

Anwendung von Synchrotronstrahlung zur Charakterisierung von Biomineralien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Frank Neues

geboren in Tönisvorst

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2005 bis Januar 2008 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 11. April 2008

Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

Prof. Dr. C. Mayer

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Sand

Für meine Tochter
Angelina

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	6
2.	<i>Theoretische Grundlagen</i>	8
2.1	Biomineralisation	8
2.1.1	Grundprinzipien der Biom mineralisation	11
2.1.1.1	Kontrolle über die Kristallkeimbildung	13
2.1.1.2	Kontrolle über das Kristallwachstum	13
2.1.1.3	Kristallisation in abgegrenzten Bereichen	15
2.1.1.4	Bildung eines Verbundes aus anorganischem Mineral und organischer Matrix	16
2.1.1.5	Zusammenfügen von einzelnen Biokristalliten zu größeren Aggregaten	16
2.1.2	Amorphes Calciumcarbonat als Vorläuferverbindung in der Biom mineralisation	18
2.2	Calciumphosphat	19
2.2.1	Knochen	23
2.2.2	Zähne	28
2.3	Calciumcarbonat	30
2.3.1	Exoskelett	34
3.	<i>Methoden</i>	35
3.1	Synchrotronstrahlung	35
3.1.1	Entstehung von Synchrotronstrahlung	36
3.1.2	Das Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY)	37
3.2	Hochauflösende Röntgenpulverdiffraktometrie am HASYLAB (DESY)	41
3.2.1	Bestimmung der Partikelgröße nach Scherrer	42
3.2.2	Anwendung der Rietveldmethode	43
3.2.3	Anwendung der Methode nach Goldsmith	44
3.3	Mikrocomputertomographie am HASYLAB (DESY)	47
3.3.1	Experimenteller Aufbau	47
3.3.2	Projektionen und Rekonstruktion	49
3.3.3	Auswertung und Darstellung	52
3.3.4	Fixierung in Exopoxidharz	54
3.4	<i>Environmental scanning electron microscopy (ESEM)</i>	54
3.5	Thermogravimetrie (TG)	54
3.6	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	55

3.7	Proteinaseverdau	55
4.	Ergebnisse	56
4.1	Calciumphosphat	56
4.1.1	Untersuchung des Skelettes und der Zähne des Zebrafischlings (<i>Danio rerio</i>)	56
4.1.2	Untersuchung des Skelettes eines gesunden und eines deformierten Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	63
4.1.3	Untersuchung der Wirbelkörper des Lachses (<i>Salmo salar</i> L.)	68
4.1.4	Der Einfluss von Fetuin-A auf die Mineralisation im Knochen	76
4.1.5	Vergleich eines fluorotischen mit einem gesunden Zahn	84
4.2	Calciumcarbonat	92
4.2.1	Isopoden	92
4.2.1.1	Häutung von Isopoden	93
4.2.1.2	Untersuchung der Kutikula von <i>Porcellio scaber</i> während der Häutung	99
4.2.1.3	Vergleich von terrestrischen und marinen Isopoden	116
4.2.1.4	Untersuchung weiterer Isopoden	128
4.2.2	Die Schalenbildung der Süßwasserschnecke <i>Biomphalaria glabrata</i> im embryonalen Stadium	133
4.2.3	Untersuchung der Schale der Australseepocke (<i>Elminius modestus</i>)	139
5.	Zusammenfassung	145
6.	Literatur	149
7.	Anhang	168
7.1	Abkürzungsverzeichnis	168
7.2	Publikationsliste	170
7.3	Lebenslauf	173
7.4	Erklärung	174
7.5	Danksagung	175

1. Einleitung

Biomineralisation ist die Bildung von Mineralien durch Lebewesen. Begonnen mit der Entstehung des Lebens auf diesem Planeten haben sich die Lebewesen durch die Evolution entwickelt und an die sich verändernden Bedingungen auf der Erde angepasst. Die Nutzung von mehr als 70 Mineralien^[1-3] für viele verschiedene Anwendungsgebiete wurde dabei ständig verbessert. Durch die Kombination von anorganischen und organischen Anteilen können die so entstehenden Verbundmaterialien eine hohe Härte bei ebenfalls hoher Flexibilität erreichen und je nach Einsatzgebiet variiert werden. Diese reichen von der Verwendung als Endoskelett^[4] (stützend), als Werkzeug (Zahn^[5] oder Schere^[6]), zum Schutz vor Feinden (Exoskelett^[7] oder Schale^[8]), bis hin zur Sinneswahrnehmung (Magnetotaxis^[9] oder Schwerkraftsensor^[10]) und Reizweiterleitung (optische Wahrnehmung^[11]).

Seit mehreren Jahren versuchen Forschergruppen aus Bereichen wie Chemie, Physik, Biologie, Medizin oder Materialwissenschaften, die Grundprinzipien der Biomíneralisation zu verstehen.^[12-25] Durch diese Grundlagenforschung könnten neue Werkstoffe hergestellt, vorhandene Werkstoffe (wie beispielsweise Implantate) verbessert oder Wege zur Verhinderung von ektopischer Kristallisation (z. B. Arteriosklerose, Zahnstein, Gallen- oder Nierensteine) gefunden werden.

Diese Arbeit kann in zwei Teilbereiche unterteilt werden. Es wurde zum einen versucht, die Anwendung von zwei auf Synchrotronstrahlung basierenden Methoden im Forschungsgebiet der Biomíneralisation zu etablieren und andererseits die Prinzipien der Biomíneralisation besser zu verstehen.

Die folgenden Projekte wurden in dieser Arbeit bearbeitet:

1. Die Untersuchung des Skeletts und der Zähne von Zebraquarienfischen (*Danio rerio*).
2. Die Untersuchung der Skelette eines normalen und eines deformierten Medakafisches (*Oryzias latipes*).
3. Der Vergleich unterschiedlicher Teile der Wirbel von Lachsen (*Salmo salar* L.).
4. Die Analyse der Knochen von unterschiedlichen Mäusen.
5. Der Vergleich eines fluorotischen mit einem gesunden Zahn.
6. Die Verfolgung der Veränderung der Kutikula (Schale) von *Porcellio scaber* während der Häutung.
7. Die Analyse der Kutikula verschiedener Asselarten.
8. Die Schalenbildung der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* im embryonalen Stadium.
9. Die Untersuchung der Schale von Australseepocken (*Elminius modestus*).

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Biomineralisation

Die Biomineralisation (auch biologische Kristallisation genannt) stellt eine von drei Gruppen der Kristallisation dar. Die bekannteste ist die geologische Kristallisation. Bei ihr wirken über sehr lange Zeiträume ein hoher Druck und/oder eine hohe Temperatur. Dadurch entstehen große, hochgeordnete Kristalle. In ihnen

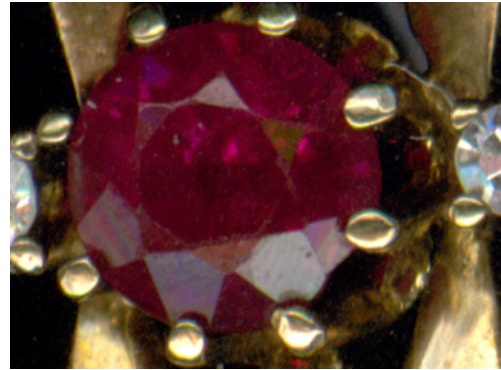


Abbildung 2.1-1: Bild eines Rubins
(www.hpwt.de)

können noch zusätzlich andere Elemente enthalten sein. So können farbige Kristalle entstehen, von denen einige sehr wertvoll sind. Im Rubin (Abbildung 2.1-1) ist beispielsweise ein geringer Anteil von Chrom im sonst farblosen



Abbildung 2.1-2: Bild zweier Bergkristalle (oben) und zweier Amethyste (unten). (www.hpwt.de)

Korund (Al_2O_3) für die rote Farbe verantwortlich. Der Bergkristall (SiO_2) erhält durch Spuren von Eisen oder Mangan eine violette Farbe und wird dann als Amethyst bezeichnet (Abbildung 2.1-2).

Von chemischer Kristallisation spricht man, wenn unter normalen Bedingungen Kristalle aus einer Mutterlauge gefällt werden. Dabei werden meist kleine ungeordnete Kristalle gebildet. Durch die schnelle Kristallbildung entstehen hier oft Kristalldefekte oder amorphe Phasen.

Die durch Biomineralisation gebildeten Kristalle entstehen unter kontrollierten Bedingungen eines biologischen Systems. Sie sind meist sehr klein und hoch geordnet. Stets sind in Biomineralien auch organische Verbindungen eingebaut, so dass ein Kompositmaterial mit besonderen Eigenschaften entsteht. In der Biomineralisation unterscheidet man zwei Varianten: Die biologisch induzierte und die biologisch kontrollierte Mineralisation.^[12]

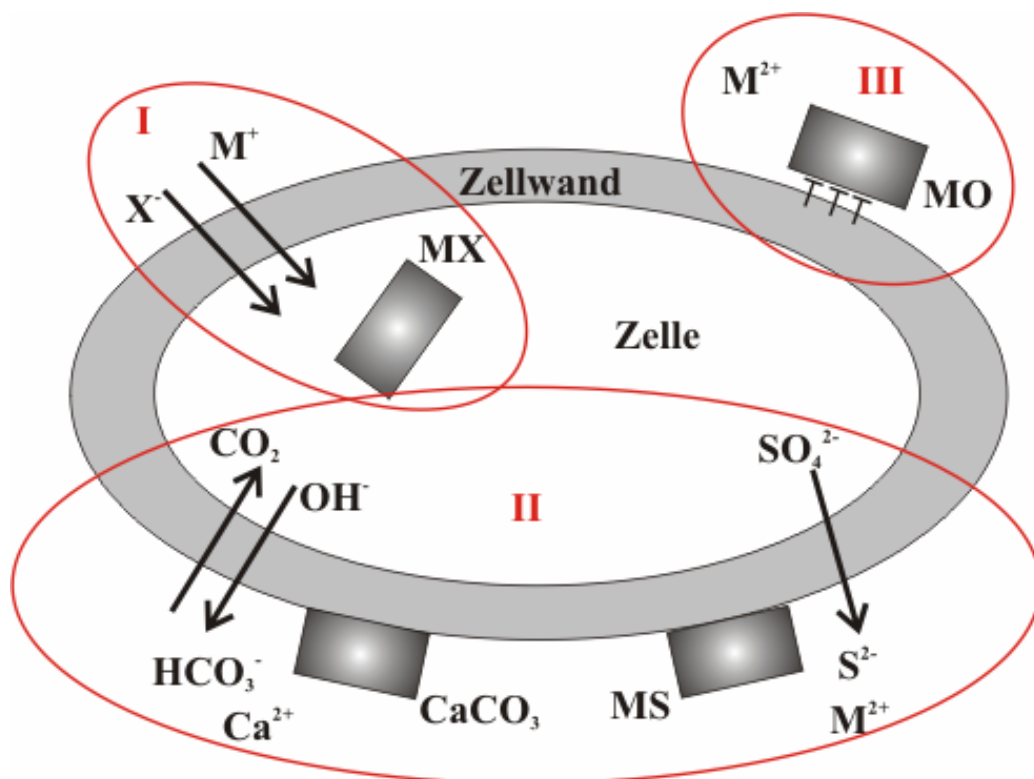


Abbildung 2.1-3: Schematischer Ablauf der biologisch induzierten Mineralisation (Abbildung nach S. Mann).

Bei der biologisch induzierten Mineralisation werden Mineralien durch Interaktion des Metabolismus und der Umgebung des Organismus gebildet. Allerdings ist die Mineralisation dabei nur ein Nebeneffekt.^[17] Ein Beispiel dafür ist die Bildung von Stromatolithen (biogene Sedimentgesteine aus Calciumcarbonat) durch marine benthonische Cyanobakterien. Die ältesten Stromatolithen sind etwa 3,5 Milliarden Jahre alt.^[26] Ein weiteres Beispiel ist die Bildung von Mangan(IV)-oxid aus Mangan(II).^[27] Auch die Akkumulation oder Maskierung von toxischen Schwermetallionen wie Blei, Cadmium oder des Schwermetalloxidkations Uranyl (UO_2^{2+}) durch Bakterien (I in Abbildung 2.1-3), werden dieser Form der Biomineralisation zugeordnet.^[17] Die Bildung der Mineralien entlang der Zellwand ist eine ausgeprägte Eigenschaft der biologisch induzierten Mineralisation. Dies kann unter Umständen auch zum Einschluss der Zelle in das gebildete Mineral führen. Keime bilden sich an der Zellwand dort, wo sich Ionenkanäle zum Transport der zur Mineralisation benötigten Bausteine befinden (II in Abbildung 2.1-3). Auch Lipide, Polysaccharide oder Proteine auf/in der Zellwand können als Kristallisationsplattform dienen (III in Abbildung 2.1-3). Da die Mineralisation hier nicht ständig kontrolliert wird, sind Größe, Form, Struktur (Morphologie) und Zusammensetzung der Partikel sehr unterschiedlich.

Mineralien, die durch biologisch kontrollierte Mineralisation gebildet wurden, sind dagegen Biomineralien mit definierter Zusammensetzung und Struktur. Ein Grund dafür ist der in hohem Maße regulierte Verlauf dieser Form der Biomineralisation. Knochen, Zähne oder Schneckenschalen werden unter anderem so gebildet. Dabei kann das Material von einer Spezies reproduzierbar in Partikelgröße, Morphologie, Zusammensetzung und morphologischer Kristallorientierung gebildet werden. Auch der Einbau in hierarchische Strukturen ist gleichbleibend. Die biologisch kontrollierte Mineralisation ist in einzelligen Organismen wie beispielsweise Algen weit verbreitet. Der einzig gut

dokumentierte Fall für Bakterien sind die magnetotaktischen Bakterien. In mehrzelligen Organismen ist diese Form sogar extrem weit verbreitet.

Der älteste Fund von Biomineralien stammt von vor etwa 3,5 Milliarden Jahren.^[26] Von da an dauerte es noch knapp drei Milliarden Jahre, bis sich vor ungefähr 570 Millionen Jahren die Biomineralisation global durchsetzte und heute in vielen Lebewesen zu finden ist.^[28] In dieser Zeit sind durch die Evolution Biomineralien für viele Anwendungsgebiete entwickelt und weiterentwickelt worden. Bis heute sind über 70 Verbindungen bekannt die hier eingesetzt werden.^[1-3] Eine Übersicht über die Vielfalt ist in Tabelle 2.1-1 gezeigt.

2.1.1 Grundprinzipien der Biomineralisation

Der Prozess der Biomineralisation beginnt bereits mit der Transkription der DNS im Lebewesen und der darauf folgenden Translation der Informationen zur Bildung von Proteinen oder Enzymen. Zusammen mit anderen Umwelteinflüssen ist die Biomineralisation ein hoch komplexes System. Für die Biomineralisation sind fünf Kontrollmechanismen gut untersucht: ^[1]

1. Kontrolle über die Kristallkeimbildung
2. Kontrolle über das Kristallwachstum
3. Kristallisation in abgegrenzten Bereichen
4. Bildung eines Verbundes aus anorganischem Mineral und organischer Matrix
5. Zusammenfügen von einzelnen Biokristalliten zu größeren Aggregaten

Tabelle 2.1-1: Übersicht von Biomineralien und ihrer Funktion^[17,29,30]

	Mineralname	Summenformel	Organismus	Funktion
Calcium-carbonate	Calcit	CaCO_3	Coccolithen	Exoskelett
			Foraminiferen	
			Crustaceen	
			Mollusken	Schale
			Säugetiere	Schwerkraftsensor
			Trilobiten	optische Wahrnehmung
	Mg-Calcit (Dolomit)	$(\text{Mg,Ca})\text{CO}_3$	Echinodermen	Panzer/Stacheln
			Octocorallia	Stacheln
	Aragonit	CaCO_3	Gastropoden	Liebespfeil
			Mollusken	Schale
			Korallen	Exoskelett
			Fische	Schwerkraftsensor
			Cephalopoden	Auftrieb
	Vaterit	CaCO_3	Gastropoden	Schale
Ascidiacea			Stacheln	
amorphes CaCO_3	$\text{CaCO}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	Crustaceen	Exoskelett	
		Pflanzen	Calciumspeicher	
Calcium-phosphate	Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Vertebraten	Endoskelett, Zähne
	Octacalcium-phosphat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	Vertebraten	Precursor in Knochen
	amorphes Calciumphosphat	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$	Vertebraten	Ionenspeicher in Mitochondrien pathologische Verkalkungen
Erdalkali-sulfate	Bassanit	$\text{CaSO}_4 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$	Quallen	Scherkraftsensor
	Coelestin	SrSO_4	Acantharia	Skelett
	Baryt	BaSO_4	Loxodes	Schwerkraftsensor
Caraceae				
Eisenoxide und -hydroxide	Magnetit	Fe_3O_4	Napfschnecken	Radula
			Käferschnecken	
			Bakterien	Magnetotaxis
			Fische & Vögel	magnetische Navigation
	Ferrihydrit	$5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	Pflanzen/ Tiere	Speicherproteine
			Biber, Ratte	Zahnoberfläche
			Seegurke	mechanische Stabilität
	Goethit	$\alpha\text{-FeO(OH)}$	Napfschnecken	Radula
Lepidocrocit	$\gamma\text{-FeO(OH)}$	Käferschnecken	Radula	
Silikate	amorphe Strukturen	$\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$	Diatomeen	Exoskelett
			Radiolarien	
			Kieselschwämme	Lichtleitung
			Gräser	mechanische Stabilität, Schutz

2.1.1.1 Kontrolle über die Kristallkeimbildung

Zur Bildung der ersten Kristallkeime aus den Ionen einer übersättigten Lösung ist eine Aktivierungsenergie nötig. Diese kann durch Wechselwirkung mit organischen Oberflächen herabgesetzt werden. Dazu lagern sich zu Beginn negativ geladene Biomoleküle an Oberflächen an (Abbildung 2.1.1-1 A). Anschließend werden durch elektrostatische Wechselwirkung die positiv geladenen Calciumionen angezogen und angelagert (B und C). Nach der Bildung einer Lage Calciumionen werden Carbonationen angezogen und bilden ebenfalls eine Lage (D). Diese Vorgänge wechseln sich immer weiter ab und der Keim kann wachsen (E). Der beschriebene Vorgang stellt allerdings nur eine schematische Vereinfachung dar. Welches Polymorph entsteht, kann durch eine spezielle Anordnung der Oberfläche beeinflusst werden. Dies geschieht beispielsweise bei Mollusken, in deren Schale Aragonit gebildet wird.^[1,12,16,17]

2.1.1.2 Kontrolle über das Kristallwachstum

Ist der Keim gebildet und somit die polymorphe Phase festgelegt, so kann der Kristall weiter wachsen. Dadurch wird normalerweise die Form mit der niedrigsten Energie gebildet. Für Calcit ist dies ein Rhomboeder. Um andere Geometrien zu bilden, muss das Wachstum des Kristalls beeinflusst werden. Dies geschieht mit Hilfe von Biomolekülen, die das Wachstum in eine bestimmte Richtung inhibieren (Abbildung 2.1.1-2). Dazu adsorbieren spezielle Biomoleküle (E) an den zu ihnen passenden Kristalloberflächen und verhindern so das Wachstum in diese Richtung (B-D). Die Oberflächen können durch Netzebenen, die kristallographisch durch die Millerschen Indizes definiert werden, charakterisiert (A) werden.^[1,12,16,17]

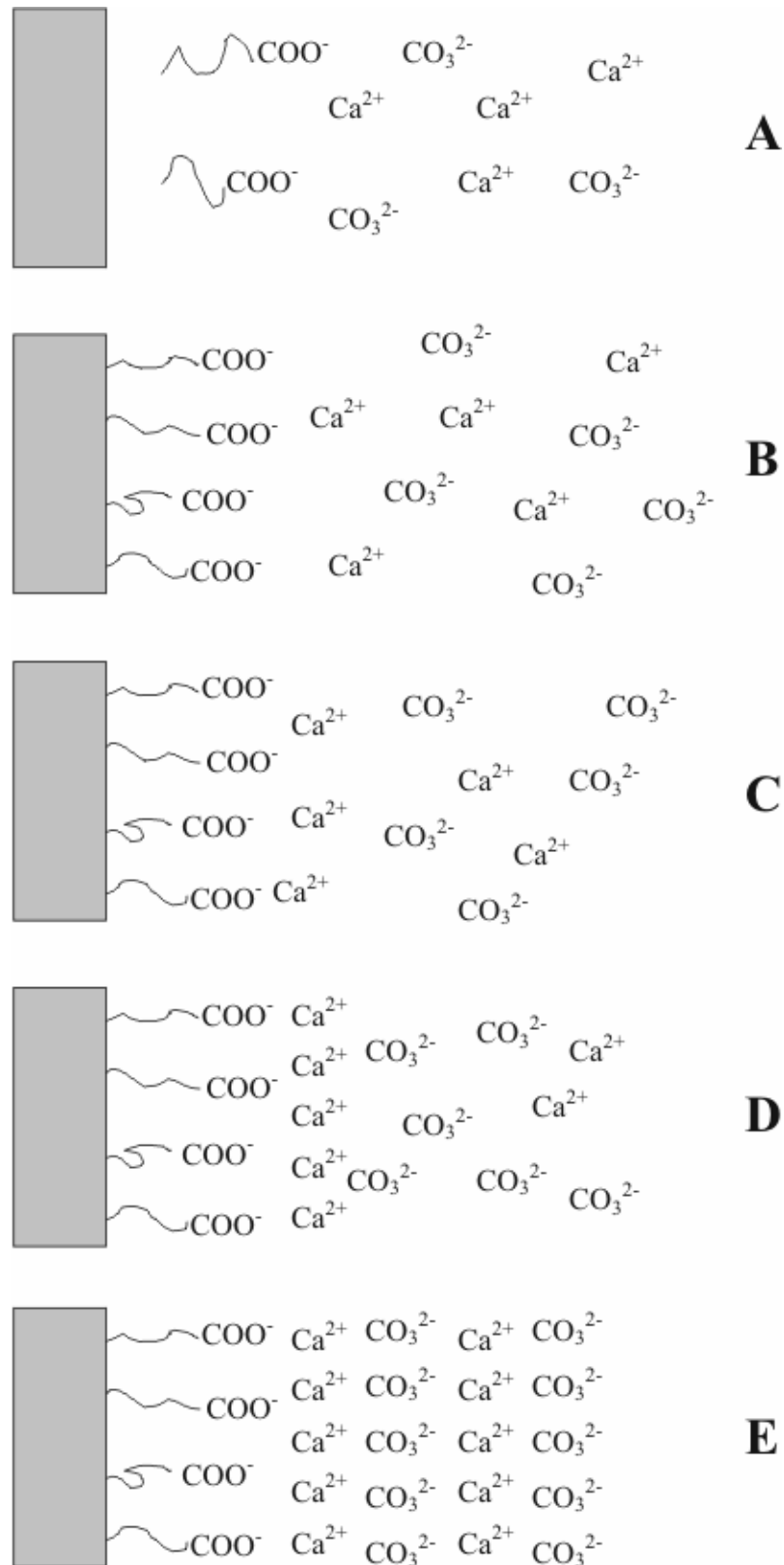


Abbildung 2.1.1-1: Schematischer Mechanismus der induzierten heterogenen Keimbildung am Beispiel von Calciumcarbonat.^[1]

