globularinklusionen in CaCO<sub>3</sub>-Kristallen und vielleicht auch Poren in der Eischale sprechen für das Auftreten von gasförmigem CO<sub>2</sub>.

### 5.2.2. Unlösliche Matrix

Die unlösliche Matrix aus Eischalen ist bisher kaum untersucht worden. Es war nur bekannt, daß es sich um Pro-

teine und Polysaccharide mit einem niedrigen Gehalt an Wasser und Lipiden handeln müsse<sup>[115]</sup>.

Ausgehend von eigenen Studien an Conchiolin<sup>[91]</sup> konnte auch an der unlöslichen Matrix von Eischalen die gleichzeitige Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  nachgewiesen werden<sup>[92]</sup>. Die unlösliche Matrix hat in wäßriger Suspension einen pH-Wert von ca. 8.5. Dadurch kann die Bindungsfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  und damit das Entstehen von Primärkristallen erklärt werden.

Analog zu Studien an Conchiolin<sup>[76]</sup> konnte die unlösliche Matrix von Hühnereischalen durch SDS-Behandlung in Untereinheiten zerlegt und fraktioniert werden<sup>[58]</sup>. Dabei fällt auf, daß die unlösliche Matrix der Eischale nur aus wenigen Polypeptiden konstruiert ist (bisher entdeckt: 50, 16 und 14 kDalton). Jedoch liegt auch hier eine Vielzahl von Modifikationen durch sulfatierte Oligosaccharide vor, die die Bindungsfähigkeit für  $\text{HCO}_3^-$  beeinflussen. Sämtliche modifizierte Untereinheiten binden  $\text{Ca}^{2+}$ , doch haben nur Untereinheiten mit I.P.-Werten von > 7.0 eine zusätzliche Affinität für  $\text{HCO}_3^-$ .

Untereinheiten der unlöslichen Matrix von Eischalen reagieren positiv mit Anti-Conchiolin-Seren; ebenso ist eine Immunreaktion zwischen Anti-Schalenmatrix-Seren und Conchiolin-Untereinheiten nachweisbar<sup>[58, 77]</sup>. Anti-Schalenmatrix-Seren reagieren sehr stark mit dem Cytosol von Mucosazellen der Schalendrüse des Huhns. Das beweist allerdings nur das Vorkommen von Komponenten der Schalenmatrix in diesen Zellen<sup>[58]</sup>.

### 5.3. Synthese von Schalenproteinen

Lösliche Vorstufen der Eischalenmatrix werden nach eigenen Untersuchungen in der Leber synthetisiert<sup>[58]</sup>. Die primären Syntheseprodukte umfassen wenige lösliche Polypeptide (bisher gefunden: 60, 40, 14, 12 kDalton), die in nachfolgenden Reaktionen modifiziert werden (limitierte Proteolyse, Polysaccharid- oder Oligosaccharid-Addition, Sulfatierungsreaktionen). Die Modifikationsschritte könnten in der Leber oder in der Schalendrüse stattfinden. Von der Leber aus erfolgt der Abtransport (Primärprodukt oder Sekundärprodukt?) durch die Blutbahn zur Schalendrüse. Spätestens in der Schalendrüse müßten die Modifikationsreaktionen ablaufen. In jedem Fall entstehen zwei Arten von Sekundärprodukten. Das gleiche 12-kDalton-Polypeptid wird mit sulfatierten Polysaccharid-Molekülen verknüpft, die zu Suprastrukturen (ca. 5000 kDalton) aggregieren und damit Proteoglycanen ähneln. Diese Strukturen entsprechen der löslichen Matrix. Ob Aggregate oder Untereinheiten von den Mucosazellen der Schalendrüse gespeichert und sezerniert werden, ist unbekannt. Wahrscheinlich werden das 50- und das 14-kDalton-Polypeptid nur geringfügig modifiziert (Oligosaccharid-Einheiten, keine Sulfatierung), in den Mucosazellen gespeichert und sezerniert. Vermutlich erfolgt die Sekretion in Form von modifizierten Untereinheiten, da im Uterussekret keine Schalenprotein-Aggregate nachweisbar sind. Auch diese nur mit Oligosaccharid-Resten modifizierten Polypeptide aggregieren spätestens beim Kontakt mit den Fasern der Eischalenhaut ebenfalls zu Suprastrukturen, die der unlöslichen Matrix entsprechen (vgl. Abb. 7).

