

Kontroll- und Designprinzipien bei der Biomineralisation

Von Lia Addadi* und Stephen Weiner*

Viele Organismen können Kristallisationsprozesse erstaunlich gut kontrollieren. Die räumlich orientierte Keimbildung, die Kontrolle der Kristallmorphologie, die Bildung einzigartiger Protein-Einkristall-Composite und die Erzeugung geordneter multikristalliner Bereiche, all dies liegt durchaus im Bereich des biologisch Machbaren. Die Untersuchung dieser Kontroll- und Designprinzipien der Biomineralisation ist ein faszinierendes Arbeitsgebiet. Das Verständnis dieser biologischen und chemischen Prozesse und deren technische Umsetzung kann einerseits zur verbesserten Herstellung synthetischer Materialien, andererseits zur Lösung vieler ernster medizinischer Probleme beitragen, die in Verbindung mit der Mineralisation stehen.

1. Einleitung

Organismen nutzen Mineralien auf die eine oder andere Weise seit mindestens 3500 Millionen Jahren. Zeugnisse der frühesten Formen des Einsatzes von Mineralien sind fossile Stromatolithe, die in Sedimentgesteinen erhalten blieben. Stromatolithe sind Lebensgemeinschaften bakterienartiger prokaryontischer Organismen, die Mineralien sowohl einschlossen als auch indirekt zur Bildung um sich selbst veranlaßten. Seitdem haben Organismen ihre Fähigkeiten zur Kontrolle der Mineralienbildung langsam verbessert, bis vor etwa 570 Millionen Jahren eine Vielzahl hauptsächlich vielzelliger Organismen innerhalb eines Zeitraums von „nur“ wenigen Millionen Jahren begann, mineralisierte Skelettstrukturen zu bilden. Während dieser entscheidenden Periode in der Evolution der Biomineralisation wurden die grundlegenden Muster der Skelettbildung festgelegt. Es wurde aber auch postuliert, daß einige der zugrundeliegenden Prinzipien der Mineralisation selbst von früheren Organismen übernommen worden seien^[1].

Heutzutage ist das Phänomen Biomineralisation weit verbreitet, wobei Lebewesen aller fünf Reiche die Fähigkeit haben, Mineralien zu produzieren. Diese Mineralien haben eine große Vielfalt von Funktionen. Die bloße Menge Calciumcarbonats biologischen Ursprungs und amorphen Siliciumdioxids, die durch marine Lebewesen produziert werden, beherrscht wichtige Bereiche der Chemie der Ozeane und, indirekt, auch der Atmosphäre. Diese Mineralien haben sich in außerordentlicher Menge auf dem Grund der Ozeane angesammelt und im Laufe der Zeit beträchtlich zum Gesamtvorkommen an Sedimentgesteinen auf der Erde beigetragen.

Die enorme Vielfältigkeit dieses Phänomens bei lebenden Organismen und auch die Tatsache, daß die ablaufenden Prozesse möglicherweise Äonen evolutionärer Anpassung widerspiegeln, deuten darauf hin, daß von diesen Organismen viel über die Bildung von Mineralien und besonders über die Kontrolle der Kristallbildung gelernt werden kann. Weiterhin haben viele der von Organismen gebildeten mineralisierten Gewebe vorteilhafte mechanische Eigenschaften. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, einige der Designprinzipien für die Herstellung hochwertiger synthetischer Materialien zu nutzen. Mit diesen futuristischen Ideen

im Hinterkopf haben wir uns entschlossen, das Augenmerk dieser Übersicht auf die der Biomineralisation zugrundeliegenden Prinzipien zu richten, die von Organismen zur Kontrolle der amorphen und der kristallinen Mineralisation herangezogen werden, sowie auch auf die Art, wie geordnete kristalline Bereiche gebildet werden.

Für Leser mit geringen oder keinen Vorkenntnissen zur Biomineralisation wird anfangs eine kurze Übersicht über die bei diesen Prozessen beteiligten Mineralien und Makromoleküle gegeben. Einige Exkurse sind am Textende hinzugefügt worden, um gewisse Aspekte der im eigentlichen Artikel diskutierten Biologie näher zu beleuchten. Diese Biologie ihrerseits wird weitgehend aus dem Blickwinkel der beteiligten Festkörperstrukturen behandelt. Auf viele sehr wichtige Punkte wird nicht eingegangen: beispielsweise auf die Aktivität der Zellen, die all diese Prozesse steuern, auf Hormone und andere Moleküle, die die Kommunikation zwischen den mineralisierenden Zellen und dem Rest des Organismus aufrechterhalten sowie auf die ausgefeilten und verwickelten Prozesse im Zusammenhang mit der Aufnahme und dem Transport der Ionen zum Ort der Ablagerung. Gute Informationen zu diesen Themen liefern Simkiss und Wilbur^[2] sowie Evered und Harnett^[3].

Der gegenwärtige Kenntnisstand auf dem Gebiet der Biomineralisation ist folgendermaßen charakterisiert: Der größte Teil unseres Wissens über in-vivo-Prozesse ist rein deskriptiv, und die zugrundeliegenden Prinzipien sind vorwiegend aus in-vitro-Beobachtungen abgeleitet. Das wirkliche Verstehen, wie ein ganzer geordneter Bereich von Makromolekülen und Kristallen, die ein biologisches Material darstellen, gebildet wird, liegt noch weit jenseits der Grenzen unseres gegenwärtigen Wissens. Wir können, wie immer, darüber spekulieren, und werden dies natürlich auch tun. Der Hauptteil dieser Übersicht beschreibt daher, wie spezielle Prozesse bei der Mineralisation kontrolliert werden. Am Ende versuchen wir, verschiedene Konzepte zusammenzuführen und zu erklären, wie geordnete kristalline Bereiche in vivo gebildet werden könnten.

2. Die von Organismen gebildeten Mineralien

Von mehr als sechzig unterschiedlichen Mineralien ist bekannt, daß sie von lebenden Organismen gebildet werden. Dazu zählen amorphe Mineralien sowie anorganische und organische Kristalle^[1]. Calciummineralien machen etwa 50 % aller bekannten biogenen Mineralien aus, was eventuell

[*] Prof. L. Addadi, Prof. S. Weiner
Department of Structural Biology
Weizmann Institute of Science
Rehovot 76100 (Israel)

den hohen Ca-Gehalt des Meerwassers und auch die häufige Verwendung von Ca als Botenstoff in Zellen widerspiegelt. Letztgenannte Funktion erfordert sehr niedrige interzelluläre Calciumkonzentrationen und den effektiven Transport von Ca aus dem Zellinneren heraus durch Membranpumpen^[4]. Die Tatsache, daß zwei der drei Mineralien, die in größerem Umfang zur Skelettverstärkung verwendet werden – Calciumcarbonat (Calcit und Aragonit) und Calciumphosphat (Dahllit) –, Calciummineralien sind, zeigt möglicherweise die Nutzung dieser nach außen gepumpten Calcium-Ionen im Organismus an.

Nur wenige der amorphen Mineralien erfüllen Funktionen, die mit dem Skelett zusammenhängen. Eine bedeutende Ausnahme macht amorphes Silicumdioxid. Skelette aus Silicumdioxid werden in großem Umfang von Meerespflanzen, die Photosynthese betreiben (Diatomeen = Kieselalgen), einzelligen marinen Radiolarien (Strahlentierchen), bestimmten Schwämmen sowie vielen terrestrischen Pflanzen gebildet (Abb. 1)^[5,6]. Amorphe Mineralien, insbesondere amorphes Calciumcarbonat und -phosphat, werden häufig als temporärer Speicher der Ionen, die für den Zellmetabolismus essentiell sind, verwendet. Eine ganze Reihe von Organismen, von denen viele keine sonstigen mineralisierten Ablagerungen bilden, haben solche speziellen Speicherzellen^[7]. Oftmals, auch wenn es etwas ungewöhnlich anmutet, werden amorphe Mineralien als Depot zur Ablagerung toxischer Metalle benutzt, die zusammen mit dem Wirtmineral durch Abscheidung durch das Lumen (Hohlraum) entfernt werden. Das häufigste Wirtmaterial bei Einlagerungen ist amorphes Calciumpyrophosphat^[8].

Kristalle werden auf viele unterschiedliche Arten in Organismen benutzt. Eine recht verbreitete Anwendung, meist in beweglichen Organismen, ist der Wahrnehmungssinn für die Schwerkraft. Dabei befinden sich die mineralischen Ablagerungen in von sensorischen Zellen umgebenen Hohlräumen, in denen sich die schwereren Mineralablagerungen ganz ähnlich wie ein Senkblei bewegen. Diese relativen Bewegungen werden von den sensorischen Zellen verfolgt^[1]. Einkristalle des magnetischen Eisenoxids Magnetit werden von Bakte-

rien, Algen und vielen Tieren zur Bestimmung des Erdmagnetfelds herangezogen, gewöhnlich für Navigationszwecke^[9]. Die Größe dieser Kristalle ist üblicherweise auf ungefähr 100 nm festgelegt, um sicherzustellen, daß die Kristalle als einzelne magnetische Bereiche fungieren^[10]. Die gebräuchlichste Verwendung von Kristallen ist die in Form multikristalliner Anordnungen, hauptsächlich um hochentwickelte Skelettstrukturen zu bilden. Die Ordnung der Kristalle in diesen Bereichen kann sehr außergewöhnlich sein, eine Eigenschaft, auf die wir in dieser Übersicht besonders eingehen werden.

3. Die von Organismen zur Kontrolle der Mineralisation verwendeten Makromoleküle

Im Jahr 1967 entdeckten Veis und Perry^[11] im Dentin von Vertebratenzähnen (Vertebraten = Wirbeltiere) ein höchst ungewöhnliches Protein. Es besteht zu etwa 40 Molprozent aus Asparaginsäure und 40 Molprozent Phosphoserin. Dieses ungewöhnlich saure Polymer ist mit dem Mineralisationsprozeß eng verflochten, aber seine genaue Funktion ist noch nicht bekannt^[12]. Seitdem wurden saure Proteine und Glycoproteine, die gewöhnlich reich an Asparaginsäure sind und oft Glutaminsäure enthalten, phosphorylierte Aminosäuren sowie saure, sulfatierte Polysaccharide in mineralisierten Geweben von sehr vielen Organismen gefunden^[1]. Ihre weite Verbreitung in Organismen aus unterschiedlichen Bereichen ist einer der Gründe, weshalb Weiner et al.^[13] vorgeschlagen haben, daß die Verwendung dieser Verbindungen zur Kontrolle der Mineralisation sich lange vor dem Aufkommen von Skelettbildungen vor ungefähr 570 Millionen Jahren entwickelte. Diese Makromoleküle werden jetzt als Schlüsselkomponenten im Mineralisationsprozeß betrachtet.

Keine wirklich aciden Makromoleküle sind bezüglich Primär- und Sekundärstrukturen vollständig charakterisiert, ganz zu schweigen von den Tertiärstrukturen. Mit der Handhabung dieser hochgeladenen Polymere sind vielfältige tech-



Lia Addadi, geboren 1950 in Padova (Italien), studierte 1968–1973 Organische Chemie an der Università degli Studi di Padova. Anschließend wechselte sie an das Weizmann Institute of Science (Israel), wo sie 1979 ihre Promotion abschloß. Nach ihrer Postdoktoranden-Zeit (1981–1982) in Harvard bei J. R. Knowles kehrte sie ans Weizmann-Institut zurück und hat dort seit 1988 eine Stelle als Associate Professor inne. Sie erhielt 1978 den Kennedy Award des Weizmann-Instituts für Doktoranden, den G.-M.-J.-Schmidt-Preis für ihre Promotion (1981), den Ernst-David-Bergmann-Preis für Chemie (1986) und den Annual Award of the Israel Chemical Society (1989). Zu ihren Forschungsinteressen zählen die Mechanismen der Biomineralisation, die pathogene Kristallisation, die Festkörper-Stereochemie und die Wechselwirkungen von Proteinen mit Kristalloberflächen.



Stephen Weiner, geboren 1948 in Pretoria (Südafrika), studierte von 1966–1972 Geologie und Chemie an der University of Cape Town (Südafrika) sowie Geochemie an der Hebrew University in Jerusalem. 1976 schloß er am California Institute of Technology in Pasadena (Kalifornien) seine Promotion auf dem Gebiet der Biomineralisation und Geobiologie ab. Nach einer zweijährigen Postdoktoranden-Zeit am Weizmann Institute of Science blieb Weiner dort, wurde 1985 Associate Professor und 1990 Professor für Biomineralisation und Archäologische Chemie. 1980 erhielt er den Shmuel-Jaroslavsky-Preis für Untersuchungen zur Biogeochemie von mineralisierten Geweben und 1984 den Ernst-David-Bergmann-Preis für Chemie. Weiner ist gemeinsam mit H. A. Lowenstam Autor eines Buches über Biomineralisation.

nische Probleme verbunden. Verschiedene Abschnitte der Aminosäuresequenzen sind aufgeklärt worden, und diese enthalten Reihen von Poly-Asp^[14] sowie alternierende Sequenzen mit Asp an jeder zweiten Position^[15]. Die Proteine und in einigen Fällen die davon abgeleiteten sulfatierten Polysaccharide treten mit Calcium in Wechselwirkung^[16], und tatsächlich scheint Calcium auch die Bildung der β -Faltblattstruktur in diesen Makromolekülen zu fördern^[17]. Viele Proteine aus mineralisierten Geweben, besonders die von Vertebraten^[18] und im geringeren Ausmaß die aus Spiculae (winzige Hartstrukturen aus Kalk) von Seeigellarven^[19], sind sequenziert worden. Viele von diesen sind ihrer Zusammensetzung nach nicht ungewöhnlich sauer; einige weisen sich wiederholende Sequenzen auf, von denen man sich Wechselwirkungen mit einem regelmäßig aufgebauten Kristallgitter vorstellen könnte. Interessant ist auch, daß in Knochen, die von allen mineralischen Geweben am besten untersucht worden sind, noch keine stark sauren Proteine gefunden worden sind, die vergleichbar mit denen wären, die in Dentin und mineralisierten Geweben von Invertebraten (wirbellose Tiere) reichlich vorkommen.

Die sauren Makromoleküle sind oft eng mit eher hydrophoben Makromolekülen verknüpft, die gewöhnlich ausge dehnte dreidimensionale Strukturen bilden. Diese Gerüstmakromoleküle variieren von Gewebe zu Gewebe und übernehmen unter anderem vermutlich auch bestimmte mechanische Funktionen. Verbreitete Beispiele für solche Gerüstmoleküle sind Typ-I-Collagen in Knochen und Dentin, α -Chitin-Protein-Komplexe in Arthropoden (Gliederfüßer) und β -Chitin-Protein-Komplexe in Mollusken(Weichtiere)- und Brachiopoden(muschelähnliche Armfüßer)-Schalen^[1, 13].

4. Auffüllen von Hohlräumen mit Mineralien: Vorteile von amorphen und kristallinen Materialien

Ein entscheidender Schritt bei der Kontrolle der Mineralisation, der bei fast allen Organismen durchlaufen wird, ist die primäre Erzeugung eines Hohlraums. Danach werden Mineralien unter kontrollierten Bedingungen veranlaßt, sich in diesem Hohlraum auszubreiten^[20]. Der Hohlraum ist gewöhnlich durch Zellmembranen, Vesikel (bläschenförmige Strukturen) oder zuvor abgelagerte makromolekulare Matrixgerüste begrenzt. Das Auffüllen dieser Räume mit amorphen Mineralien scheint, im Gegensatz zum Auffüllen mit Kristallen, eine gänzlich andere Strategie zu erfordern. Dies soll im folgenden detaillierter diskutiert werden.

Der Begriff amorphes Material kann auf mehrere Arten definiert werden. Vom theoretischen Standpunkt aus sind amorphe Materialien solche, die keine strukturelle Regelmäßigkeit in Abständen größer als die erste Koordinationssphäre haben. Vom praktischen Standpunkt aus aber hängt die Definition des Begriffs amorph von der Technik ab, mit der die Kristallinität oder ihr Fehlen nachgewiesen werden soll, sei es Röntgenbeugung, Infrarotabsorption oder EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*). Der Unterschied zwischen amorphen Materialien und kristallinen, die eine Nahordnung haben, ist also unzureichend definiert. Für Fragen der Raumerfüllung ist dieses Problem nicht allzu bedeutend, da das Vorhandensein von Nahordnungen auf molekularer Ebene nicht das gesamte isotrope

Verhalten der Festphase beeinflußt, so daß die Fernwechselwirkungen im Inneren des Materials im Durchschnitt in allen Richtungen gleich sind. Folglich können amorphe Materialien und auch Materialien mit Nahordnung leicht in die gewünschte Form gebracht werden. Der Unterschied zwischen diesen zwei Arten von Materialien wird jedoch bedeutsam, sobald man Übergänge von amorphen zu kristallinen Phasen betrachtet, da die Existenz sehr kleiner geordneter Bereiche sehr wohl eine dominierende Rolle für den Weg der Umwandlung spielen und somit die Beschaffenheit der Phase im Endzustand bestimmen kann. Diese Frage wird in Abschnitt 8 über Polymorphie näher erörtert.

