

Lipide in der Eischale vom Strauss (*Struthio camelus*)¹ Lipids in the egg shell of the ostrich (*Struthio camelus*)

K. Kriesten, H. Egge und R. Faust²

Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Katzenburgweg 7, D-5300 Bonn; Physiologisch-Chemisches Institut, Membranlipide, Nussallee 11, D-5300 Bonn; Zoologischer Garten Frankfurt, Alfred-Brehm-Strasse 16, D-6000 Frankfurt a. M. (Bundesrepublik Deutschland), 3. Oktober 1978

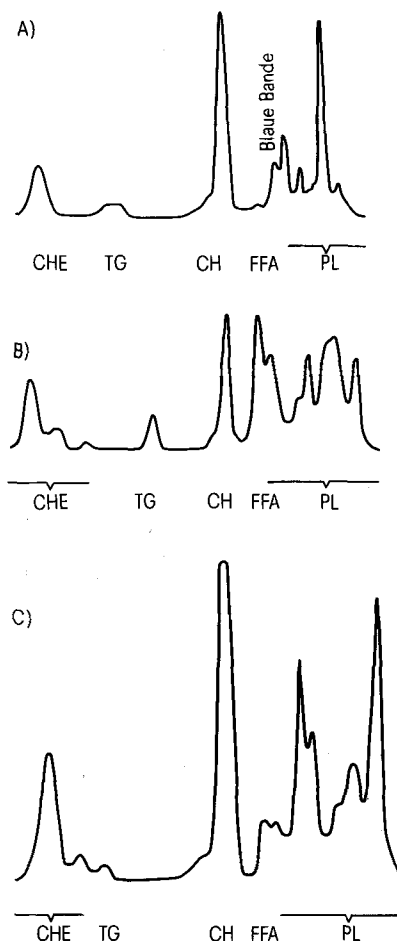
Summary. The egg shell (with cuticle) of the ostrich contained a total lipid concentration of 0.19 mg/g egg shell; the phospholipids constituted the major portion, among the 'neutral' lipids cholesterol esters, cholesterol and free fatty acids were identified. The egg shell lipids showed a stimulating effect on the crystal growth of calcium carbonate; the highest rate of crystal growth was observed with the phospholipid fraction.

Lipide wurden bereits aus menschlichen und tierischen Hartgeweben, den Knochen³⁻⁸ und den Zähnen⁹⁻¹², extrahiert. Untersuchungen von Irving u. Wuthier¹³ deuteten darauf hin, dass die Lipide an den Calcifizierungsprozessen im Knochen beteiligt sind. Die Analyse der Lipide aus Knochen ergab hohe Konzentrationen an sauren Phospholipiden; sie enthielten vor allem Serin- und Inositol-Phosphatide. Phosphatidylserin stellte den Hauptanteil in den Lipiden, die aus der hypertrophen Chondrozyten-Zone des Epiphysenknorpels (Abschnürung von Matrix-Vesikeln) isoliert wurden¹⁴. Bosky u. Posner¹⁵⁻¹⁷ konnten Phospholipide als Ca^{++} -bindende Moleküle im Knochen nachweisen. – In der kalkigen Eischale von Vögeln wurden Lipide bisher nur aus der Eischale vom Huhn (*Gallus gallus domesticus*) isoliert¹⁸. Über die Lokalisation der Lipide in der Eischale und ihre Funktion bei den Calcifizierungsvorgängen liegen bisher keine Angaben vor. In der vorliegenden Studie soll versucht werden, dies nach Bestimmung des Lipidmusters der Straussen-Eischale zu klären.