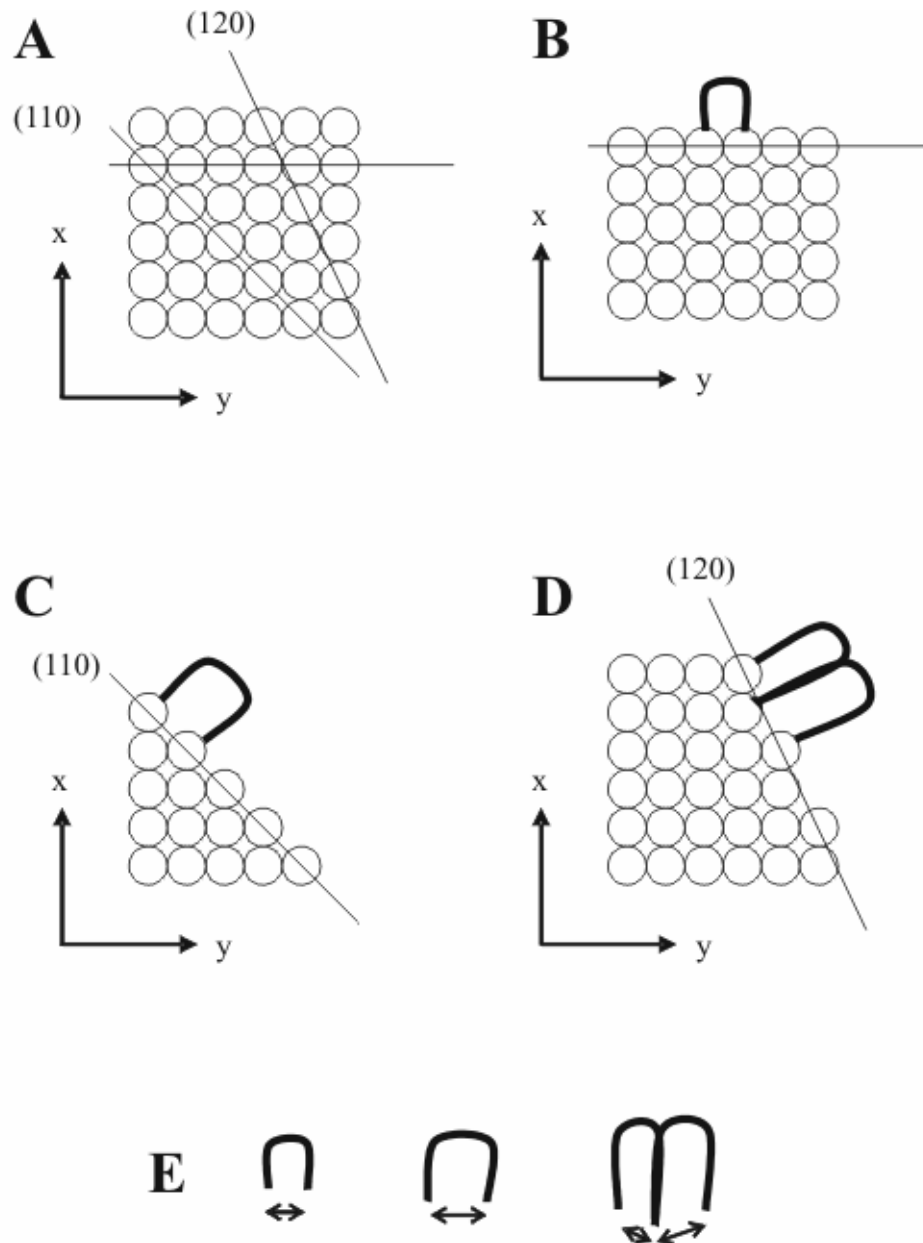


Abbildung 2.1.1-2: Schematische Darstellung der bevorzugten Adsorption. ^[1]

2.1.1.3 Kristallisation in abgegrenzten Bereichen

Dieser Teil der Biomineralisationskontrolle dient zur Größenbegrenzung der Kristalle, denn durch die ersten beiden Kontrollmechanismen ist es nur möglich, die Form festzulegen (z. B. Würfel, Oktaeder, Stäbchen oder Plättchen). Dazu muss der Kristallisationsraum eingeschränkt werden. Dies geschieht meist durch Vesikel, in die durch Ionenpumpen die entsprechenden Ionen transportiert werden. Durch Vesikel ist auch ein Transport aus der Zelle heraus und so eine

extrazelluläre Mineralisation möglich. Dies ist beispielsweise bei Osteoblasten im Knochen der Fall.^[1,12,16,17,31]

2.1.1.4 Bildung eines Verbundes aus anorganischem Mineral und organischer Matrix

Dieser Verbund zeichnet alle Biomineralien aus. Er dient dazu, die mechanischen Eigenschaften des Materials zu verbessern. Die Schalen von Muscheln bestehen aus Calcit oder Aragonit und sind viel härter als die reinen Kristalle. Eine hohe Stabilität mit ebenfalls hoher Elastizität zeichnet Knochen aus, welcher aus einem Verbund von Kollagen und Hydroxylapatit besteht. Das Verhältnis von Mineral zur organischen Matrix kann je nach Anwendung sehr variieren. Knochen und Dentin enthalten vergleichbar große Anteile, Enamel oder Molluskschalen hingegen mehr als 98 % Mineral. Dabei unterscheiden sich auch die mechanischen Eigenschaften. Im Fall von ähnlich großen Anteilen bildet sich ein Verbundwerkstoff, in dem das Mineral die Härte des elastischen Grundmaterials verbessert (Abbildung 2.1.1-3 A), wie es beispielsweise im Knochen der Fall ist. Dagegen verbessert die organische Matrix, die zu einem geringeren Anteil in das Mineral eingelagert ist, das Bruchverhalten. Kristalle besitzen bevorzugte Spaltrichtungen; diese entsprechen bestimmten Netzebenen im Kristall (z. B. [104] in Calcit). Mikrorisse können sich entlang einer solchen Netzebene ausweiten und so zum Bruch führen (B). Durch eingelagerte organische Moleküle können Risse entlang einer Netzebene im Kristall gestoppt werden. So wird ein Bruch verhindert (C).^[1,12,16,17]

2.1.1.5 Zusammenfügen von einzelnen Biokristalliten zu größeren Aggregaten

Im letzten Schritt können nun noch einzelne Kristalle oder Verbundwerkstoffe zu größeren Baueinheiten zusammengesetzt werden. Dies geschieht, wenn ein Biomineral für die benötigte Aufgabe nicht ausreicht. So werden beispielsweise

die Schalen von Diatomeen oder Coccolithophoren (marine Einzeller) gebildet. Cölfen et al. beschreiben über Mesokristalle neue Kristallisationsmechanismen. Mesokristalle sind dabei größere Kristalle, die aus Nanokristallen aufgebaut sind.^[1,12,16,17,32]

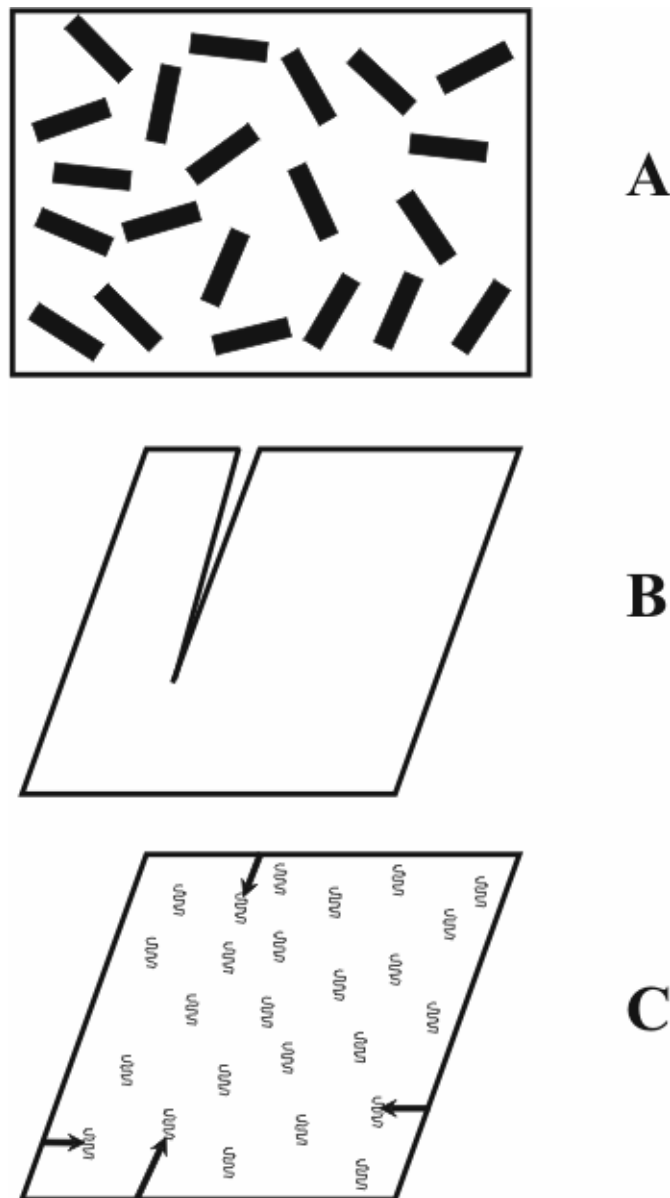


Abbildung 2.1.1-3: Änderung der mechanischen Stabilität in Biomaterialien.^[1]

2.1.2 Amorphes Calciumcarbonat als Vorläuferverbindung in der Biomineralisation

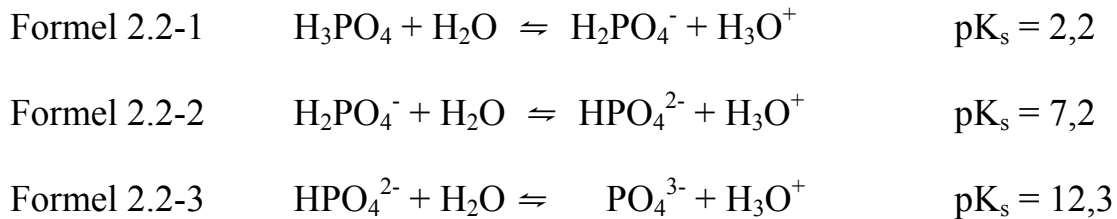
Im Jahre 1984 wiesen Weiner und Traub^[33] in Molluskenschalen Chitin und Seidenprotein nach und vermuten, dass das Seidenprotein eine passive Rolle in der Biomineralisation spielt und in ihm das Chitin gebildet wird. Addadi et al.^[34] greifen diesen Ansatz auf und postulieren eine neue Theorie. Chitin fungiert hier als Gerüst und das Seidenprotein füllt anfangs den Raum aus, der später durch das Mineral ausgefüllt wird. Es scheint ein Platzhalter für das Mineral zu sein. In das Chitin wird als erstes amorphes Calciumcarbonat eingelagert. Später bildet sich daraus Aragonit. Dies und der Fund von amorphem Calciumcarbonat in Larven von Mollusken^[35] lassen den Schluss zu, dass amorphes Calciumcarbonat als Precursor für die kristalline Phase dient. Der Fund von amorphem Calciumcarbonat an der Oberfläche von adulten Muschelschalen und von Vesikeln mit amorphem Calciumcarbonat und Vaterit im Gewebe unterstützen diese Theorie.^[36,37] Auch die Lagerung von amorphem Calciumcarbonat in sternalen Kalkspeichern von *Porcelio scaber* während der Häutung deutet auf diese Funktion hin. Dabei haben EXAFS-Untersuchungen des amorphen Calciumcarbonates gezeigt, dass die Nahordnung schon der späteren kristallinen Form Calcit gleicht.^[38] Auch weitere Publikationen berichten von diesem Effekt.^[8,39-41]

2.2 Calciumphosphat

Als Calciumphosphate bezeichnet man die Calciumsalze der (Ortho)phosphorsäure. Dabei sind unterschiedliche stöchiometrische Zusammensetzungen möglich (Tabelle 2.2-1). Die (Ortho)phosphorsäure ist eine mittelstarke dreiprotonige Säure mit den folgenden Dissoziationsstufen:

Tabelle 2.2-1: Übersicht der verschiedenen Calciumphosphate.^[42-44]

Name	Abkürzung	Formel	Ca:P Verhältnis	Dichte/ g·cm ⁻³	Kristallsystem
amorphes Calciumphosphat	ACP	Ca _x (HPO ₄) _y ·n H ₂ O	1,2-2,2	k. A.	röntgenamorph
Monocalciumphosphat- Anhydrat	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5	2,23	triklin
Monocalciumphosphat- Monohydrat	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0,5	2,58	triklin
Dicalciumphosphat- Anhydrat	DCPA	CaHPO ₄	1,0	2,32	monoklin
Dicalciumphosphat- Dihydrat	DCPD	CaHPO ₄ ·2 H ₂ O	1,0	2,89	triklin
Octacalciumphosphat	OCP	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ ·5 H ₂ O	1,33	2,61	triklin
α-Tricalciumphosphat	α-TCP	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	2,86	monoklin
β-Tricalciumphosphat	β-TCP	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	3,07	rhomboedrisch
Hydroxylapatit	HAP	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	3,16	monoklin oder hexagonal
Tetracalciumphosphat	TTCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0	3,05	monoklin



Allgemein gilt, dass die Dihydrogenphosphate alle in Wasser löslich sind. Die Hydrogenphosphate und Phosphate sind dagegen nur löslich, wenn als Kation ein Alkalimetall dient. In Säuren sind alle Calciumphosphate löslich.

Monocalciumphosphat-Monohydrat (MCPM) kann aus stark sauren Lösungen gefällt werden. Es gibt oberhalb von 100 °C das Kristallwasser ab und wird so Monocalciumphosphat-Anhydrat (MCPA). Es ist die am besten lösliche Form. Aufgrund seiner hohen Acidität wurde es noch nicht in biologischen Hartgeweben gefunden. Es wird als Bestandteil in synthetischen Calciumphosphat-Zementen eingesetzt.

MCPA kommt ebenfalls nicht in der Natur vor und hat keinen Anwendungsbereich in der Medizin.

Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD) kann aus wässrigen Lösungen gefällt werden und gibt bei Temperaturen von mehr als 80 °C das Kristallwasser ab. So entsteht Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA). DCPD ist in der Natur als Bestandteil von pathologischen Ablagerungen wie Zahnstein, Chondrocalcinose oder Blasensteinen zu finden. Des Weiteren wird es als Zwischenprodukt bei der Knochenbildung und dem Abbau des Zahnschmelzes durch Karies vermutet. Es wird wie MCPM in Calciumphosphat-Zementen verwendet.

DCPA kann durch Kristallisation aus wässrigen Lösungen oberhalb von 100 °C synthetisiert werden. Es kommt nicht in der Natur vor, wird aber als Bestandteil von Calciumphosphat-Zementen eingesetzt.

Octacalciumphosphat (OCP) tritt als Zwischenprodukt bei der Fällung von Hydroxylapatit (HAP) oder calciumdefizitärem Hydroxylapatit (CDHA) auf. Es

findet sich neben DCPD in Zahnstein und Blasensteinen. Zusätzlich wird es als Zwischenprodukt bei der Biomineralisation vermutet.

β -Tricalciumphosphat (β -TCP) wird durch Calcinieren von CDHA oberhalb von 800 °C gewonnen (Formel 2.2-4). Durch eine Temperatur von mehr als 1125 °C wandelt es sich in α -Tricalciumphosphat (α -TCP) um. Verglichen mit α -TCP ist es die stabilere Phase bei Raumtemperatur. Es findet sich in Kombination mit Magnesium als Whitlockit, $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_2$, in Zahnstein, Blasensteinen, Speicheldrüsensteinen, arthritischem Knorpel und Weichgewebsablagerungen. In reiner Form oder im Gemisch mit HAP wird es als Knochenersatzmaterial verwendet.



α -TCP entsteht durch Erhitzen von β -TCP auf über 1125 °C. Wie DCPA kommt es nicht in der Natur vor, wird aber auch als Bestandteil von Calciumphosphat-Zementen eingesetzt.

Tetracalciumphosphat (TTCP) wird durch eine Festkörperreaktion bei mehr als 1300 °C aus DCPA und Calciumcarbonat synthetisiert (Formel 2.2-5). Da es mit Wasser zu HAP und Calciumhydroxid reagiert, ist es in der Natur nicht zu finden. Es findet in der Herstellung von Calciumphosphat-Zementen Verwendung.



Amorphes Calciumphosphat (ACP) ist ein Zwischenprodukt, beispielsweise bei der Fällung aus wässriger Lösung. Die Zusammensetzung hängt dabei vom pH-Wert und den Konzentrationen der Lösungen ab. Deshalb wurde ACP mit Calcium-zu-Phosphat-Verhältnissen von 1,2 bis 2,2 gefunden. Es ist in

Verkalkungen von Weichgeweben zu finden und wird gelegentlich in Calciumphosphat-Zementen verwendet.

CDHA, $\text{Ca}_{5-x}(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{3-2x}\text{OH}$, entsteht beim Fällern aus neutraler oder basischer wässriger Lösung. Er wandelt sich je nach Zusammensetzung oberhalb von 700 °C in β -TCP oder in eine Mischung aus β -TCP und HAP um.^[1]

HAP kristallisiert in monokliner Form und wandelt sich bei 211 °C in die hexagonale Form um.^[45] Die kristallographischen Daten der beiden Phasen sind in Tabelle 2.2-2 dargestellt. HAP ist die stabilste und am schlechtesten lösliche Form der Calciumphosphate. Es findet Anwendung als Knochenersatzmaterial oder Beschichtung auf metallischen Implantaten.

Tabelle 2.2-2: Vergleich der beiden Hydroxylapatitstrukturen.

Mineral	Hydroxylapatit ^[46]	Hydroxylapatit ^[47]
Formel	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Raumgruppe	$P 6_3/m$ (176)	$P 2_1/b$ (14, setting 3)
Kristallsystem	hexagonal	monoklin
Gitterkonstanten / Å	a=b=9,418 c=6,884 $\gamma=120^\circ$	a=9,4214 b=18,8428 c=6,8814 $\gamma=120^\circ$
Dichte / g·cm⁻³	3,16	3,16
ICDD-Referenz	09-0432	76-0694

Durch den Austausch der an HAP beteiligten Ionen sind viele verschiedene Zusammensetzungen möglich. Beim bereits genannten CDHA wurde beispielsweise Hydrogenphosphat eingebaut und dadurch formal Calcium ersetzt. Calcium kann aber auch durch Natrium, Kalium, Magnesium oder Strontium ersetzt werden. Eine weitere Austauschmöglichkeit besteht darin, dass Hydroxid durch Fluorid,^[48] Chlorid oder Bromid ersetzt wird. Durch eine Substitution von Ionen können sich auch die Eigenschaften des Apatits ändern. Durch Fluorid wird der Apatit zum Beispiel beständiger gegenüber Säuren. Als

weiteres Beispiel kann die Stabilisierung der hexagonalen Phase bei Raumtemperatur durch Fluorid und Chlorid genannt werden. Carbonat kann sowohl für Phosphat als auch für Hydroxid eingebaut werden. Man spricht in diesem Fall auch von Carbonatapatit.

In der belebten Natur findet man HAP immer in der nichtstöchiometrischen Form, beispielsweise in Knochen und Zähnen. Da der Substitutionsgrad sehr klein ist, werden die entsprechenden Biomineralien trotzdem als HAP beschrieben und, da oft Carbonat eingebaut wird, als Carbonatapatit (Dahlit) bezeichnet.^[1,49,50]

Eine ausführliche Beschreibung der Calciumphosphate und ihrer Anwendungen kann in den Büchern von J. C. Elliott^[42] und T. Kanazawa^[51] gefunden werden.