Eine sehr wesentliche Frage stellt sich nach den Regelmechanismen der hepatischen Synthese von Vorstufen der

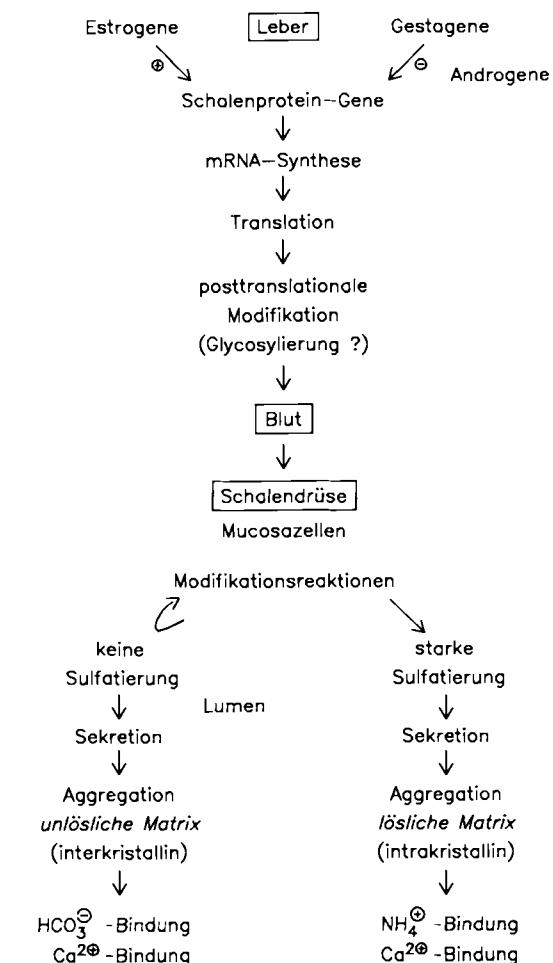


Abb. 7. Schematische Darstellung der Eischalen-Proteinsynthese (Einzelheiten siehe Text).

Eischalen-Matrix. Diese Frage haben wir aufgegriffen, weil sie besonders praxisorientiert ist und weil die Antwort helfen könnte, die Dünnschaligkeit von Hühnereiern (Knickeiern) zu erklären. Bisherige Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß die hepatische Synthese von Schalenproteinen estrogenabhängig verläuft und vom Funktionszustand der Leber bestimmt wird. Anti-Estogene, z. B. Tamoxifen, hemmen die Schalenprotein-Synthese genauso wie Androgene und Gestagene sowie typische Lebergifte ( $\alpha$ -Amanitin und Phalloidin)<sup>[77]</sup>. Zwischen hohen Estrogenenpiegeln bei Legehennen und Leberschäden bestehen direkte Zusammenhänge. Tiere mit einer hohen Legeleistung und damit einer hohen Estrogenproduktion leiden zumeist am Fettleber-Hämorrhagie-Syndrom<sup>[132]</sup>. Dies ist bereits ein pathologischer Zustand. Zusätzliche Applikation von Estrogenen (17 $\beta$ -Estradiol oder Diethylstilbestrol) an Hochleistungstiere lösen massive Leberschäden aus und beenden die Eiproduktion und die Synthese von Schalenprotein-Vorläufern in der Leber<sup>[133]</sup>. Anhand dieser Beobachtungen läßt sich die Dünnschaligkeit von Hühnereiern erklären.

### 5.4. Molekulare Mechanismen der Eischalenbildung

Auch wenn hinsichtlich der molekularen Mechanismen der Eischalenbildung vergleichsweise spärliche Informa-

tionen vorliegen, so versuchen wir dennoch anhand der verfügbaren Versuchsergebnisse einen Zusammenhang zu konstruieren. In der Schalendrüse werden sämtliche Komponenten der Eischale zusammengeführt und sezerniert. Es ist unklar, ob die einzelnen Bestandteile längere Zeit in den Mucosazellen (MC) dieses Gewebes gespeichert werden. Ein Signal für die Sekretion dieser Verbindungen besteht offensichtlich in einem mechanischen Reiz durch die Rotation des noch schalenlosen Eies in der Drüse. Dieser Effekt läßt sich z. B. auch mit Tischtennisbällen auslösen, deren Oberfläche mit einer Schicht von Eischalenhaut (membrana testacea, MT) bedeckt sein muß. Außerdem dürfen so präparierte Tischtennisbälle nicht in der Schalendrüse fixiert sein. Werden diese Bedingungen eingehalten, wird die Schale auch auf unphysiologische Unterlagen abgelegt<sup>[107]</sup>.

Es muß angenommen werden, daß zunächst Untereinheiten der unlöslichen Matrix (UM) auf der Eischalenhaut deponiert werden und spätestens dann unlösliche Aggregate bilden. Diese Aggregate vermögen gleichzeitig  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HCO}_3^-$  zu binden ( $\text{pH} > 8.0$ ) und Primärkristalle zu bilden (Abb. 8). Dies ist aber nur möglich, wenn die dabei entstehenden Protonen eliminiert werden können. Als Protonenfänger dient möglicherweise Ammoniak, das bei der Schalenbildung in hohen Konzentrationen auftritt<sup>[134, 135]</sup>. Als ein  $\text{NH}_3$ -bildendes Enzym ist Adenosin-Desaminase in der Schalendrüse identifiziert worden. Es dient offensichtlich zum Abbau von Adenosin (Harnsäuresynthese als Endprodukt des Proteinstoffwechsels bei Vogelarten) und