Material und Methode. Mit Aqua dest. gereinigte Eischalen (ohne Membrana testacea) vom Strauss (*Struthio camelus massaicus*; Zoologischer Garten Frankfurt; Gelege) wurden in einer Kugelmühle pulverisiert. Das Extrahieren der Lipide aus dem Eischalenpulver erfolgte mit Chloroform: Methanol (v/v; 8:5), modifiziert nach Folch et al.¹⁹, unter Rückfluss (3 h; 70 °C). Der eingeengte Extrakt (Vakuum-Evaporation) wurde gegen Aqua bidest. dialysiert. Der getrocknete (unter N_2) Extrakt wurde danach in 1 ml Chloroform/Methanol gelöst und mit 50 μl Ameisensäure versetzt. Dieses Gemisch wurde anschliessend mit Aqua bidest. gewaschen. Zur Gewinnung der Schalen-Matrix wurden kleinere Schalenstücke bei Raumtemperatur mit Ameisensäure (1,5–2 N) behandelt (48 h). Die entkalkte Matrix wurde mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen und unter N_2 getrocknet. Die Lipidextraktion aus der Matrix erfolgte wie bereits angegeben. Die Bestimmung des Gesamtlipids wurde gravimetrisch mit einer Elektrowaage (Cahn-Gram) durchgeführt; die Analyse der Lipidfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch nach Van Gent²⁰ und Egge et al.²¹. Die Phospholipide wurden mit der Aceton-Präzipitations-Methode²² separiert. Der Nachweis der Phospholipide wurde zusätzlich mit spezifischen Reagenzien^{23,24} durchgeführt. Einzelne Phospholipide wurden mittels Standards (Lecithin, Kephalin: SIGMA; Lysolecithin: SERVA) identifiziert. Die Änderung der Kristallwachstumsgeschwindigkeit von Calciumcarbonat (Calcit) nach Zugabe von Lipiden aus der Eischale wurde unter Standardbedingungen bei konstanter Übersättigung und mittels eines pH-stat.-Verfahrens gemessen (H.-J. Meyer, unveröffentlicht). Verwendete Abkürzungen: CHE = Cholesterinester; CH = Cholesterin; TG = Triglyceride; FFA = freie Fettsäuren; PL = Phospholipide; GL = Gesamtlipid.

Ergebnisse und Diskussion. Die Konzentration des Gesamtlipids aus dem ersten Extrakt der Strausseneischale betrug ca. 90 $\mu\text{g/g}$ Eischalenpulver (Tabelle). Dabei wiesen die

Phospholipide mit 44,5% den höchsten Anteil auf. Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Lipide trat zwischen dieser Fraktion und der Fraktion der freien Fettsäuren während des Besprühens mit 10% H_2SO_4 eine blaue Bande (ca. 6,7%) auf; es könnte sich hier um ein Oxidationsprodukt des Cholesterins handeln (Figur). Als ein Bestandteil der Phospholipide konnte dünnschichtchromatographisch Lecithin identifiziert werden. Der Anteil des Cholesterins am Gesamtlipid betrug 23,3%; es folgten die Cholesterinester mit 13,3%, die Triglyceride mit 8,9% und die freien Fettsäuren mit 3,3%. In der Eischale vom Huhn wiesen dagegen die Triglyceride die höchste Konzentration auf, gefolgt von den Cholesterin-



Densitometerkurven der Lipidextrakte nach Dünnschichtchromatographie: A 1. Lipidextrakt (Eischalenpulver); B 2. Lipidextrakt (Eischalenpulver); C Lipidextrakt (Schalen-Matrix).

estern, den freien Fettsäuren und dem Cholesterin. Der Phospholipidanteil betrug durchschnittlich 27,6%. Die Phospholipid-Konzentration der Eischalen von verschiedenen Hühnerrassen wichen signifikant, wenn auch nur geringfügig, von diesem Wert ab¹⁸.