2.2.1 Knochen

Der Knochen ist viel mehr als nur ein starres, Stabilität gebendes Bauteil in vielen Lebewesen. Er ist ein komplexes Organ mit vielfältigen Funktionen. Er dient als mechanische Stütze, Muskelerersatz, zum Schutz innerer Organe, als Reservoir für Mineralsalze und als Produktionsort der Blutzellen. Bei der Entwicklung des Knochens müssen die verschiedenen Gewebetypen im Knochen (Knochen-, Knorpel-, fibröses und blutbildendes Gewebe) eng zusammenwirken. Diese Entwicklung ist ein permanenter Prozess, denn der Knochen wird immer wieder auf-, ab- und umgebaut (*bone remodeling*). Somit ist er in der Lage, zu wachsen und sich zu regenerieren.^[52,53] Dabei spielt die mechanische Belastung eine große Rolle. Schon früh wurde bekannt, dass der Aufbau des Knochens durch die Art der Belastung mitbestimmt wird.^[54] Zudem ist es wichtig, dass die am Knochenbau beteiligten Prozesse je nach Aufgabe (Entwicklung, Wachstum, Substanzerhaltung, Reparatur oder Altern) aufeinander abgestimmt werden.^[55] Faszinierend dabei ist die Kombination von Stabilität und Bruchfestigkeit mit hoher Elastizität. Diese Eigenschaft bekommt

der Knochen durch den Verbund einer organischen Matrix (ca. 30 %) mit einer anorganischen Phase (ca. 70 %). Hauptbestandteil der organischen Matrix ist das Kollagen vom Typ I. Die anorganische Phase besteht größtenteils aus Hydroxylapatit, genauer Carbonatapatit, bei dem Phosphat durch Carbonat ersetzt wird.^[56]

Im Knochen finden sich vier verschiedene Zelltypen, die für die Bildung von Knochensubstanz (Osteoblasten), den Abbau von Knochensubstanz (Osteoklasten) und die Stabilität sowie die Funktion des Mineralspeichers (Osteozyten und Liningzellen) verantwortlich sind.^[31]

Osteoklasten sind große vielkernige Zellen. Sie werden durch Fusion von einkernigen Stammzellen gebildet. Die HAP-Kristalle werden durch die ausgeschiedene saure Phosphatase angelöst. Bildung, Aktivität und Lebensdauer (Apoptose) der Osteoklasten ist von den Osteoblasten abhängig.^[57]

Die kuboiden Osteoblasten entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen aus Stammzellen. Sie stehen untereinander in engem Kontakt und bilden so ein die Knochoberfläche bedeckendes Netzwerk, dass über Knochenkanäle (Canaliculi) mit Osteozyten erweitert wird.^[58] Die Aufgaben der Osteoblasten sind unter anderem die Produktion von Kollagen, die Mineralisierung der Knochen, das Auflösen von Matrixproteinen sowie die Attraktion und Aktivierung der Osteoklasten zur Steuerung des *bone remodeling*.^[59] Bei der Knochenbildung wird zuerst eine unmineralisierte Kollagenmatrix (Osteoid) gebildet. Anschließend sekretieren die Osteoblasten mit Hydroxylapatit gefüllte Matrixvesikel, die mit Hilfe der Matrixproteine Osteocalcin und Osteonectin in die Kollagenmatrix eingebaut werden. Durch Hormone und Wachstumsfaktoren wie IGF, EGF, TGF α , TGF β , PDGF, PTH und Vitamin D3 werden Knochenauf- und -abbau reguliert, indem die Zellen aktiviert oder deaktiviert werden.^[60]

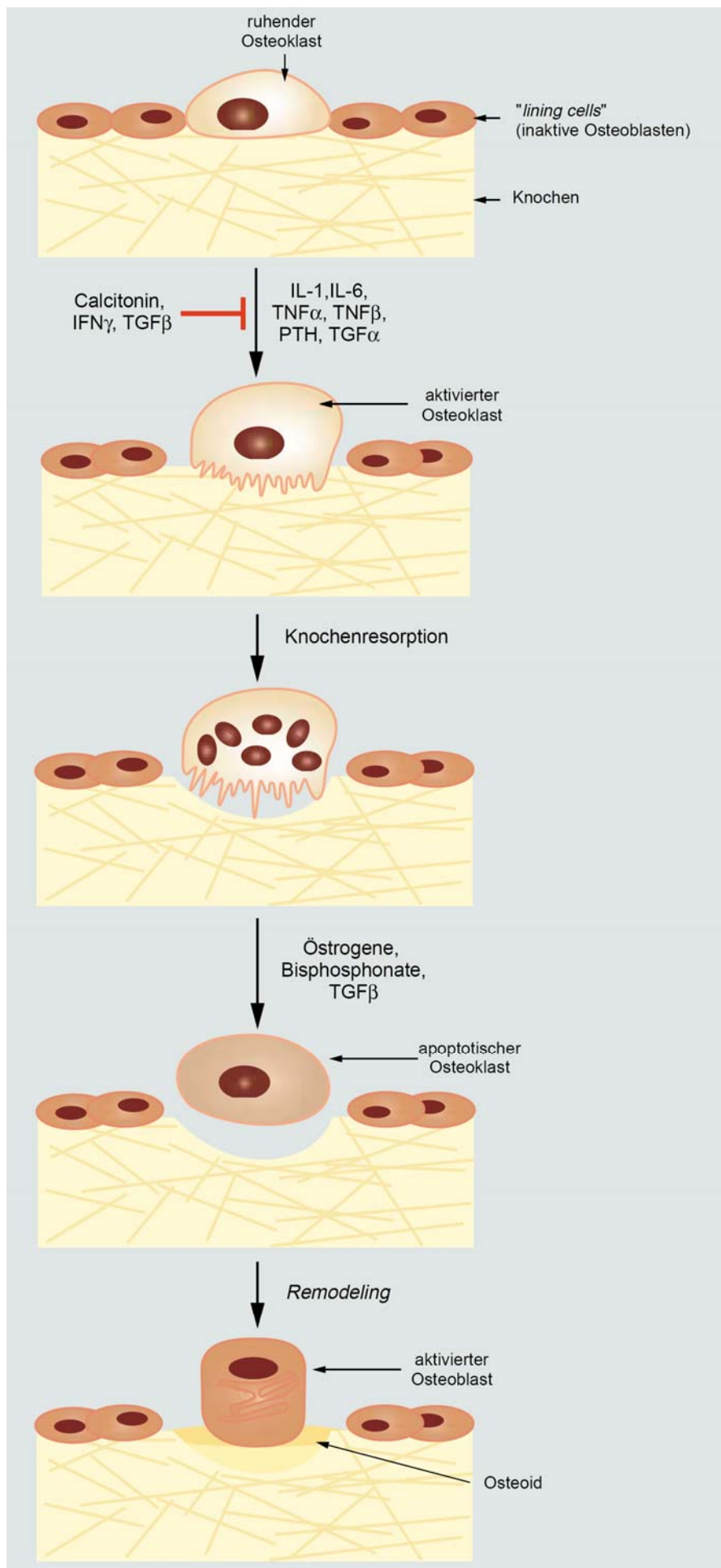


Abbildung 2.2.1-1: Ab- und Aufbau des Knochens.^[56]

Liningzellen, welche höchstwahrscheinlich identisch mit ruhenden Osteoblasten (*resting cells*) sind, liegen an der Osteoidoberfläche und haben eine geringere Enzymausstattung als die aktiven Zellen und besitzen zusätzlich eine oberflächenabdeckende Membran (*membrana limitans*). Sie spielen eine zentrale Rolle beim Auf- und Abbau der Knochenmatrix.^[56,58]

Osteozyten liegen in der gebildeten Knochenmatrix und haben sich ebenfalls aus den Osteoblasten entwickelt. Sie stehen in regulativem Kontakt zu den Liningzellen und können bei Bedarf wieder mit der Matrixproduktion beginnen.^[52]

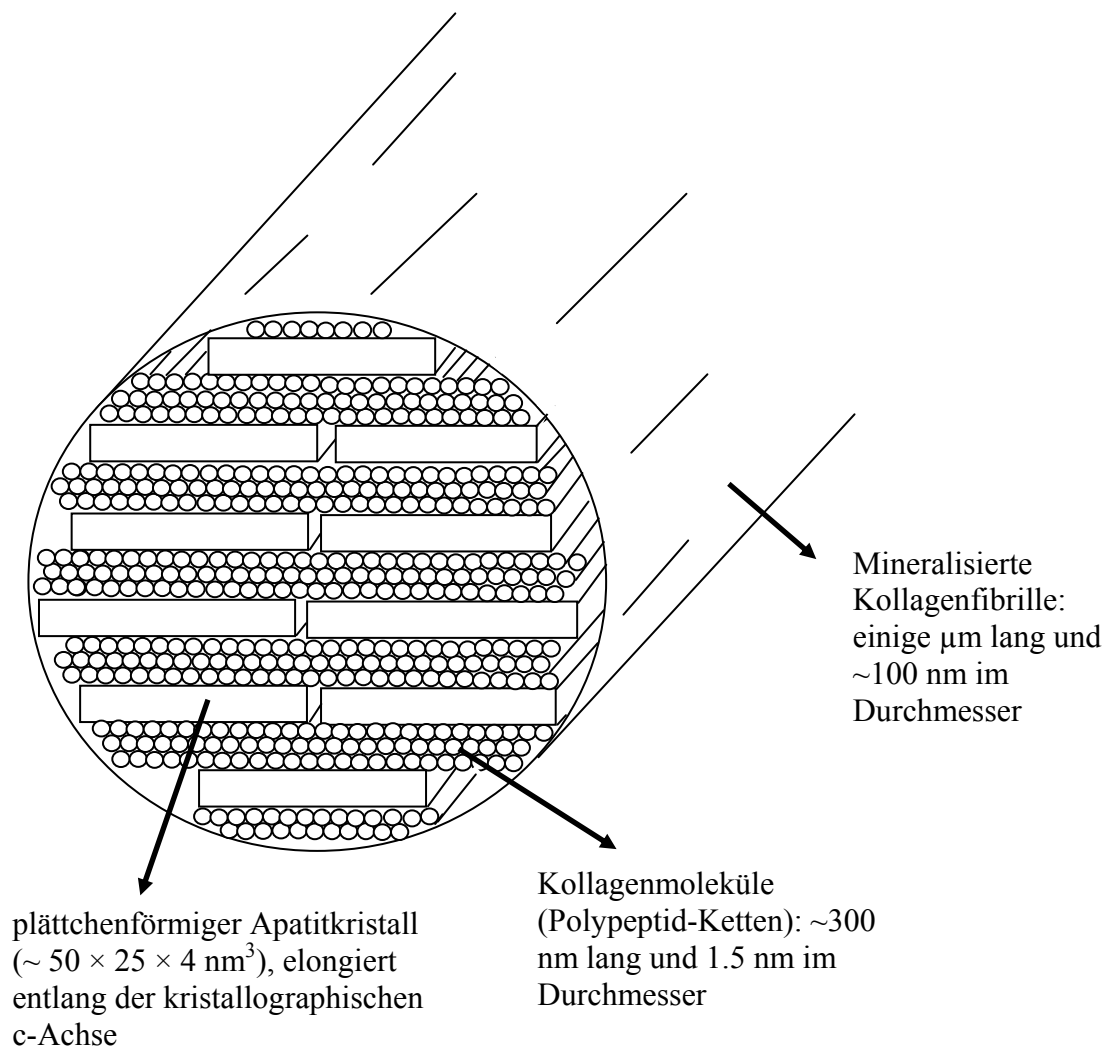


Abbildung 2.2.1-2: Schnitt durch eine Kollagenfibrille, mit Kollagen und Apatitkristallen.^[1]

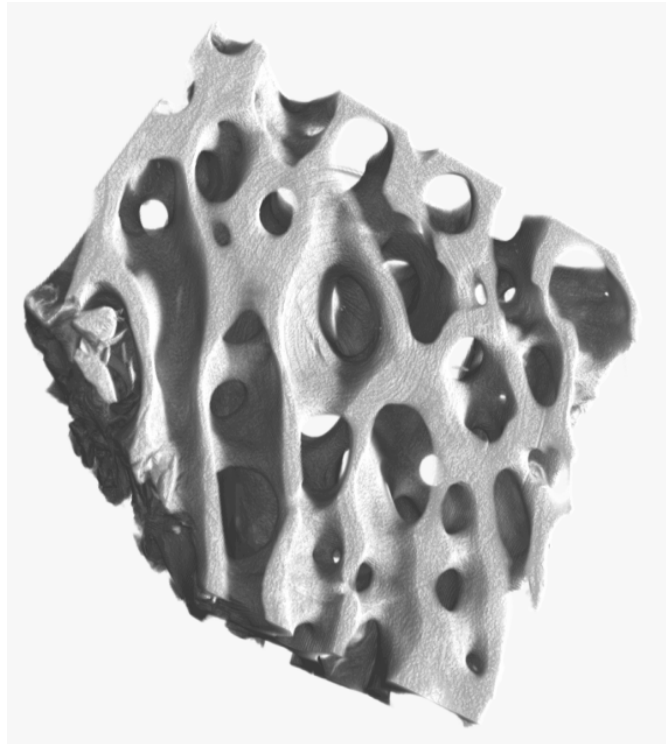


Abbildung 2.2.1-3: Mikrocomputertomographische Aufnahme eines spongiösen Knochens.^[1]

Das *bone remodeling* wird unter anderem von den Zellen der Osteoblastenlinie kontrolliert.^[61] Der schematische Ablauf ist in Abbildung 2.2.1-1^[56] gezeigt. Dabei wird der ruhende Osteoklast durch stimulierende Metabolite aktiviert. Er bildet dann den Bürstensaum und beginnt mit der Resorption. Ist der Resorptionsprozess beendet, so stirbt der Osteoklast durch morphologische Apoptose. Anschließend erfolgt die Bildung des neuen Knochenmaterials durch einen Osteoblasten. Verlässt man nun die zelluläre Ebene und betrachtet den Knochen makroskopisch, so findet man als kleinste Baueinheit die mineralisierten Kollagenfibrillen (Abbildung 2.2.1-2). Diese bestehen aus Kollagen I-Tripel-Helices und biologischem Apatit. Die Apatitkristalle haben eine Abmessung von ca. 50 nm·25 nm·4 nm und sind entlang der c-Achse verlängert. Mit diesen Baueinheiten wird dann der Knochen gebildet. Er besteht aus einer äußeren kompakten Schicht (Corticalis) und einem porösen Innenraum (Spongiosa). Abbildung 2.2.1-3 zeigt einen Ausschnitt (5 mm Kantenlänge) des spongiösen Teils eines Knochens. In diesem Innenraum befindet sich das

Das Dentin hat eine dem Knochen ähnliche Struktur. Es umschließt die Pulpa, welche aus Nerven, Blutgefäßen, Zellen und anderem Gewebe besteht ^[62-64] und bildet dadurch den funktionellen Dentin-Pulpa Komplex.^[65] Die Pulpa wird in verschiedene Bereiche unterteilt, die sich durch die Anordnung der Zellen unterscheiden.^[62,64,66,67] Dentin kann ähnlich dem Knochen verändert und umgebaut (*remodeling*) werden. Die dafür zuständigen Zellen sind Präodontoblasten und Odontoblasten, welche unter anderem von Zellen der Pulpa beeinflusst werden.^[68] Diese bilden zuerst Prädentin (nicht mineralisiertes Kollagen), in das dann Apatit eingelagert wird.^[1] Im Inneren ist Dentin von parallelen Kanälen durchzogen, in denen Fortsätze der Odontoblasten verlaufen.^[64]

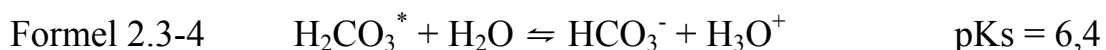
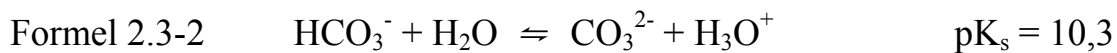
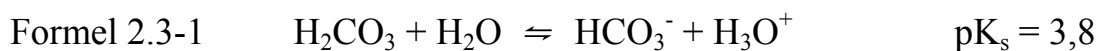
Durch die Ähnlichkeit zu Knochen können Osteoklasten das Dentin resorbieren, weshalb es nach außen durch den Zahnzement umschlossen und so geschützt ist. Der Zahnzement ist durch Bindegewebsfasern mit dem Knochen verbunden und sorgt somit für den festen Sitz des Zahns im Kiefer.

Der Zahnschmelz grenzt den Zahn oberhalb des Zahnfleischs nach außen hin ab. Er besteht aus Enamel, welches sich von Knochen und Dentin unterscheidet. Enamel besteht zu 97 % aus Apatit, 1,5 % organischen Bestandteilen (kein Kollagen) und 1,5 % Wasser. In der Übergangsschicht (Enameloid) von Enamel zu Dentin bilden die großen (ca. 100 µm · 50 nm · 50 nm) Apatitkristalle einen Verbund mit Kollagen. Durch Substitution des Hydroxids mit Fluorid an der Oberfläche des Zahnschmelzes, beispielsweise durch fluoridhaltige Zahnpasta, werden Härte und Säurebeständigkeit des Enamels erhöht. Die Bildung der Apatitkristalle im Enamel erfolgt unter strenger biologischer Kontrolle. Ameloblasten bilden erst eine Schmelzmatrix, welche zu 90 % aus dem Protein Amelogenin besteht. Diese organische Matrix wird anschließend fast vollständig durch Apatit ersetzt. So entstehen die langen Kristalle in paralleler Anordnung mit einer erstaunlich einheitlichen Form. Die Mineralisation des Schmelzes findet nur im Kiefer statt und ist mit dem Durchbruch abgeschlossen. Dies und

die Tatsache, dass im Enamel keine Zellen vorhanden sind, schließen einen zellulären Reparaturmechanismus aus. Im Mund kann jedoch ein angeätzter Zahn durch eine biologisch induzierte Mineralisation von Apatit aus Speichel repariert werden, da die Calcium- und Phosphatkonzentration hier sehr hoch ist.^[1]

2.3 Calciumcarbonat

Calciumcarbonat ist das Calciumsalz der Kohlensäure mit der Summenformel H_2CO_3 . Kohlensäure ist eine mittelstarke zweiprotonige Säure,^[69] deren Dissoziationsstufen die pK_s -Werte von 3,8 und 10,3 haben (Formel 2.3-1 und Formel 2.3-2).



Bezieht man nun die Reaktion zum Lösen von Kohlenstoffdioxid in Wasser mit ein (Formel 2.3-3), so erhöht sich der erste pK_s -Wert auf 6,4. Der Grund dafür ist, dass das Reaktionsgleichgewicht auf Seite der Edukte liegt. Für H_2CO_3^* in Formel 2.3-4 wird angenommen, dass sich das gesamte CO_2 zu Kohlensäure umgesetzt hat. Damit ist die effektive Säurekonstante definiert.^[70,71] Das Dissoziationsgleichgewicht von Kohlenstoffdioxid ist in Abbildung 2.3-1 gezeigt.^[72]

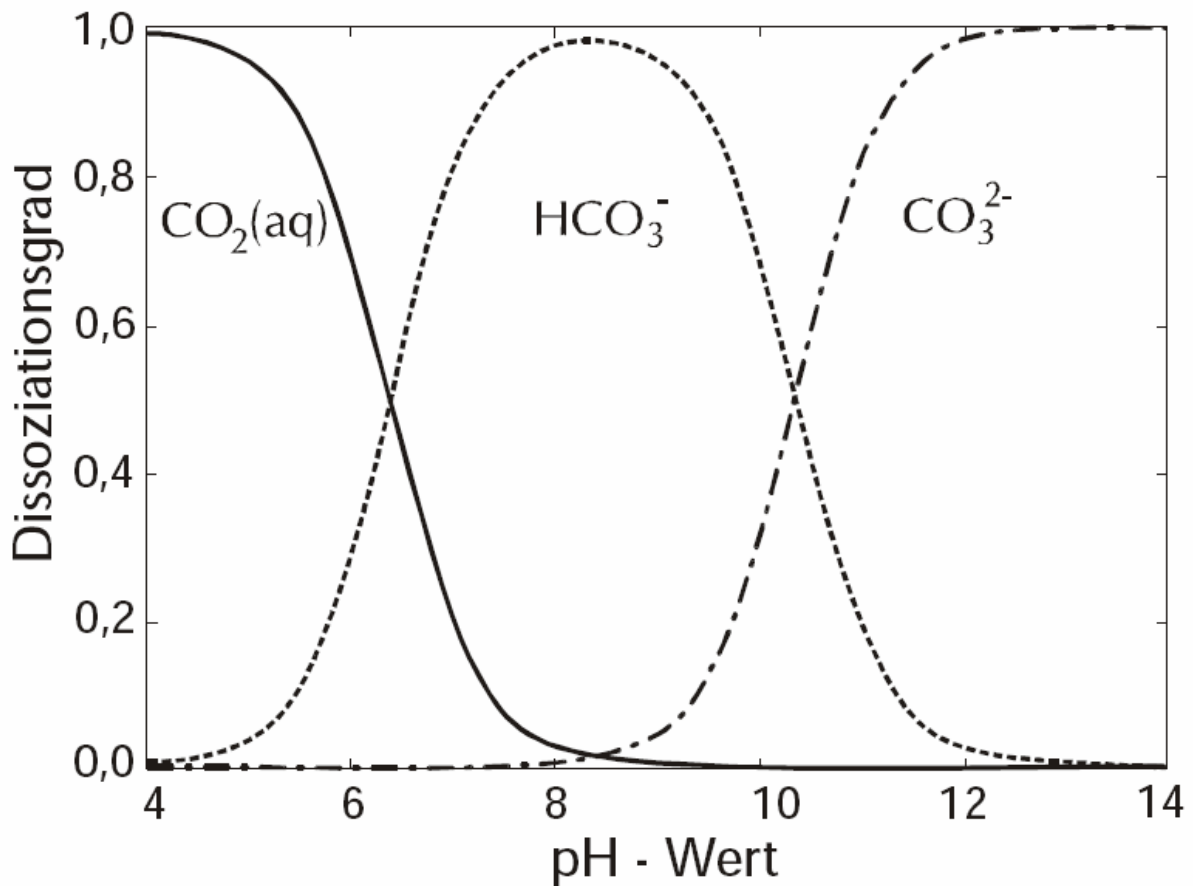


Abbildung 2.3-1: Dissoziationsgleichgewicht von Kohlenstoffdioxid in verdünnter wässriger Lösung bei 25 °C.^[72]

Tabelle 2.3-1: Übersicht der polymorphen und pseudopolymorphen Phasen des Calciumcarbonats.

Mineral	Calcit ^[73]	Aragonit ^[74,75]	Vaterit ^[76]	Monohydrocalcit ^[77]	Ikait ^[78]
Formel	CaCO ₃	CaCO ₃	CaCO ₃	CaCO ₃ ·H ₂ O	CaCO ₃ ·6 H ₂ O
Raumgruppe	$R \bar{3}c$ (167)	$Pmcn$ (62)	$P6_3/mmc$ (194)	$P3_1$ (144)	$C2/c$ (15)
Kristallsystem	trigonal	orthorhombisch	hexagonal	hexagonal	monoklin
Gitterkonstanten/ Å	a=b=4,991 c=17,062 γ=120°	a=4,959 b=7,964 c=5,738 α=β=γ=90°	a=b=4,130 c=8,490 γ=120°	a=b=10,5536 c=7,5446 γ=120°	a=8,792 b=8,312 c=11,021 β=110,53°
Dichte / g·cm ⁻³	2,71	2,93	2,65	2,43	1,83
Stabilität	stabilste Phase	stabil über 70 °C	metastabil unter 15 °C	Wasserabgabe ab 60-80 °C	stabil bei 0-4 °C
ICDD-Referenz	81-2027	76-0606	72-0506	83-1923	75-1733

Von Calciumcarbonat sind Calcit, Aragonit, Vaterit, Monohydrocalcit und Ikaite als polymorphe und pseudopolymorphe Phasen bekannt. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.3-1 gezeigt. Zusätzlich zu den Polymorphen muss auch amorphes Calciumcarbonat^[41,79-81] (ACC) als instabile Zwischenstufe genannt werden, welches bei der Fällung aus wässrigen Lösungen gebildet wird und sich schnell in Calcit und Vaterit umwandelt.^[82] Aus Vaterit entsteht dann durch Umkristallisation ebenfalls Calcit. Dabei ist die Bildung von Calcit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Bei höheren Temperaturen wird die Bildung des Calcits inhibiert und es bilden sich zuerst Aragonit und Vaterit. Letztendlich werden hier Aragonit und Vaterit ebenfalls wieder in Calcit umgewandelt. Thermodynamisch betrachtet ist Calcit das stabilste und Vaterit das instabilste wasserfreie Polymorph. Abbildung 2.3-2 zeigt REM-Aufnahmen der drei wasserfreien Polymorphe des Calciumcarbonats. Calcit bildet rhomboedrische, Aragonit nadelförmige und Vaterit plättchenförmige Kristalle. Die zugehörigen Kristallstrukturen sind in Abbildung 2.3-3 gezeigt. Ein wichtiger Unterschied zwischen amorphem Calciumcarbonat und den Polymorphen besteht in der besseren Löslichkeit des amorphen Calciumcarbonats (Tabelle 2.3-2), wobei die Löslichkeit größer wird, je instabiler das Polymorph ist.