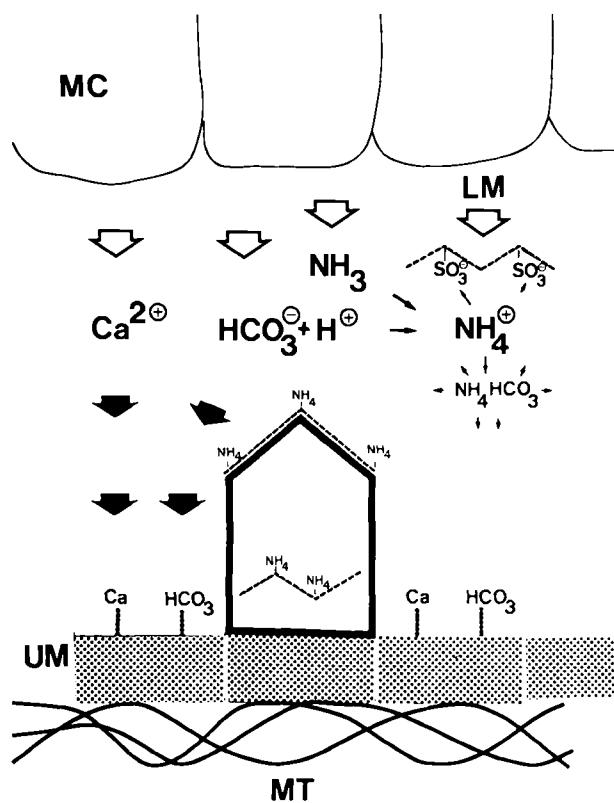
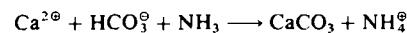


Abb. 8. Molekulare Mechanismen der Schalenbildung: Initiationsphase. Mucosazellen (MC) der Schalendrüse sezernieren  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , Aggregate der unlöslichen Matrix (UM), Aggregate der löslichen Matrix (LM) sowie  $\text{NH}_3$ . Die UM lagert sich zunächst auf Schichten der Eischalenhaut (MT) und bindet simultan Calcium- und Hydrogencarbonat-Ionen. Dabei entstehen Primärkristalle ( $\text{CaCO}_3$ ) und  $\text{H}^+$ . Protonen reagieren mit  $\text{NH}_3$  zu  $\text{NH}_4^+$ . Ammonium-Ionen werden durch Sulfat-Gruppen der LM und durch Hydrogencarbonat gebunden.

zur Eliminierung von  $\text{NH}_3$  durch den Legetrakt. Neben  $\text{NH}_3$  werden auch noch andere Giftstoffe, z. B. Be, Hg, Cd, durch die Eiablage aus dem Organismus entfernt<sup>[136]</sup>.  $\text{NH}_3$  fängt nach folgender Gleichung Protonen ab:



Eine Rückresorption von  $\text{NH}_4^+$  durch Mucosazellen ist nur sehr schwer möglich. Infolgedessen muß  $\text{NH}_4^+$  am Ort der Calcifizierung verbleiben. Die Situation wird verständlich, wenn man die lösliche Matrix (LM) in diesen Mechanismus einbezieht: Die lösliche Matrix liefert nämlich bei der Hydrolyse mit  $\text{HCl}$  große Mengen an Ammoniak (60–80% der Ninhydrin-positiven Substanzen der LM). Offensichtlich bindet die lösliche Matrix mit ihren vielen Estersulfat-Resten  $\text{NH}_4^+$ . Möglicherweise wird ein weiterer, aber geringer Anteil an  $\text{NH}_4^+$  durch  $\text{HCO}_3^-$  als  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gebunden; diese Reaktion hilft, ein leicht alkalisches Milieu zu stabilisieren. Dadurch wird auch eine günstige Voraussetzung für die Kristallisation von  $\text{CaCO}_3$  ( $\text{pH} > 8.0$ ) geschaffen. Außerdem läßt sich auf diese Weise das intrakristalline Vorkommen der löslichen Membran erklären – die unlösliche Membran tritt stets interkristallin auf (vgl. Abb. 9). Da die Proteine der unlöslichen und der löslichen Membran eine sehr ähnliche Aminosäuren-Zusammensetzung aufweisen, ist es denkbar, daß diese Proteine auch ähnliche Aminosäuren-Sequenzen haben. An den Positionen, die