Möglicherweise erlauben die Lipidkonzentrationen einzelner Fraktionen, z.B. die der Phospholipide, Aussagen über phylogenetische Beziehungen zwischen verschiedenen Vogeltaxa. So ist der hohe Phospholipidanteil in der Eischale vom Strauss wahrscheinlich für die Eischalen von Raiten charakteristisch; denn in der Eischale vom Nandu (*Rhea americana*) konnten wir einen ähnlich hohen Phospholipidgehalt (ca. 60%) des Gesamtlipids nachweisen. Der kristalline Rückstand (aufgelöst mit 1,5–2 N Ameisensäure) nach dem ersten Extrahieren der Lipide enthielt ebenfalls 5 Lipidfraktionen (2. Extrakt) (Figur). Hierbei betrug die Gesamtlipidkonzentration ca. 100 µg/g kristallines Eischalenmaterial (Tabelle). Auffallend war wiederum der hohe Anteil an Phospholipiden mit 66%. Es folgten das Cholesterin mit 11%, die freien Fettsäuren und die Triglyceride mit jeweils 8% und die Cholesterinester mit 7% (Tabelle). Die unterschiedlichen Gesamtlipidwerte des 1. und 2. Lipidextrakts können durch das Freilegen grösserer Matrixanteile bei der Aufarbeitung des Schalenmaterials (für das 2. Extrahieren) bedingt sein. Die Lipidanalyse der Schalen-Matrix (nach Entkalken der Eischalenstücke) ergab 5 Lipidfraktionen mit einer Gesamtlipidmenge von ca. 110 µg/g Schalen-Matrix (Figur, Tabelle). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Lipide der Eischale hauptsächlich in der Schalen-Matrix lokalisiert sind. Hierbei waren die Phospholipide mit 62%, das Cholesterin mit 21%, die Cholesterinester mit 11% und die freien Fettsäuren mit 5% beteiligt. Die Triglyceridfraktion wies nur 1% auf.

Die Kristallwachstumsstudien (Calciumkarbonat) zeigten einen beschleunigenden Effekt der Lipidextrakte. Während der Lipidextrakt aus pulverisierten Eischalen das Kristallwachstum um 15% beschleunigte, stieg dieser Wert bei den Lipiden aus der Schalen-Matrix auf 24% an. Die gereinigte Phospholipidfraktion verursachte eine weitere Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit. Dies zeigt, dass unter den Lipidfraktionen die Phospholipide bei der Calcitbildung den grössten Effekt erzielen. Vermutlich wird Calcium zunächst an die Phospholipide gebunden; sie (besonders Phosphatidylserin²⁵) haben eine hohe Affinität für dieses Kation²⁶.

Der hohe Anteil der Phospholipide in der Matrix der Eischale vom Strauss und ihr katalytischer Effekt auf das Kristallwachstum weisen darauf hin, dass diese Lipidfraktion an den Calcifizierungsprozessen der Eischale von Vögeln, ähnlich wie beim Knochen, beteiligt sein kann. Die Phospholipide können dabei, wie Irving³ für die Calcifikation in den Zähnen und Knochen annimmt, bei

der Lokalisation der Ca-Ionen und bei der Interaktion der organischen Matrix mit der Mineralphase eine Rolle spielen. Wuthier^{6,7} zeigte, dass die Konzentration von Calcium in den Matrix-Vesikeln 25–50mal grösser ist als in den angrenzenden Chondrozyten (Epiphysenknorpel). Bei der Anreicherung von Ca⁺⁺ in den Vesikeln soll das Phosphatidylserin der Vesikelmembran eine entscheidende Rolle spielen. Aus Knochen konnten Boskey u. Posner^{15–17} einen Calcium-Phospholipid-Phosphat-Komplex mit einem molaren Verhältnis an Ca/P_{an} von 1:1 isolieren, der Calcium am hydrophilen Pol bindet. Ob bei der Kristallbildung (Calcit) in der Vogeleischale ein ähnlich stabiler Komplex zwischen Calcium, Phospholipid und dem Carbonat-Ion vorkommt, ist noch offen.

Nach Vogel u. Boyan-Salyers²⁷ sind die sauren Phospholipide an basische Protein-Kerne (Proteolipid) gebunden und sollen als Nucleations-Agens bei der Calcifizierung fungieren. Die Lipide bzw. Phospholipide der organischen Eischalen-Matrix (Netzwerk aus Fibrillen und/oder fibrillären Membranen sowie Vesikeln) sind vermutlich auch mit Proteinen und Kohlenhydraten (Glycoproteine²⁸) assoziiert. Sie können möglicherweise in Kombination als supramolekularer Komplex die Calcifikation der Eischale steuern.