Tabelle 2.3-2: Vergleich der Löslichkeitsprodukte und der Sättigungskonzentrationen der Calciumcarbonatphasen bei 25 °C.^[80,83]

Phase	Löslichkeits- produkt $\cdot 10^{-9} (\text{mol L}^{-1})^2$	Sättigungs- konzentration mmol L^{-1}
ACC	400	0,632
Vaterit	12	0,109
Aragonit	4,6	0,068
Calcit	3,3	0,057

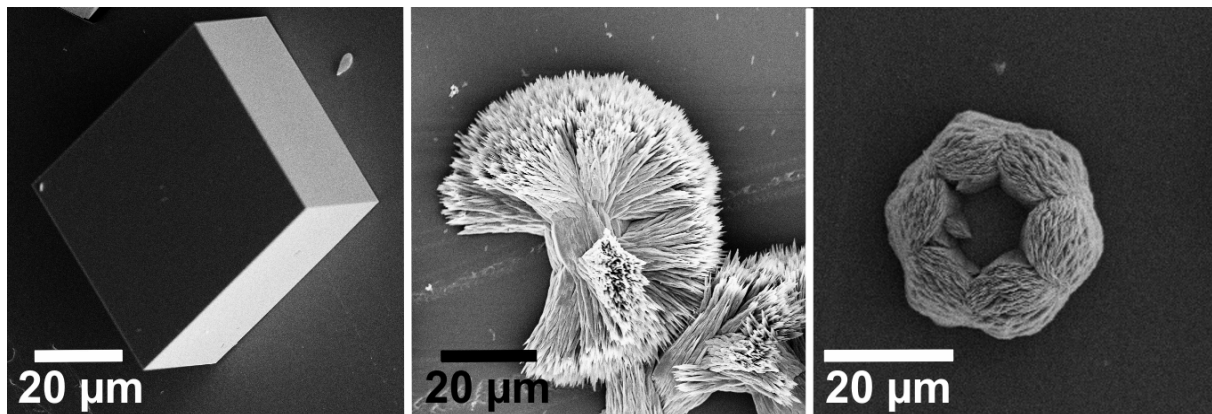


Abbildung 2.3-2: REM-Aufnahmen der drei wasserfreien Polymorphe des Calciumcarbonats. Links: rhomboedrischer Calcit; Mitte: nadelförmiger Aragonit; Rechts: plättchenförmiger Vaterit.^[29]

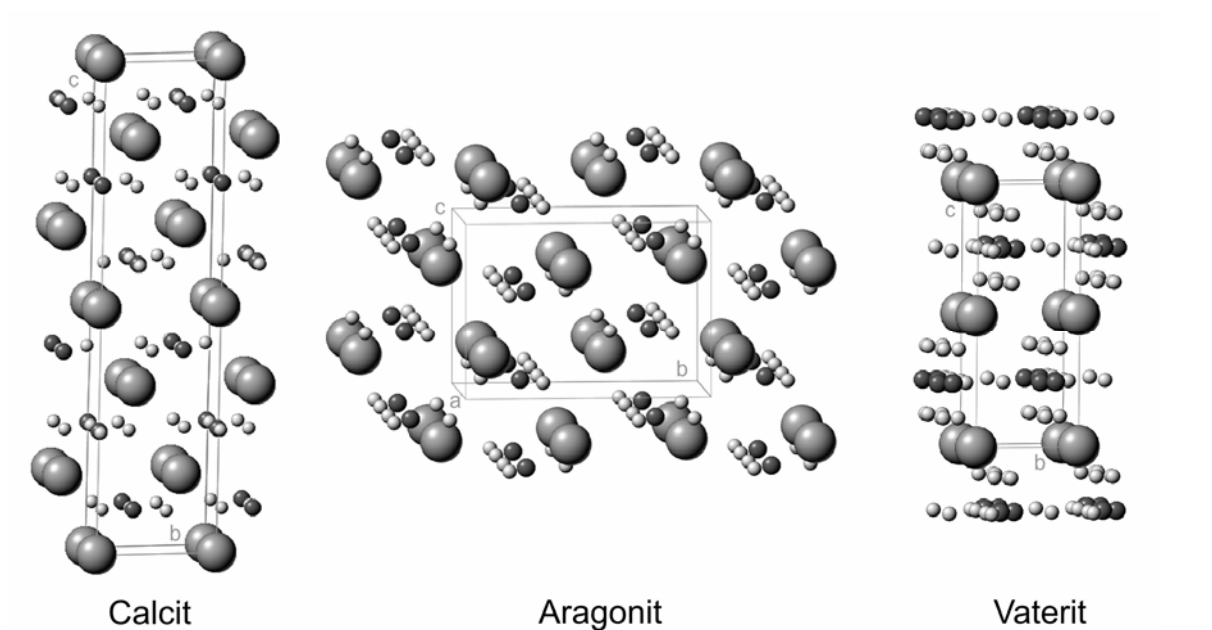


Abbildung 2.3-3: Schematische Darstellung der Kristallstrukturen von Calcit, Aragonit und Vaterit.^[29] Calcium: große graue Kugeln, Kohlenstoff: mittlere schwarze Kugeln, Sauerstoff: kleine weiße Kugeln.

Monohydrocalcit kann als Bodensediment in kalten Gewässern gefunden werden. Es beginnt mit der Abgabe des Wassers zwischen 60 und 80 °C. Ikaite wurde am Ika-Fjord vor Grönland entdeckt.^[84] Es wird unter anaeroben Bedingungen in 0 °C-kaltem Meerwasser gebildet, welches mit

Gletscherausläufern in Kontakt steht. Ikait wurde später auch in anderen Gebieten gefunden.^[85,86]

In der Natur ist Calciumcarbonat als Kalkstein, Kreide oder Marmor zu finden und kommt außerdem sehr häufig als Biomineral vor.^[12,22,38,87,88] Es ist in Wasser sehr schlecht löslich und kann so auch als Schale oder Panzer für im Wasser lebende Organismen dienen. Das leichter lösliche Calciumhydrogencarbonat ist für die Wasserhärte verantwortlich; dadurch ist die Verfügbarkeit für Organismen sichergestellt. Aufgrund der Übersättigung im Meerwasser wird es von marinen Organismen oft verwendet.

2.3.1 Exoskelett

Bei Lebewesen die ihre Stabilität nicht durch Knochen, also ein Endoskelett, erhalten, sondern durch eine mehr oder weniger feste Haut, spricht man von einem Exoskelett. Typische Beispiele sind die Haut von Arthropoden^[89] wie Insekten, Kieferklauenträgern und Krebstieren. Die Grundlage eines Exoskeletts bilden Fibrillen aus Chitin und Proteinen. Diese Fibrillen besitzen eine helikale Struktur.^[90] Sie bilden eine Matrix, in die ein Mineral (meist Calciumcarbonat) eingelagert werden kann. Das eingelagerte Mineral verbessert die Stabilität des Exoskeletts und verhindert auch einen Verlust von Feuchtigkeit.^[91] Es wird vermutet, dass der Schutz vor Austrocknung eine Voraussetzung für die Entwicklung von aquatischen zu terrestrischen Lebensräumen war. Der Schutz vor Fressfeinden kann ebenfalls eine Aufgabe des Exoskeletts sein. Meist kann ein Exoskelett nicht mit dem Lebewesen wachsen, so dass es von Zeit zu Zeit abgeworfen und neu aufgebaut werden muss. In diesem Fall spricht man von der Häutung.

Des Weiteren findet man Exoskelette bei Mollusken (Weichtieren) wie Schnecken oder Muscheln und bei Bryozoen (Moostierchen). Bei den Mollusken wird es aus Calciumcarbonat und Proteinen gebildet.

3. Methoden

3.1 Synchrotronstrahlung

In dieser Arbeit wurde Synchrotronstrahlung zur Untersuchung von Biomineralien verwendet. Synchrotronstrahlung wurde 1947 zum ersten Mal beobachtet.^[92-94] Sie ist eine elektromagnetische Wellenstrahlung und kann mit einer hohen Intensität in einem breiten Frequenzbereich (Abbildung 3.1-1) erzeugt werden. Dieser reicht von Infrarot- bis Röntgenstrahlung. Dieser breite Frequenzbereich bei hoher Intensität und eine hohe Brillanz sind die wichtigsten Vorteile der Synchrotronstrahlung.

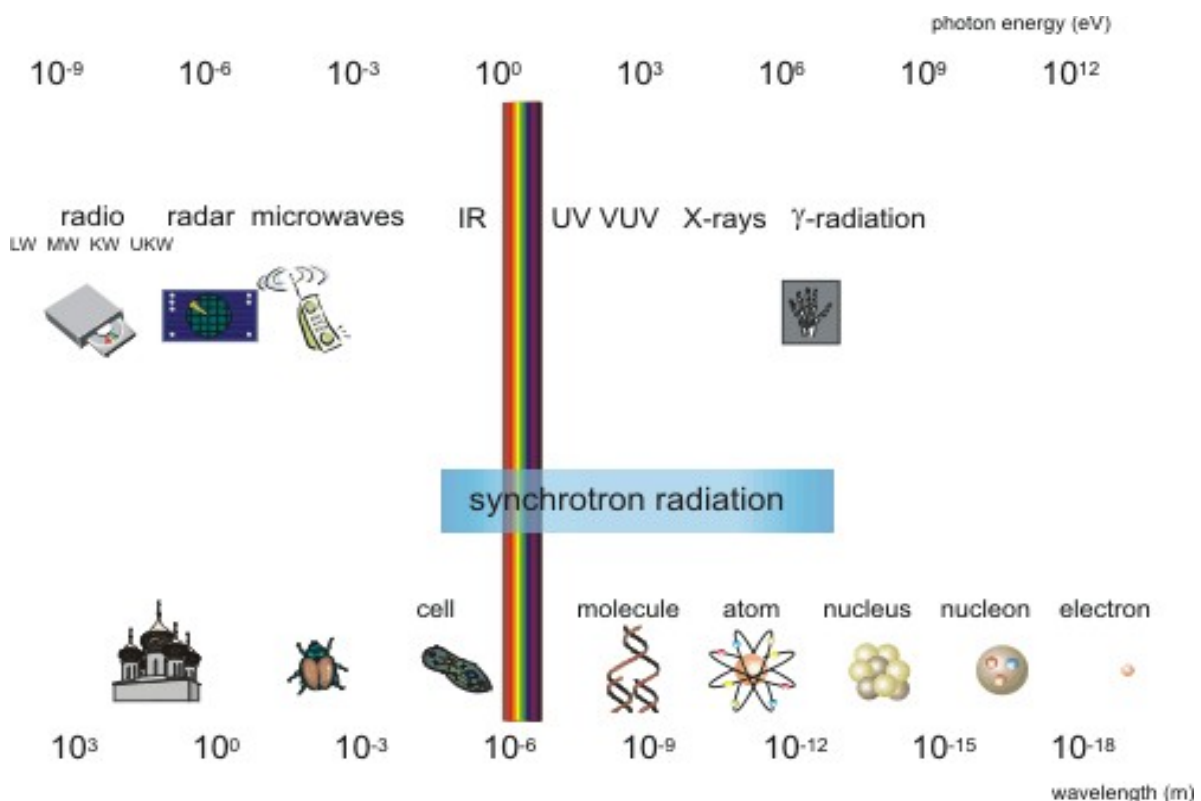


Abbildung 3.1-1: Elektromagnetisches Spektrum. Gezeigt sind hier die Wellenlänge (untere Skala) und die entsprechende Energie (obere Skala). Außerdem sind zum Vergleich mit der Wellenlänge entsprechende Gegenstände und Anwendungen für bestimmte Wellenlängen zu sehen. Auch der Bereich des sichtbaren Lichtes und der Synchrotronstrahlung sind markiert. (www.desy.de)

3.1.1 Entstehung von Synchrotronstrahlung

Alle elektrisch geladenen Teilchen, die positiv oder negativ beschleunigt werden, emittieren Strahlung. In einer Röntgenröhre werden beispielsweise Elektronen abgebremst und so Bremsstrahlung erzeugt. Ein Elektron, welches sich auf einer Kreisbahn bewegt (z. B. in Speicherringen), ändert zwar seine Geschwindigkeit nicht, aber ständig seine Richtung. Die Richtungsänderung stellt dabei eine Beschleunigung in eine andere Raumrichtung dar. Aus diesem Grund strahlt es permanent elektromagnetische Wellen ab. Bewegt sich das Elektron langsam auf dieser Kreisbahn, so strahlt es nach vorne und hinten gleichermaßen. Dabei entspricht die Frequenz der Strahlung (Dipolstrahlung; entdeckt von H. Hertz) der Umlauffrequenz des Elektrons. Bewegt sich das Elektron jedoch mit relativistischer Geschwindigkeit (also nahe der Lichtgeschwindigkeit), so ändert sich die Abstrahlungscharakteristik und die Strahlung ist stark nach vorne gerichtet (Abbildung 3.1-2). Um diesen Effekt zu

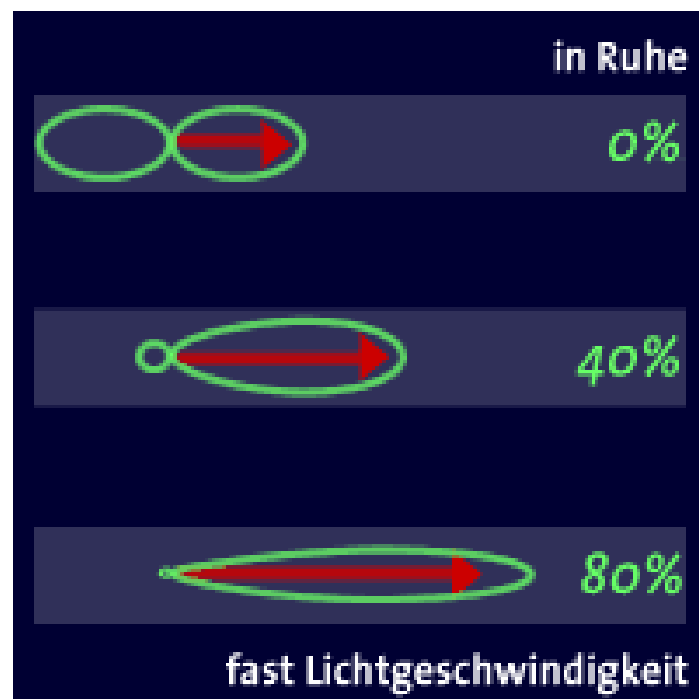


Abbildung 3.1-2: Darstellung der Strahlungskeule bei verschiedenen Geschwindigkeiten. (www.desy.de)

erklären, reicht die klassische Physik nicht aus. Nur zusammen mit der von Albert Einstein entwickelten speziellen Relativitätstheorie kann dieser erklärt werden. Je kleiner der Radius im Verhältnis zur Geschwindigkeit ist, desto größer wird die Intensität der Strahlung. Eine detaillierte Beschreibung der Synchrotronstrahlung findet sich in den Büchern von A. Hofmann^[95] und P. J. Duke^[96].

3.1.2 Das Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY)

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Synchrotronstrahlung wurden am HASYLAB durchgeführt, welches an das Forschungszentrum DESY angegliedert ist. Das DESY ist eines der weltweit führenden Beschleunigerzentren und Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft. Der Hauptstandort des DESY liegt in Hamburg-Bahrenfeld. Von der Gründung am 18. Dezember 1959 dauerte es vier Jahre, bis mit der Teilchenforschung am 1. Januar 1964 begonnen wurde. 1974 wurde der Doppelringspeicher DORIS fertig gestellt, in dem anfangs Kollisionsexperimente durchgeführt wurden. Heute dient DORIS III ausschließlich als Speicherring für die Forschung mit Photonen (d. h. Synchrotronstrahlung) und gehört zum HASYLAB. Im Laufe der Zeit wurden im DESY verschiedene weitere Beschleunigeranlagen, wie zum Beispiel HERA, PETRA oder FLASH aufgebaut. Die Forschungsschwerpunkte des DESY liegen in der Entwicklung, dem Bau und Betrieb von Teilchenbeschleunigern, sowie in der Teilchenphysik und in der Forschung mit Photonen.

Der Speicherring DORIS III, an dem Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, wird mit Positronen betrieben. Ihr Vorteil ist, dass diese eine längere Lebensdauer als Elektronen haben. Der Grund dafür liegt in der positiven Ladung von ionisierten Restmolekülen oder Partikeln. So werden sie von

Elektronen angezogen und führen dadurch häufiger zu Kollisionen als bei Positronen, von denen sie sich abstoßen. Zur Erzeugung der Positronen werden Elektronen im Linearbeschleuniger LINAC II auf 450 MeV beschleunigt und auf eine 7 mm dicke Wolframscheibe gelenkt. Dadurch entstehen Elektronen-Positronen-Paare, wovon die Positronen dann durch eine 1,8 T Spule und einer weiteren Beschleunigungsstrecke eingefangen und beschleunigt werden. Dem LINAC II folgt dann der Positronen-Intensitäts-Akkumulator (PIA), in dem die Positronen gesammelt werden, bevor sie in den Synchrotronring DESY II überführt und auf eine Geschwindigkeit nahe der Lichtgeschwindigkeit beschleunigt werden. Dabei müssen die Magnetfelder, die die Positronen auf einer Kreisbahn halten, entsprechend der zunehmenden Energie eingestellt (synchronisiert) werden. Die komplette Bahn der Positronen liegt in einem Röhrensystem. Um Verluste durch Stöße mit Gasteilchen zu verhindern, herrscht dort ein Ultrahochvakuum. Vom Synchrotronring werden die Positronen dann in den Speicherring (DORIS III) geleitet (Abbildung 3.1-3). Im Speicherring wird die Energie konstant gehalten und nicht weiter beschleunigt. In dieser Beschreibung sind nur Einrichtungen des DESY beschrieben, die für diese Arbeit relevant sind. Wie schon erwähnt, bietet das DESY eine Reihe weiterer Anlagen.

So genannte Wiggler und Undulatoren wurden in den DORIS Speicherring eingebaut, um eine Strahlung mit höherer Energie oder Intensität zu erhalten. In Wiggler und Undulatoren werden die Positronen durch eine lineare Folge von Dipolmagneten auf eine meist sinusförmige Bahn gelenkt. So wird Synchrotronstrahlung in Richtung der durchschnittlichen Bewegungsrichtung erzeugt. Im Wiggler erfolgt durch Magnete eine starke Auslenkung der Positronen. Durch die große Auslenkung entsteht eine hohe Photonenenergie. Des Weiteren können hier die Strahlungskeulen nicht miteinander interferieren, so dass ein relativ breites Spektrum entsteht. Bei Undulatoren ist die

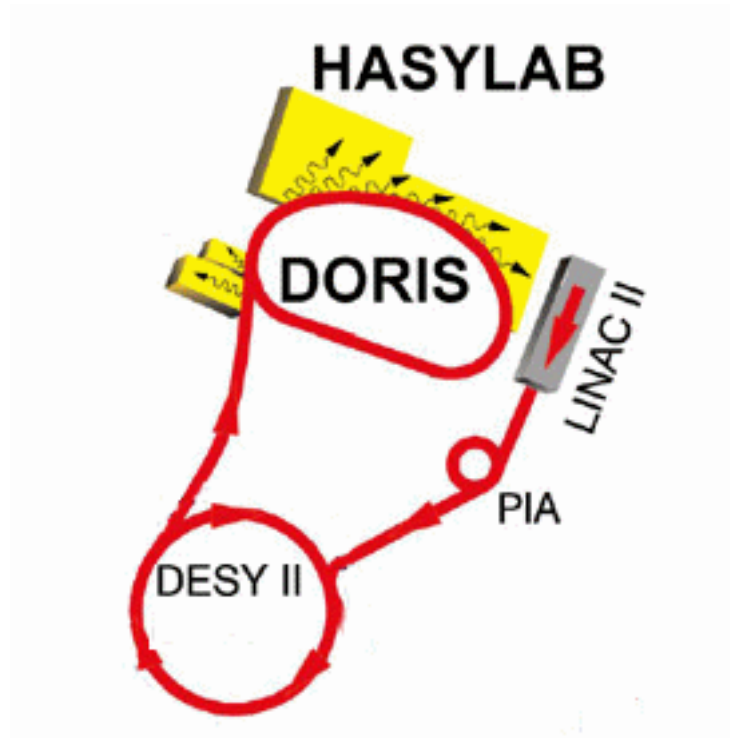


Abbildung 3.1-3: Schematischer Aufbau der Anlagen am DESY mit LINAC II, PIA, DESY II und DORIS. (www.desy.de)

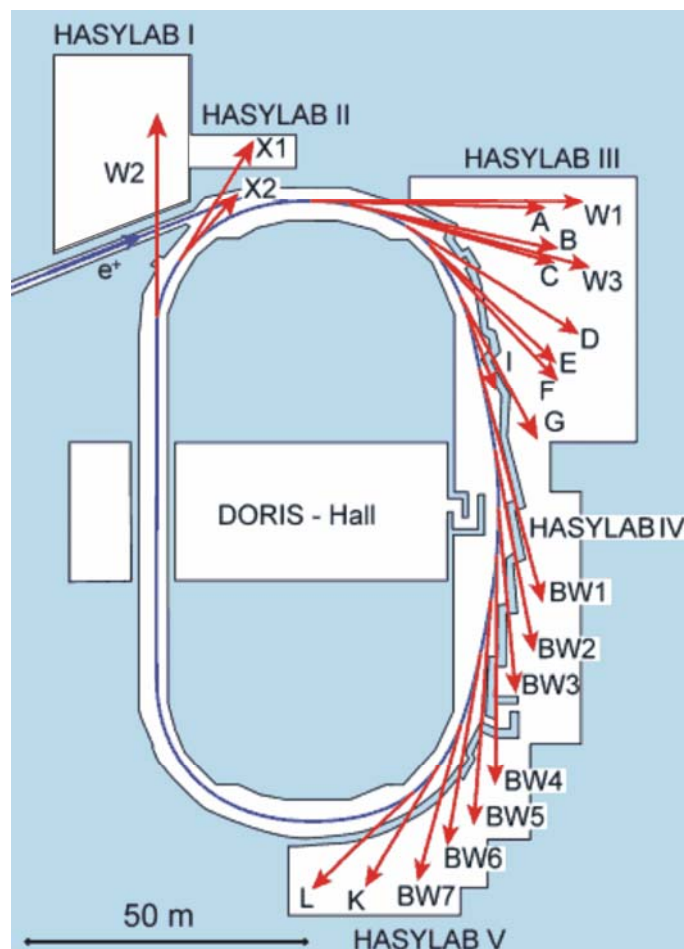


Abbildung 3.1-4: Schematischer Aufbau des DORIS III Speicherrings mit den Messplätzen. (www.HASYLAB.de)

Auslenkung gering. Das führt zu einer Interferenz der Strahlungskeulen und so zu einem scharfen Spektrum mit allerdings kleinerer Photonenenergie. Mehr Informationen zu Wiggler und Undulatoren finden sich in den Büchern von Wille^[97] und Jackson^[98].