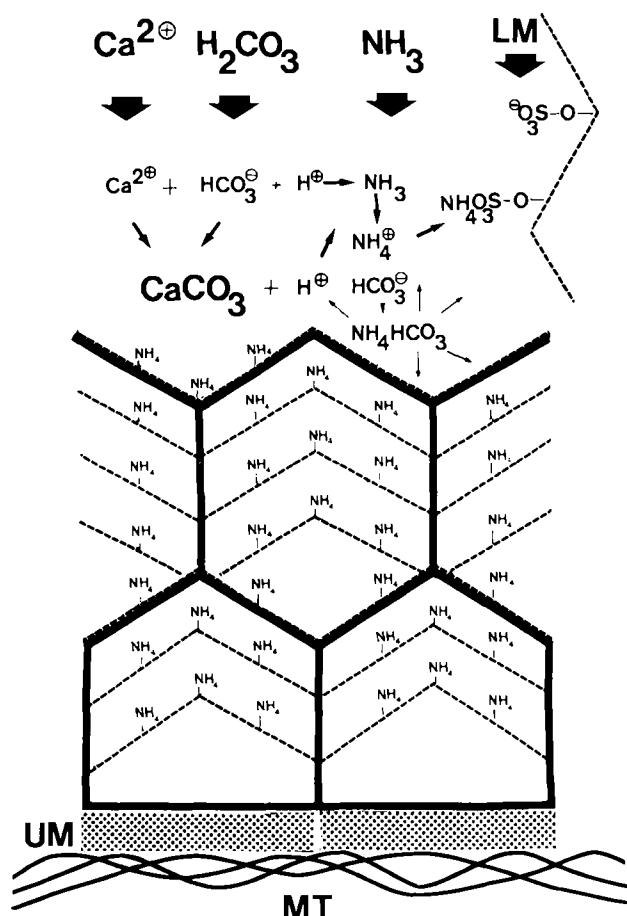


Abb. 9. Molekulare Mechanismen der Schalenbildung: Elongationsphase. Der in Abb. 8 skizzierte Prozeß setzt sich fort und führt zum Kristallwachstum unter interkristallinem Einschluß der löslichen Membran (LM) (nach Reaktion mit  $\text{NH}_4^+$ ). Die unlösliche Membran (UM) wird vermutlich bei Übergängen von Kristallschichten (siehe Abb. 2) interkristallin deponiert.

die Kristallform bestimmen, dürften die Sequenzen gleich sein<sup>[\*]</sup>. Die unlösliche Matrix wird vermutlich spätestens immer dann deponiert, wenn ein Übergang von einer morphologischen Schicht der Schale zu einer anderen erforderlich wird, z. B. innerhalb der Mammilla und innerhalb der Spongiosa (siehe dazu Abb. 6).

Die Termination der Schalenbildung wird wahrscheinlich durch die Aktion von Carboanhydratase eingeleitet, die aus  $H_2CO_3$  gasförmiges  $CO_2$  bildet (Abb. 10). Damit steht kein  $HCO_3^-$  mehr zur  $CaCO_3$ -Bildung zur Verfügung; das Abfangen von  $H^+$  erübrigts sich. Das bedeutet, daß auch die Sekretion von  $NH_3$  nicht mehr erforderlich ist. Überschüssiges  $Ca^{2+}$  kann von den Sulfat-Gruppen der löslichen Membran gebunden werden; eine Rückresorption von  $Ca^{2+}$  durch Mucosazellen gegen einen steilen  $Ca^{2+}$ -Gradienten ist nicht möglich. Daß gasförmiges  $CO_2$  auftritt, wird durch Globular-Inklusionen in  $CaCO_3$ -Kristallen wahrscheinlich. Ob auch die Porenbildung in der Schale damit zusammenhängt, ist bisher unbewiesen. Während sich jedoch in Eischalen sowohl Poren als auch Carboanhydratase finden, fehlen beide in Molluskenschalen.

Eine verminderte Synthese von Schalenproteinen führt nach den hier beschriebenen Vorstellungen automatisch zu einer herabgesetzten Bindung von  $NH_4^+$  an die lösliche

Membran, auch wenn genügend  $Ca^{2+}$  und  $HCO_3^-$  zur Verfügung stehen. Protonen können damit nur noch unzureichend durch  $NH_3$  abgefangen werden, selbst wenn ein geringer Anteil an  $NH_4^+$  gebunden wird.  $HCO_3^-$  fehlt dann bei der Kristallbildung. Protonen im Überschuß lösen bereits existierende  $CaCO_3$ -Kristalle wieder auf.

Das Ergebnis einer eingeschränkten Synthese von Schalenproteinen ist Dünnschaligkeit der Eier (Knickeier-Syndrom). Als übergeordnetes Regelsystem kontrolliert der Estrogen-Status die Synthese von Schalenproteinen<sup>[133]</sup> und Carboanhydratase<sup>[127]</sup> und damit die Schalenbildung. Damit wird auch klar, weshalb die Schalenqualität auch durch verbesserte Ca-Versorgung von Legehennen auf breiter Front nicht verbessert werden konnte<sup>[137]</sup>.

Die Bildung von Molluskenschalen dürfte auf molekularer Ebene in ähnlicher Form ablaufen. Allerdings ist kaum etwas über die Synthese von Schalenproteinen und deren Regulation bekannt.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Biomineralisationsprozesse sind in der Natur sehr weit verbreitet. Sie grenzen sich von geologischen Mineralisationsvorgängen durch die Existenz organischer Matrices ab. Organische Matrices bestehen häufig aus Proteinen (Kollagen, Dentin, Conchiolin usw.); gelegentlich kommen fast ausschließlich Polysaccharide vor (Coccolithen). Auf einer Matrix werden anorganische Kristalle deponiert (Mineralphase), deren Form und Größe durch die Struktur der Matrix bestimmt wird. Die Matrixkomponenten lassen sich in vielen Fällen in eine wasserlösliche Fraktion und in einen unlöslichen Anteil trennen.