Konzentrationen der einzelnen Lipidfraktionen des 1. und 2. Lipidextrakts aus dem Eischalenpulver und des Extrakts aus der Matrix der Eischale vom Strauss

	1. Lipidextrakt Eischalenpulver (mg/g)	2. Lipidextrakt extrahiertes Eischalenpulver (mg/g)	Matrixextrakt entkalkte Schalenmatrix (mg/g)
CHE	0,012	0,007	0,012
TG	0,008	0,008	0,001
CH	0,021	0,011	0,023
FFA	0,003	0,008	0,006
Blaue Bande	0,006	–	–
PL	0,040	0,066	0,068
GL	0,09	0,1	0,11

- 1 Forschergruppe Biomineralisation. Von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördertes Projekt.
- 2 Herrn K. Kasimir danken wir für seine experimentelle Unterstützung bei den Lipiduntersuchungen. Herrn Prof. H.-J. Meyer, Mineralogisches Institut Bonn, danken wir für die Messungen der Kristallwachstumsgeschwindigkeit.
- 3 J.T. Irving, Clinica ortop. 97, 225 (1973).
- 4 R.E. Wuthier, J. Lipid Res. 9, 68 (1968).
- 5 R.E. Wuthier, Clinica ortop. 90, 191 (1973).
- 6 R.E. Wuthier, Calcif. Tiss. Res. 23, 125 (1977).
- 7 R.E. Wuthier, F.H. Wians, Jr, M.S. Giancola und S.S. Dragic, Biochemistry 17, 1431 (1978).
- 8 T.R. Dirksen, Biochim. biophys. Acta 231, 458 (1971).
- 9 T.R. Dirksen, J. dent. Res. 43, 128 (1963).
- 10 J.T. Irving und R.E. Wuthier, Archs. oral Biol. 5, 323 (1961).
- 11 I.M. Shapiro, R.E. Wuthier und J.T. Irving, Archs oral Biol. 11, 501 (1966).
- 12 S.Q. Alam und R.S. Harris, J. dent. Res. 51, 1474 (1972).
- 13 J.T. Irving und R.E. Wuthier, Clinica ortop. 56, 237 (1968).
- 14 R.E. Wuthier und J.W. Cummins, Biochim. biophys. Acta 337, 50 (1974).
- 15 A.L. Boskey und A.S. Posner, Calcif. Tiss. Res. 19, 273 (1976).
- 16 A.L. Boskey und A.S. Posner, Calcif. Tiss. Res. 22, 197 (1978).
- 17 A.L. Boskey und A.S. Posner, Calcif. Tiss. Res. 23, 251 (1977).
- 18 R.J. Hasiak, D.V. Vahdehra und R.C. Baker, Comp. Biochem. Physiol. 37, 429 (1970).
- 19 J. Folch, M. Lees und G.H. Sloane-Stanley, J. biol. Chem. 226, 497 (1957).
- 20 C.M. Van Gent, Z. analyt. Chem. 236, 344 (1968).
- 21 H. Egge, U. Murawsky, J. Müller und F. Zilliken, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 351, 1316 (1970).
- 22 M. Kates, Technique Lipidology, Laboratory Technique Biochem. Molecularbiol., p. 393, Ed. T.S. Work und E. Work. North-Holland/American Elsevier, Amsterdam-London-New York 1972.
- 23 J.C. Dittmer und R.L. Lester, J. Lipid Res. 5, 126 (1964).
- 24 C.S. Hanes und F.A. Isherwood, Nature (Lond.) 164, 1107 (1949).
- 25 J.M. Cotmore, G. Nichols, Jr, und R.E. Wuthier, Science 172, 1339 (1971).
- 26 R.M.C. Dawson und H. Hauser, in: Calcium and Cellular Function, p. 17, Ed. A.W. Cuthbert. McMillan, London 1970.
- 27 J.J. Vogel und B.D. Boyan-Salyers, Clinica ortop. 118, 230 (1976).
- 28 G. Krampitz, K. Kriesten und R. Faust, Biomineralisation 7, 1 (1974).