Der Speicherring DORIS III hat einen Umfang von ~ 300 m, 42 Messplätze und wird heute mit Positronen einer Energie von 4,45 GeV betrieben (Abbildung 3.1-4). In ihm bewegen sich die Positronen in fünf Paketen (bunches). Dadurch ist die Strahlung gepulst. Die Dauer eines Pulses beträgt ~ 120 ps und der Abstand der Pulse ~ 193 ns. Während des Betriebs fällt die Ringspannung innerhalb von acht Stunden exponentiell von ~ 140 mA auf ~ 90 mA (Abbildung 3.1-5). Im Rhythmus von acht Stunden werden daher neue Positronen eingespeist.^[99]

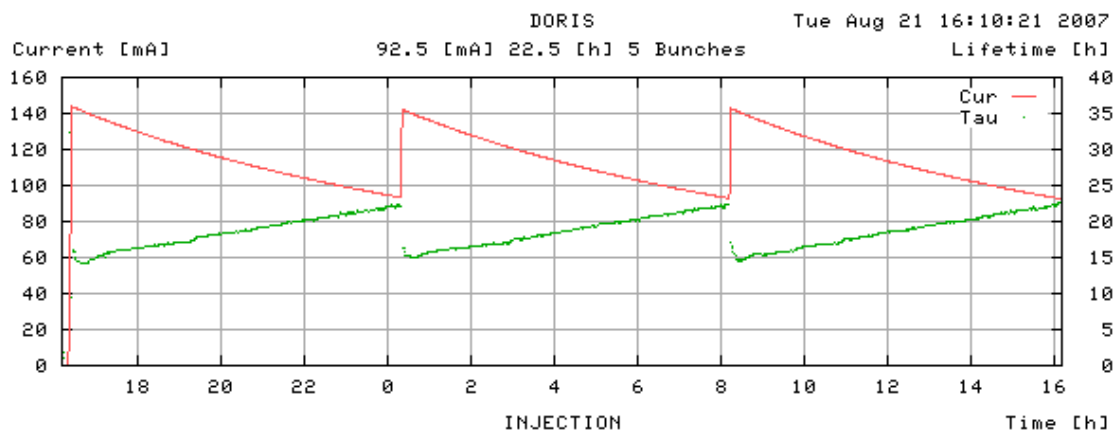


Abbildung 3.1-5: Typischer Verlauf des Ringstroms (rot) und der Positronenlebensdauer (grün) über einen Tag im DORIS Speicherring. Aufgenommen kurz vor einer neuen Injektion (Einspeisung neuer Positronen). ^(www.HASYLAB.de)

3.2 Hochauflösende Röntgenpulverdiffraktometrie am HASYLAB (DESY)

Röntgenpulverdiffraktometrie ist eine Beugungsmethode. Generell ist Beugung an kristallinen Stoffen mit Röntgen-, Elektronen-, Neutronen- und γ -Strahlung möglich, und man erhält so Informationen über die Struktur der Probe.

Röntgenstrahlen besitzen eine Wellenlänge in der Größenordnung der Netzebenenabstände in Kristallen. So kann die Röntgenstrahlung durch die Netzebenenscharen im Kristall dreidimensional gebeugt werden.

Formel 3.2-1
$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin(\Theta)$$

Dabei kommt es nur zu einer konstruktiven Interferenz (hier Reflex genannt), wenn der Abstand zwischen den parallelen Netzebenen (d_{hkl} ; wobei h, k, l die Lage der Netzebene im Raum beschreiben) mit dem Beugungswinkel (Θ) und der Wellenlänge (λ) die Bragg-Bedingungen (Formel 3.2-1) erfüllen.^[100] Der Faktor n darf dabei nur einen ganzzahligen Wert annehmen und stellt die Ordnung der Beugung dar. Für jede Kristallstruktur ergibt sich so ein charakteristisches Diffraktogramm. Misst man das Diffraktogramm eines Einkristalls, so liegen die Reflexe verteilt auf der Ewaldkugel. Die Punkte bilden bei der Messung eines Pulvers, in dem viele Kristallite statistisch verteilt sind, Beugungsringe. Diese Ringe können dann zweidimensional in einem Diffraktogramm dargestellt werden. Dabei wird die Intensität gegen den Beugungswinkel (in $^{\circ}2\Theta$) aufgetragen. Jeder Reflex gehört zu einer Netzebenenschar und wird in Diffraktogrammen zugeordnet (indiziert, mit Hilfe der Millerschen Indizes; h, k, l). Diffraktogramme sind für die unterschiedlichen Kristallstrukturen charakteristisch und können so zur Identifikation verwendet werden. Es ist außerdem möglich, bei einem Gemisch

aus verschiedenen Phasen, diese zu quantifizieren. Dazu verwendet man die Rietveldmethode.

Für eine quantitative Phasenanalyse wurden die Probe vor der Messung mit einem Quarz-Standard (SiO_2) im Verhältnis 5:1 (Probe:Quarz) gemischt und anschließend im Mörser zerrieben. Die Messungen erfolgten als Flachprobe auf einer Kaptonfolie in Transmissionsgeometrie bei Raumtemperatur an der Beamline B2 des DORIS III Speicherrings am HASYLAB (DESY). Als Detektor diente ein Image Plate Detector (OBI).^[101,102] Bei den Messzeiten wurden unterschiedliche Wellenlängen zwischen $\lambda = 0,47176 \text{ \AA}$ und $\lambda = 1,18344 \text{ \AA}$ verwendet.

3.2.1 Bestimmung der Partikelgröße nach Scherrer

Kleine Kristallite haben eine kleinere Anzahl von Netzebenen, die zur Beugung beitragen. Dadurch kommt es zu weniger destruktiven Interferenzen bei Winkeln nahe dem Bragg-Winkel und der Reflex wird breiter. Dieser Effekt ist durch die Scherrer-Gleichung^[100,103] beschrieben. In ihr wird der Zusammenhang zwischen der Halbwertsbreite (FWHM) des Reflexes $[\text{°}2\theta]$, der Wellenlänge, λ [\AA], der Kristallitgröße, D [\AA] und dem Beugungswinkel, Θ [$\text{°}\theta$] gezeigt. K ist dabei eine formabhängige Konstante die üblicherweise auf 1 gesetzt wird und 57,3 ein Umrechnungsfaktor von Radiant auf Winkelgrade.

$$\text{Formel 3.2.2} \quad \text{FWHM} = \frac{K \cdot \lambda \cdot 57,3}{D \cdot \cos(\Theta)}$$

3.2.2 Anwendung der Rietveldmethode

Die Rietveldmethode^[104-107] wurde in dieser Arbeit verwendet, um eine quantitative Phasenanalyse durchzuführen. Dazu wurden an den erhaltenen Diffraktogrammen mit Hilfe der FULLPROF Suite 2005^[108] Software eine Anpassung nach Le Bail durchgeführt.^[109] Für die Anpassung müssen die Raumgruppe sowie die ungefähren Abmessungen der Elementarzelle und die Kristallstruktur bekannt sein. Die Berechnung eines Diffraktogramms erfolgt auf der Grundlage einer Pseudo-Voigt-Funktion, die sich aus Anteilen (η) von Gauß- (Formel 3.2.2-1) und Lorentz-Funktion für jeden Reflex (Formel 3.2.2-2) zusammensetzt.

$$\text{Formel 3.2.2-1 } FWHM = \sqrt{U \cdot \tan^2(\Theta) + V \cdot \tan(\Theta) + W + \frac{Z}{\cos^2(\Theta)}}$$

$$\text{Formel 3.2.2-2 } FWHM = X \cdot \tan(\Theta) + \frac{Y}{\cos(\Theta)}$$

Die Variablen U , V , W , X und Y definieren die Halbwertsbreite (FWHM). Durch Verfeinerung dieser Parameter und des Gauß- und des Lorentzanteils (η) der Pseudo-Voigt-Funktion wird das Profil des Diffraktogramms angepasst. Anschließend werden die Strukturparameter (z. B. a , b und c) verfeinert. Mit diesen Informationen können die Phasenanteile von Quarz und Calcit quantitativ bestimmt werden. In der Literatur wurde die Genauigkeit der Methode untersucht. Sie ist grundsätzlich sehr hoch,^[110] nimmt jedoch bei schlechtem Signal-zu-Rauschverhältnis stark ab. Da am HASYLAB bedingt durch die Eigenschaften der Synchrotronstrahlung ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht wird, wurden die Messungen für diese Arbeit dort durchgeführt. Weitere Ungenauigkeiten entstehen durch den biologischen Ursprung der Proben. Biomineralien sind oft sehr klein oder haben eine bevorzugte Orientierung, wobei diese nicht nur durch eine Verlängerung einer

kristallographischen Achse entstehen sondern beispielsweise durch Agglomeration oder strukturelle Verzerrungen durch eingebaute Biomoleküle. Da die Rietveldmethode keine Ansätze für diese speziellen Veränderungen bietet wird der Fehler dieser Methode hier auf $\pm 5\%$ (relativ) geschätzt.

3.2.3 Anwendung der Methode nach Goldsmith

Durch die Methode nach Goldsmith^[111] kann der Substitutionsgrad des Calciums durch Magnesium im Calcit bestimmt werden. Als Grundlage dient eine Kalibrations-Messreihe (Tabelle 3.2.3-1), in der der Gehalt von Magnesiumcarbonat im Calcit in den Proben bekannt ist. Von diesen Proben wurden dann die Gitterkonstanten a und c bestimmt. Zusätzlich wurde auch der Magnesiumgehalt mit der Position des Reflexes der Netzebenenschar (104) verglichen. Dabei wird die Zelle erwartungsgemäß mit steigendem Magnesiumgehalt kleiner, da Magnesium kleiner als Calcium ist.

Tabelle 3.2.3-1: Messreihe von Goldsmith et al. ^[111]

Sample	MgCO ₃ [mol%]	c [Å]	a [Å]	$d(104)$ [Å]
G-680	4,94	16,9510	4,9676	3,0196
G-698	9,89	16,8520	4,9428	3,0018
G-696	14,83	16,7350	4,9216	2,9854
G-672	19,78	16,6360	4,9022	2,9712
Calcit	0,00	17,0640	4,9899	3,0359

Die Einheit „mol%“ ist hier definiert durch:

$$\text{Formel 3.2.3-1} \quad x(\text{MgCO}_3) = \frac{[\text{MgCO}_3]}{[\text{MgCO}_3] + [\text{CaCO}_3]} \cdot 100\%$$

Betrachtet man die graphische Auftragung der Daten (Abbildung 3.2.3-1 bis 3), so sieht man einen linearen Zusammenhang. Durch lineare Regression der Daten erhält man drei Geradengleichungen, durch die der Magnesiumgehalt, $x(\text{MgCO}_3)$ (in mol%) im Calcit bestimmt werden kann. Aus diesen drei Werten wird anschließend der Mittelwert gebildet.

Für die Elementarzellenlänge a in Å gilt:

Formel 3.2.3-2 $x(\text{MgCO}_3) = -223 \cdot a + 1112$ aus Abbildung 3.2.3-1

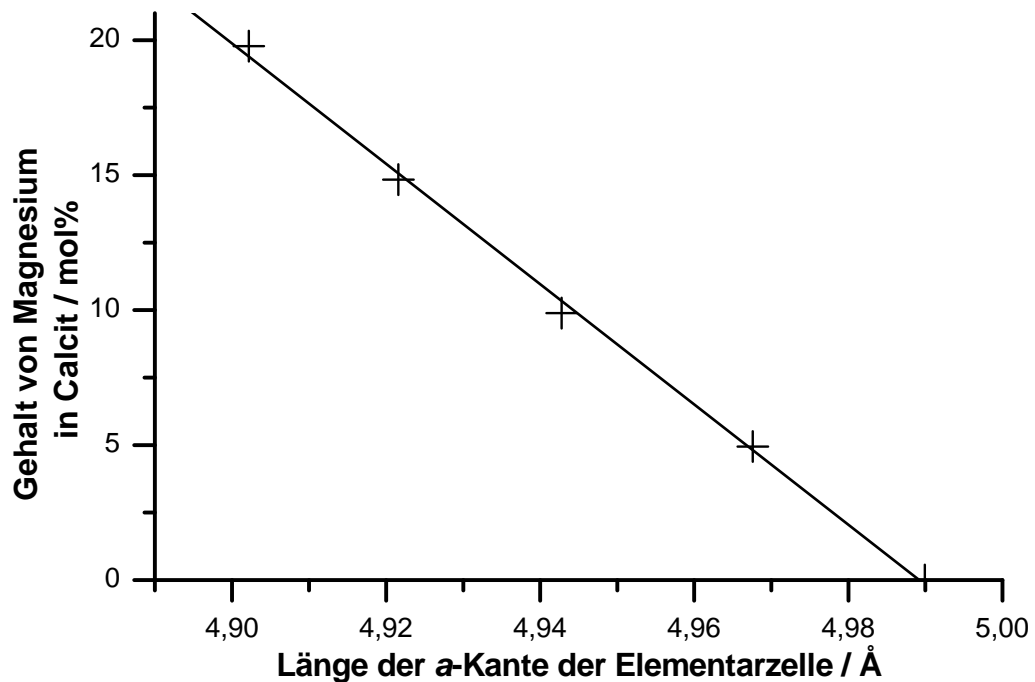


Abbildung 3.2.3-1: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Magnesium und der Elementarzellenlänge a .

Für die Elementarzellenlänge c in Å gilt:

Formel 3.2.3-3 $x(\text{MgCO}_3) = -46 \cdot c + 787$ aus Abbildung 3.2.3-2

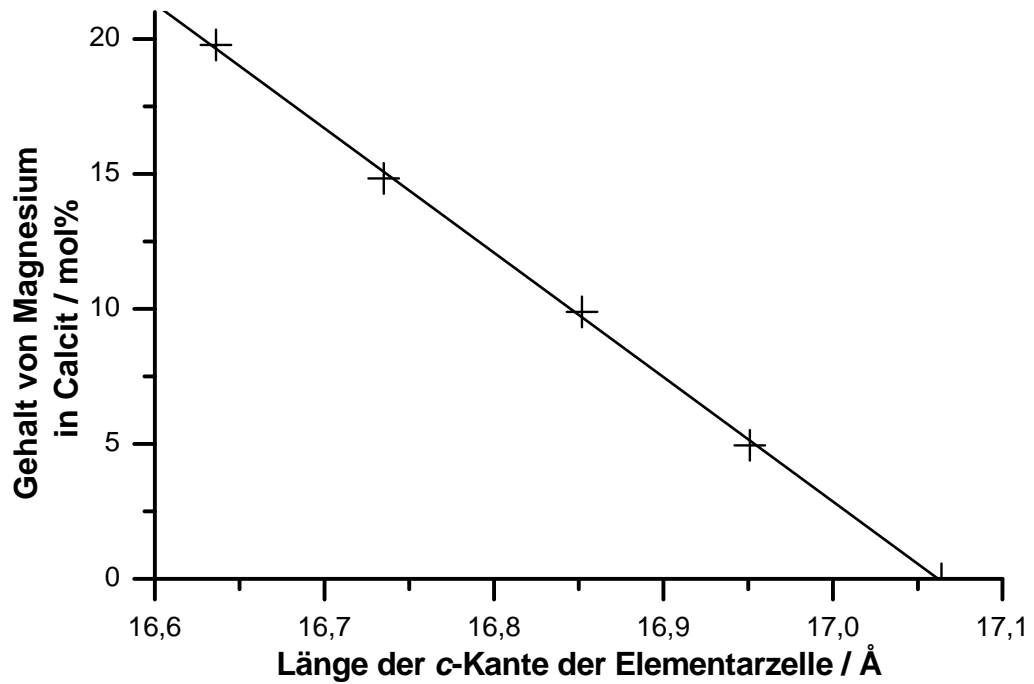


Abbildung 3.2.3-2: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Magnesium und der Elementarzellenlänge c .

Für die Position des (104)-Reflexes d in Å gilt:

Formel 3.2.3-4 $x(\text{MgCO}_3) = -302 \cdot d + 916$ aus Abbildung 3.2.3-3

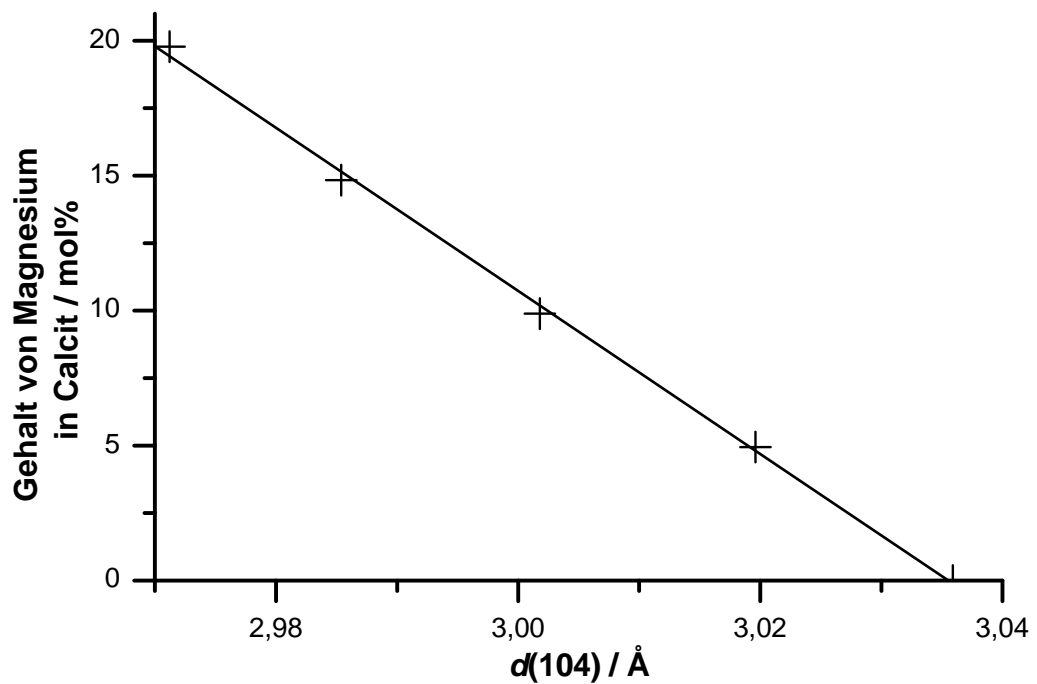


Abbildung 3.2.3-3: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Magnesium und der Position des (104)-Reflexes von Calcit.

3.3 Mikrocomputertomographie am HASYLAB (DESY)

Computertomographie ist allgemein durch die diagnostische Anwendung in der Medizin bekannt. Sie gehört zu den sogenannten bildgebenden Verfahren. Entwickelt wurde sie von A. M. Cormack und G. Hounsfield, die 1979 dafür den Nobelpreis in Medizin erhielten. Durch die Computertomographie ist es möglich, dreidimensionale Rekonstruktionen aus zweidimensionalen Röntgenaufnahmen (Projektionen) zu erstellen. Ein großer Vorteil der Computertomographie ist die Tatsache, dass das Objekt für die Messung nicht präpariert werden muss. So können auch keine Präparationsartefakte entstehen. Nach der Messung können dann virtuelle Schnitte in den 3D-Datensätzen gemacht werden.^[112]

3.3.1 Experimenteller Aufbau

Die auf Synchrotronstrahlung basierende Mikrocomputertomographie (SR μ CT) wird am HASYLAB (DESY) seit 2002 an den Beamlines BW2 und W2 des DORIS III Speicherrings vom GKSS Forschungszentrum Geesthacht durchgeführt (Abbildung 3.1-4). Je nach Zusammensetzung der Probe wird die Energie gewählt, bei der die Tomogramme den besten Kontrast zeigen. Dazu stehen die Beamlines BW2 mit einem Energiebereich von 8 bis 24 keV und W2 (20 bis 200 keV) zur Verfügung. Neben der Energie unterscheiden sich auch die Strahlgröße (BW2: 10 mm \cdot 3,5 mm; W2: 65 mm \cdot 8 mm) und die Auflösung (BW2: >2 μ m; W2: >3 μ m). Der apparative Aufbau ist an beiden Beamlines gleich (Abbildung 3.3.1-1). Die Probe wird für die Messung auf einen Metallstab geklebt und dieser dann in den Probenhalter eingeschraubt. Mit ihm kann die Probe in alle drei Raumrichtungen bewegt und um sich selbst gedreht werden. Dabei wird die Bewegung in x- und y-Richtung nur zum Justieren der Probe benötigt. Ist die Probenhöhe größer als die Strahlhöhe (BW2: 3,5 mm; W2: 8 mm), so muss die Probe in mehreren Höhenstufen gemessen werden.