Biologische Verkalkungsprozesse haben sich wahrscheinlich aus Entgiftungsmechanismen entwickelt. Die  $Ca^{2+}$ -Ionen-Konzentration wird wegen ihrer physiologischen Wirkung in lebenden Zellen sehr sorgfältig reguliert. Ein Überschuß an  $Ca^{2+}$  wird aus dem Cytoplasma entfernt und vorzugsweise in den extrazellulären Raum transportiert. Entsprechende Gegenionen (Phosphat, Hydrogencarbonat, seltener Sulfat) reagieren mit  $Ca^{2+}$  zu Ablagerungen, die in Form eines Exoskeletts (Molluskenschalen) oder eines Endoskeletts (Wirbeltiere) ausgebildet werden können.

Am Beispiel der Eischalenbildung werden die Interaktionen von organischen Matrixkomponenten mit  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$  und  $NH_3$  dargestellt. In diesem Fall werden die löslichen Matrixvorstufen (Polypeptide) in der Leber synthetisiert, während aus der Schalendrüse des Legetrakts die Sekretion der Matrixproteine zusammen mit  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$  und  $NH_3$  erfolgt.  $NH_3$  dient als Protonenfänger und wird als  $NH_4^+$  an die Estersulfat-Reste der löslichen Matrix gebunden, die intrakristallin verteilt vorkommt. Die Synthesegeschwindigkeit wird durch den Estrogenstatus reguliert, wobei ein überhöhter Estrogenspiegel Leberschäden verursacht. Eine eingeschränkte Leberfunktion verringert die Syntheseleistung und führt zur Dünnschaligkeit von Eiern. Die Synthese von löslichen Matrixkomponenten in der Leber wird durch Estrogene reguliert und hängt von einem funktionstüchtigen Lebergewebe ab. Diese Erkenntnisse sollten bei künftigen tierzüchterischen Maßnahmen berücksichtigt werden.

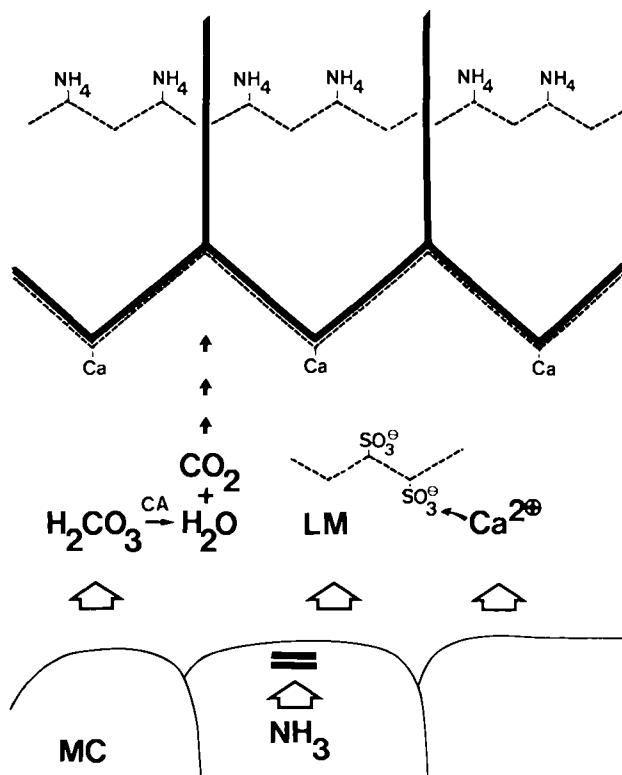


Abb. 10. Molekulare Mechanismen der Schalenbildung: Terminationsphase. Die Mucosazellen (MC) der Schalendrüse beenden zuerst die Sekretion von  $NH_3$ . In das Lumen der Schalendrüse sezernierte Carboanhydratase (CA) bildet gasförmiges  $CO_2$ , während überschüssige  $Ca^{2+}$ -Ionen von Sulfat-Gruppen der löslichen Membran (LM) gebunden werden. Dies führt zur Beendigung der Sekretionsprozesse (Einzelheiten siehe Text).

[\*] Die Sequenzermittlung gestaltet sich sehr schwierig, weil die Fragmentierung kaum reproduzierbar ist. Schalenproteine haben sich einer Spaltung durch alle bisher bekannten proteolytischen Enzyme entzogen. Eine Fragmentierung durch entsprechende chemische Reaktionen ist nicht möglich, weil die dazu erforderlichen Aminosäuren (z. B. Methionin) in diesen Proteinen nicht vorkommen.

Ferner bietet sich nun die Möglichkeit, die Struktur des Schalenmatrix-Gens im Zusammenhang mit der „Gen-Bibliothek“ des Erbguts von Hühnern detailliert zu untersuchen. Daraus könnten Erkenntnisse über eventuelle Mutationen gewonnen werden.

*Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat unsere Arbeiten durch großzügige Sachbeihilfen unterstützt.*

Eingegangen am 7. Juli,  
veränderte Fassung am 6. November 1987 [A 689]

- [1] K. J. Götting: *Malakozoologie: Grundriß der Weichtierkunde*, Gustav Fischer, Stuttgart 1974, S. 1, 39.
- [2] H. A. Lowenstam in T. W. Donelly (Hrsg.): *The Earth Sciences: Problems and Progress in Current Research*, Chicago Press, Chicago 1963, S. 137.
- [3] H. A. Lowenstam in R. W. Brauer (Hrsg.): *Barobiology and the Experimental Biology of the Deep Sea*, University of North Carolina Press, Chapel Hill 1973, S. 19.
- [4] E. T. Degens, *Top. Curr. Chem.* 75 (1964) 1.
- [5] J. E. Eastoe in H. J. J. Blackwood (Hrsg.): *First European Symposium on Bone and Teeth*, Pergamon Press, Oxford 1964, S. 269.
- [6] H. Gebhard, A. Neuhaus: *Epitaxie-Daten anorganischer und organischer Kristalle*, Springer, Berlin 1972.
- [7] K. M. Towe, *Biomineralisation* 4 (1972) 1.
- [8] H. K. Erben, *Biomineralisation* 4 (1972) 15.
- [9] N. Watabe, K. M. Wilbur, *Nature (London)* 188 (1960) 334.
- [10] K. Simkiss, *Comp. Biochem. Physiol.* 16 (1965) 423.
- [11] K. Wada, *Bull. Natl. Pearl Res. Lab. Jpn.* 7 (1961) 703.
- [12] C. Grégoire, *Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg.* 38 (1962) 1.
- [13] H. Mutvei, *Acta Univ. Stockh. Stockholm Contrib. Geol.* 20 (1969) 17.
- [14] C. Grégoire, *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 42 (1967) 653.
- [15] D. Travis, *J. Ultrastruct. Res.* 23 (1968) 183.
- [16] D. Travis in H. Schraer (Hrsg.): *Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects*, North Holland, Amsterdam 1970, S. 203.
- [17] a) N. Watabe, K. M. Wilbur (Hrsg.): *The Mechanisms of Mineralization in Invertebrates and Plants*, University of South Carolina Press, Columbia 1976; b) K. Simkiss in [17a], S. 1.
- [18] J. W. Greenawalt, C. S. Rossi, A. L. Lehninger, *J. Cell Biol.* 23 (1970) 21.
- [19] A. L. Lehninger, *Biochem. J.* 119 (1970) 129.
- [20] F. Bett, N. C. Blumenthal, A. S. Posner, G. L. Becker, A. L. Lehninger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2088.
- [21] F. G. E. Pautard in [17a], S. 33.
- [22] R. B. Rucker, D. Ford, W. Goettlich Riemann, K. Tom, *Calcif. Tissue Res.* 14 (1974) 317.
- [23] W. Dirscherl, H. Dohr, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355 (1974) 1135.
- [24] J. Matheja, E. T. Degens, *Neues Jahrb. Geol. Paläont. Monatsh.* 4 (1968) 215.
- [25] M. A. Crenshaw, *Biomineralisation* 6 (1972) 6.
- [26] a) G. H. Nancollas (Hrsg.): *Biological Mineralization and Demineralization*, Springer, Berlin 1982; b) M. A. Crenshaw in [26a], S. 243.
- [27] G. Krampitz, J. Engels, M. Hamm, C. Cazaux, *Biomineralisation* 9 (1977) 59.
- [28] G. Krampitz in [26a], S. 219.
- [29] P. V. Hauschka, J. B. Lian, P. M. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3925.
- [30] M. J. Glimcher, B. Lefteriou, D. Kossiva, *Calcif. Tissue Int.* 27 (1979) 83.
- [31] M. J. Glimcher, D. Kossiva, A. Roufosse, *Calcif. Tissue Int.* 27 (1979) 187.
- [32] M. J. Glimcher, D. Brickley-Parsons, D. Kossiva, *Calcif. Tissue Int.* 27 (1979) 281.
- [33] J. B. Lian, M. Skinner, M. J. Glimcher, P. Gallop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 (1976) 349.
- [34] J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan, P. Roepstorff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 2730.
- [35] J. Stenflo, J. W. Suttie, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 157.
- [36] K. King, *Biochem. Biophys. Acta* 542 (1978) 542.
- [37] L. Cohen-Solal, J. B. Lian, D. Kossiva, M. J. Glimcher, *Biochem. J.* 177 (1979) 81.
- [38] M. P. Molinari-Tosatti, L. Gotte, *Calcif. Tissue Res.* 6 (1971) 329.
- [39] D. A. Hall, *Biochem. J.* 59 (1955) 459.
- [40] R. Eisenstein, J. P. Ayer, S. Papajannis, G. M. Hass, H. Hellis, *Lab. Invest.* 13 (1964) 1198.
- [41] M. P. Molinari-Tosatti, L. Galziguan, V. Moret, L. Gotte, *Calcif. Tissue Res.* 2 (1968) 88.
- [42] B. C. Starcher, G. Saccomani, D. W. Urry, *Biochim. Biophys. Acta* 310 (1973) 481.
- [43] B. C. Starcher, B. A. Cox, D. W. Urry, *Calcif. Tissue Res.* 17 (1974) 1.
- [44] D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 810.
- [45] J. A. Foster, E. Bruenger, W. R. Gray, L. B. Sandberg, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 2876.
- [46] I. Mandl, R. S. Keller, *Proteins Relat. Subj.* 22 (1975) 127.
- [47] D. V. Van der Helm, T. V. Willoughby, *Acta Crystallogr. Sect. B* 25 (1969) 3217.