Ein Einkristall zeichnet sich durch die regelmäßige Wiederholung einer Grundstruktur in allen drei Dimensionen aus, die die molekularen Wechselwirkungen auf typisch anisotrope Art optimiert. Die Anisotropie der Elementarzelle spiegelt sich im anisotropen Wachstum des Kristalls wider. In anderen Worten, wo Wechselwirkungen zwischen Molekülen oder Ionen schwächer sind, ist das Kristallwachstum verlangsamt^[2a]. Dies wiederum begründet die charakteristische Morphologie jedes Kristalls^[21]. Die Bildung bestimmter Kristallflächen – unter Vernachlässigung der Wechselwirkungen mit der Umgebung – ist das Ergebnis einer geringeren Ablagerungsgeschwindigkeit auf Kristallflächen in diesen bestimmten Richtungen. Eine ähnliche, sehr anschauliche Beobachtung kann bei der Kristallspaltung gemacht werden. Ein Einkristall läßt sich einfacher entlang der kristallographischen Ebenen brechen, die durch relativ schwache Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Der Bruch wird den Weg des geringsten Widerstand gehen und ohne Schwierigkeiten entlang glatter Oberflächen verlaufen.

In bezug auf die Raumauffüllung der Hohlräume haben amorphe und kristalline Materialien also sehr unterschiedliche Eigenschaften. Das Fehlen einer sich über weite Bereiche wiederholenden Struktureinheit in amorphen Materialien kann möglicherweise vorteilhafte Eigenschaften bewirken: keine bevorzugte Wachstumsrichtung, keine bevorzugten Bruchebenen und keine fest definierten Außenflächen. Mögliche mechanische Vorteile kristalliner Phasen sind andererseits geringere Löslichkeit, größere Dichte und geordnete Oberflächen- und Festkörperstrukturen, die alle zu gewünschten physikalischen Eigenschaften führen können.

Bei der Biomineralisation sind nur wenig Fälle bekannt, bei denen die intrinsischen Eigenschaften von Kristallen direkt genutzt werden. Das klassische Beispiel ist das Vorhandensein von Magnetit in magnetotaktischen Bakterien, in denen die magnetischen Eigenschaften der Einkristalle sowie ihre Größe, die der eines einzelnen magnetischen Bereichs entspricht, zur passiven Orientierung der Bakterien im Erdmagnetfeld genutzt werden. Ebenso können die optischen Eigenschaften von Kristallen von Organismen für bestimmte Zwecke eingesetzt werden. Einkristalle von Calcit dienen als Augenlinsen für die ausgestorbenen Trilobiten (Dreilappkrebse)^[22], Harnsäurekristalle können als Reflektoren in der Cutikula (Teil des Panzers) von Skarabäen (Blatthornkäfern) verwendet werden, wodurch deren prächtige goldene Färbung hervorgerufen wird^[23]. Diese Beispiele sind jedoch eher die Ausnahme als die Regel. Die meisten kristallinen Phasen erfüllen mechanische Aufgaben, wobei die Kristallinität mehr zur Kontrolle des Wachstums der Mineralphase dient und nicht die intrinsischen Eigenschaften der Kristalle nutzt. Im Hinblick hierauf kann das Problem, wann amor-

phe oder kristalline Mineralien bei der Biomineralisation entstehen, auf eine zugegebenermaßen extreme Weise umformuliert werden, die aber dazu dient, die obigen Punkte zu verdeutlichen.

1. Bei Mineralien, die unter Normalbedingungen im amorphen Zustand stabil sind, wird diese amorphe Phase aus mechanischen Gründen und solchen der Raumerfüllung bevorzugt sein.

2. Bei Mineralien, die im amorphen Zustand metastabil sind und sich spontan in kristalline Phasen umwandeln, gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder wird die amorphe Phase stabilisiert oder spezielle Mechanismen zur Kontrolle des Wachstums und der Eigenschaften der kristallinen Phase kommen zum Einsatz und überwinden nötigenfalls deren Nachteile.

Das beste Beispiel für die erste Klasse von Verbindungen ist amorphes Siliciumdioxid, zur zweiten Klasse zählen Calciumcarbonate und -phosphate.

4.1. Auffüllen der Hohlräume mit amorphen Materialien

Amorphe Materialien sind auch als unterkühlte Flüssigkeiten beschrieben worden. Amorphe Festkörper werden im allgemeinen spontan von Oxiden der Elemente mittlerer Elektronegativität gebildet, bei denen der Sauerstoff-Element-Bindungscharakter als Mischform aus ionischer und kovalenter Bindung beschrieben werden kann. Gängige Elemente mit glasbildenden Oxiden gehören meist zu den Gruppen III, IV und V des Periodensystems. Diese besondere Art der Bindung ermöglicht es diesen Oxiden, Strukturen zu bilden, die als aus eckenverknüpften Polyedern aufgebaute dreidimensionale Polymere betrachtet werden können^[24]. Aus der Polymerstruktur resultiert die hohe Viskosität und geringe Löslichkeit des Materials, und beide Eigenschaften tragen zu dessen kinetischer Stabilität bei. Amorphes Siliciumdioxid ist ein klassischer Vertreter dieser Verbindungskategorie. Durch die niedrige Koordinationszahl der Atome und die Verknüpfung der Koordinationspolyeder über Ecken und nicht über Kanten oder Flächen können offene Strukturen gebildet werden, in denen die Si-O-Si-Winkel variabel sind, ohne die SiO₄-Tetraeder selbst zu verzerren. Silicium wird in der löslichen Form von Kieselsäure in den Körperflüssigkeiten transportiert und in situ durch Knüpfen von Si-O-Si-Bindungen und partieller Wasserabspaltung polymerisiert. Das Lösen von Siliciumdioxid ist also mit einer echten Hydrolysereaktion verbunden^[5, 25]. Die Kombination dieser Faktoren ermöglicht es, daß Siliciumdioxid abgelagert – und so die oft phantastisch ausmodellierten Strukturen von Diatomeen (Abb. 1 oben) und Radiolarien bildet – oder zu den filigranen korbartigen Strukturen in den Choanoflagellaten^[26] (Kragengeißeltierchen) geflochten werden kann. In vielen Landpflanzen, und zwar besonders in Gräsern, sind Teile der Pflanze mit Siliciumdioxid gefüllt^[6] (Abb. 1 unten). Das Siliciumdioxid fungiert unter anderem als Schleifmittel, das Pflanzenfresser daran hindert, beliebig viel Gras abzuweiden. Simpson^[27] beobachtete, daß sich, als die Gräser im Miozän die Fähigkeit erlangten, sich mit Siliciumdioxid zu verstärken, die Struktur der Pferdegebisse änderte, um sich dieser neuen Realität anzupassen.

Amorphes Calciumcarbonat und -phosphat werfen vielfältige, höchst interessante Probleme auf, denn diese Mate-

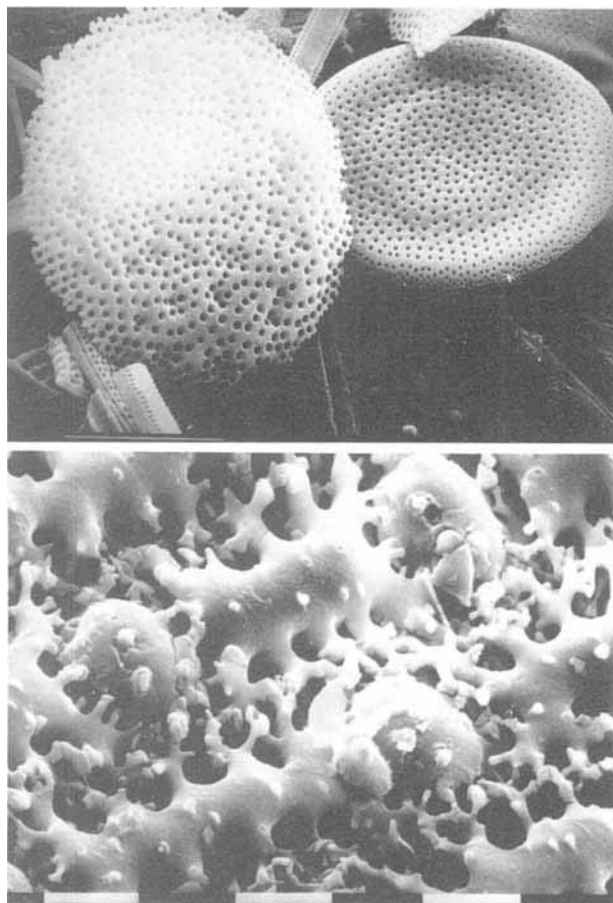


Abb. 1. Abscheidungen von amorphem Siliciumdioxid durch die Meeresdiatomee *Thalassiosira lentiginosa* (aus einem Tiefseevorkommen; oben) und durch die Weizenpflanze *Triticum aestivum* (unten). Das Siliciumdioxid durchdringt die Zellwände, das organische Material ist vollständig entfernt worden, so daß nur die mineralisierten Umrisse der Zelle beobachtet werden. Die Linie am unteren Bildrand entspricht 20 µm im oberen Bild und die Einteilungen des Maßbandes im unteren Bild 10 µm.

rialien kristallisieren leicht in mehreren polymorphen, kristallinen Formen, und ihre Umwandlung von der amorphen in die kristalline Phase ist unter nahezu physiologischen Bedingungen nicht nur thermodynamisch bevorzugt, sondern vollzieht sich auch kinetisch schnell^[28]. Daß diese amorphen Mineralien „stabile“ Phasen in Organismen sind, ist nicht Ausdruck mangelnder Kontrolle bei der Mineralisation, sondern vielmehr Ergebnis beabsichtigter Verhinderung der Kristallisation. Der Organismus muß Energie aufbringen, damit diese Phasen nicht kristallisieren. Der Grund für die Verwendung amorphen Calciumphosphats oder -carbonats in inter- oder extrazellulären Speichereinheiten liegt wahrscheinlich darin, daß es aufgrund seiner höheren Löslichkeit (im Vergleich mit der kristallinen Phase) leichter zur Wiederverwendung zur Verfügung steht. In den Zähnen von Chitonen (Käferschnecken) wird beispielsweise amorphes Calciumphosphat länger als zehn Tage stabilisiert und wandelt sich erst dann in Dahllit um^[29] (Exkurs 1). Daraus folgt, daß die Geschwindigkeit und der zeitliche Verlauf der Umwandlung exakt kontrolliert ablaufen. Eine Reihe von Beispielen sind bekannt, bei denen amorphe Materialien zum Bau gehärteter Teile verwendet werden. Das Trägermaterial für die Kiemen der zweischaligen Muschel *Neotrigonia*^[30] oder die Stilette von Nemertinen (Schnurwürmer)^[31], die wie eine Harpune zum Aufspießen der Beutetiere benutzt werden,

bestehen beide aus amorphem Calciumphosphat. Die Frage, wie diese Organismen das Material am Kristallisieren hindern, bleibt unbeantwortet, obwohl viele Inhibitoren bekannt sind, die diese Aufgabe mehr oder minder spezifisch erfüllen könnten. Dieser Punkt wird im Abschnitt 8 über Polymorphie weiter diskutiert werden. Völlig unklar ist, warum Organismen für derartige rein strukturelle Funktionen einem relativ weichen amorphen Material den Vorzug geben.

4.2. Auffüllen der Hohlräume mit kristallinen Materialien

Ungeachtet möglicher Vorteile amorpher Mineralien enthalten die meisten mineralisierten Gewebe kristallines Material. Um auf die einfachste Art einen Raum mit Kristallen auszufüllen, muß man dort zunächst die höchst mögliche lokale Übersättigung einer Lösung herbeiführen. Danach gilt es, die Keimbildung zu induzieren oder das System spontan durch Kristallisation in einen Zustand geringerer Energie zu überführen bei gleichzeitigem Entfernen von überschüssigem Lösungsmittel. Unter den Voraussetzungen, daß die Konzentration des metastabilen gelösten Stoffes hoch, die Kristallisation schnell und die gebildeten Kristalle klein sind, wird sich die resultierende Mineralphase trotz ihrer Kristallinität nicht allzu sehr von einem amorphen Material unterscheiden. Diese Situation liegt bei Sphärolithen aus Calciumcarbonat vor, die sich in metastabilen, übersättigten Lösungen spontan bilden. „Tröpfchen“ aus Calciumcarbonat und Wasser scheiden sich aus der Lösung ab und Kristallisieren mit der Zeit oder schnell beim Trocknen und ergeben Sphärolithe von einer der drei polymorphen Modifikationen von Calciumcarbonat, Calcit, Aragonit oder Vaterit^[32]. Die Organisation der Kristalle in Sphärolithen ist gelegentlich überraschend geordnet, und die Gesamtform, wenn auch variabel, ist letztlich rund. Dies ist aufgrund des Postulats, daß Flüssigkeitstropfen eine minimale Oberflächenenergie erreichen, zu erwarten (Exkurs 2). Das Problem bei dieser Art der Kristallisation ist, daß diese nicht einfach zu kontrollieren und schwierig zu reproduzieren ist. Werden die gebildeten Kristalle beispielsweise größer, so wird ihre Packung zunehmend weniger kompakt. Die Anwesenheit von Poren setzt dagegen die mechanische Stabilität herab. Soll die Kristallisation kontrolliert ablaufen, muß sie langsam sein. In der Natur werden hauptsächlich zwei Wege beschritten, um die Kontrolle der Kristallbildung zu verbessern: die Verwendung von Einkristallen und die Bildung geordneter Kristallbereiche.

5. Einkristalle

Wird ein Gesamtkörper aus einem einzigen Kristall gebildet, resultieren als Vorteile maximale Packungsdichte, ein hohes Maß an Ordnung und Homogenität. Nur eine größere taxonomische Gruppe, die Echinodermen (Stachelhäuter), haben diese Lösung gewählt (Exkurs 3). Definitionsgemäß ist ein Einkristall durch eine Elementarzelle, die kleinste Einheit, die alle grundlegenden räumlichen und Symmetriebeziehungen zwischen den Atomen und Molekülen enthält, charakterisiert. Die Elementarzelle wiederholt sich im Raum durch Translation entlang der Hauptkristallachsen, was zu einem perfekten dreidimensionalen Gitter führt, das abrupt

an den begrenzenden Kristalloberflächen endet. In solch einem idealen Kristall sind die Oberflächen makroskopisch und mikroskopisch parallel zu den Ebenen mit niedrigster Oberflächenenergie. Ein realer Kristall weicht jedoch von dieser idealen Beschreibung ab. Die Oberfläche eines in einer Lösung wachsenden Kristalls steht in aktivem Kontakt mit der Umgebung einschließlich Lösungsmittel, gelöster Substanz und Verunreinigungsmolekülen. Die Oberflächenschicht ist deshalb wahrscheinlich niemals so geordnet wie der innere Kristallkörper. Die Translation zwischen den Elementarzellen ist auch im Kristall nur über einen geringen Abstand, die sogenannte Kohärenzlänge, perfekt, danach wird sie durch Fehler und Fehlorderungen gestört. Ein realer Kristall hat somit eine charakteristische Kohärenzlänge und ein charakteristisches Mosaikgefüge; Parameter, die die Abweichung von der idealen Ordnung als Fehlerhäufigkeit und Gesamtunordnung zwischen perfekten Bereichen beschreiben.

Bereiche, die durch Grenzlinien getrennt sind, können auf mikroskopischer Ebene innerhalb jedes realen Kristalls definiert werden. Die Definition eines Einkristalls ist somit ähnlich problematisch wie diejenige eines amorphen Materials, da auch hier die Definition von der Technik abhängt, die zur Bestimmung der fraglichen Eigenschaft verwendet wird. Dies ist keine Frage der Semantik. Manche Organismen haben die Fähigkeit zur Beeinflussung der Eigenschaften von Einkristallen erworben.

Die Echinodermen (Stachelhäuter) bilden die große Mehrzahl ihrer Skelettelemente, nämlich Stacheln, Platten und anders geformte Skelettstücke aus Calcit (Exkurs 3). Jedes Skelettelement beugt Röntgenstrahlen wie ein guter Einkristall^[33]. Im Fall von Seeigelstacheln beträgt die mittlere Verdrehung der Elementarzellen gegeneinander im gesamten Skelettelement weniger als 0.15° ^[34]. Die gefensterte und gewundene Morphologie des Elements sowie die gleichmäßig gekrümmten Oberflächen lassen sicher nicht an einen Einkristall denken. Beobachtungen des in-vivo-Wachstums von Seeigelstacheln^[35a] und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Bildung einer harten Schale in ausgewachsenen Seeigeln^[35b] ergaben, daß jedes Skelettelement aus einem einzigen Kristallkeim hervorgeht. Dies ist sehr bemerkenswert, wenn man bedenkt, daß viele dieser Elemente mehrere Zentimeter groß sind. Die andere Möglichkeit zur Neubildung der Stacheln wäre nach den Vorstellungen von Shimizu und Yamada ein Vielkeimprozeß^[36], bei dem die Orientierung der Keimstellen um weniger als 0.2° über enorme Entfernungen abweichen dürfte. Towe^[37] hat vorgeschlagen, daß Skelettelemente einen Umkristallisierungsschritt durchlaufen, um den makroskopischen Einkristall zu bilden. Gut ausgerichtete Kristallkeime sind in der Biologie bekannt (z.B. in Perlmuttern in bestimmten Muscheln), aber ihre Ausrichtung ist weit schlechter^[38] (um 10°) als in den Calcitelementen von Echinodermen. Dieses Dilemma unterstreicht ein wichtiges Konzept zum Verständnis dieses Einkristall-Phänomens: Sowohl die Abfolge der Ereignisse, die bei der Bildung eines Skelettelements ablaufen, als auch die Natur des Endzustands muß bestimmt werden.