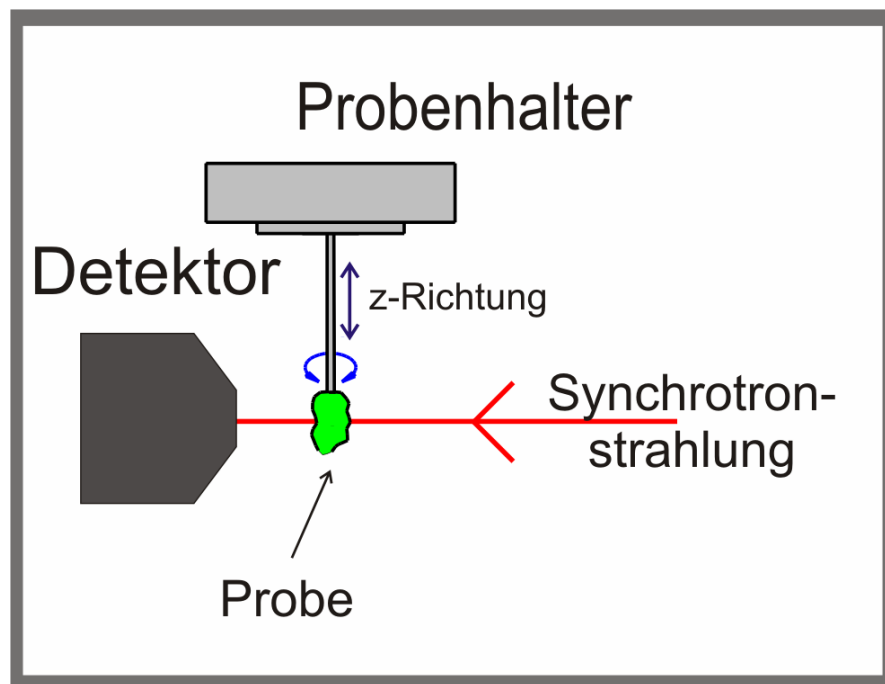


Abbildung 3.3.1-1: Schematischer Aufbau der Absorptionskontrast-Mikrocomputertomographie

Dazu wird ein Versatz in z-Richtung durchgeführt. Während der Messung einer Höhenstufe wird die Probe in Schritten von $0,250^\circ$ von 0° bis 180° gedreht und bei jedem Winkel mit dem Detektor ein Röntgenbild aufgenommen. Nachdem der Röntgenstrahl durch die Probe abgeschwächt wurde, trifft dieser am Detektor auf einen Fluoreszenzschirm. Dort werden die Röntgenstrahlen in sichtbares Licht umgewandelt (Abbildung 3.3.1-2). Über optische Spiegel wird der Strahl dann um den Strahlfänger gelenkt, der die CCD Kamera vor den Röntgenstrahlen schützt. Bevor die Kamera (KX2; Apogee Instruments; 14-bit

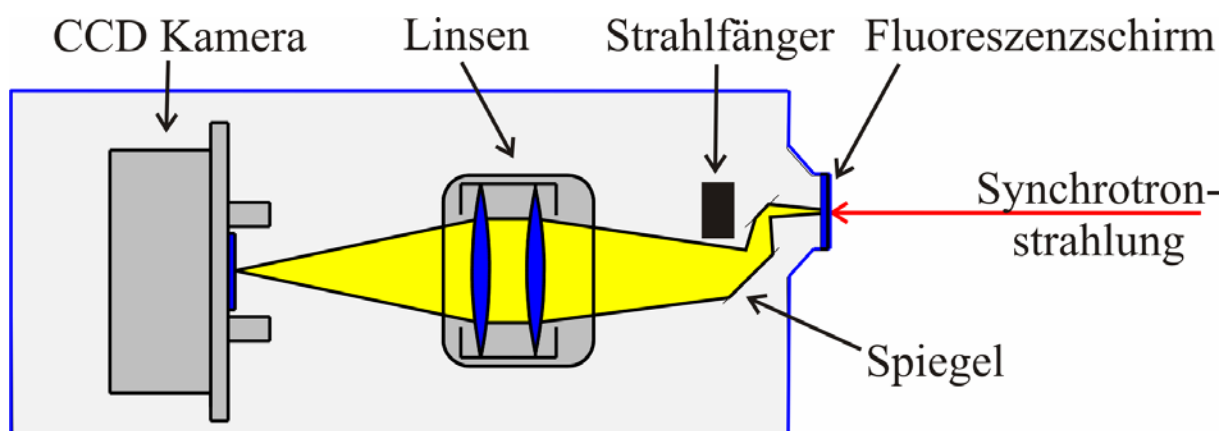


Abbildung 3.3.1-2: Aufbau des Röntgendetektors

Digitalisierung bei 1,25 MHz Ausleserate, 1536·1024 Pixel; Pixelgröße 9·9 μm^2) das Bild aufnimmt, wird es noch durch ein Linsensystem vergrößert. Während der Messung wird nach je acht Bildern eine Aufnahme des Hintergrundes (Referenzbild) gemacht.

3.3.2 Projektionen und Rekonstruktion

Der Wechselwirkungsmechanismus bei der Absorptionstomographie, also die Abschwächung der Röntgenstrahlen durch die Probe, wird beschrieben durch das Lambert-Beersche Gesetz:

Formel 3.3.2-1
$$I = I_0 \cdot e^{(-\mu \cdot d)}$$

Dabei sind I_0 die Intensität des einfallenden Röntgenstrahls, I die Intensität des abgeschwächten Röntgenstrahls und μ der lineare Schwächungskoeffizient einer homogenen Probe der Dicke d . Da in der Praxis keine homogenen Proben vorliegen, muss der lineare Schwächungskoeffizient als Integral über die Absorptionsstrecke dargestellt und Formel 3.3.1 modifiziert werden. Hier gehen bei der zweidimensionalen Röntgenaufnahme die Tiefeninformationen verloren.

Formel 3.3.2-2
$$I = I_0 \cdot e^{\left(-\int \mu(s) \cdot ds\right)}$$

Der Integral stellt die Projektion (p) im mathematischen Sinne dar.

Formel 3.3.2-3
$$p = \int \mu(s) \cdot ds$$

Es kann die Projektion also wie folgt ermittelt werden.

Formel 3.3.2-4
$$p = \ln \frac{I_0}{I}$$

Um die verloren gegangenen Informationen zurück zu gewinnen, wird eine Rückprojektion der gefilterten Projektion genutzt. Dazu wurde der BKFIL-Algorithmus der RECLBL-Bibliothek verwendet.^[113] Dieser Vorgang soll nun beispielhaft erklärt werden. Zur Vereinfachung wird der Ablauf an einer Schicht der Probe erklärt, da der Ablauf für alle Schichten gleich ist. Die Projektionsdaten einer Schichthöhe werden durch eine Zeile der CCD-Kamera aufgenommen. Der dreidimensionale Datensatz setzt sich aus allen rekonstruierten Schichten zusammen. Wie bereits beschrieben, werden Aufnahmen von 0° bis 180° aufgenommen. Abbildung 3.3.2-1 zeigt beispielhaft die Entstehung der Projektionen. Die Diagramme zeigen Projektionen für die Winkel $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ und 180° (von rechts nach links). Für die Rekonstruktion einer Einzelschicht werden zunächst die Projektionen dieser Schicht für alle Winkel in einem zweidimensionalen Datensatz, dem Sinogramm, zusammengesetzt (Abbildung 3.3.2-2). Zur Ermittlung des Rotationszentrums, das als Eingabeparameter für die Rekonstruktion benötigt wird, wurde ein neu entwickelter Optimierungsalgorithmus verwendet.^[99] Hat man das Rotationszentrum ermittelt, so kann die Rückprojektion durchgeführt werden. Damit gewinnt man die durch die Aufnahme verloren gegangene dritte Dimension. Dazu werden die berechneten Grauwerte bei den entsprechenden Winkeln zurück auf die Position der Probe projiziert (virtuell). In Abbildung 3.3.2-3 ist die Rückprojektion schematisch gezeigt. Im ersten Bild wird nur ein Winkel ($n=1$; $\theta=0^\circ$) projiziert (von rechts nach links). Im zweiten Bild sind es schon zwei Winkel ($n=2$; $\theta=0^\circ$ und 90°). Projiziert wird wieder entsprechend

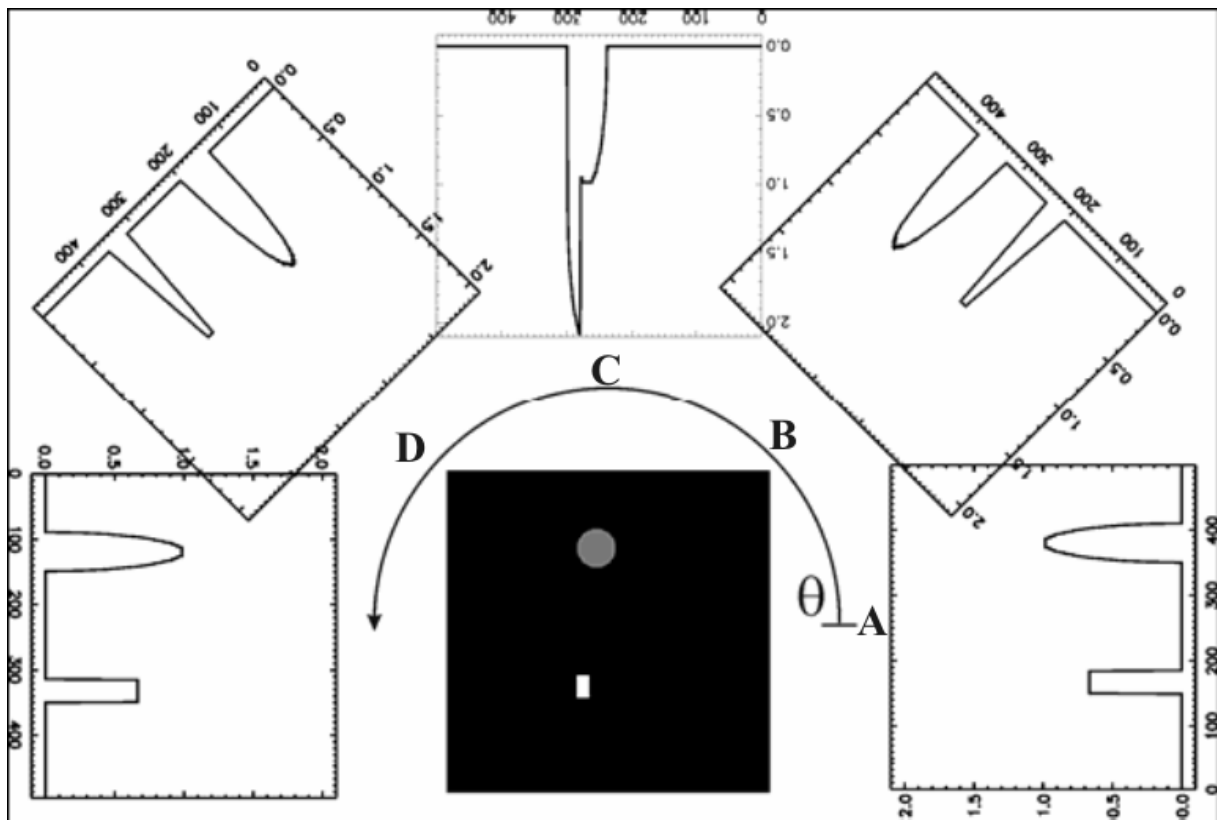


Abbildung 3.3.2-1: Darstellung der eindimensionalen Projektion einer zweidimensionalen Schicht für verschiedene Winkelpositionen. (T.Donath)

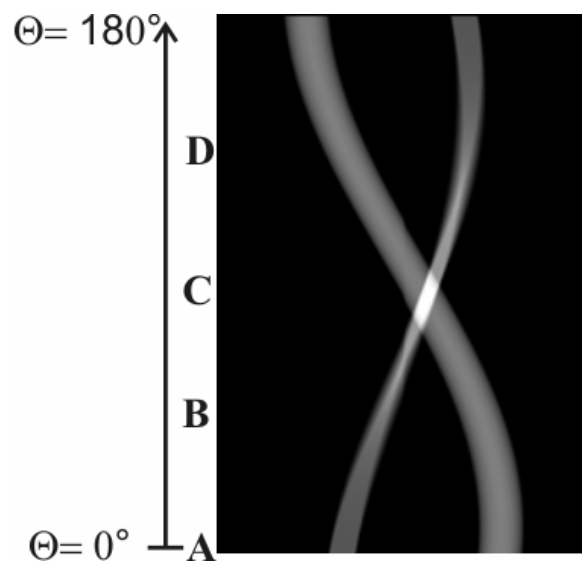


Abbildung 3.3.2-2: Sinogramm der Einzelschicht. (T.Donath)

des Winkels von rechts nach links für $\theta = 0^\circ$ und von oben nach unten für $\theta = 90^\circ$. Durch die Projektion der Daten von weiteren Winkeln ($n = 4, 10, 50$ und 500) erhöht sich die Qualität der Aufnahme. Die einzeln rekonstruierten Schichten der Probe werden anschließend zu einem dreidimensionalen Datensatz zusammengesetzt. So werden die dreidimensionalen Datenpunkte, genannt Voxel, gebildet.

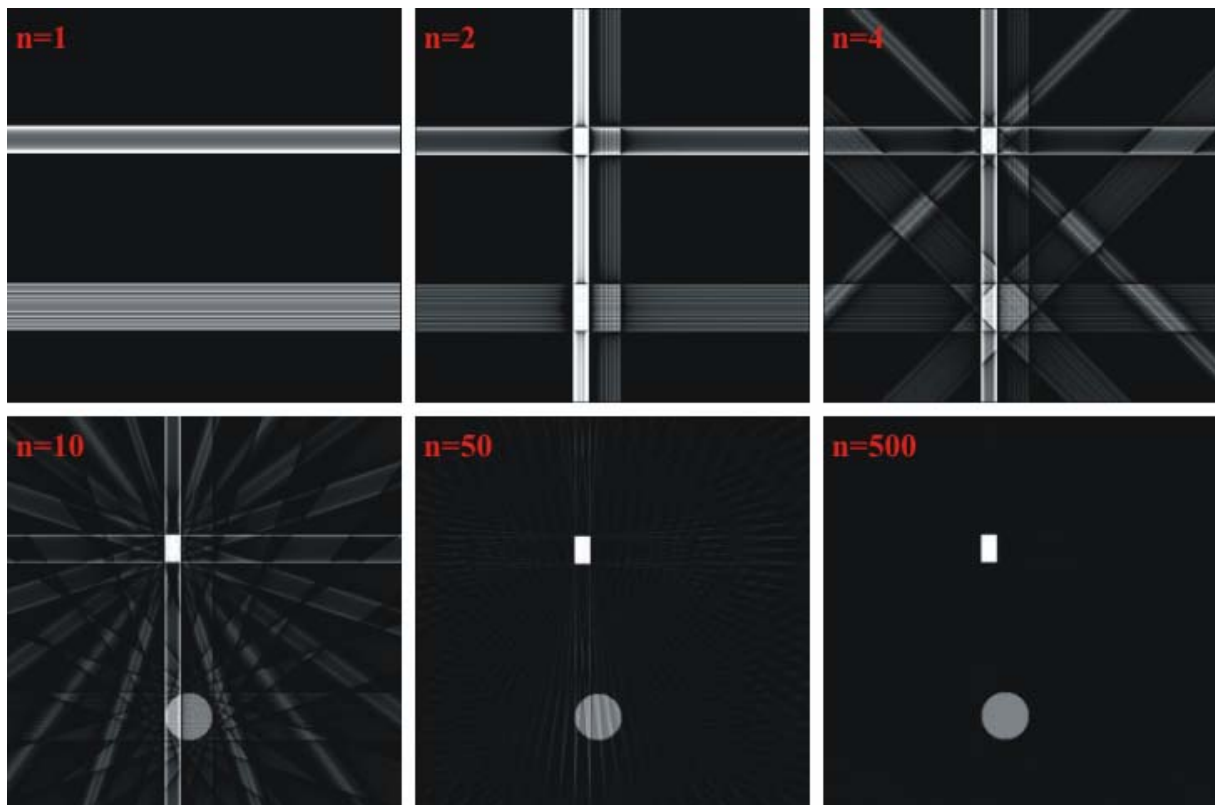


Abbildung 3.3.2-3: Rückprojektion für die einzelnen Winkel. Mit steigender Anzahl der Winkel (n) wird die Schärfe der Aufnahme verbessert. ^(T.Donath)

3.3.3 Auswertung und Darstellung

Die abschließende Auswertung und Darstellung der dreidimensionalen Daten wurde mit dem Programm VG Studio MAX 1.2. durchgeführt.^[114,115]

Eine wichtige Größe, die noch benötigt wird, ist die Kantenlänge der Voxel (l in μm), die wie folgt berechnet wird.

Formel 3.3.3-1

$$l = \frac{\tau \cdot B}{M}$$

Für die Berechnung werden die Kantenlänge eines Pixels der CCD-Kamera ($\tau = 9 \mu\text{m}$), die Vergrößerung durch das Linsensystem (M) und der Binningfaktor (B) benötigt. Das so genannte Binning beschreibt einen Vorgang, der verwendet wird, um das Arbeiten mit den zum Teil sehr großen Datensätzen zu vereinfachen oder sogar erst zu ermöglichen. Bei einem Faktor von zwei werden $2 \cdot 2 \cdot 2$ Datenpunkte (Voxel) zu einem zusammengefügt. Abbildung 3.3.3-1 zeigt diesen Vorgang in zweidimensionaler Form. Für einen Binningfaktor von drei gilt dementsprechend, dass $3 \cdot 3 \cdot 3$ Datenpunkte (Voxel) zu einem zusammengefügt werden.

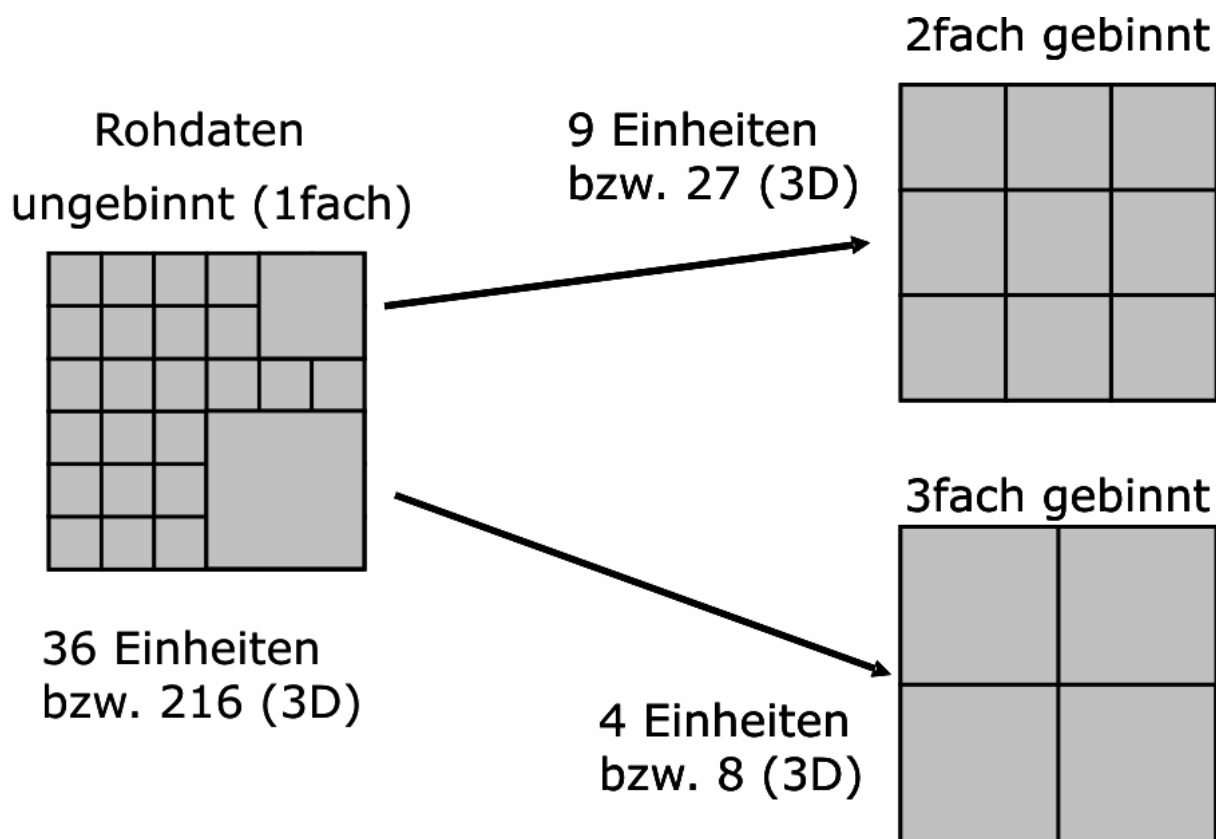


Abbildung 3.3.3-1: Graphische Beschreibung des Binningfaktors.

3.3.4 Fixierung in Epoxidharz

Ist das zu untersuchende Objekt nicht starr, so muss es fixiert werden, damit es sich während der Messung nicht bewegen kann. Vorbereitend wurde ein Zebrabärbling sowie ein gesunder und ein deformierter Medaka durch eine Wasser/Ethanol-Reihe entwässert. Dazu wurde die Probe bei 4 °C für je 30 min in Ethanollösungen mit Konzentrationen von 30 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 % und 100 % (zweimal) eingelegt. Um das zum Einbetten verwendete Epoxidharz vorzubereiten, wurden 24 g Agar 100 epoxy resin (äquivalent zu Epon 12), 22 g DDSA (Härter), 6 g MNA (Härter) und 1,5 g BDMA (Beschleuniger) gemischt und bei -20 °C gelagert. Die Probe wurde nach dem Entwässern in eine Reihe von Epoxidharz in Ethanol gegeben: 60 min (4 °C) in 50 % (zweimal), 60 min (4 °C) in 80 %, 6 h (4 °C) in 80 %, 6 h (25 °C) in 100 % und 2 d (60 °C) in 100 % zur Polymerisation.

3.4 *Environmental scanning electron microscopy* (ESEM)

Bei der *Environmental scanning electron microscopy* können auch Proben vermessen werden, die den elektrischen Strom nicht leiten. Das heisst, dass die Proben nicht bedampft werden müssen. Im Vergleich zur klassischen Elektronenmikroskopie sind auch die Anforderungen an das Vakuum nicht so hoch. Die Messungen wurden an einem FEI Quanta 400 FEG (5 kV; ohne Bedampfen) durchgeführt.

3.5 Thermogravimetrie (TG)

Die thermogravimetrische Analyse gehört allgemein in die Gruppe der Thermischen Analyse, bei der die Veränderungen eines Stoffes als Funktion der Temperatur verfolgt werden. Bei der TG wird eine Probe erhitzt und währenddessen die Masse gemessen. So können mehrere Zersetzungs- oder Oxidationsvorgänge in einer Messung quantifiziert werden. Sie sind als Stufen

in einem Thermogramm zu sehen. Neben dem Temperaturprogramm kann noch die Atmosphäre eingestellt werden. Diese kann oxidativ (durch z. B. Sauerstoff), inert (z. B. Stickstoff oder Argon) oder reduktiv (z. B. Formiergas= N₂/H₂) wirken.

Die thermogravimetrische Analyse wurde mit einer Thermowaage STA 409 PC der Firma Netzsch durchgeführt. Für die Ergebnisse dieser Methode wird ein Fehler von 0,5 Gew.-% angenommen.^[116]

3.6 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Bei der Atomabsorptionsspektroskopie wird die zu messende Probe (beispielsweise durch ein Zerstäuber/Brennsystem) in die einzelnen Atome gespalten. Anschließend wird die Absorption bei bestimmten Wellenlängen gemessen.

Calcium- und Magnesiumgehalte von Proben wurden für diese Arbeit durch Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie an einem Unicam 939 Gerät bestimmt. Die Differenz einer Doppelbestimmung lag typischerweise bei 0,2 Gew.-%.

3.7 Proteinaseverdau

Vor dem Erstellen der ESEM-Aufnahmen vom Zebraabärbling wurde das Skelett eines Fisches durch einen Proteinaseverdau des Weichgewebes extrahiert. Dies erfolgte durch Platzierung des Fisches bei 55 °C in eine Lösung aus 200 mM NaCl, 100 mM tris-HCl-Puffer, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0.2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) und 100 µg ml⁻¹ Proteinase K (Fa. Roth) bei pH 8,0. Nach 12 h wurde der Fisch mit VE-Wasser gewaschen.

4. Ergebnisse

4.1 Calciumphosphat

4.1.1 Untersuchung des Skelettes und der Zähne des Zebraärbblings

(*Danio rerio*)^[117,118]

Der Zebraärbbling oder auch Zebrafisch genannt (in Anlehnung an den englischen Namen *zebrafish*), mit dem wissenschaftlichen



Namen *Danio rerio* **Abbildung 4.1.1-1:** Bild eines Zebraärbblings. (www.wikipedia.de)

(früher *Brachydanio rerio*), gehört in die Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Sie ist mit 1400 Arten die größte Familie unter den Fischen. Zebraärblinge werden etwa fünf bis sechs Zentimeter lang und leben in Südostasien. Sie wurden 1822 das erste Mal beschrieben.