- [48] D. W. Urry, W. D. Cunningham, T. Onishie, *Biochim. Biophys. Acta* 292 (1973) 853.
- [49] G. Krampitz, H. K. Erben, K. Kriesten, *Biomineralisation* 4 (1972) 88.
- [50] G. Krampitz, K. Kriesten, R. Faust, *Biomineralisation* 7 (1974) 1.
- [51] G. Krampitz, U. Koester, W. Fischer, *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 13 (1975) 125.
- [52] G. Krampitz, W. Boehme, K. Kriesten, H. Hardebeck, *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 12 (1974) 1.
- [53] H. K. Erben, G. Krampitz, *Biomineralisation* 3 (1971) 51.
- [54] S. Hunt: *Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates*, Academic Press, London 1970.
- [55] R. W. Wickhoff: *The Biochemistry of Animal Fossils*, Scientechnica, Bristol 1972, S. 71.
- [56] H. Wuzel, *Dissertation*, Universität Bonn 1985.
- [57] E. Marler, E. A. Davidson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 648.
- [58] J. Eckert, R. Schade, H. Glock, G. Krampitz, A. Enbergs, J. Petersen, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 56 (1986) 258.
- [59] G. Krampitz, W. Witt, *Top. Curr. Chem.* 78 (1979) 57.
- [60] E. Bonucci, *Calcif. Tissue Res.* 24 (1977) Abstr. No. 16.
- [61] B. Strates, W. F. Neumann, G. J. Levins, *J. Phys. Chem.* 61 (1957) 279.
- [62] M. S. Santanam, *J. Mol. Biol.* 1 (1959) 65.
- [63] B. N. Bachra, A. E. Sobel, J. W. Stanford, *Arch. Biochem.* 84 (1959) 79.
- [64] B. N. Bachra, A. E. Sobel, *Arch. Biochem.* 85 (1959) 9.
- [65] M. J. Glimcher, A. J. Hodge, F. O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43 (1957) 860.
- [66] M. J. Glimcher in R. F. Sognnaes (Hrsg.): *Calcification in Biological Systems*, Am. Assoc. Adv. Sci., Washington DC 1960, S. 421.
- [67] W. F. Neumann, M. W. Neumann: *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*, University of Chicago Press, Chicago 1958, S. 169.
- [68] M. J. Glimcher, L. C. Bonar, E. J. Daniel, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 541.
- [69] D. R. Taves, W. F. Neumann, *Arch. Biochem.* 108 (1964) 390.
- [70] a) A. Mehner, W. Hartfiel (Hrsg.): *Handbuch der Geflügelphysiologie*, VEB Fischer, Jena 1983; b) G. Krampitz in [70a], S. 1050.
- [71] V. R. Meenakshi, P. E. Hare, K. M. Wilbur, *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 40 (1971) 1037.
- [72] N. Watabe, *J. Ultrastruct. Res.* 12 (1963) 351.
- [73] K. M. Wilbur, K. Simkiss, *Compr. Biochem.* 26A (1968) 229.
- [74] S. Weiner, *Calcif. Tissue Int.* 29 (1979) 163.
- [75] S. Weiner, L. Hood, *Science (Washington)* 190 (1975) 987.
- [76] R. Schade, *Dissertation*, Universität Bonn 1986.
- [77] R. Schade, *Arch. Geflügelkd.* 51 (1987) 81.
- [78] A. P. Wheeler, J. W. George, C. A. Evans, *Science (Washington)* 212 (1981) 1397.
- [79] S. Weiner, H. A. Lowenstam, L. Hood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2541.
- [80] M. A. Crenshaw, H. Ristedt in [17a], S. 353.
- [81] G. Krampitz, *Haliotis* 10 (1980) 82.
- [82] T. Samata, G. Krampitz, *Malacologia* 22 (1982) 225.
- [83] T. Samata, P. Sanguansri, C. Cazaux, M. Hamm, J. Engels, G. Krampitz in M. Omori, N. Watabe (Hrsg.): *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants*, Tokai University Press, Tokyo 1980, S. 37.
- [84] J. Gordon, M. R. Carriker, *Mar. Biol. (Berlin)* 57 (1980) 251.
- [85] S. Weiner, W. Traub, *FEBS Lett.* 111 (1980) 311.
- [86] G. E. Beedham, *Nature (London)* 174 (1954) 750.
- [87] M. A. Crenshaw, H. Heeley, *J. Dent. Res.* 49B (1967) 65.
- [88] S. Hotta, *Earth Sci. Tokyo* 23 (1969) 133.
- [89] C. Grégoire, *Chem. Zool.* 7 (1972) 45.
- [90] T. Samata, persönliche Mitteilung 1985.
- [91] G. Krampitz, H. Drolshagen, S. Hotta, *Experientia* 39 (1983) 1104.
- [92] R. Schade, H. Glock, D. Röttgen, G. Krampitz, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 52 (1984) 1104.
- [93] D. S. Howell, J. C. Pita, *Clin. Orthop.* 118 (1976) 208.
- [94] B. Engfeldt, A. Kulth, O. Westerborn, *Arch. Pathol.* 68 (1959) 600.
- [95] A. Hesse, H. Wuzel, *Urol. Int.* 41 (1986) 81.
- [96] A. Hesse, H. Wuzel, G. Krampitz, W. Vahlensieck, *Urol. Res.* 15 (1987) 93.
- [97] H. Fleisch, R. Felix, R. Schenk in H. Slavkin, R. E. Greulich (Hrsg.): *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression*, Academic Press, New York 1975, S. 368.
- [98] G. M. Herring, *Calcif. Tissue Res.* 24 (1977) 29.
- [99] S. Y. Ali, L. Evans, *Biochem. J.* 112 (1969) 427.
- [100] A. J. Barrett, *Biochem. J.* 117 (1970) 601.