5.1. Verstärkung der Einkristalle (Bruchfestigkeit)

Skelettelemente von Seeigeln weisen noch ein weiteres nach Antwort verlangendes Paradoxon auf. Einkristalle von

anorganischem Calcit können leicht entlang der hexagonalen (104)-Ebenen gespalten werden. Skelettelemente von Seeigeln werden – obwohl sie höchst beachtliche Einkristalle sind – nicht auf diese Art gespalten (Exkurs 3). Stattdessen sind sie, im Vergleich zu reinem Calcit, unter Bildung von sogenanntem Muschelbruch, der normalerweise in amorphen Gläsern gefunden wird, schwierig zu brechen^[37]. Saure Proteine sind in Mengen von 0.02 Gewichtsprozent in den Skelettelementen enthalten^[39, 40]. Bezeichnenderweise sind die Proteine im Inneren der Mineralphase eingeschlossen und können nur durch deren Auflösung freigesetzt werden. Sie sind alle wasserlöslich und bilden keine durchgehenden Überzüge wie beispielsweise in den organischen Matrices von Weichtier(Mollusken)schalen. In-vitro-Experimente zum Kristallwachstum wie auch Messungen der Kristalltextur mit Synchrotronstrahlung zeigten, daß die sauren Proteine an den Begrenzungen von Kristallbereichen lokalisiert sind; deren mittlere Kohärenzlängen sind mit ungefähr 1500 Å bedeutend kleiner als die reiner Calcitkristalle (4500 Å)^[34]. Die Proteine werden bevorzugt während des Wachstums an definierten kristallographischen Ebenen, parallel zur kristallographischen *c*-Achse im Kristall, adsorbiert (Abb. 2)^[40]. Die resultierenden synthetischen Kristalle

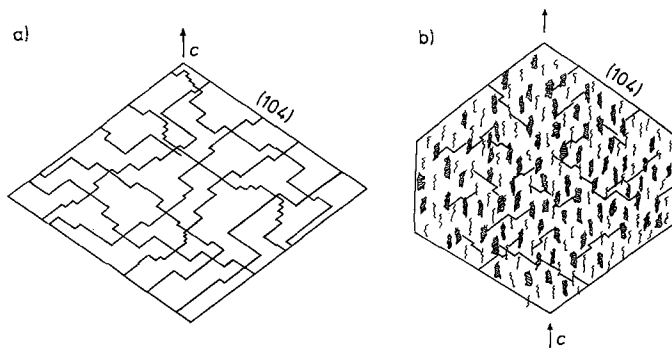


Abb. 2. Schematische Wiedergabe des Spaltverhaltens von a) einem reinen Calcitkristall, b) einem Calcitkristall mit eingebauten Seeigelproteinen. Die Spaltebenen sind immer parallel zu (104)-Flächen. Das Protein ist an den drei symmetrieverwandten Sätzen von (110)-Ebenen parallel zur *c*-Achse adsorbiert.

werden ebenfalls unter Bildung von Muschelbruch, sehr ähnlich den Stacheln selbst, gespalten. Interessanterweise werden aus Weichtierschalen extrahierte saure Proteine nicht bevorzugt an den gleichen kristallographischen Ebenen des Calcit adsorbiert, und sie beeinflussen das Spaltungsverhalten von Einkristallen nicht auf die gleiche Weise^[40]. Die künstlichen Kristalle in diesem letzteren Fall sind zerbrechlicher, und ihre Spaltung läuft entlang dem Satz regulärer {104}-Spaltflächen.

Auch wenn wir noch nicht genügend Information über die Zusammensetzung und Strukturen saurer Proteine aus Mollusken und Seeigeln haben, so spiegeln doch Unterschiede in der Art, wie die Proteine das Kristallwachstum beeinflussen, die Funktion wider, die sie erfüllen. Wir haben vorgeschlagen, daß Seeigelproteine das kristalline Material durch kontrollierten schichtweisen Einschluß dieser Proteine im schiefen Winkel zu den Spaltebenen gegen Bruch verstärken (Abb. 2). Ob diese mechanische Verstärkung auf eine direkte Mitwirkung des Proteins durch Ändern der Richtung oder durch Stoppen eines fortschreitenden Bruchs zurückzuführen

ist oder ob sie auf die Änderung der während des Kristallwachstums sich bildenden Kristalltextur beschränkt ist, ist noch nicht bekannt. Dieser von der Natur eingeschlagene Lösungsweg zur Umgehung eines intrinsischen Problems des Konstruktionsmaterials ist neu und überraschend. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es sich hier um einen Einzelfall handelt.

6. Kontrolle der Kristallmorphologie

Biogene Mineralien sind vermutlich am meisten für ihre nahezu unbegrenzte Vielfalt an Formen bekannt und geschätzt, von denen viele keinerlei Ähnlichkeit mehr mit ihren anorganischen Gegenstücken haben (Exkurs 4). Fast nichts ist darüber bekannt, wie dies in vivo erreicht wird, außer daß wahrscheinlich geladene Polymere wie Proteine, Polysaccharide oder eine Kombination aus beiden eine Rolle dabei spielen.

Wechselwirkungen zwischen geladenen Polymeren und wachsenden Kristallen können spezifisch oder auch nicht-spezifisch sein. Wir definieren hier als nichtspezifische Wechselwirkung eine, bei der das geladene Polymer mit allen Oberflächen eines gegebenen Kristalls in Wechselwirkung tritt, im Gegensatz dazu als spezifische Wechselwirkung eine, bei der eine bestimmte Oberfläche gegenüber den anderen bevorzugt ist. Spezifische Wechselwirkungen sind am wahrscheinlichsten, wenn es sich um relativ schwache Wechselwirkungen handelt, da selbst geringe Unterschiede bei der Oberflächenerkennung verstärkt werden. Nehmen der ionische Charakter der Kristall- und Polymeroberflächen und die Stärke der Wechselwirkungen zu, besonders durch die kooperative Wechselwirkung vieler geladener Gruppen am Makromolekül, so wird der Einfluß auf das Kristallwachstum zunehmend weniger spezifisch. Dieses Phänomen wurde in vitro für Polyelektrolyte wie Polyasparagat oder Polyacrylate an wachsenden Calcitkristallen^[41], für saure Polysaccharide an Natriumchlorid^[42] sowie für Chondroitinsulfat an Hydroxylapatit^[43] und Natriumurat^[44] festgestellt. Den Mechanismus der Inhibierung kann man sich so vorstellen, daß alle Kristallstufen über die gesamte Oberfläche des wachsenden Kristalls blockiert oder vergiftet werden.

Ist das Makromolekül Teil eines flexiblen Bläschens, so ist der physikalische Kontakt mit der Außenhaut wahrscheinlich nicht ausreichend, um das Wachstum zu hemmen, da Kristalle ein starkes Bestreben haben, Gitterschichten mit minimaler Oberflächenenergie zu vervollständigen. So bilden zum Beispiel die Magnetiteinkristalle in magnetotaktischen Bakterien gut definierte Flächen^[45], obwohl sie vermutlich mit der inneren Oberfläche des Bläschens, in dem sie sich bilden, in Kontakt stehen^[46]. Wahrscheinlich ist eine chemische Wechselwirkung nötig, um das Kristallwachstum im Inneren einer flexiblen Hülle an einer beliebigen Stelle der Schichtauffüllung anzuhalten. Wird ein Inhibitor in einer Membranstruktur immobilisiert, kann beim physikalischen Kontakt chemische Inhibierung eintreten. Eine Inhibierung kann auch in merklichem Ausmaß durch den kooperativen Effekt der vielen Carboxylat- und Phosphatgruppen der Lipide, die die Membran selber aufbauen, erreicht werden. Diese Art der Inhibierung durch immobilisierte Moleküle hat als weiteren Vorteil, daß sie nur dann wirksam wird, wenn der Kristall die Membran berührt, aber davor das Kri-

stallwachstum nicht stört. Dies mag für die glatten und gekrümmten Mineralskelette von Echinodermen und für einige Cocolithen (Calcitplättchen oder -schalen, die von Kalkflagellaten erzeugt werden) verantwortlich sein (Exkurs 3).

Die Kristallmorphologie kann auch durch Adsorption von Verunreinigungen aus der Lösung auf bestimmte Kristalloberflächen beeinflusst werden. Dies war sogar schon bekannt, bevor die Röntgenbeugung das gebräuchliche Mittel zur Bestimmung von Kristallstrukturen wurde^[47]. Die an der Kontrolle der Kristallmorphologie beteiligten Mechanismen der Inhibierung sind auf molekularer Ebene in einer systematischen Serie von Untersuchungen an organischen Kristallen und maßgeschneiderten Inhibitoren von der Festkörpergruppe am Weizmann-Institut studiert worden^[48]. Es wurde gezeigt, daß derartige Inhibitoren selektiv auf bestimmten Kristallebenen an Gitterstellen absorbiert werden, an denen ein mit dem Substratmolekül identischer Teil des Moleküls sich in die reguläre Anordnung der Oberflächenschicht einfügen kann.

Der Rest des Inhibitormoleküls, der nicht zur Kristallstruktur paßt, steht von der Oberfläche ab und stört somit den regulären Verlauf der Abscheidung in den darauffolgenden Schichten und verzögert so das Wachstum in dieser Richtung. Die Kristallmorphologie wird durch die relativen Wachstumsgeschwindigkeiten des Kristalls in den drei Raumrichtungen bestimmt. Sie kann somit durch den geschickten Einsatz geeigneter Inhibitoren nach Wunsch kontrolliert werden („crystal engineering“)^[49]. Umgekehrt können Informationen über die Kristallebenen, die spezifisch mit Inhibitormolekülen in Wechselwirkung treten, durch Analyse der morphologischen Veränderungen, die der Inhibitor beim Kristallwachstum bewirkt, gewonnen werden. Dieses morphologische Hilfsmittel kann also auch benutzt werden, um Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Kristalloberflächen und biologischen Makromolekülen in Lösung zu erhalten. Dies ist unabhängig von der möglichen Funktion der morphologischen Veränderung selbst.

Die „Verunreinigungen“, die man für wirksam bei der Änderung der biologischen Kristallmorphologie hält, sind die sauren Makromoleküle oder eine Untergruppe von ihnen. In einer Versuchsreihe wurden Kristalle *in vitro* in Lösungen gezüchtet, die geringe Mengen der Proteine enthielten^[50]. Die Ergebnisse zeigten, daß einige, aber nicht alle sauren Proteine spezifisch mit bestimmten Außenflächen wachsender Kristalle in Wechselwirkung treten und ihre Morphologie abändern können. Damit dies stattfindet, müssen die Proteine, zumindest teilweise, in β -Faltblattstruktur vorliegen. Darüberhinaus wurde beobachtet, daß saure Proteine vieler mineralisierter Gewebe oft bevorzugt mit Kristallflächen in Wechselwirkung treten, die ein bestimmtes Strukturmotiv aufweisen; es kann sich dabei um Kristalle von Dicarboxylaten^[50], Calcit^[40], Phosphatesterne^[51] oder die Calciumphosphatminerale Octacalciumphosphat^[52] und Dahllit^[53] handeln. Das gemeinsame Merkmal dieser Motive ist, daß die Carboxylatgruppen abwechselnd mit den Calcium-Ionen eine Kette bilden, wobei die Sauerstoffatome mehr oder weniger parallel und die Alkylketten der Carboxylate senkrecht dazu zur Kristallfläche orientiert sind. *In vivo* könnten sich die Proteine auch in Lösung ähnlich verhalten. Die Tatsache, daß ähnliche stereochemische Merkmale an wechselwirkenden Flächen in unterschiedlichen Systemen gefunden wurden, ist ein Hinweis darauf, daß viel-

leicht allgemeine Regeln für die Wechselwirkung zwischen Kristallen und sauren Makromolekülen existieren^[54].

7. Kontrolle der Keimbildung

Die entscheidende Grundbedingung für die Bildung vieler mineralisierter Gewebe ist, daß die Kontrolle der Keimbildung gewährleistet sein muß. Kristalle, die an bestimmten Orten und mit wohl definierten Orientierungen gewachsen sind, eignen sich am besten zur Bildung optimaler Materialien. Die Fähigkeit zur Kontrolle der Keimbildung wird in manchen Fällen ganz einfach durch Betrachtung der Feinstruktur des Gewebes offensichtlich, aber wie sie erreicht wird, ist sicherlich eine der grundlegendsten Fragen, um die es beim Thema Biomineralisation geht.

7.1. Speziell zur Keimbildung entwickelte Proteine

Die Verwendung spezifischer Proteine ist eine gute Strategie zur Keimbildung. Die Keimbildung tritt nicht ein, bevor das keimbildende Makromolekül am vorgesehenen Platz ist. Dies erfordert auch, daß der Keimbildner (Nucleator) nicht nur fähig ist, die Kristallkeimbildung auszulösen, sondern auch sich selbst an einer spezifischen Stelle im Gittergerüst zu positionieren. Bei Perlmuttertschichten (Exkurs 5) könnte die Triebkraft dieses Prozesses in der alternierenden Sequenz der sauren Proteine liegen^[13]. Wenn die Kette β -Faltblattstruktur hat, bilden die hydrophoben Reste eine Oberfläche, die am Gerüstprotein adsorbiert wird. Die Gerüstmatrix, die ebenso β -Faltblattstruktur hat, fixiert das lösliche Protein und bestimmt wahrscheinlich teilweise seine Faltung (Abb. 3). Die sauren Reste ragen in die Lösung hinein und

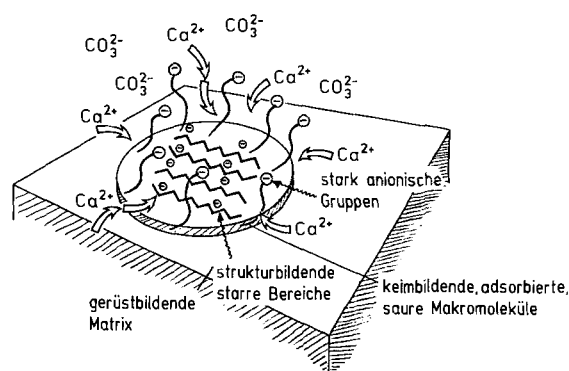


Abb. 3. Schematische Wiedergabe des Keimbildungsorts in der Perlmuttertschicht von Molluskenschalen. Das lösliche saure Protein ist durch Adsorption an der gerüstbildenden Matrix immobilisiert. Die Keimbildung ergibt sich als Folge kooperativen Wirkens flexibler konzentrierender Gruppen und strukturbildender starrer Bereiche.

bestimmen den Ort der Keimbildung. Sie binden Calcium-Ionen in einer Schicht, die die Grenzfläche zum gerade zu bildenden Kristall darstellt. Die Bildung dieser anfänglich zweidimensionalen Calciumschicht legt fest, daß der entstehende Kristall sich so aufbaut, daß seine *c*-Achse senkrecht zur keimbildenden Oberfläche steht. *In-vitro*-Experimente mit sauren Makromolekülen aus Molluskenschalen zeigen, daß einige, aber nicht alle dieser Proteine, wenn sie an ein

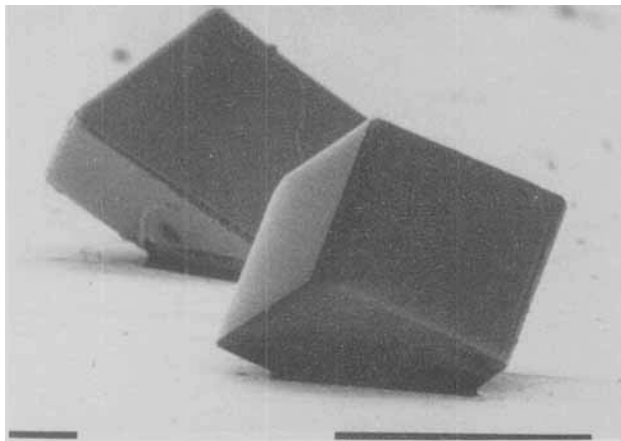


Abb. 4. Synthetische Calcitkristalle, deren Keimbildung mit sauren, auf einem künstlichen Substrat adsorbierten Proteinen aus Molluskenschalen ausgelöst wurde. Die Kristalle sind bezüglich ihrer *c*-Achse senkrecht zum Substrat orientiert und zeigen die typische rhomboedrische Bruchmorphologie nichtbiogenen Calcits. Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 0.1 mm.

festes Substrat gebunden werden, die Keimbildung von Calcitkristallen so auslösen können, daß ihre *c*-Achsen senkrecht zur Ebene des keimbildenden Substrats stehen^[50] (Abb. 4). Dies ist die häufigste in-vivo-Orientierung von Calcit und auch Aragonit. In beiden Strukturen steht die *c*-Achse senkrecht zu den Calcium- und Carbonatschichten^[54] (Abb. 5).