Während der letzten Jahre wurde der Zebraärbbling eines der am meisten untersuchten Labortiere. Die kurze Generationszeit,^[119] die Transparenz der Embryonen und die einfache Mutagenese sind Eigenschaften, die ideal für experimentelle Studien sind. Die meisten Untersuchungen wurden auf genomischer Ebene durchgeführt.^[120-124] Sein Genom wurde bereits fast komplett entschlüsselt und seit dem permanent aktualisiert (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish). Auf Grund von gemeinsamen Vorfahren in der Evolution haben Menschen und Fische viele Gemeinsamkeiten in der Entwicklung.^[125] So wurde der Zebraärbbling ein Modellorganismus für

die Untersuchungen zu genetischen und umweltbedingten Einflüssen in der Krebsforschung,^[126,127] Nephrologie^[128] und Oralbiologie,^[129,130] um nur einige zu nennen. Der Zebrabärbling bildet das gleiche Skelett- und Muskelgewebe wie höhere Wirbeltiere (z. B. *Homo sapiens*). Auch die Bildung der Knochen sowie deren Aufbau ist vergleichbar.^[121,131] Fu-Zhai Cui und Xiu-Mei Wang haben in einer Studie das Potential des Zebrabärblings für die Biomineralisation sowie Knochenkrankheiten aufgezeigt.^[132] An den durch das Boneremodeling ständig veränderten Knochen, könnten altersbedingte Veränderungen der Mineralisation untersucht werden.^[133-135] Durch andere Experimente könnte die Osteoporose weiter erforscht werden.^[119,136] Dazu sind die Wirbelkörper besonders geeignet.^[121,137-140]

Wie alle Arten der Cyprinidae hat auch der Zebrabärbling keine Zähne in der Mundhöhle, dafür allerdings im Schlund (Pharynx). Diese Zähne sind verbunden mit dem hinteren branchialen Bogen (Schlundkiefer) und werden permanent nach einem bestimmten Schema ersetzt.^[141] Auf jeder Seite der Kieferknochen befinden sich drei Zahnreihen, mit fünf (ventral), vier (dorsal) und drei oder vier (Mitte) Zähnen.^[142] Auch bei den Zähnen ist die grundlegende Morphologie vergleichbar mit denen der meisten Wirbeltiere. Die Krone besteht aus einer dünnen Lage Enamel, während Dentin die Pulpa umgibt, welche Odontoblasten und andere Zellen enthält.^[143] Die Wurzel ist über Kollagenfasern mit dem Knochen verbunden. Da diese Zähne über die gesamte Lebensspanne permanent ersetzt werden, ist der Zebrabärbling ein guter Modellorganismus, um die Zahnentwicklung und Mineralisation von Enamel und Dentin zu untersuchen.^[130,141,144,145]

Als Basis für weiterführende Untersuchungen wurde die grundsätzliche Morphologie des Skelettes und der Schlundzähne des Zebrabärblings untersucht.^[117] Die Kombination von Polarisations-Licht-Mikroskopie (PLM), Rasterelektronenmikroskopie (REM), energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) und Synchrotronstrahlungs-Mikrocomputertomographie (SR μ CT)

ermöglichten einen Einblick in die Abläufe der Biomineralisation, dort wo sie im Organismus stattfinden.

Für die Untersuchungen wurden adulte Zebrabärblinge (*Danio rerio*; Wildtyp vom Stamm AB) vom *Zebrafish International Resource Center* (Ref. No. P40 RR12546) verwendet. Die SR μ CT Aufnahmen wurden bei einer Energie von 19 keV erstellt. Dabei mussten auf Grund der Länge des Fisches (2,9 cm) elf Höhenstufen aufgenommen werden. Die Voxelkantenlänge nach der Rekonstruktion betrug 7 μ m.

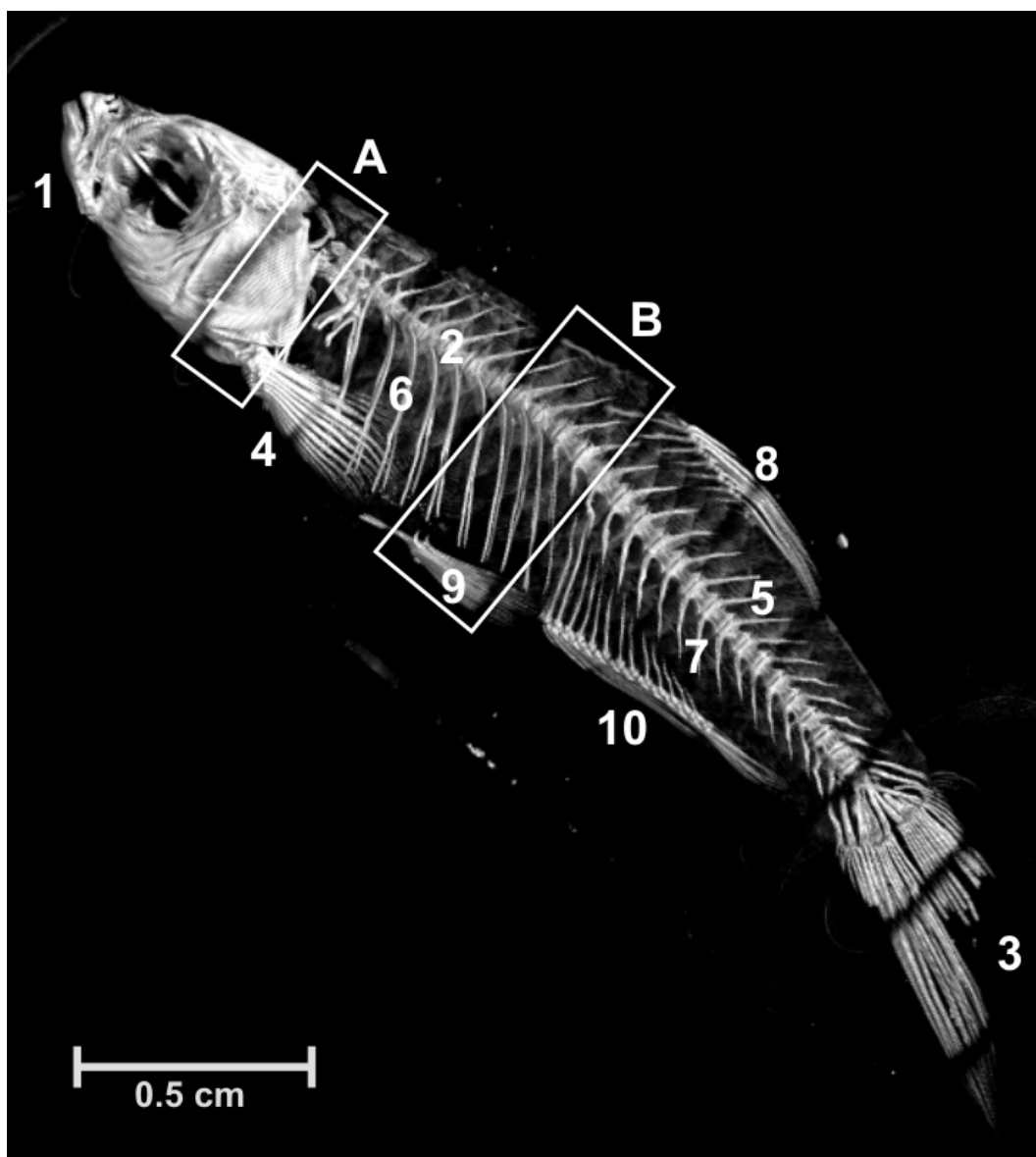


Abbildung 4.1.1-2: SR μ CT Aufnahme eines Zebrabärblings.

Abbildung 4.1.1-2 zeigt einen Überblick des Skelettes vom Zebrabärbling. Man sieht dort den Schädel (1), die Wirbelsäule (2) und die Schwanzflosse (3). Die Brustflosse (4) ist am Schädel befestigt. Während die Neuralbögen (5) an allen Wirbeln zu finden sind, sind die Rippen (6) nur an den präkaudalen (vorderen) und die Hämalbögen (7) nur an den kaudalen Wirbeln zu finden. Der präkaudale Bereich reicht vom Schädel bis zum Beginn der Rückenflosse (8). Die folgenden Wirbel gehören zum kaudalen Bereich. Zusätzlich sind noch die Bauchflosse (9) und die Analflosse (10) zu sehen, welche wie die Rückenflosse nicht direkt durch Knochen oder Gelenke mit der Wirbelsäule verbunden sind. Zwei Teile des Skeletts werden nun genauer beschrieben. Der erste ist ein Teil vom Schädel (A) und der zweite ein Stück der Wirbelsäule (B).

Im hinteren Teil des Schädels befinden sich die Kieferknochen mit den Zähnen (Abbildung 4.1.1-3). Man sieht die Anordnung der Zähne in verschiedenen Reihen sowie die Abnahme der Länge von vorne nach hinten. Die Anordnung der Zähne ist hier horizontal und nicht wie beim Menschen vertikal. Zudem haben Menschen unterschiedliche Zähne (Schneide-, Eck- und Backenzähne). Deshalb wird vermutet, dass sich die Funktion der Schlundzähne des Zebrabärblings von humanen Zähnen unterscheidet. Abbildung 4.1.1-4 zeigt vergleichend eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kieferknochen mit Zähnen.

Der Bereich B in Abbildung 4.1.1-2 beinhaltet drei Wirbel in ihrer natürlichen Anordnung. Abbildung 4.1.1-5 zeigt eine Vergrößerung dieses Abschnitts. Die Wirbelkörper, die daran befestigten Rippen und der Wirbelkanal sind klar zu erkennen. Außerdem sind Teile der Haut zu sehen. Abbildung 4.1.1-6 zeigt vergleichend eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Rippen-Wirbelverbindung.

Allgemein kann gesagt werden, dass die Rasterelektronenmikroskopie eine höhere Auflösung zeigt. Sie hat jedoch zwei Nachteile gegenüber der SR μ CT. Zum einen ist sie eine Methode, mit der nur Oberflächen untersucht werden können, wenn sie nicht mit zusätzlichen Funktionen wie beispielweise dem *focused ion beam* (FIB) ausgesetzt ist. Der zweite Nachteil ist die Tatsache, dass eine Präparation der Probe notwendig ist. Dabei können Präparationsartefakte entstehen, die die Probe verändern. Die SR μ CT ist dagegen eine zerstörungsfreie Methode, bei der die Probe lediglich fixiert werden muss. Da in der Regel nur kleine Proben mit SR μ CT untersucht werden, hat diese Untersuchung gezeigt, dass auch größere (genauer längere) Objekte mit dieser Methode untersucht werden können. Für weitere Anwendungen an Proben der gleichen Größe muss eine größere Überlappung der Höhenstufen verwendet werden, damit keine Messartefakte (wie z. B. die Ringe in Abbildung 4.1.1-2 an den Grenzen der Höhenstufen) entstehen.



Abbildung 4.1.1-3: Frontaler Blick auf den Schädelabschnitt A in Richtung Schwanz (SR μ CT). (rechts: Vergrößerung eines Kieferknochens).

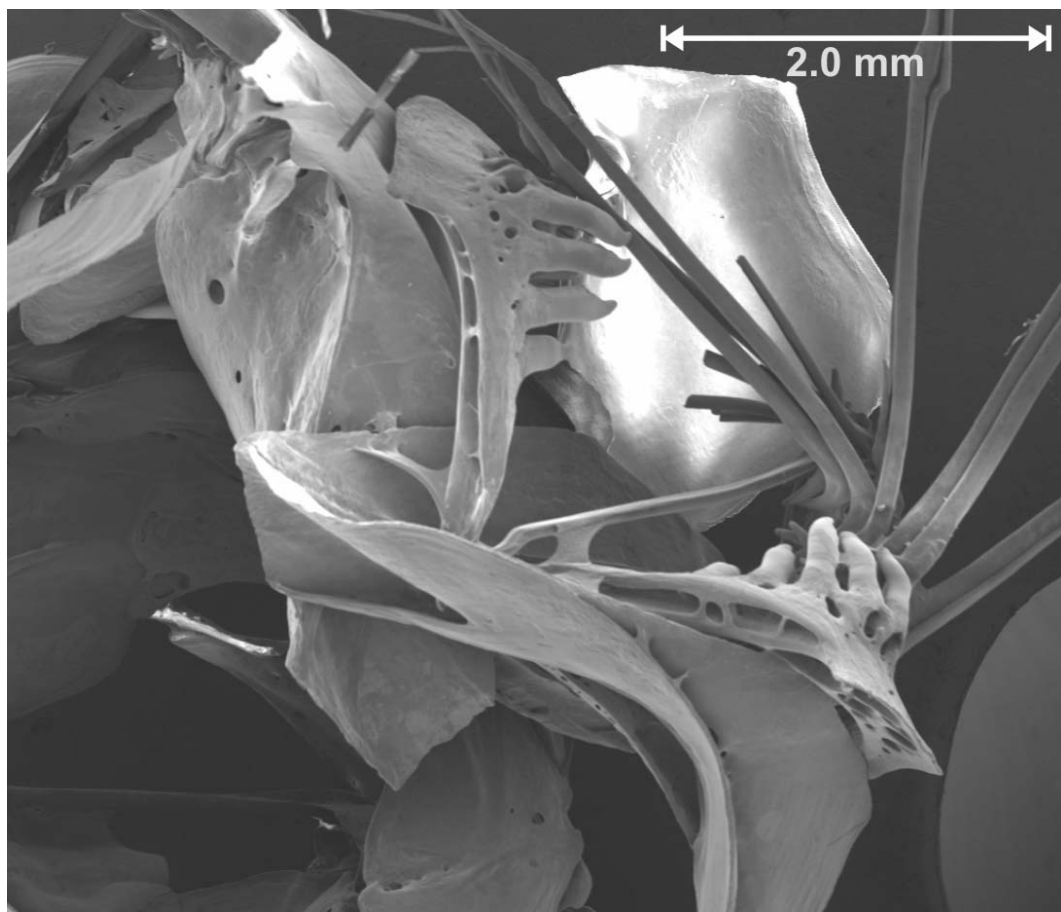


Abbildung 4.1.1-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kieferknochen mit Zähnen.

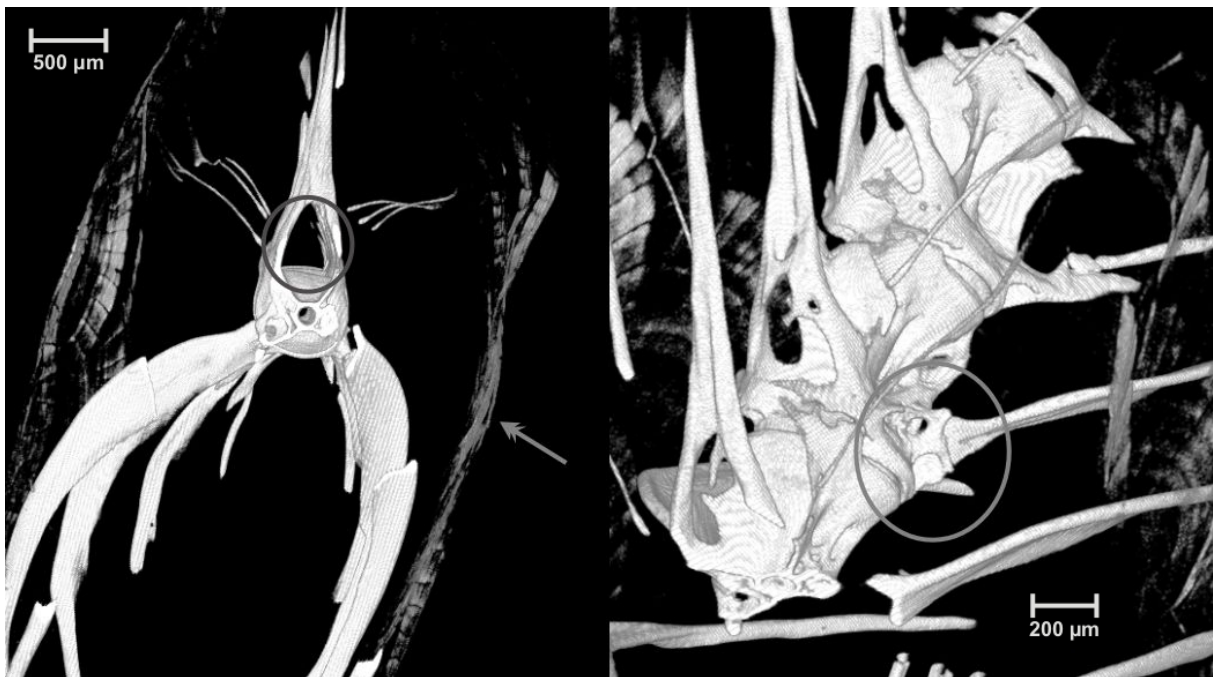


Abbildung 4.1.1-5: Vergrößerung (SR μ CT) eines Segmentes der Wirbelsäule mit drei Wirbelkörpern (B). Auf dem linken Bild sind der Wirbelkanal (Kreis) und der mineralisierte Teil der Haut (Pfeil) zu sehen. Das rechte Bild zeigt eine Verbindung zwischen Wirbel und Rippen (Kreis).

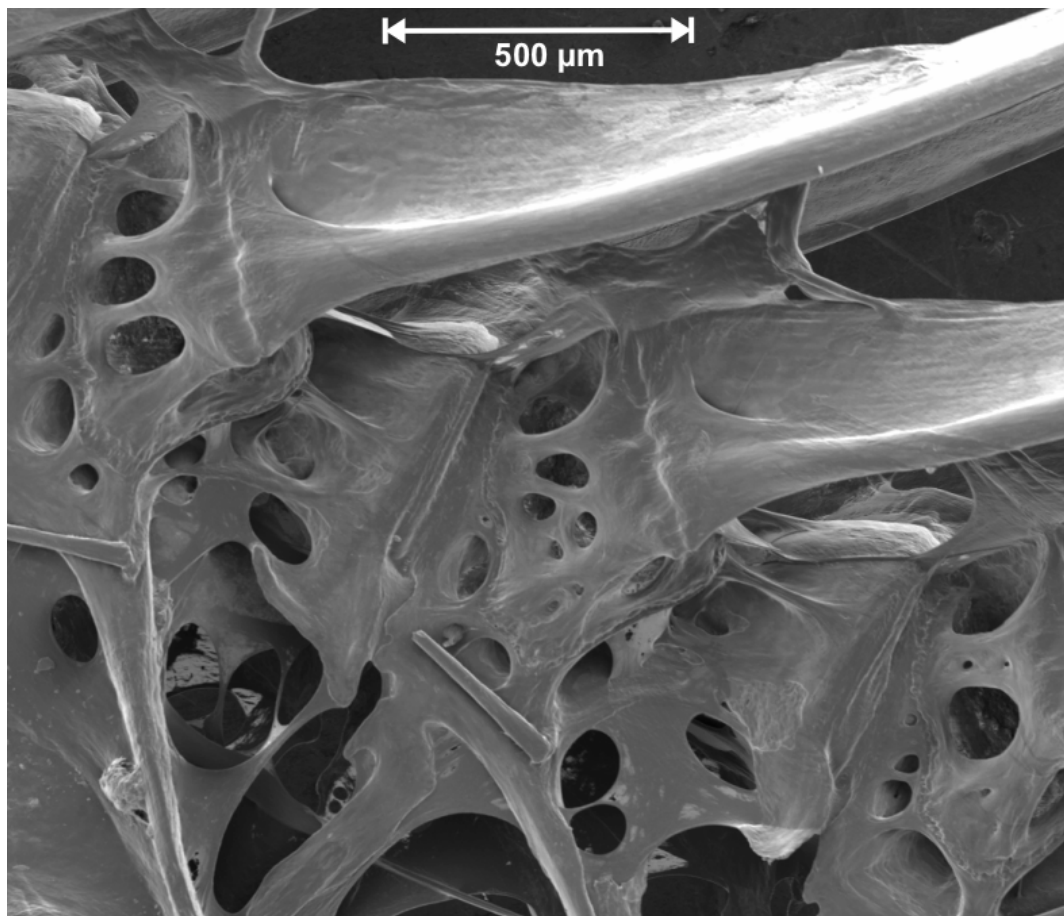


Abbildung 4.1.1-6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Rippen-Wirbel-Verbindung.

4.1.2 Untersuchung des Skelettes eines gesunden und eines deformierten Medaka (*Oryzias latipes*)^[146]

Der Medaka (*Oryzias latipes*) heißt auch Japanischer Reiskärpfling und gehört in die Ordnung der Hornhechtartigen (Beloniformes). Er ist wie der Zebraärbliing ein hervorragender Modelorganismus für die Knochenentwicklung. Eine stetig anwachsende Zahl an Publikati-



Abbildung 4.1.2-1: Bild eines Medaka.
(www.wikipedia.de)

onen zeigt, dass die genetischen und zellulären Mechanismen zwischen dem Medaka und höheren Wirbeltieren hoch konserviert sind.^[147-149] Medaka kann somit zur Untersuchung von beispielsweise menschlichen Knochendeformierungen wie idiopathischer Skoliose (eine Verkrümmung der Wirbelsäule) genutzt werden.^[150] Um den Medaka als *in vivo* Model für genetische Studien bei Knochenkrankheiten zu verwenden, ist es nötig, eine zerstörungsfreie Methode zu finden, die auch bei ausgewachsenen Medakas angewendet werden kann. Um die Ossifikation von embryonalen Fischen zu untersuchen, wurden schon viele Methoden angewendet,^[151] was unter anderem *in vivo* Färbemethoden mit Calcein und Alizarincomplexon, histologische Färbung mit Alizarinrot^[133,149,152,153] und klassische Färbung mit anschließender Stereomikroskopie einschließt.^[154,155]

Mit diesen Methoden konnte keine ausreichende räumliche Auflösung erreicht werden,^[156-158] so dass auch hier die SR μ CT angewendet wurde. Diese Methode hatte sich bei der Untersuchung des Zebraärbliings (*Danio rerio*) bereits bewährt.^[117]

Gorman et al. untersuchten in einer Studie bereits Knochendeformationen bei Guppys (*Poecilia reticulata*) und fanden einen Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und der Deformation.^[150,159]

Für die Untersuchungen wurden Medaka (Wildtyp) des Carbio (*Carolina Biological Supplies*) Stamms verwendet. Sie stammten aus dem Labor von Prof. Schartl (Universität Würzburg) und wurden seit mehreren Generationen an der RWTH Aachen gezüchtet (Prof. Görlich). Weniger als 1 % der Nachkommen zeigen nicht tödliche Deformationen. Als Grund für die idiopathischen Deformationen werden unbekannte genetische Veränderungen vermutet, wobei aber nicht-genetische Gründe nicht ausgeschlossen werden können.^[150] Es wurden je ein gesunder und ein deformierter Medaka ausgewählt. Die SR μ CT Aufnahmen wurden bei einer Energie von 19 keV erstellt. Dabei mussten auf Grund der Größe der Objekte 13 Höhenstufen beim gesunden Fisch (ca. 3 cm lang) und 10 Höhenstufen beim deformierten (ca. 2 cm lang) aufgenommen werden. Die Voxelkantenlänge nach der Rekonstruktion betrug in beiden Fällen 6,55 μ m.