- [101] H. B. Fell, T. J. Dingle, *Biochem. J.* **87** (1963) 403.  
 [102] A. I. Sapolsky, R. D. Altmann, J. F. Woessner, D. S. Howell, *J. Clin. Invest.* **52** (1973) 624.  
 [103] J. F. Woessner, R. J. Shamberger, *J. Biol. Chem.* **246** (1971) 1951.  
 [104] A. A. Dogterom, A. Doderer, *Calcif. Tissue Int.* **33** (1981) 505.  
 [105] H. K. Erben, *Biomineralisation* **1** (1970) 1.  
 [106] G. Krampitz, J. Engels, I. Heindl, A. Heinrich, M. Hamm, R. Faust, *Arch. Geflügelkd.* **38** (1974) 197.  
 [107] G. Krampitz, E. Greuel, K. Kriesten, H. Hardebeck, J. Engels, U. Koester, I. Helfgen, F. Arbab, *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **86** (1973) 313.  
 [108] G. Krampitz, H. K. Erben, K. Kriesten, *Biomineralisation* **4** (1972) 88.  
 [109] J. Wolken, *Anat. Rec.* **111** (1951) 79.  
 [110] J. R. Baker, D. A. Balch, *Biochem. J.* **82** (1962) 352.  
 [111] K. Simkiss, T. G. Taylor, *Phys. Biochem. Domest. Fowl* **3** (1971) 1331.  
 [112] E. Wedral, D. V. Vadehra, R. C. Baker, *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **47** (1974) 631.  
 [113] D. V. Vadehra, K. R. Nath, R. C. Baker, *Poul. Sci.* **50** (1971) 1638.  
 [114] J. K. Candlish, R. G. Scougall, *Int. J. Protein Res.* **1** (1969) 299.  
 [115] K. Simkiss, C. Tyler, *Q. J. Microsc. Sci.* **98** (1957) 12.  
 [116] A. Paul-Gardais, J. Picard, B. Hermelin, *Biochim. Biophys. Acta* **354** (1974) 11.  
 [117] D. A. Balch, R. A. Cooke, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **10** (1970) 13.  
 [118] R. J. Hasiak, D. V. Vadehra, R. C. Baker, *Comp. Biochem. Physiol.* **37** (1970) 429.  
 [119] R. J. Hasiak, D. V. Vadehra, R. C. Baker, *Comp. Biochem. Physiol.* **35** (1970) 761.  
 [120] A. Heinrich, *Dissertation*, Universität Bonn 1975.  
 [121] M. Müller, R. Schade, G. Krampitz, *Arch. Geflügelkd.* **51** (1987) 121.  
 [122] K. Bronsch, T. Diamantstein, *Zentralbl. Veterinärmed.* **2** (1964) 323.  
 [123] G. Krampitz, J. Engels, I. Heindl, *Arch. Geflügelkd.* **39** (1975) 189.  
 [124] G. Krampitz, K. Kriesten, I. Helfgen, *Experientia* **30** (1975) 228.  
 [125] R. S. Bernstein, J. Nevalainen, F. Schraer, H. Schraer, *Biochem. Biophys. Acta* **159** (1968) 367.  
 [126] T. Diamantstein, F. Schlüns, *Acta Histochem.* **19** (1964) 269.  
 [127] A. Potz, G. Krampitz, *Arch. Geflügelkd.* **45** (1981) 9.  
 [128] F. Schlüns, T. Diamantstein, *Nature (London)* **209** (1960) 304.  
 [129] G. Krampitz, J. Engels, *Proteins Relat. Subj.* **22** (1975) 355.  
 [130] W. J. Schmidt, *Z. Zellforsch. Mikros. Anat.* **68** (1965) 874.  
 [131] A. R. Terepka, *Exp. Cell Res.* **30** (1963) 183.  
 [132] W. Hartfiel in [70a], Teil II, S. 703.  
 [133] D. Wieser, G. Krampitz, *Zuchthygiene* **22** (1987) 267.  
 [134] J. W. Campbell, K. V. Speeg, *Nature (London)* **224** (1969) 725.  
 [135] G. Reddy, J. W. Campbell, *Experientia* **28** (1972) 530.  
 [136] G. Krampitz, P. Fischer, *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.* **50** (1983) 113.  
 [137] K. P. Linn, *Dissertation*, Universität Bonn 1986.