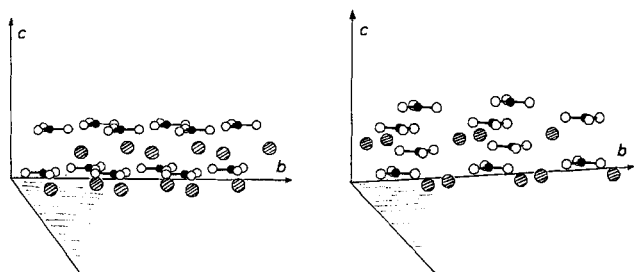


Abb. 5. Teilstrukturen von Calcit (links) und Aragonit (rechts). Wiedergegeben sind die (001)-Ebenen in Verbindung mit der keimbildenden Oberfläche. Die Calciumschichten sind praktisch identisch, der Unterschied zwischen beiden Strukturen zeigt sich in den Positionen der Carbonat-Ionen. Schraffierte Kugeln sind Ca-Ionen, schwarze C-Atome und weiße O-Atome.

Es gibt Hinweise, wenn auch indirekte, auf spezifisch keimbildende Proteine in Perlmuttschichten (Exkurs 5), aber für alle anderen Gewebe ist ihre Existenz bis jetzt hypothetisch. In Knochen befinden sich beispielsweise Kristalle in Zwischenräumen innerhalb der Collagenfibrillen. Der Kristall wächst nach der Keimbildung auf der Oberfläche in die Fibrille hinein, denn im Inneren der Fibrille ist wenig oder kein Platz für ein keimbildendes Molekül. Wir beschränken uns an dieser Stelle auf eine Beschreibung der Eigenschaften, die zur kontrollierten Keimbildung beitragen. Grundlagen hierfür sind in-vitro-Untersuchungen an sauren Glycoproteinen aus Mollusken.

7.2. Konformation und Starrheit

Saure lösliche Proteine können einerseits im adsorbierten Zustand als Keimbildner wirken, aber andererseits auch die

Kristallisation unterbinden, wenn sie gelöst vorliegen. Dies gewährleistet, daß die Kristallisation nicht am falschen Ort und zur falschen Zeit eintritt. Die Verhinderung der Kristallisation aus der Lösung wird durch die Flexibilität der Polypeptidkette in Lösung sichergestellt. Wir nehmen an, daß die Keimbildung auf dem Substrat durch eine Anordnung von Carboxylatgruppen von Asparaginsäureresten katalysiert wird, die fest eine geordnete und starre Konformation einnehmen^[55]. Eine ausgedehnte Schicht ist in Lösung nicht stabil und starr genug, um ein gutes Substrat zur Bildung und Stabilisierung von Kristallkeimen zu sein. Diese Hypothese wird durch Daten aus verschiedenen Bereichen gestützt. Einerseits sind flexible Polyelektrolyte gut bekannt als Inhibitoren für Kristallkeimbildung und -wachstum^[56]. Andererseits ist beobachtet worden, daß die gleichen Gruppen, immobilisiert in einer Monoschicht, selektive Keimbildner für Kristalle sind^[57, 58], deren Ebenen der Oberflächenstruktur der Monoschicht nachempfunden sind. Mit maßgeschneiderten polymeren Inhibitoren ist auch gezeigt worden, daß eine Anordnung von Seitenketten, die der Struktur des fertigen Kristalls entspricht, selektiv seine Keimbildung unterdrückt, wenn diese in Lösung vorliegt^[59].

Um den Mechanismus der räumlich orientierten Keimbildung verstehen zu können, haben wir einige Modellsysteme, unter anderem Polycarboxylate in unterschiedlichen Konformationen, untersucht^[41]. Wir beobachteten, daß Polyasparagat, das auf Filme von sulfoniertem Polystyrol in teilweiser β -Faltblattstruktur adsorbiert war, die Keimbildung von Calcit von der (001)-Calciumebene aus induziert. Adsorbiertes Polyacrylat mit zufälliger Konformation hat nicht denselben Effekt, und Polyglutamat mit einem relativ zum Polyasparagat geringen Anteil an β -Faltblattstruktur hat einen dazwischenliegenden Effekt. Alle drei Polymere sind starke Inhibitoren für Keimbildung und Wachstum von Calcit aus der Lösung, weil sie auf die Oberfläche von Calcitkristalliten oder -keimen adsorbiert werden und so deren Wachstum verzögern und/oder unterbrechen.

Es ist interessant, daß das Verhalten dieser relativ kleinen Polymere und oberflächenaktiven Proteine im Gegensatz zu dem großer globulärer Proteine steht, jedoch die beteiligten grundlegenden Mechanismen dieselben sind. Albumin aus menschlichem Serum wirkt in vitro in Lösung als Keimbildner für Natriumurat-Monohydrat-Kristalle^[60], wobei eine Anzahl von Carboxylatgruppen an der Oberfläche beteiligt ist. Dieses Protein ist groß und stabil genug, auch in Lösung starre Bereiche an seiner Oberfläche zu erzeugen. Diese stabilisieren die Kristallkeime durch Wechselwirkung mit ihrer Kationenschicht. Die Adsorption des Proteins auf Polystyrolfilmen führt aber zum völligen Verlust seines Keimbildungsvermögens. Das Protein unterliegt teilweiser Denaturierung nach der Adsorption^[44], die wahrscheinlich mit dem Aufbrechen der Einheiten der keimbildenden Bereiche einhergeht.

7.3. Kooperative Wechselwirkungen

Ein weiteres Element, das als Teil des Keimbildungsmechanismus identifiziert wurde, sind die kooperativen Wechselwirkungen zwischen der oben erwähnten strukturierten und starren Carboxylatanordnung und anionischen Sulfatgruppen, die sich an flexiblen Oligosaccharidketten befin-

den. Sulfatierte Polysaccharide, die an Polypeptidketten gebunden sind (Proteoglycane), liegen in Knorpeln vor und sind durch die Kationenkonzentration am osmotischen Gleichgewicht des Gewebes beteiligt. Bei der Keimbildung von Calciumcarbonatkristallen ist derselbe Effekt postuliert worden^[61], wobei die Calcium-Ionen anschließend zu den fixierten Carboxylatpositionen hindurchwandern, wo die Kristallisation als Folge weiterer Bindung von Carbonat einsetzt^[55] (siehe Abb. 3). Die Möglichkeit der Existenz eines solchen Prozesses ist an Modellsystemen aus flexiblen Polystyrolsulfonatketten und adsorbiertem Polyasparagat mit β -Faltblattstruktur demonstriert worden. Wiederum kann der gleiche Prozeß wegen mangelnder Organisation, die sich erst im adsorbierten Zustand durch Einschränken der Beweglichkeit einstellt, nicht in Lösung ablaufen.

Bemerkenswert ist, daß Natrium-Ionen reichlich in Meerwasser und in der Flüssigkeit, die sich außerhalb des Mantel-epitels (extrapalliale Flüssigkeit) von Mollusken befindet, in einer viel höheren Konzentration (0.5 M) als Calcium vorhanden sind, so daß sie die Wechselwirkungen zwischen Calcium und sauren Proteinen in Lösung stören^[62]. Die Zusammensetzung der sich tatsächlich vor der Kristallkeimbildung mit der Matrix in Kontakt befindlichen Flüssigkeit ist jedoch unbekannt. So kann man über einen weiteren möglichen Mechanismus spekulieren, der sicherstellt, daß die Kristallisation nur dann erfolgt, wenn es gewünscht wird, und zwar durch selektives Entfernen oder Einführen von Störkationen wie Natrium am Kristallisationsort. Es ist lang bekannt, daß mit biologischen Membranen Ionentrennungen erreicht werden können. So filtern Meeresprotozoen der Gattung *Acantharia* Strontium aus dem Meerwasser, um ihre Strontiumsulfatskelette aufzubauen, und zwar gegen einen enormen Konzentrationsgradienten. Sie selektieren dabei Sr-Ionen, obwohl die ihnen sehr ähnlichen Ca-Ionen wesentlich häufiger sind^[63]. Seeigel bauen ihre Skelette aus teilweise bis zu 40 Molprozent Magnesium enthaltendem Calcit^[64]. Der Calcit aus Molluskenschalen enthält gewöhnlich sehr wenig Magnesium. Ganz offensichtlich wird hier auch der Mg-Gehalt gut kontrolliert^[65]. Es ist daher denkbar, daß Natrium selektiv entfernt wird, um bestimmte Proteine am Ort der Keimbildung zu aktivieren, indem stärkere Wechselwirkungen mit Calcium zugelassen werden.

8. Kontrolle des polymorphen Typs

Viele Organismen üben totale Kontrolle über den polymorphen Typ der Abscheidungen aus. In der Biologie gibt es zahlreiche Beispiele dafür, daß ein Organismus dieselbe Verbindung an einer Stelle in einer bestimmten Struktur und in einer zweiten Struktur an einer anderen, oft unmittelbar benachbarten Stelle kristallisiert^[1, 2]. Wir verstehen weder, wie dies erreicht wird, noch welche Vorzüge das eine polymorphe Material gegenüber dem anderen hat.

Nach den Gesetzen der Thermodynamik ist die Kristallisation bevorzugt, wenn die Energie des Kristallkeims als solche in ihrem absoluten Wert gleich oder größer ist als die Energie der Wechselwirkung mit der Umgebung (Oberflächenenergie). Aus einer Lösung, die bezüglich des stabilen, aber nicht des metastabilen Polymorphs eines bestimmten Materials übersättigt ist, kann nur das stabile Polymorph kristallisieren. Ist die Lösung jedoch bezüglich mehr als einer

kristallinen Form übersättigt, können alle Modifikationen ausfallen. Der Gleichgewichtszustand niedrigster Energie wird dann erreicht, wenn sich alle weniger stabilen polymorphen Formen in die stabilste umwandeln. Obige Betrachtungen sind rein thermodynamischer Natur. Es ist hingegen allgemein bekannt, daß sowohl die Bildung eines bestimmten Polymorphs als auch die Umwandlung einer Phase in eine andere kinetisch kontrolliert sein können^[66].

Im Prinzip kann ein metastabiles Polymorph nach zwei gegensätzlichen Mechanismen kristallisieren: Verhinderung der Keimbildung der stabilen Form oder bevorzugte Keimbildung der metastabilen Form. Es gibt viele Beispiele unter Beteiligung organischer Moleküle für den ersten Fall^[59] und sehr wenige oder keines für die zweite Kontrollmethode^[58].

Die Prozesse unter Beteiligung organischer Moleküle können gut untersucht werden, da sie stereochemisch einfacher zu beeinflussen sind. Ein maßgeschneidertes Additiv, das die Struktur eines Kristalls der stabilen, aber nicht der metastabilen Form hat, kann die Kristallisation der stabilen Form hinreichend verzögern, um die Kristallisation der weniger stabilen Phase zu ermöglichen^[59]. Diese Experimente stützen auch die Auffassung, daß übersättigte Lösungen Aggregate mit vielfältigen Strukturen enthalten, und jede der unterschiedlichen Formen, oder zumindest einige davon, den fertigen Kristallen ähnelt. Wenn die Kristallisation bestimmter davon selektiv inhibiert wird, ist das Wachstum der anderen Formen kinetisch bevorzugt. Analog können geordnete Oberflächen, die einem Polymorph an einer bestimmten Kristallebene entsprechen, im Prinzip selektiv dessen Keime stabilisieren. Organisierte Oberflächen von Monoschichten^[67] und Oberflächenaggregate^[68] amphiphiler Moleküle verhalten sich als Kristallkeimbildner und können diesem Mechanismus zufolge die Wahl des Polymorphs beeinflussen. Es ist gezeigt worden, daß Stearatmonoschichten die Keimbildung von Vaterit, einem instabilen Polymorph von Calciumcarbonat, induzieren können. Der Mechanismus der Induzierung ist noch nicht vollständig geklärt, es ist aber vorgeschlagen worden, daß die Orientierung der Carbonat-Ionen in Richtung der (001)-Keimebene entscheidend ist^[58].

Die verbreitetsten Beispiele für die Festlegung auf ein bestimmtes Kristallpolymorph bei der Biomineralisation treten bei den Calciumcarbonaten Calcit, Aragonit und Vaterit auf. Thermodynamisch ist bei normalen atmosphärischen Temperaturen Calcit das stabilste Polymorph. Aragonit ist weniger stabil als Calcit, und das instabilste Polymorph ist Vaterit. Obwohl die Stabilitäten von Calcit und Aragonit in Wasser sehr ähnlich sind, können Organismen diese mit höchster Präzision beeinflussen. Die Anwesenheit anderer zweifach geladener Ionen wie Magnesium und Strontium begünstigt die Bildung von Aragonit bzw. Calcit^[69]. Aragonit hat eine dichtere Struktur, die wahrscheinlich das kleine Magnesium-Ion nicht aufnehmen kann, da dieses während der Adsorption an den Stellen, an denen der Kristall wächst, eine größere Hydrathülle hat. Magnesium kann jedoch ins Innere von Calcit eingebaut werden, wo es das Kristallwachstum inhibiert. Meerwasser hat hohe Konzentrationen an Magnesium, und Aragonit ist tatsächlich das Polymorph, das sich aus Meerwasser spontan bildet. Polymorphie kann so auf chemischer Ebene durch Einstellung von Fremdionenkonzentrationen und kinetisch durch Hinderung des Wachstums des stabilen Polymorphs gesteuert werden. Aber auch eine Kontrolle auf der Ebene der Keimbildung ist vor-

stellbar. Wir möchten jedoch betonen, daß die (001)-Schichten von Calcit und Aragonit, bei denen der Kristallaufbau am häufigsten beginnt, bezüglich der Positionen ihrer Calcium-Ionen praktisch identisch sind. Die selektive Bildung von Keimen für eines der zwei Polymorphe hätte wahrscheinlich ebenso die Festlegung der Positionen der Carbonat-Ionen einzubeziehen (siehe Abb. 5).

Die Calciumphosphatminerale sind ein weiteres klassisches Dilemma für unser Verständnis der Biomineralisation. Dahllitkristalle von Knochen weisen eine ganze Reihe von Unregelmäßigkeiten auf. Sie sind nichtstöchiometrische Verbindungen^[70], ihre Abmessungen (ca. $200 \times 500 \times 30 \text{ \AA}$)^[71] lassen auf ein hohes Verhältnis Oberfläche/Festkörpervolumen schließen, und ihre Morphologie, nämlich unregelmäßig geformte dünne Plättchen^[71], die in Richtung der *c*-Achse verlängert sind^[71], spiegelt nicht die Symmetrie der hexagonalen Struktur wider. Die Wirksamkeit eines „Gedächtniseffekts“ von vorangegangenen Phasen ist zur Erklärung einiger dieser Phänomene vorgeschlagen worden^[72]. In der Tat weist das Phasendiagramm von Calciumphosphat einen Reichtum an Formen auf, deren Bildung und Umwandlungen abhängig von pH-Wert, Temperatur, Konzentration und Anwesenheit fremder anorganischer und organischer Bestandteile sind^[73]. Die Struktur der wahrscheinlichsten Vorstufe von Apatit, Octacalciumphosphat, ist identisch mit der von Hydroxylapatit in einer Schicht der (100)-Ebene^[72] (Abb. 6). Die Hydroxylapatitschichten sind

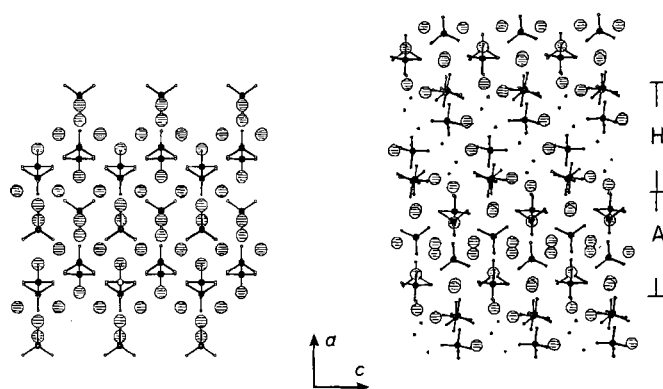


Abb. 6. Packungsanordnungen von Hydroxylapatit (links) und Octacalciumphosphat (rechts), Blick auf die (010)-Ebene. In der Struktur von Octacalciumphosphat ist die Hydratschicht H zwischen „Apatitschichten“ A in der (100)-Ebene eingeschlossen. Schraffierte Kugeln sind Ca-Ionen, schwarze Kugeln P-Atome und kleine weiße Kugeln O-Atome. *a*- und *c*-Achsen gelten für beide Strukturen.

jedoch von Hydratschichten eingeschlossen, die ebenfalls zu (100) parallel verlaufen. Diese müssen entfernt werden, um die Ionen in die Gitterordnung der Apatitstruktur zu bekommen. Obwohl viel über das Verhalten dieser Systeme in vitro bekannt ist, weiß man erst wenig über die Art und Vorgeschichte der keimbildenden Kristalle in Knochen.

Das Konzept der Umwandlung einer Phase mit einem eventuell vorhandenen Gedächtniseffekt bietet interessante Möglichkeiten im Hinblick auf die Umwandlung amorpher Phasen in kristalline. Solche Umwandlungen sind in der Biologie bekannt^[1], wobei eines der am besten belegten Beispiele das der Zähne von Chitonen (Käferschnecken) ist (Exkurs 1). Nun stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit sehr kleiner, nahgeordneter Bereiche innerhalb einer amorphen

Struktur ihre Umwandlung in eine vollständig kristalline Phase bestimmen kann^[74]. Wenn dies möglich ist, dann könnten die Bedingungen der Fällungsreaktion der ursprünglichen, amorphen Phase oder die Anwesenheit von Spurenbestandteilen die Bereiche mit Nahordnung beeinflussen und folglich auch, lange vor der letzten Umwandlung, die Beschaffenheit der endgültigen Phase. Das Entfernen von Inhibitoren oder ein Wechsel der äußeren Bedingungen können dann die Kristallisation auslösen und diesen Anfangskeimen das Wachstum erlauben.

9. Raumerfüllung mit Kristallanordnungen: Das Design biologischer Materialien

Die Bildung mechanisch widerstandsfähiger, mineralisierter Gewebe durch Organismen erfordert sehr ausgefeilte Verfahren, und tatsächlich benötigte die Natur Tausende von Millionen Jahren, diese Fähigkeit zu erlangen. In Abhängigkeit vom Grad der Vervollkommenung ist es erforderlich, einen Raum abzugrenzen, den Zustrom der Ionen zu kontrollieren, einen Ort für die Keimbildung zu schaffen, die Kristallmorphologie und -orientierung zu kontrollieren – Dinge, die wir jeweils einzeln diskutiert haben. Am Ende dieses Artikels geben wir einen Überblick über einige der Produkte all dieser Aktivitäten, nämlich den mineralisierten biologischen Materialien selbst.

Der vielleicht einfachste Weg für Organismen, ein Material zu bilden, besteht darin, einen Hohlraum abzugrenzen, Ionen dort hineinzupumpen und die Kristallbildung an nichtspezifischen, willkürlich verteilten Keimorten zu induzieren. Das Produkt ist eine mineralisierte Anhäufung von Sphärolithen. Beispiele für solche Materialien sind die Stacheln, die aus dem Gürtel (Perinotum) von Chitonen herausstehen^[75] (Abb. 7, links oben), die gekammerten Ablagerungen von *Nautilus*^[76] (Exkurs 2) und die verstärkten Wände der Kalkalge *Halimeda*^[77] (Exkurs 4). Das Endprodukt ist sehr porös, hat eine schlechte oder gar keine innere Organisation und ähnelt in vielerlei Hinsicht einer synthetischen Keramik.

Durch Kontrolle der Keimbildungsorte und besonders durch deren regelmäßige Verteilung kann ein bedeutend besser geordnetes Gewebe, aber immer noch auf Basis von Sphärolithen, gebildet werden. Beispiele für die Anwendung dieser Strategie sind Otolithe (Gehörsteinchen) von Fischen^[78] (Exkurs 2) und Schalen von Vogeleiern^[79] (Abb. 7, rechts oben). In Eierschalen wird der Ort der Keimbildung von organischen Molekülen, unter anderem sulfatierten Polysacchariden, die eine sphärische Struktur einnehmen, kontrolliert. Bei der Keimbildung von Calcitkristallen stehen deren *c*-Achsen mehr oder minder senkrecht zu ihrer Oberfläche. Da die Keimbildung räumlich sehr nahe an der inneren Membran erfolgt, ist das Wachstum der Kristalle in dieser Richtung gehindert. Kristalle, deren Wachstum in andere Richtungen orientiert ist, hören beim Kontakt mit Kristallen einer benachbarten Keimstelle, oder wenn sie die weiter entfernte äußere Membran erreichen, zu wachsen auf. Somit weisen viele der Kristalle eine pseudobevorzugte Orientierung lediglich aufgrund der Ausmaße des zur Verfügung stehenden Raumes auf. Die Packungsdichte des Produkts ist sicherlich gestiegen.

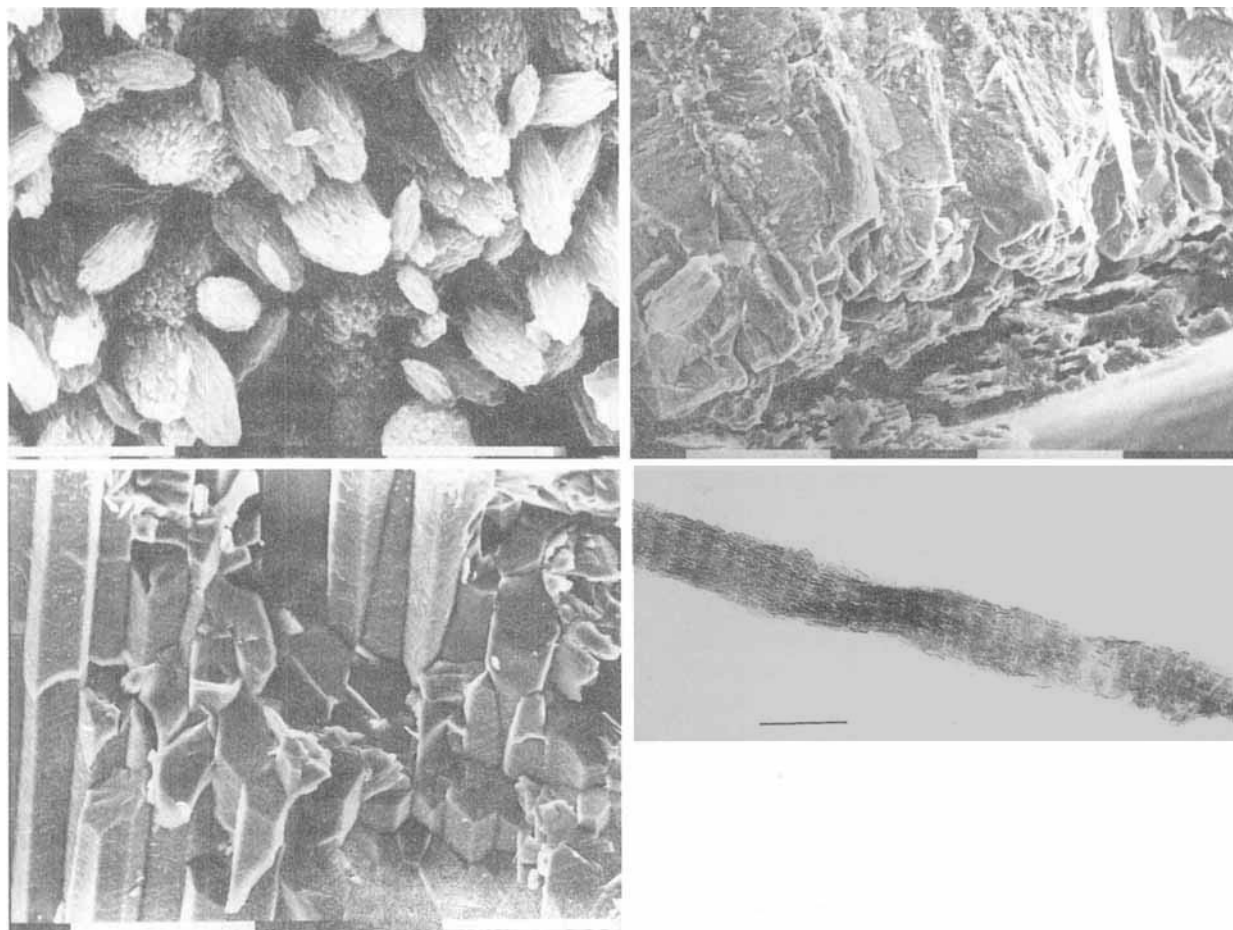


Abb. 7. Beispiele für vier verschiedene von Organismen verwendete Methoden, Räume mit Kristallanordnungen aufzufüllen. Links oben: Aragonit-Sphärolithe, die die Stacheln des Gürtels der Chitone *Acanthopleura haddoni* (Mollusca) bilden. Die Sphärolithe zeigen keine Vorzugsorientierung und sind locker gepackt (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 10 μm). Rechts oben: Blick auf eine Schnittfläche und innere Oberfläche der Eierschale eines Haushuhns. Im unteren Teil erkennt man die Keimzentren der Calcitkristalle und im oberen Teil das Zusammenwachsen der Kristalle zu Kolumnarstrukturen (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 0.1 μm). Links unten: Die äußere prismatische Calcitschicht der Schale der Muschel *Atrina serrata*. Jeder Calcitkristall geht von einem einzigen Keimort aus und wächst im Inneren eines organischen Matrixgerüsts, das nicht zu sehen ist. (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 0.1 mm). Rechts unten: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen lyophilisierten, aber ungefärbten mineralisierten Collagenfibrille aus einer Sehne eines Hausputers. Die beobachtete Elektronendichte ist auf die Anwesenheit dünner, plättchenförmiger Dahllitkristalle zurückzuführen, die bevorzugt in den Hohlräumen der Collagenfibrille lokalisiert sind und so das charakteristische faserige Muster offenlegen. Die Fibrille ist so verdreht, daß in einem Teil auf die Kante der Kristalle, in anderen Bereichen auf deren Fläche gesehen wird. Das Collagengerüst, in dem die Kristalle wachsen, ist nicht zu sehen (Linie entspricht 2.00 nm).

Bei den vorigen Beispielen ging es um die Bildung vieler Kristalle von einem einzigen Keimort aus. Eine weitaus bessere Kontrolle kann erreicht werden, wenn an einem einzigen Keimort nur ein einziger Kristall produziert wird. In der Biologie tritt dieses Phänomen häufig zusammen mit der lokalen Isolierung der Keimbildungsstelle auf, so daß sich jeder einzelne Kristall in seinem eigenen vordefinierten Raum bildet. Das ideale Beispiel hierfür ist die prismatische Schicht bei Mollusken (Weichtiere) (Abb. 7, links unten) mit ihren einzelnen Kristallen aus Calcit oder seltener Aragonit, die sich in ihrem eigenen Gerüst bildet^[80]. Auf diese Art gebildete mineralisierte Gewebe von Mollusken bestehen zu über 95% aus Mineralien, weniger als 5% Matrix^[81]. Sie zeichnen sich durch hohe Dichte und ausgezeichnete Ordnung aus. Die Größe der Kristalle liegt allgemein im Mikro- und Submikrometerbereich.

An der Bildung mineralisierter Collagenfibrillen, den Bausteinen der Knochen, des Dentins und mineralisierter Sehnen, sind ähnliche Prozesse beteiligt, doch unterscheiden sich die Ausmaße der Produkte sehr. Die Keime für einzelne, plättchenförmige Dahllitkristalle, die nur wenige Hundert Å lang und breit sowie nur 20 bis 30 Å dick sind^[71], kristallisie-

ren an speziellen Orten auf oder in der Collagenfibrille. Sie wachsen in einen vorgeformten Hohlraum, der das Aussehen einer engen Rille oder eines Kanals hat^[82], in die Fibrille hinein. Diese Rillen verhindern, aber nur vorübergehend, das weitere Wachstum der Kristalle^[83], die sich weiter in Richtung der Überlappungszone der Fibrille ausdehnen^[84]. Das Collagengerüst gibt allem Anschein dem „Druck“ nach, und die Kristalle schaffen sich dann ihren eigenen Raum (Abb. 7, rechts unten). Dies wurde durch Neutronenbeugungsuntersuchungen gezeigt, die ergaben, daß die tripelhelicalen Collagenmoleküle mit dem fortschreitenden Wachstum der Kristalle dichter zusammenrücken, wobei der mittlere Abstand zwischen ihnen von ungefähr 15 auf 12 Å reduziert wird^[85]. Knochen sind ein hochgeordnetes Compositmaterial, die Matrix macht ungefähr 20 Gewichtsprozent des Gewebes aus, Mineralien 60 bis 70%, und der Rest ist Wasser^[86]. Die mechanischen Eigenschaften von Knochen wie Youngscher Modul (Elastizitätsmodul), Biegefestigkeit und Zerreißfestigkeit stehen alle in direktem Zusammenhang mit dem Anteil an Mineralien^[87], einem Parameter, der strikter biologischer Kontrolle unterliegt.

Ein weiteres zur Illustrierung von Designprinzipien nützliches hochgeordnetes Gewebe ist die Perlmutter-schicht von Mollusken (Exkurs 5). Auch hier wird die Bildung eines einzelnen Kristalls pro Keimbildungsstelle induziert, aber im Gegensatz zu vielen anderen Geweben wird die Orientierung des Kristalls relativ zur Struktur des Matrixsubstrats vollständig in allen drei Dimensionen kontrolliert. Die Kristalle wachsen schnell, wobei ihre *c*-Achsen senkrecht zur keimbildenden Oberfläche stehen und bilden die für Aragonit üblichen Nadeln (Exkurs 5). Sie hören auf, in *c*-Richtung zu wachsen, wenn sie die nächste bereits positionierte Matrixschicht erreichen und dehnen sich dann nur noch seitwärts aus. Sie hören völlig auf zu wachsen, entweder wenn sich benachbarte Kristalle berühren oder wenn sie auf eine Oberfläche der Matrix stoßen. Dies ist ein noch nicht geklärtes Problem. Eine höchst ungewöhnliche Eigenschaft von Perlmutter ist, daß einige Mollusken, beispielsweise die Gastropoden (Schnecken), außer der Richtung der *c*-Achse nicht die relativen Orientierungen benachbarter Kristalle kontrollieren. Einzelne Kristalle sind jedoch noch spezifisch bezüglich des Matrixsubstrats ausgerichtet. Im Gegensatz dazu orientieren viele Muscheln und *Nautilus* benachbarte Kristalle so, daß über die *c*-Achsen-Orientierung hinaus auch die *a*- und *b*-Achsen eine bevorzugte Ausrichtung haben. Von zwei Muschelspezies, *Neotrigonia margaritacea* und *Pinctada margaritifera*, ist bekannt, daß sie die Orientierungen ihrer *a*- und *b*-Achsen bemerkenswert gut kontrollieren^[38]. Es wäre höchst interessant herauszufinden, ob es irgendwelche Vorteile, mechanischer oder anderer Natur, durch die Ordnung dieser Kristallbereiche gibt.

Die anspruchsvolleren Strategien von Organismen zur Hohlraumauffüllung nutzen stark die Mitarbeit und die Fähigkeiten der Zellen, um eine Leistungsfähigkeit beim Strukturdesign zu erreichen, die die wohl schon sehr gute der

Matrixmoleküle noch übersteigt. Diese Eigenschaften können mit synthetischen Systemen beinahe unmöglich nachgeahmt werden.

10. Schlußbemerkungen

Die Unterschiedlichkeit in Textur, Zusammensetzung und Bedeutung mineralisierter biologischer Materialien ist enorm. Diese Materialien werden einer großen Vielfalt von Funktionen angepaßt, so daß sie nicht notwendigerweise in jedem Fall die „perfekte“ Lösung für jede spezifische, funktionelle Aufgabe sind, da es evolutionäre Grenzen gibt, die den Bereich einschränken, in dem sie optimal entworfen werden können. Das Verständnis der bei ihrem Aufbau und ihrer Funktionsweise wirksamen Prinzipien ist für sich genommen ein faszinierendes Feld. Darüberhinaus kann man durch das klare Herausarbeiten der zugrundeliegenden Mechanismen, die bei der Bildung verschiedener mineralisierter Materialien wirksam sind, Einsichten in allgemeine biologische Phänomene gewinnen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können auch eine reiche Quelle für Ideen zur Verbesserung der menschlichen Fähigkeiten zur Herstellung synthetischer Materialien sein.

Exkurs 1. Die Radula von Chitonen: Ein natürliches Labor zur Untersuchung der Dynamik der Mineralisation

Die Chitone, primitive Mitglieder des Stamms der Mollusken, werden an Felsküsten aller Weltmeere gefunden. Sie haben eine zungenähnliche Zahnplatte, genannt Radula (Abb. A, links oben), die sie bei der Nahrungssuche zum

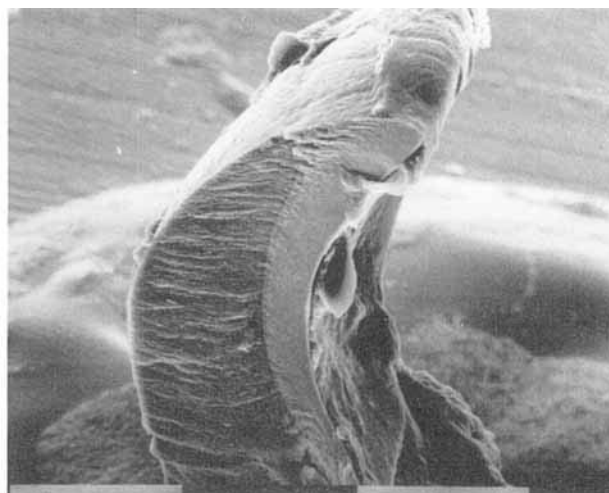
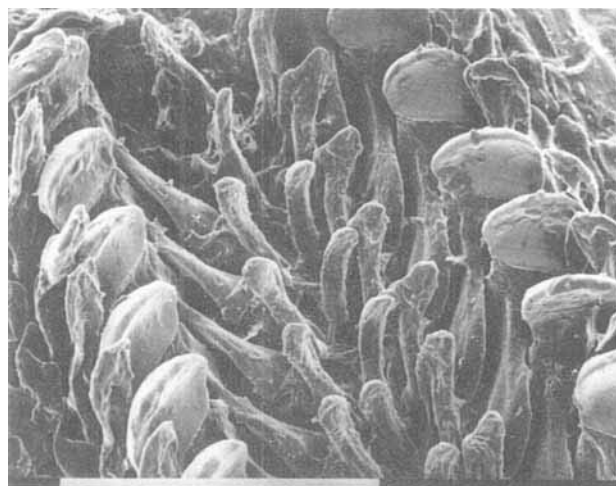
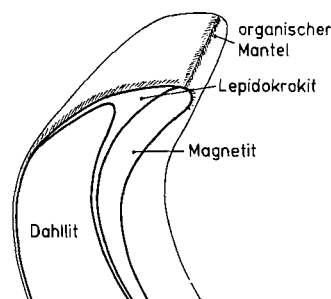


Abb. A. Links oben: Blick auf den fertigen Teil der Radula der Chitone *Acanthopleura haddoni*, der fünf Zahnreihen zeigt. Nur die löffelförmigen Objekte sind mineralisiert. Rechts oben: Bruchfläche eines einzelnen mineralisierten Zahns. Einteilungen auf den Maßbändern entsprechen 1 mm (links) und 0.1 mm (rechts). Rechts unten: Schematische Zeichnung der drei unterschiedlichen Schichten des Zahns und ihre mineralogische Zusammensetzung (vgl. Abb. rechts oben).



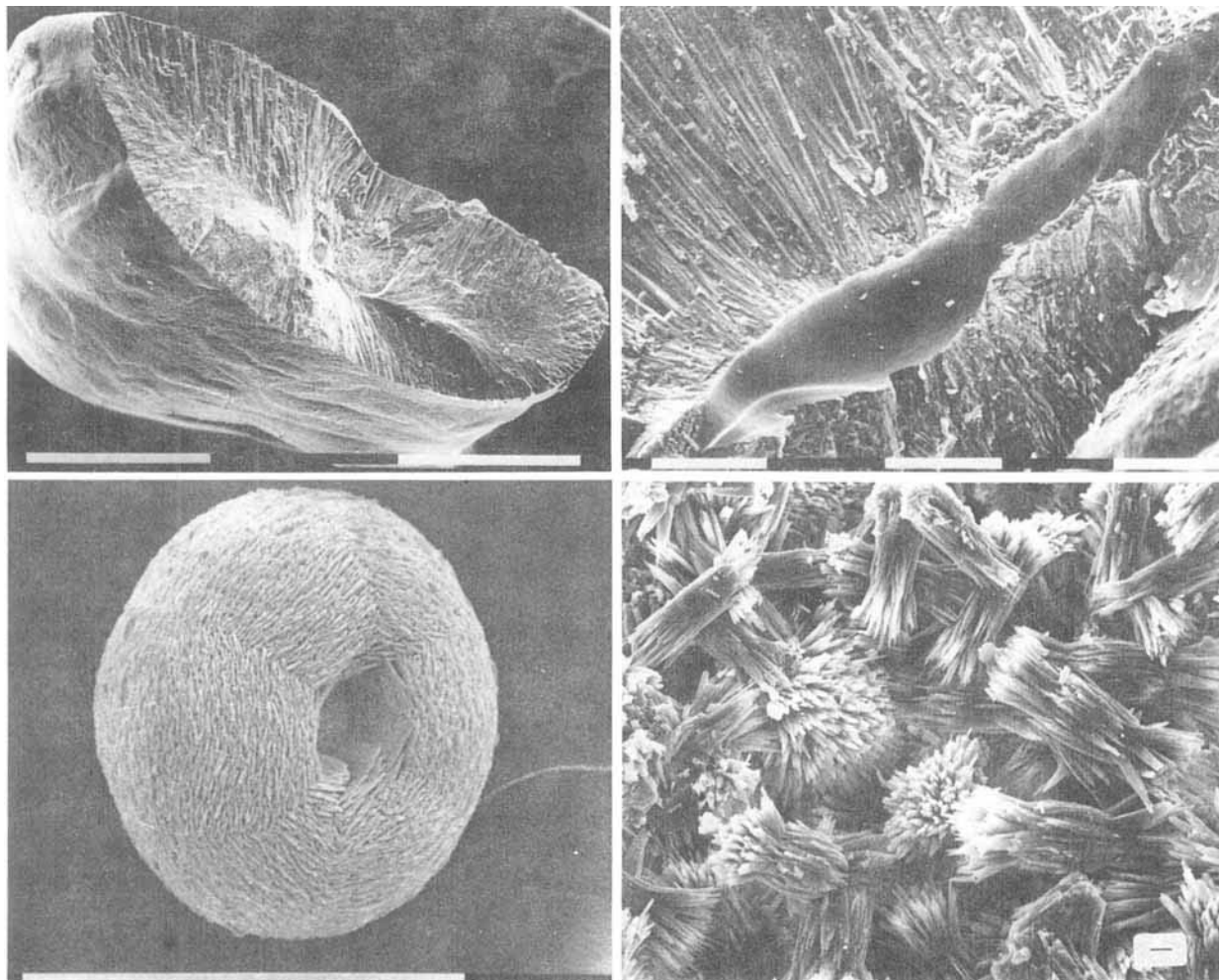


Abb. B. Links oben: Otolith (Sagitta) aus Aragonit vom Knochenfisch *Seriphus politus*. Der Otolith ist so gebrochen, daß man die zentrale Oberfläche sieht, von der aus die Aragonitkristalle zu wachsen begannen (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 1 mm). Rechts oben: Bruchoberfläche mit strahlenförmigen Aragonitkristallen des Otolithen mit höherer Auflösung (Maßstab in der Abbildung 0.1 mm). Links unten: In vitro gebildeter Sphärolith aus Vateritkristalle. (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen bei den Abbildungen rechts oben und links unten 0.1 mm). Rechts unten: Die in der Kammer des Cephalopoden (Kopffüßer) *Nautilus pompilius* ausgefallenen Aragonitsphärolithe (Bildbreite 135 μm).

Submikrometerbereich bis zu Zentimetern! Sowohl amorphe als auch kristalline Mineralien werden in Vesikel gebildet, und im zweiten Fall kann es sich um Einkristalle oder multikristalline Phasen handeln. Zwei der faszinierendsten Beispiele für das Kristallwachstum in Vesikeln zeigen Echinodermen, Seeigel, Schlangensterne und Seegurken sowie Coccolithophoridae (Kalkflagellaten), kalkhaltige Meeresalgen, die in den Weltmeeren in sehr großen Mengen vorkommen.

Die Echinodermen bilden intrazellulär, im Inneren sehr großer Vesikel, große Calciteinkristalle (Abb. C, links oben). Dies wird dadurch erreicht, daß viele Zellen ihre Zellwandmembranen zu einer großen Vakuole verschmelzen lassen, so daß im Innern dann das Vesikel mit der Mineralphase entsteht^[35]. Die Stadien der Kristallbildung werden am besten am Beispiel von Seeigellarven beschrieben, da diese in Laborkulturen gezüchtet werden können. Der Keim für den Calcitkristall bildet sich im Inneren des Vesikels und ist dreieckig. Er beginnt dann, in drei unterschiedliche Richtungen zu wachsen, die alle entlang der kristallographischen *a*-Achse liegen, um mit der Bildung der sogenannten dreistrahligen Spiculae (siehe Abschnitt 9) zu beginnen. Danach wird die Wachstumsrichtung erstaunlicherweise nach an-

fänglichem Wachstum in eine bestimmte Orientierung gedreht^[94]. Zu einem späteren Zeitpunkt ändert einer der Arme seine Wachstumsrichtung um 90°, um mit dem Wachstum in Richtung der *c*-Achse fortzufahren. Vermutlich bestimmt die Form des Vesikels die Wachstumsrichtung, „berücksichtigt“ aber auch kristallographische Erfordernisse. Ein empfindliches Wechselspiel zwischen Biologie und Kristallographie.

Jedes einzelne Plättchen im Skelett ausgewachsener Seeigel hat höchstwahrscheinlich seinen Ursprung in einer einzigen Keimbildung^[95a] und wächst dann intrazellulär zu Größen von bis zu etwa einem Zentimeter. Die Stacheln ähneln im Grunde in ihrer Struktur den Plättchen, können aber Größen bis zu 25 cm erreichen, und sind dennoch Einkristalle^[95b]. Der Kristall hat eine überaus komplizierte Form (Abb. C, links oben), alle seine Oberflächen sind ohne Ecken und Kanten, Eigenschaften, die man normalerweise nicht mit einem Einkristall verbindet. Noch verwirrender ist die Tatsache, daß die Bruchoberflächen des Calcits der Stacheln nicht den glatten und geraden Bruchebenen von anorganischem Calcit ähneln. Sie sind gekrümmt, weisen Stufen auf und ähneln den Muschelbruchoberflächen amorpher Gläser sehr^[37] (Abb. C, rechts oben). Seeigel haben auch

Abschaben von Felsoberflächen benutzen. Lowenstam entdeckte 1962, daß die Zähne der Radula von einer Schicht des harten, magnetischen Eisenoxidminerals Magnetit überzogen sind^[88]. Magnetit wurde danach in vielen und zwar besonders in wandernden Organismen gefunden, bei denen die Kristalle als Teil des Navigationssystems zur Orientierung im Erdmagnetfeld dienen^[9].

Chitone nutzen ihre Zähne mit einer Geschwindigkeit von ungefähr einer bis zwei Reihen pro Tag ab^[89]. Neue Zähne werden genauso schnell nachgebildet, und die ganze Radula mit ihren etwa 100 Zahnreihen ist letztlich ein Fließband der Zahnproduktion. Sie ist daher ideal zum Studium der Dynamik der Mineralisationsprozesse, da jede Reihe etwa eine Tagesproduktion der Zahnherstellung ist^[90]. Die grundlegenden Schritte werden hier anhand der Chitonida beschrieben^[89], wobei sich die verschiedenen Familien in Details unterscheiden. Ein einzelner Zahn besteht im wesentlichen aus drei Schichten (Abb. A, rechts oben und unten), die sich jeweils mineralogisch voneinander unterscheiden. Im ersten Stadium der Zahnbildung ordnen sich Zellen zu einer kapselartigen Struktur mit einem zentralen Hohlraum. Das Matrixgerüst wird in diesem extrazellulären Raum aufgebaut. Nach dem Aufbau von ungefähr zehn Zahnreihen führen die Zellen Eisen-Ionen ein, die sich in der äußeren Zahnschicht in Form des hydratisierten Eisenoxidminerals Ferrihydrit ablagern. Innerhalb von zwei bis drei Reihen wandelt sich Ferrihydrit in Magnetit um. Dieser Prozeß setzt sich fort, bis die gesamte äußere Schicht mit Magnetit aufgefüllt ist. Im Bereich der Zahnreihe 30 wird ein weiteres Eisenoxidmineral namens Lepidokrokit in einer schmalen Zone unterhalb der Magnetitschicht abgeschieden. Anschließend wird das Zahninnere mit amorphem Calciumphosphat aufgefüllt und auf unbekannte Weise für etwa zehn Zahnreihen stabilisiert. Danach beginnt es innerhalb einer einzigen Zahnreihe zu kristallisieren. Die Kristalle wachsen weiter, und/oder das Gitter wird geordneter (mit Infrarotspektroskopie kann leider zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden), bis die fertigen Zähne zum Einsatz kommen und abgestoßen werden. Die ungewöhnlichste Beobachtung ist, daß die Dahllitkristalle mehr oder minder an der Matrixschicht ausgerichtet werden, was nahelegt, daß die strukturierte Matrixoberfläche den Umwandlungsprozeß auslöst und kontrolliert^[29].

Die Radula von Chitoniden hat sich als Goldmine für Informationen zum Thema Biomineralisation erwiesen, und viele der grundlegendsten Konzepte, die jetzt für die Mineralisation der meisten anderen Gewebe allgemein gültig sind, haben ihren Ursprung in Untersuchungen an dieser höchst interessanten Molluske. Mineralisationsprozesse der Radula werden bei weitem noch nicht verstanden, und viele grundlegende Fragen sind noch zu beantworten.

Exkurs 2. Sphärolithische Kristallisation in der Biologie

Sphärolithe (strahlenförmig angeordnete Zusammenwachsung verschiedener Mineralindividuen) sind Kristallagregate, die aus schnell kristallisierenden Lösungen entstehen. Sie werden in vitro leicht aus hoch übersättigten CaCO_3 -Lösungen gebildet, und die Kristallaggregate können bemerkenswert geordnete Strukturen formen (Abb. B, links unten). Das oft gebildete Polymorph von CaCO_3 ist die

metastabile Form Vaterit. Sphärolithische Strukturen werden von vielen unterschiedlich mineralisierenden Organismen gebildet, etwa von roten Kalkalgen, von Federkorallen, sechsstrahligen Korallen und in Vogeleischaalen^[1]. Es ist interessant, daß sowohl Vogeleischaalen als auch Skelette von sechsstrahligen Korallen zu den Systemen gehören, die am schnellsten mineralisieren.

Die wahrscheinlich am häufigsten vorkommende Art sphärolithischer Mineralisation tritt im Inneren kleiner, sphärischer, intrazellulärer Vesikel (bläschenförmige, membranumschlossene Strukturen) auf, in denen die Kristalle als temporäre Speicher für Ionen, die für den Metabolismus des Organismus wichtig sind, fungieren. Solche spezialisierten Zellen, oft als Calciumzellen bezeichnet, haben viele verschiedene Tiere, von denen die meisten keine anderen mineralisierten Ablagerungen bilden^[7]. Die Keimbildung findet an einem zentralen Punkt statt, von dem aus die Kristalle radial wachsen. Die Vesikelmembranen verhindern vermutlich das weitere Kristallwachstum. Man beachte, daß in den kleinen, extrazellulären Matrixvesikeln von mineralisierendem Knorpel die Carbonatapatitkristalle die Membran durchstoßen und außerhalb des Vesikels weiterwachsen^[91].

Unterschiedliche Organismen ändern die Methode, nur einen Sphärolithkeimbildungsort zu bilden, ab, indem das Sphärolithenwachstum von mehreren Keimbildungsorten, die auf einer Oberfläche verteilt sind, ausgeht. Die Otolithe (Gehörsteinchen) von Fischen sind gute Beispiele hierfür (Abb. B, links und rechts oben)^[78]. Otolithe sind millimetergroße, flache Körper, die gewöhnlich aus Aragonit oder Vaterit bestehen und zur Geräuschempfindung, aber auch zur Wahrnehmung von Schwerkraft und Beschleunigung dienen^[92]. Die Kristallkeimbildung findet auf einer organischen Oberfläche statt, und die Kristalle wachsen mit ihren *c*-Achsen mehr oder weniger ($\pm 10^\circ$) senkrecht zu der Oberfläche^[78]. Ein ähnliches Phänomen tritt in aus Calcit bestehenden Eierschalen und in aus Aragonit bestehenden sechsstrahligen Korallen auf.

Ein höchst interessanter Fall ist die sphärolithische Mineralisation der bekannten perlmuttfarbenen Molluske *Nautilus*, deren Aragonitschale unter sehr gut kontrollierten Bedingungen angelegt wird. Im Gegensatz dazu werden aus der in den Kammern der Schale vorhandenen Flüssigkeit sphärolithische Aragonitkristalle ausgefällt (Abb. B, rechts unten)^[76]. Diese Kammern enthalten auch Gas, das als Teil des Auftriebssystems hinein- oder herausgepumpt wird. Einige der ausgestorbenen Verwandten des neuzeitlichen *Nautilus*, die Ammoniten (Kopffüßer), füllten ihre Kammern teilweise oder ganz mit sphärolithischen Kristallen, um ihr spezifisches Gewicht und ihre Orientierung bezüglich der Wassertiefe zu kontrollieren^[93]. Durch sphärolithische Mineralisation können also in der Biologie schnell relativ große Volumina mit Mineralien aufgefüllt werden.

Exkurs 3. Kristalle, die sich in Vesikeln bilden – Echinodermen und Coccolithophoridae

Vesikel (bläschenförmige, membranumschlossene Strukturen) werden von Organismen weitverbreitet zum Bilden eines Raums für die Mineralbildung verwendet. Die Vesikel können innerhalb oder, ungewöhnlicher, außerhalb der Zelle positioniert sein; ihre Größe reicht von Durchmessern im

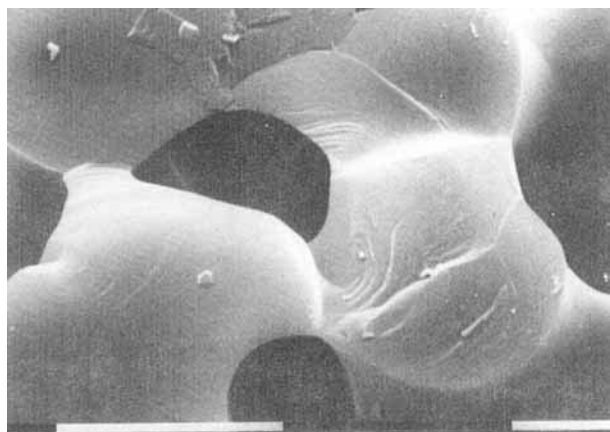
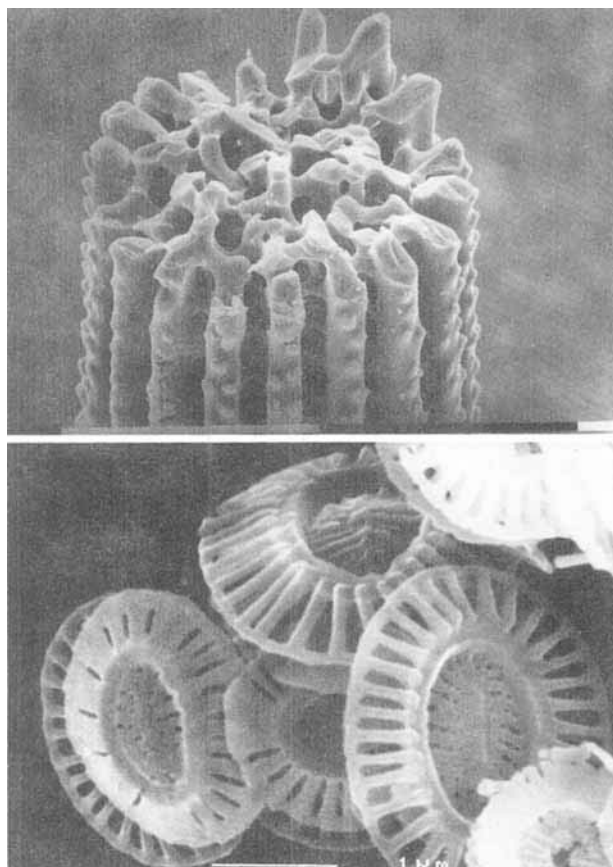


Abb. C. Links oben: Blick auf die Bruchoberfläche eines noch unfertigen Calcitstachels des Seeigels *Paracentrotus lividus* (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 0.1 mm). Rechts oben: Stärkere Vergrößerung der Bruchoberfläche des Stachels, die die charakteristische Muschelbruch- oder glasartige Frakturlinie zeigt. Links unten: Calcitcoccolithe der marinen Kalkalge *Emiliania huxleyi*. Einteilungen auf den Maßbändern entsprechen 10 μm (rechts oben) und 1 μm (links unten).

einen Satz von fünf kontinuierlich wachsenden Zähnen. Diese Zähne bestehen aus Calcit, erreichen aber in ihrem Kern Anteile von Magnesium von über 40 Molprozent. Auch der Kern hat immer noch Calcitstruktur und nicht die von Dolomit $[(\text{Ca},\text{Mg})\text{CO}_3]$ ^[64]. Trotz der Tatsache, daß der Zahn eine hochkomplexe Feinstruktur hat und das Ergebnis vieler Keimbildungsprozesse ist, zeigt doch die Röntgenbeugung, daß alle Kristalle gut ausgerichtet sind^[64, 96].

Die Coccolithophoridae sind einzellige Algen, die Photosynthese betreiben und ihre äußeren Zellwände mit Schichten von Calcitcoccolithen bedecken (Abb. C, links unten). Jeder Coccolith wird intrazellulär in einem speziellen Vesikel gebildet und nach der Fertigstellung durch die Zellmembran hindurch zur äußeren Oberfläche transportiert^[97]. Ein einzelner Coccolith hat selbst schon eine hochkomplexe Struktur. Seine Gesamtform ist die einer flachen, sphärischen Schale, aber die Morphologie ist im Detail verwickelt und für die jeweilige Spezies spezifisch^[98]. Eine solche Schale besteht tatsächlich aus etwa 20 einzelnen Elementen, von denen jedes ein Calciteinkristall ist^[99]. Die Kristalle haben ihren Keim am Rand einer organischen Grundplatte. Ein stark saures Polysaccharid, das sowohl Carboxylat- als auch Sulfatgruppen enthält und das Calcium binden kann, befindet sich in der Mineralphase und möglicherweise auch in der Membran selber^[100]. Ein Coccolith ist somit ein Beispiel für einen hochgeordneten Kristallbereich, der zusammen mit einem Strukturgerüst und sauren Makromolekülen gebildet wird. All dies findet in einem Vesikel im Inneren einer einzigen Zelle statt.

Exkurs 4. Biologische Kontrolle der Kristallmorphologie

Eines der herausragenden Kennzeichen der Biomineralisation ist die Kontrolle der Kristallmorphologie. Die meisten Organismen bilden Kristalle eines spezifischen Mineraltyps und einheitlicher Morphologie an einer bestimmten Stelle des Gewebes. Derselbe Organismus kann jedoch unter Umständen das gleiche Mineral, aber mit verschiedener Morphologie an unterschiedlichen Stellen des Gewebes erzeugen. Ein sehr gutes Beispiel hierfür sind die Schalen von Süßwassermuscheln (Abb. D, links oben), die aus zwei Schichten unterschiedlich geformter Aragonitkristalle bestehen. Keine dieser Kristallformen ähnelt den auf anorganischem Weg im magnesiumreichen Toten Meer gebildeten Aragonitkristallen (Abb. D, rechts oben). Viele marine Kalkalgen bilden Aragonit unter schlecht kontrollierten Bedingungen, und deren Kristalle (Abb. D, links unten) ähneln tatsächlich den anorganischen Aragonitkristallen (Abb. D, rechts oben).

Beispiele für artspezifische Kristallmorphologien sind in der Biologie häufig, etwa die magnetischen Kristalle magnetotaktischer Bakterien^[101], die im allgemeinen wohldefinierte Kristalloberflächen haben, aber in unterschiedlichen Abmessungen und somit unterschiedlichen Morphologien. Einige Spezies bilden jedoch Kristalle von kugelförmiger Form mit abgerundeten Oberflächen^[45]. Beide Typen bilden sich in membrangebundenen Vesikeln^[46]. Verschiedene Pflanzen produzieren kristallines Calciumoxalat-Monohydrat (Whewellit) und -Dihydrat (Weddellit) mit artspezifischer Morphologie^[102]. Marine Einzeller namens *Acantha-*

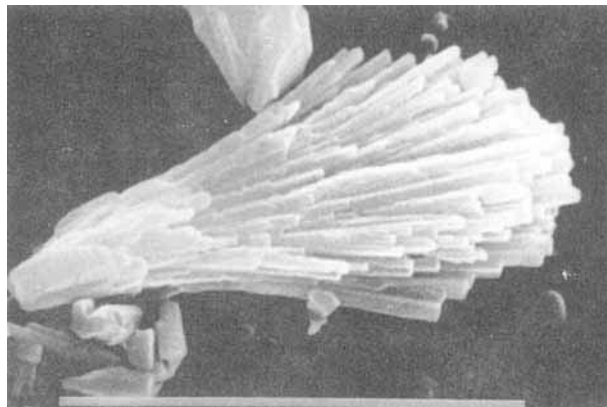
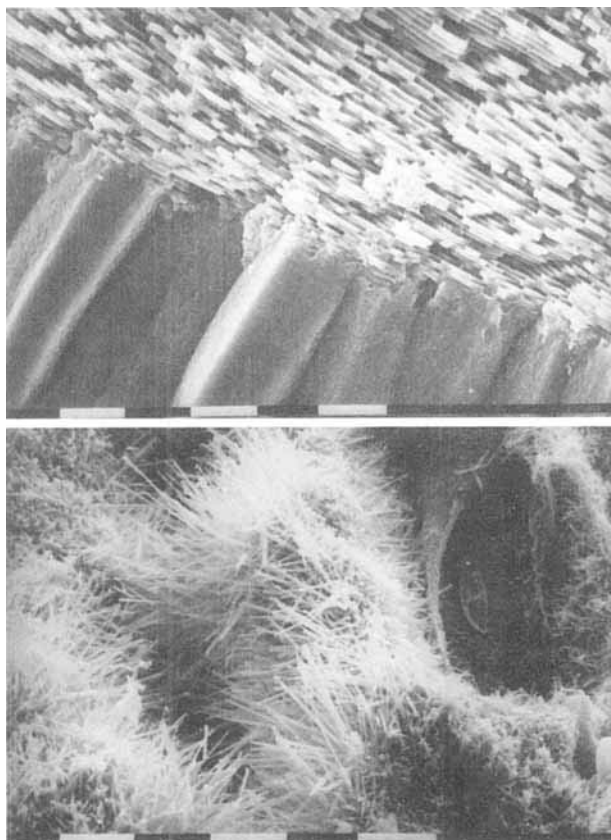


Abb. D. Links oben: Blick auf die Bruchoberfläche einer Schale der Süßwassermuschel *Elliptio complanatus* an der Verbindungsstelle zwischen der äußeren prismatischen Aragonitschicht (große Kristalle) und der inneren Aragonit-Perlmuttschicht (kleine tafelförmige Kristalle). Rechts oben: Aragonitkristalle, die anorganisch im Toten Meer gefällt wurden und jetzt Teil des Sediments der Lisan-Ablagerung sind. Links unten: Extrazellulär von der marinen Kalkalge *Halimeda* (sp.) gebildete Aragonitkristalle. Auf der rechten Seite des Bilds ist die Zellwand zu erkennen. Einteilungen auf den Maßbändern entsprechen jeweils 10 µm.

ria erzeugen wundervoll symmetrische (20-zählige Symmetrie!) Skelette aus Strontiumsulfat (Coelestin), wobei Nadeln mit drei unterschiedlichen Formen zum Aufbau der Struktur verwendet werden. Auch wenn der Hauptschaft einer Nadel gekrümmt ist, haben doch die Enden, die sich im Zentrum des Komplexes treffen, glatte Flächen, die gutdefinierten Kristallebenen entsprechen^[63]. Auch diese Skelettnadeln bilden sich im Inneren von Vesikeln.

Die Kristallmorphologie ist fast immer eine genetisch definierte Eigenschaft eines mineralisierten Gewebes. Nur wenig ist über die Vorteile einer Morphologie gegenüber einer anderen bekannt, und mit Ausnahme noch sehr am Anfang stehender Beobachtungen an Kristallen, die sich in Räumen bilden, die Lipiddoppelschichten oder makromolekulare Anordnungen mit gutdefinierter Form umgrenzen, ist nahezu nichts über die von Organismen verwendeten in-vivo-Methoden zur Kontrolle der Kristallmorphologie bekannt. Nahezu all unser gegenwärtiges Wissen basiert auf in-vitro-Experimenten.

Exkurs 5. Die Perlmuttschicht von Molluskenschalen

Die Perlmuttschicht ist für den typischen Glanz der inneren Oberfläche vieler Molluskenschalen, und natürlich auch der viel bewunderten Perle selbst, verantwortlich. Der Schimmer resultiert aus der Interferenz des Lichts, das durch die abwechselnden Schichten einheitlich dicker Aragonitkristalle und organischer Matrices hindurchtritt (Abb. E, links oben). Die Schale wird von Mantelzellen gebildet, die zunächst im extrazellulären Raum ein organisches Matrixgerüst aufbauen, das hauptsächlich aus Schichten parallel zur

Schalenoberfläche besteht^[103]. Jede Schicht wiederum besteht aus nicht weniger als fünf Unterschichten (Abb. E, links unten)^[104]. Der Kern ist ein hochgeordneter β -Chitin-Protein-Komplex, dessen Proteine viel Glycin und Alanin enthalten und β -Faltblattstruktur ähnlich der von Seidenfibrin haben. Die Chitinpolymere und die Protein-Polypeptidkette sind orthogonal ausgerichtet und bilden eine sperrholzähnliche Konstruktion^[105].

Die Oberflächen dieses Kerns sind von einer Schicht asparaginsäurereicher Proteine, möglicherweise ebenfalls mit β -Faltblattstruktur, bedeckt^[106]. Die Keimbildung für die Aragonitkristalle findet an einer bestimmten Stelle der Oberfläche statt. Von dieser weiß man, daß sie auf einzigartige Weise Calcium binden kann und daß sie, vermutlich in Form von Sulfat, schwefelreich ist^[107]. Die sich bildenden Kristalle wachsen schnell in Richtung ihrer c -Achsen und scheinen anfangs die für Aragonit übliche nichtkreisförmige Morphologie zu haben (Abb. E, rechts oben). Wenn die Kristalle die Oberfläche der nächsten Matrixschicht erreichen, stellen sie ihr Wachstum in Richtung der c -Achse ein, wachsen aber seitwärts weiter. Die Form der zu den Seiten wachsenden Kristalle in der Muschel *Neotrigonia* ist sphärisch (Abb. E, rechts oben), was eine nichtspezifische Wechselwirkung mit Additiven in Lösung nahelegt. Die wachsenden Kristalle weisen in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies unterschiedliche Formen auf und lassen damit auf mehr oder weniger spezifische Wechselwirkungen schließen.

Die Perlmuttschicht von Mollusken war das erste mineralisierte Gewebe, in dem die räumlichen Beziehungen zwischen Kristall und organischem Matrixsubstrat in drei Dimensionen aufgeklärt wurden^[105, 108]. Es wurde gezeigt, daß die a -Achse des Aragonits sich an der Richtung des

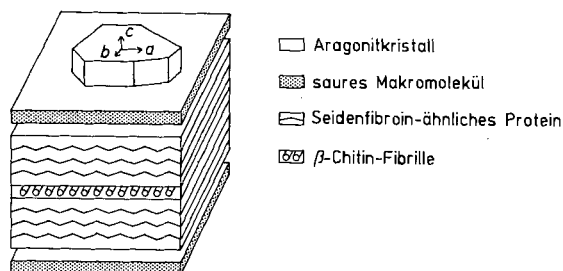
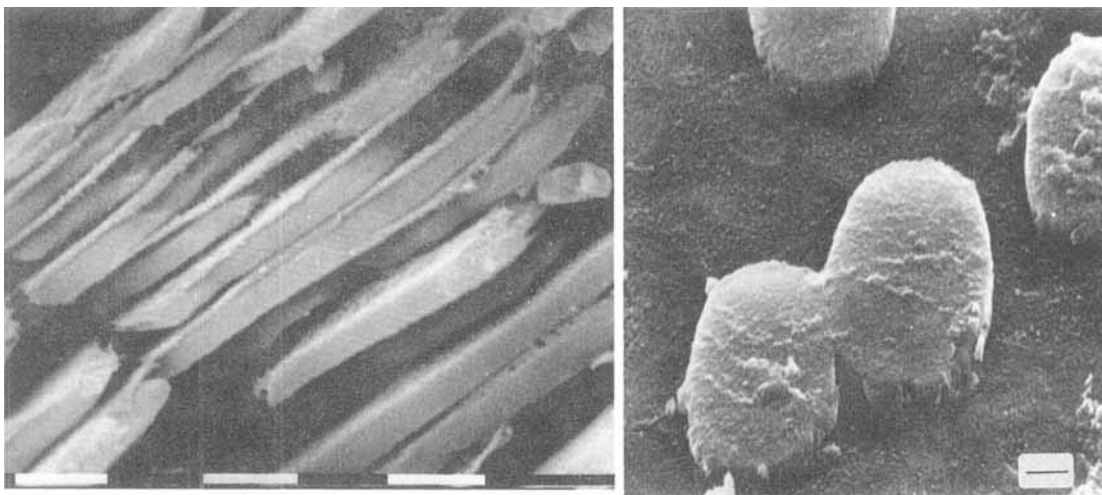


Abb. E. Links oben: Bruchoberfläche der Aragonit-Perlmuttschicht des Cephalopoden *Nautilus pompilius*. Die Oberfläche wurde fixiert und anschließend für ungefähr eine Minute mit EDTA angeätzt, um die dünne organische Matrixschicht zwischen den dickeren Aragonittafeln bloßzulegen (Einteilungen auf dem Maßband entsprechen 1 µm). Links unten: Schematische Darstellung der Struktur einer einzelnen Matrixschicht mit dem mit ihr verbundenen Kristall. Es wird gezeigt, daß die kristallographischen *a*- und *b*-Achsen des Aragonits an den Baugruppen der makromolekularen Matrix ausgerichtet werden (abgedruckt mit Genehmigung von Oxford University Press). Rechts oben: Die Oberfläche der wachsenden Perlmuttschicht der Muschel *Neotrigonia margaritiformis*. Die ovalen Aragonittafeln, die seitwärts wachsen, sind zu erkennen. Die rauhe Textur an den Oberflächen der Tafeln stellt vielleicht die Anfangsstadien der Bildung der nächsten Schicht dar. Die organische Matrix ist bei diesem Präparat nicht klar zu erkennen (Die Linie am rechten Bildrand entspricht 1 µm).

Chitinpolymers orientiert und die *b*-Achse an der der Protein-Polypeptid-Kette des Kerns. Es wird angenommen, daß die sauren Oberflächenproteine am Keimbildungsort ebenso regelmäßig, dem Kristall gegenüberliegend, ausgerichtet sind und daß sie für die beobachtete räumliche Beziehung verantwortlich sind. Zwar wächst hier sicherlich ein Kristall räumlich orientiert auf einem Substrat, doch der tatsächliche Nachweis, daß es sich um wirkliche Epitaxie handelt, erfordert mehr Informationen über die Struktur des Orts der Keimbildung selbst – eine der größten Herausforderungen im Bereich der Biomineralisierung.

Wir danken der US-Israel Binational Science Foundation und dem U.S. Public Health Service (Stipendium DE 06954) für die Förderung dieser Arbeit.

Eingegangen am 3. April 1991 [A 852]
Übersetzt von Dr. Frank Bringewski, London

- [1] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York, 1989.
- [2] a) K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization*, Academic, San Diego, 1989; b) *Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives* (Hrsg.: S. Mann, J. Webb, R. J. P. Williams), VCH, Weinheim, 1989.
- [3] *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues* (Hrsg.: D. Evered, S. Harnett, Ciba Foundation Symposium 136), Wiley, Chichester, 1988.
- [4] a) *Biomineralization and Biological Metal Accumulation* (Hrsg.: P. Westbroek, E. W. de Jong), Reidel, Dordrecht, 1983; b) R. H. Kretsinger in [4a], S. 123–131.
- [5] *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* (Hrsg.: T. L. Simpson, B. E. Volcani), Springer, New York, 1981, S. 587.
- [6] D. R. Piperno, *Phytolith Analysis*, Academic, San Diego, 1988.
- [7] B. E. Brown, *Biol. Rev.* 1982, 57, 621–667; K. Simkiss, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1976, 30, 423–444.
- [8] B. Howard, P. C. H. Mitchell, A. Ritchie, K. Simkiss, M. G. Taylor, *Biochem. J.* 1981, 194, 507–511; M. G. Taylor, K. Simkiss in [2b], S. 427–460.
- [9] *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* (Hrsg.: J. L. Kirschvink, D. S. Jones, B. J. McFadden), Plenum, New York, 1985.
- [10] J. L. Kirschvink, M. M. Walker in [9], S. 243–254.
- [11] A. Veis, A. Perry, *Biochemistry* 1967, 6, 2409–2416.
- [12] a) *Surface Reactive Peptides and Polymers* (Hrsg.: C. S. Sikes, A. P. Wheeler), (ACS Symp. Ser. 1991, 444); b) A. Veis, B. Sabsay, C. B. Wu in [2a], S. 1–12.
- [13] S. Weiner, W. Traub, H. A. Lowenstam in [4a], S. 205–224.
- [14] A. P. Wheeler, C. S. Sikes in [2b], S. 95–131.
- [15] S. Weiner, L. Hood, *Science* 1975, 190, 987–989.
- [16] S. L. Lee, A. Veis, T. Glonek, *Biochemistry* 1977, 16, 2971–2979.
- [17] D. Worms, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* 1986, 237, 11–20.
- [18] J. D. Termine in [3], S. 178–190.
- [19] H. Sucov, S. Benson, J. J. Robinson, R. J. Britten, F. Wilt, E. H. Davidson, *Dev. Biol.* 1987, 120, 507–519.
- [20] K. Simkiss in [26], S. 19–37.
- [21] J. D. H. Donnay, D. Harker, *Am. Mineral.* 1937, 22, 446–467; P. Hartman, W. G. Perdok, *Acta Crystallogr.* 1955, 8, 49–52; *ibid.* 1955, 8, 521–524.
- [22] E. N. K. Clarkson, *Paleontology* 1973, 16, 425–444; E. N. K. Clarkson, R. Levi-Setti, *Nature* 1975, 254, 663–667.
- [23] S. Caveney, *Proc. R. Soc. London B* 1971, 178, 205–225.
- [24] W. H. Zachariasen, *J. Am. Chem. Soc.* 1932, 54, 3841–3852.
- [25] C. C. Perry, S. Mann in *Evolution and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals* (Hrsg.: R. E. Crick), Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [26] *Biomineralization in Lower Plants and Animals* (Hrsg.: B. S. C. Leadbeater, R. Riding), Clarendon, Oxford, 1986.
- [27] G. G. Simpson, *Horses*, Oxford University Press, New York, 1951.
- [28] G. H. Nancollas, in [2b], S. 157–187.
- [29] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *Science* 1985, 227, 51–53.
- [30] H. A. Lowenstam, *Chem. Geol.* 1972, 9, 153–166.
- [31] S. A. Stricker, S. Weiner, *Experientia* 1985, 41, 1557–1559.
- [32] E. V. Lengyel, *Z. Kristallogr.* 1937, 97, 67–87; J. Dedek, *Le carbonate de Chaux*, Librairie Universitaire, Louvain, 1966, S. 19–20.
- [33] M. Prenant, *Arch. Zool. Exp. Gen. Note Rev.* 1926, 65, 25–38.
- [34] A. Berman, L. Addadi, A. Kivick, L. Leiserowitz, M. Nelson, S. Weiner, *Science* 1990, 250, 664–667.
- [35] a) K. Okazaki, *Embryologia* 1960, 5, 283–320; K. Märkel, U. Röser, M. Stauber, *Zoomorphology* 1989, 109, 79–87; b) K. Märkel, *Universität Bochum*, persönliche Mitteilung.

- [36] M. Shimizu, J. Yamada in *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants* (Hrsg.: M. Omori, N. Watabe), Tokai University Press, Tokyo, **1980**, S. 169–178.
- [37] K. M. Towe, *Science* **1967**, *157*, 1048–1050.
- [38] S. W. Wise, *Eclogae Geol. Helv.* **1970**, *63*, 775–797; S. Weiner, W. Traub in *Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules* (Hrsg.: M. Balaban, J. L. Sussman, W. Traub, A. Yonath), Balaban ISS, Rehovot, **1981**, S. 467–482.
- [39] S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **1985**, *234*, 7–15.
- [40] A. Berman, L. Addadi, S. Weiner, *Nature* **1988**, *333*, 546–548.
- [41] L. Addadi, J. Moradian-Oldak, S. Weiner in [12a], S. 13–27.
- [42] J. D. Birchall, R. J. Davey, *J. Cryst. Growth* **1981**, *54*, 323–329.
- [43] C. C. Chen, A. L. Boskey, *Calcif. Tissue Int.* **1985**, *37*, 935.
- [44] D. Hanein, *M. Sc. Thesis*, Feinberg Graduate School, Weizmann Institute, Rehovot, Israel, **1989**.
- [45] S. Mann, N. H. C. Sparks, R. P. Blakemore, *Proc. R. Soc. London B* **1987**, *231*, 469–476; T. Matsuda, T. Endo, N. Osakabe, A. Tonomura, T. Arii, *Nature* **1983**, *302*, 411–412.
- [46] Y. A. Garby, T. J. Beveridge, R. P. Blakemore, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 834–841.
- [47] H. E. Buckley, *Z. Kristallogr.* **1935**, *91*, 375–401; A. F. Wells, *Philos. Mag.* **1946**, *37*, 184–199; *ibid.* **1946**, *37*, 217–236; *ibid.* **1946**, *37*, 605–630.
- [48] L. Addadi, Z. Berkovitch-Yellin, I. Weissbuch, J. van Mil, L. J. W. Shimon, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 476–496; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 466–485; L. Addadi, Z. Berkovitch-Yellin, I. Weissbuch, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Top. Stereochem.* **1986**, *16*, 1–80.
- [49] Z. Berkovitch-Yellin, J. van Mil, L. Addadi, M. Idelson, M. Lahav, L. Leiserowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3111–3122.
- [50] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4110–4114.
- [51] L. Addadi, A. Berman, J. Moradian-Oldak, S. Weiner, *Connect. Tissue Res.* **1989**, *24*, 127–135; J. Moradian-Oldak, F. Frolov, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. R. Soc. London B*, **1992**, in Druck.
- [52] H. Füredi-Milhofer, L. Addadi, S. Weiner, unveröffentlicht.
- [53] J. Moradian-Oldak, Ph. D. Thesis, Feinberg Graduate School, Weizmann Institute, Rehovot, Israel, **1992**.
- [54] L. Addadi, S. Weiner in [2b], S. 133–156.
- [55] L. Addadi, J. Moradian, E. Shai, N. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2732–2736.
- [56] S. Sarig, F. Kahana, R. Leshem, *Desalination* **1975**, *17*, 215.
- [57] E. Landau, R. Popovitz-Biro, M. Levanon, L. Leiserowitz, M. Lahav, J. Sagiv, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1986**, *134*, 323–335.
- [58] S. Mann, B. R. Heywood, S. Rajam, J. D. Birchall, *Nature* **1988**, *334*, 692–695; S. Mann, B. R. Heywood, S. Rajam, J. D. Birchall, *Proc. R. Soc. London A* **1989**, *423*, 457–471.
- [59] I. Weissbuch, D. Zbaida, L. Addadi, L. Leiserowitz, M. Lahav, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1869; E. Staab, L. Addadi, L. Leiserowitz, M. Lahav, *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 40–43.
- [60] D. Perl-Treves, L. Addadi, *Proc. R. Soc. London B* **1988**, *235*, 145–159; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1990**, *187*, 1–16.
- [61] M. Thiele, A. Awad, *J. Biomed. Mater. Res.* **1969**, *3*, 431–444; M. A. Crenshaw, M. Ristedt, *Biomineralization* **1975**, *8*, 1–8.
- [62] A. P. Wheeler, K. W. Rusenko, J. W. George, C. S. Sykes, *Comp. Biochem. Physiol. B* **1987**, *87*, 953–960.
- [63] C. C. Perry, J. R. Wilcock, R. J. P. Williams, *Experientia* **1988**, *44*, 638.
- [64] J. H. Schroeder, E. J. Dwornik, J. J. Papike, *Geol. Soc. Am. Bull.* **1969**, *80*, 1613–1616.
- [65] H. A. Lowenstam in *Recent Researches in the Field of Hydrosphere, Atmosphere and Nuclear Chemistry* (Hrsg.: Y. Miyake, T. Koyama), Maruzen, Tokyo, **1964**, S. 373–404.
- [66] J. Garside in *Biological Mineralization and Demineralization* (Hrsg.: G. H. Nancollas), Springer, Berlin, **1982**, S. 23–36.
- [67] E. M. Landau, M. Levanon, J. Leiserowitz, M. Lahav, J. Sagiv, *Nature* **1985**, *318*, 353–356.
- [68] I. Weissbuch, F. Frolov, L. Addadi, M. Lahav, L. Leiserowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7718–7724.
- [69] Y. Kitano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, *35*, 1873–1980.
- [70] S. Morgulis, *J. Biol. Chem.* **1931**, *31*, 455–466; D. McConnell, *Clin. Orthop.* **1962**, *23*, 253–268.
- [71] R. A. Robinson, *J. Bone Jt. Surg.* **1952**, *34A*, 389–434; S. Weiner, P. A. Price, *Calcif. Tissue Int.* **1986**, *39*, 365–375; J. Moradian-Oldak, S. Weiner, L. Addadi, W. J. Landis, W. Traub, *Conn. Tissue Res.* **1990**, *25*, 1–10.
- [72] W. E. Brown, *Nature* **1962**, *196*, 1048–1055; *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1966**, *44*, 205–220.
- [73] H. Füredi-Milhofer, B. Purgaric, L. Brecevic, N. Pavkovic, *Calcif. Tissue Res.* **1971**, *8*, 142–153.
- [74] H. A. Lowenstam, *Chem. Geol.* **1972**, *9*, 153–166.
- [75] a) *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Hrsg.: N. Watabe, K. M. Wilbur), Univ. South Carolina Press, Columbia, **1976**; b) W. Haas in [75a], S. 389–402.
- [76] H. Mutvei, *Bull. Geol. Inst. Univ. Uppsala* **1972**, *8*, 237–261.
- [77] K. M. Wilbur, L. H. Colinaux, N. Watabe, *Phycologia* **1969**, *8*, 27–35.
- [78] E. T. Degens, W. G. Deuser, R. L. Haedrich, *Mar. Biol. Berlin* **1969**, *2*, 105–113; R. W. Gaudie, D. G. A. Nelson, *Comp. Biochem. Physiol. A* **1988**, *90*, 501–509.
- [79] K. Simkiss in *Egg Quality: A Study of the Hen's Egg* (Hrsg.: T. C. Carter), Oliver and Boyd, Edinburgh, **1968**, S. 3–25; H. Silyn-Roberts, R. M. Sharp, *Proc. R. Soc. London B* **1986**, *227*, 303–324.
- [80] H. Nakahara, G. Bevelander *Calcif. Tissue Res.* **1971**, *7*, 31–45.
- [81] P. E. Hare, P. H. Abelson, *Year Book Carnegie Inst. Washington* **1965**, *64*, 223–234.
- [82] E. P. Katz, E. Wachtel, M. Yamauchi, G. L. Mechanic, *Conn. Tissue Res.* **1989**, *21*, 149–158; W. Traub, T. Arad, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9822–9826.
- [83] W. Traub, T. Arad, S. Weiner, *Connect. Tissue Res.* **1992**, in Druck.
- [84] A. L. Arsenault, *Calcif. Tissue Int.* **1988**, *43*, 202–212; S. Weiner, W. Traub, *Conn. Tissue Res.* **1989**, *21*, 259–265.
- [85] L. C. Bonar, M. D. Grynias, J. E. Roberts, R. G. Griffen, M. J. Glimcher in *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (Hrsg.: W. T. Butler), EBSCO Media, Birmingham, AL, USA, **1985**, S. 226–233.
- [86] S. Doty, R. A. Robinson, B. Schofield in *Handbook of Physiology* (Hrsg.: G. D. Aurbach), Am. Physiol. Soc. Washington, **1976**, S. 3–23.
- [87] J. D. Currey, *Philos. Trans. R. Soc. London B* **1984**, *304*, 509–518.
- [88] H. A. Lowenstam, *Geol. Soc. Am. Bull.* **1962**, *73*, 435–438.
- [89] J. L. Kirschvink, H. A. Lowenstam, *Earth Planet. Sci. Lett.* **1979**, *44*, 193–204.
- [90] M. H. Nesson, H. A. Lowenstam in [9], S. 333–363.
- [91] D. C. Morris, H. K. Väänänen, H. C. Anderson, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **1983**, *5*, 131–137.
- [92] R. W. Morris, L. R. Kittleman, *Science* **1967**, *158*, 368–370; O. Sand, *J. Exp. Biol.* **1974**, *60*, 881–899.
- [93] G. E. G. Westermann, *Paleobiology* **1977**, *3*, 300–321.
- [94] L. Wolpert, T. Gustafson, *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 311–325.
- [95] a) K. Märkel, Universität Bochum, persönliche Mitteilung, **1991**; b) A. Burkhardt, W. Hansmann, K. Märkel, H. Niemann *Zoomorphology* **1983**, *102*, 189–203.
- [96] K. Märkel, *Ann. Zool. Jpn.* **1970**, *43*, 188–199.
- [97] H. H. Dixon, *Proc. R. Soc. (Biol.)* **1900**, *68*, 305–315.
- [98] M. Black, *Proc. Linn. Soc. London* **1963**, *174*, 41–46.
- [99] N. Watabe, *Calcif. Tissue Res.* **1967**, *1*, 114–121.
- [100] P. Westbroek, E. W. de Jong, P. van der Wal, A. H. Borman, J. P. M. de Vriend, D. Kok, W. C. de Bruijn, S. B. Parker, *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **1984**, *304*, 435–444.
- [101] R. P. Blakemore, *Science* **1975**, *190*, 377–379.
- [102] A. Frey-Wyssling, *Am. J. Bot.* **1981**, *68*, 130–141.
- [103] G. Bevelander, H. Nakahara, *Calc. Tissue Res.* **1969**, *3*, 84–92.
- [104] H. Nakahara in [4a], S. 225–230.
- [105] S. Weiner, W. Traub, *Philos. Trans. R. Soc. London B* **1984**, *304*, 425–434.
- [106] H. Nakahara, *Bull. Josai Dental Univ. II* **1982**, *209*–215; D. Worms, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **1986**, *237*, 11–20.
- [107] M. A. Crenshaw, H. Ristedt in [75a], S. 355–367.
- [108] S. Weiner, W. Traub, *FEBS Lett.* **1980**, *111*, 311–316.