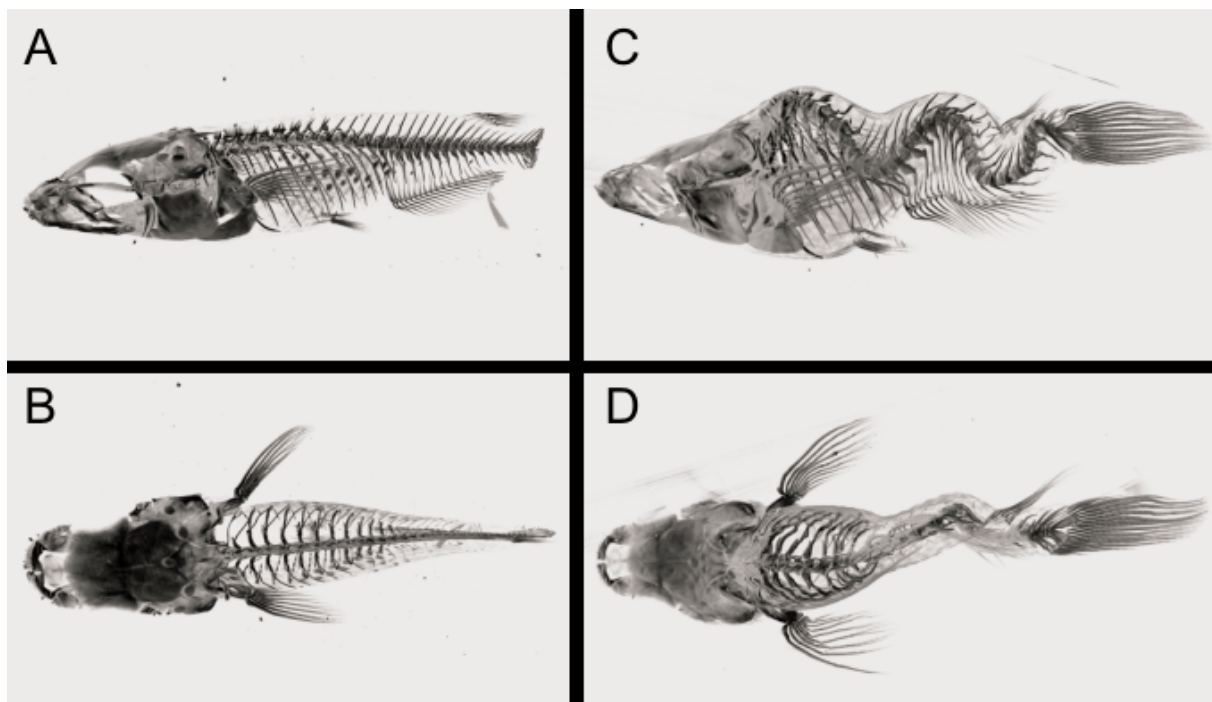


Abbildung 4.1.2-2: SR μ CT Aufnahmen des gesunden (A,B) und des deformierten Fisches (C,D) von der Seite (A,C) und oben (B,D).

In Abbildung 4.1.2-2 sind zwei komplette Fische abgebildet. Wie beim Zebrabärbling sind hier der Schädel, die Wirbelsäule und die Schwanzflosse zu sehen. Die Brustflosse ist auch beim Medaka am Schädel befestigt. Während die Neuralbögen an allen Wirbeln zu finden sind, sind die Rippen nur an den präkaudalen (vorderen) und die Hämalbögen nur an den kaudalen Wirbeln zu finden. Ein Unterschied besteht in der Lage der Rückenflossen, sie liegt beim Medaka bei den posterioren und beim Zebrabärbling bei den anterioren kaudalen Wirbeln.

Beim gesunden Medaka formen die Wirbel mit der Schwanzflosse einen stromlinienförmigen Körper (A, B). Die Wirbelsäule des deformierten Tieres ist dagegen wie ein Korkenzieher verdreht (C, D). Die Schwanzflosse ist bei diesem Tier verdreht zur Körperachse gewachsen und der Schädel ist abgeflacht (C).

Die höhere Vergrößerung zeigt, dass alle Elemente der Wirbelsäule beim deformierten Tier vorhanden sind (Abbildung 4.1.2-3 A-B und E-F). Zusätzlich zeigen die Bilder, dass der Grund für die Deformation bei der Verformung der Knochen selbst liegt. Die Wirbelkörper sind an beiden Enden verformt und sorgen so für die helikalen Windungen. Dies könnte auch der Grund für die ungerichtete Anordnung der Neural- und Hämalbögen sein. Dasselbe gilt auch für den Brustkorb und die Rippen. Bei vergleichbarer Länge bilden die Rippen des deformierten Fisches eine unnormale helikale wellenartige Form. Dabei ist die Verformung unregelmäßig (B, F).

Wie bereits erwähnt, ist der Schädel des deformierten Fisches abgeflacht. Der betroffene Teil wird Neurokranium genannt und schützt den Teil des Kopfes, in dem das Gehirn liegt (C, G). Dies scheint auch die Größe und Position der Augen und des Kiemendeckels zu beeinflussen. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass im Schädel Knochenelemente fehlen. Die Knochen

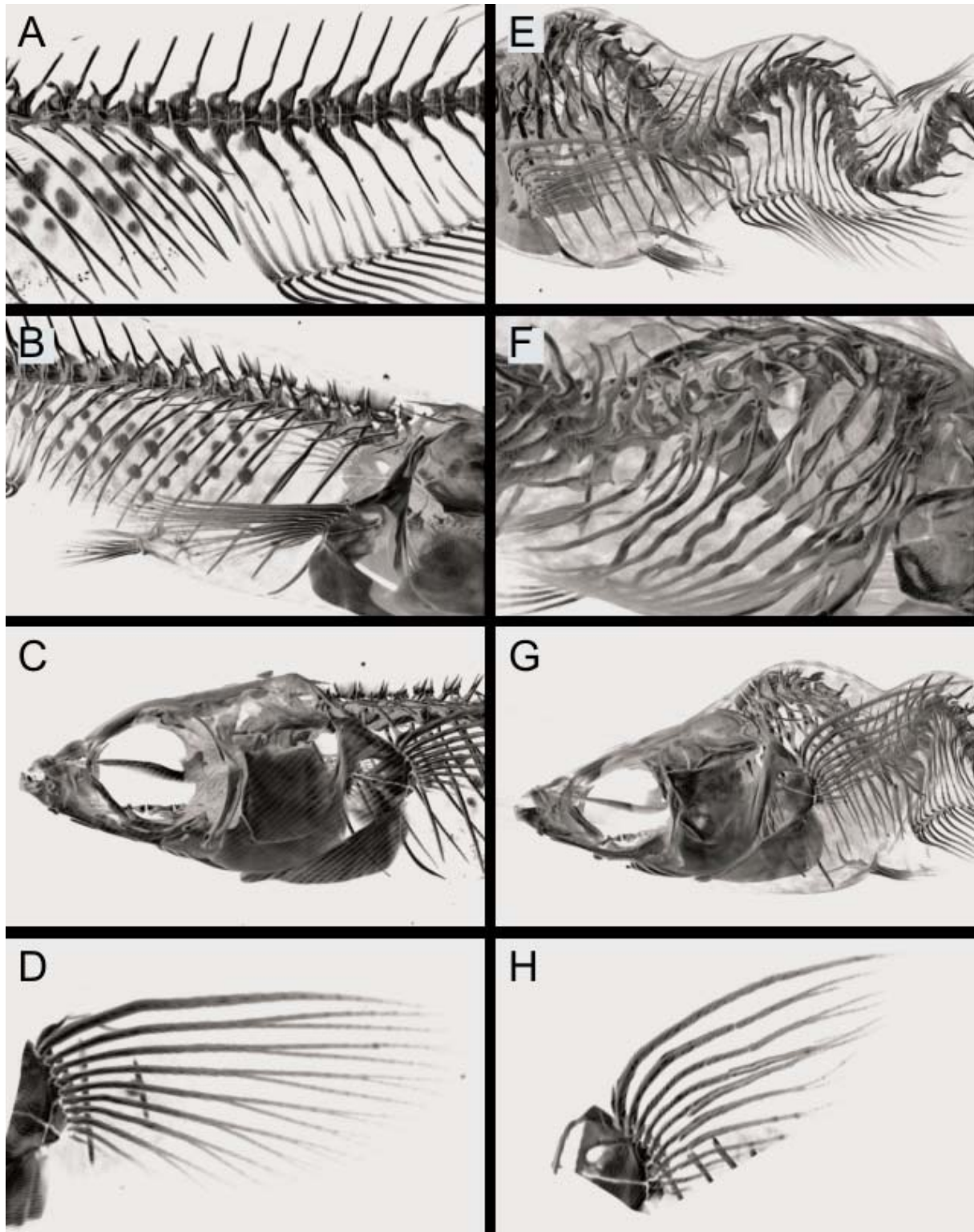


Abbildung 4.1.2-3: Vergrößerungen des gesunden (A, B, C, D) und des deformierten (E, F, G, H) Medaka. Gezeigt sind die Wirbelsäule (A, E), der Brustkorb (B, F), der Schädel (C, G) und die Brustflosse (D, H).

der Flossen (D, H) scheinen weitestgehend normal entwickelt, wie hier am Beispiel einer Brustflosse zu sehen ist. Dabei zeigen einige Knochen allerdings anomale Aufspaltungen. Beim gesunden Fisch sind auf beziehungsweise in der Haut runde Objekte zu sehen (A, B, C), die beim deformierten Fisch fehlen (E, F, G). Es kann leider weder gesagt werden, was diese Objekte darstellen, noch warum sie im deformierten Fisch nicht zu sehen sind. Es scheint, dass es Bereiche in der Haut gibt, die eine ähnliche Röntgenabsorption haben wie Knochen.

4.1.3 Untersuchung der Wirbelkörper des Lachses (*Salmo salar* L.)

Der Atlantische Lachs (*Salmo salar* L.), im Weiteren kurz Lachs genannt, wird taxonomisch in die Reihe der Fische (Pisces) sowie in die Ordnung der Lachsartigen (Salmoniformes) eingeordnet. Er kann eine Länge von 1,5 m und ein Gewicht von 36 kg erreichen. Beheimatet ist er im Nordatlantik, in der Nord- und Ostsee sowie in den entsprechenden Zuflüssen (z. B. Rhein). Zum Ablaichen kehrt der Lachs in die Flüsse und Bäche zurück, in denen er geschlüpft ist. Dabei können Strecken von bis zu 1000 km zurückgelegt werden.



Abbildung 4.1.3-1: Bild eines Lachses (*Salmo salar* L.). (www.wikipedia.de)

In diesem Kapitel wird eine Kooperation mit der Universität Bergen beschrieben. In dieser wird die Entwicklung der Wirbelsäule beginnend von der Bildung der Chorda dorsalis, auch Notochord genannt, untersucht. Sie ist der Namensgeber für den Stamm der Chordatiere, zu denen auch die Wirbeltiere gehören. Die Chorda dorsalis wird bereits bei der Gastrulation gebildet und reicht vom Schädel bis zum Schwanz. Sie definiert die Mittelachse des Körpers. Außerdem ist sie der Startpunkt für die Bildung der Wirbelsäule. Die Wirbelkörper werden durch vier nacheinander gebildete Lagen aufgebaut. Zu Beginn wird ein Ring um die Chorda dorsalis gebildet (Lage eins). Anschließend wird die komplette Chorda dorsalis eingehüllt (Lage zwei). Die folgende dritte Lage verstärkt Lage zwei. Eine spongiöse vierte Lage komplettiert den Wirbelkörper.^[160,161]

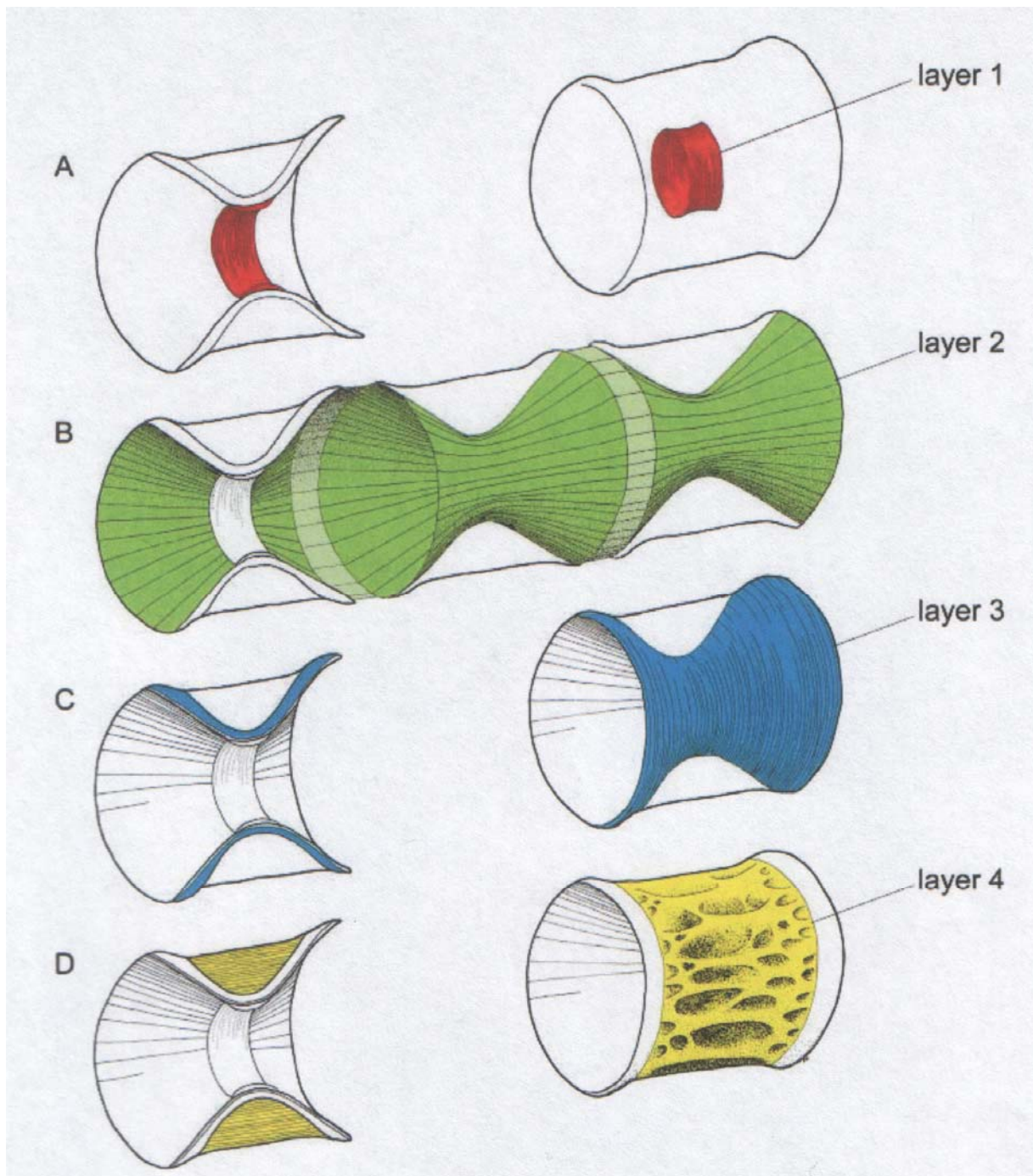


Abbildung 4.1.3-2: Darstellung der vier Lagen eines Lachswirbelkörpers (Layer 1-4).^[161]

Die Probe für Lage eins wurde direkt von Embryonen gesammelt, dabei war der Ring noch nicht bei allen Wirbeln vollständig ausgebildet. Die Proben der Lagen zwei bis vier wurden an weiterentwickelten Wirbeln voneinander separiert (Tabelle 4.1.3-1), dabei wurden nicht alle Wirbel verwendet, sondern nur ein Bereich im vorderen und einer im hinteren Teil der Tiere.

Tabelle 4.1.3-1: Liste der Proben.

Probe	Lage	Wirbel
L1	1	alle
L2a	2	13-15
L3a	3	13-15
L4a	4	13-15
L2b	2	43-45
L3b	3	43-45
L4b	4	43-45

Mittels der thermogravimetrischen Analyse und der Röntgenpulverdiffraktometrie wurden die Zusammensetzungen und die Größe der Kristalle ermittelt.

Für die thermogravimetrische Analyse wurden die Proben mit 3 K min^{-1} auf 1200 °C unter Sauerstoffatmosphäre erwärmt. Durch einen Gerätefehler wurde die Probe L4a unbrauchbar. Da die Probenmenge sehr gering war, konnte die Messung nicht wiederholt werden und fehlt aus diesem Grund in den Ergebnissen der Thermogravimetrie. In den Thermogrammen (Abbildung 4.1.3-3) sind drei Stufen zu erkennen. Die erste entsteht durch das Verdampfen von Wasser aus der Probe (bis ca. 200 °C). Bei Stufe zwei verbrennen die organischen Bestandteile (ca. $200\text{-}550 \text{ °C}$). Die Decarboxylierung des Carbonats und das damit verbundene Entweichen von Kohlendioxid verursacht die dritte

Stufe (ca. 550-750 °C). Es lässt sich daraus der Carbonatanteil in der Probe bestimmen.

Formel 4.1.3-1
$$w(\text{CO}_3^{2-}) = \frac{w(\text{CO}_2) \cdot M(\text{CO}_3^{2-})}{M(\text{CO}_2)}$$

mit $M(\text{CO}_3^{2-}) = 60,01 \text{ g mol}^{-1}$ und $M(\text{CO}_2) = 44,01 \text{ g mol}^{-1}$.

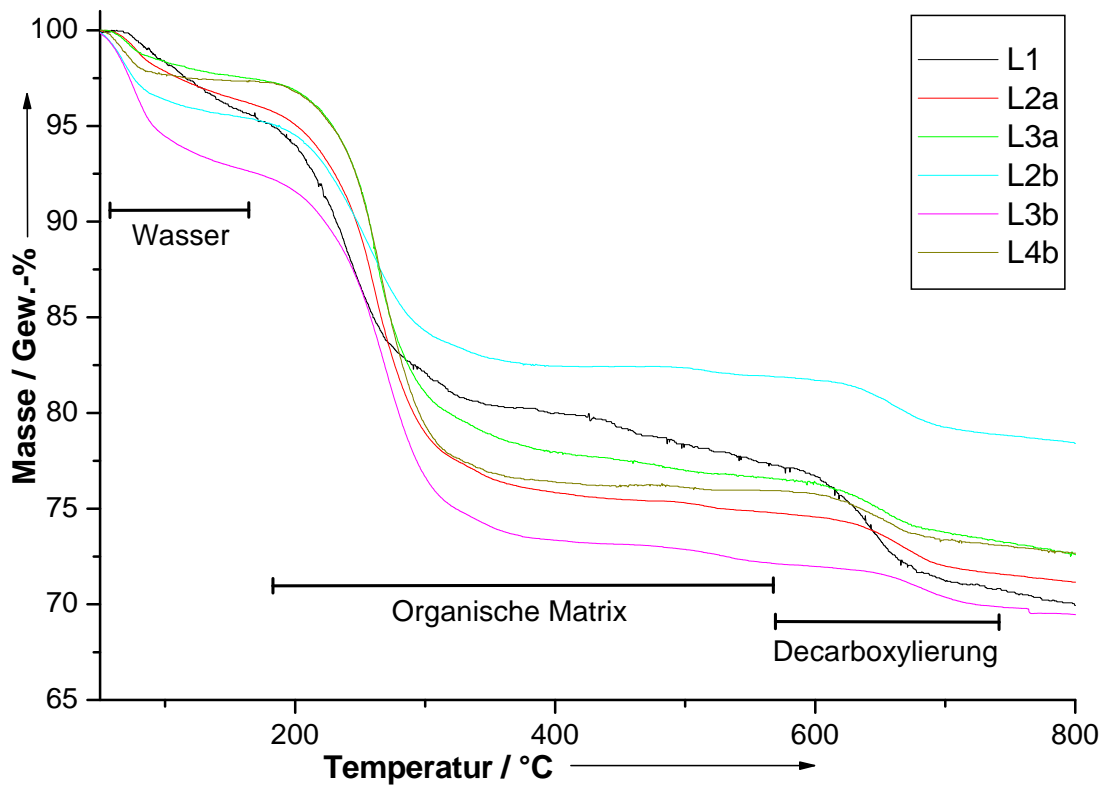


Abbildung 4.1.3-3: Thermogramme der Proben.

Tabelle 4.1.3-2 zeigt die Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse. Die untersuchten Proben zeigen einen Wassergehalt von 2,6 bis 7,6 %. Der Anteil von organischem Material liegt bei ungefähr 20 %, nur bei der Probe L2b liegt der Anteil bei 13 %. Betrachtet man den Carbonatgehalt, so findet sich eine Probe, die sich von den anderen unterscheidet. Probe L1 zeigt mit 7,9 % einen

doppelt so hohen Anteil wie die restlichen Proben (2,6-3,7 %). Die Zusammensetzung der Lachswirbellagen ähnelt der von humanen Knochen (Tabelle 4.1.3-3).^[1] Dabei besitzt nur Probe L1 einen vergleichbaren Carbonatanteil. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einem Kallus (neu gebildetes Knochengewebe nach einer Fraktur) und einem von Krebs befallenen Knochen (im weiteren als Tumor bezeichnet)^[4] verglichen. In der Literatur^[4] wurde der Calciumcarbonatanteil angegeben; um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde dieser hier auf den Carbonatanteil umgerechnet. Der Kallus zeigt einen geringeren Mineralanteil und nur sehr wenig Carbonat. Extrapoliert man den Carbonatanteil des Kallus auf einen Mineralanteil von 75 %, so liegt dieser mit 1,4 % immer noch unter den hier gefundenen Werten. Auch der Anteil von Carbonatapatit wurde hier neu berechnet, um die Ergebnisse vergleichen zu können (100 %-Wasser %-Organische Bestandteile %), da in der Literatur^[4] Calciumcarbonat und Hydroxylapatit separat betrachtet wurden. Der Tumor zeigt dagegen die gleiche Zusammensetzung wie die hier untersuchten Wirbellagen. Bigi et al.^[162] zeigen in einer Studie über Truthahnknochen einen Mineralgehalt von ungefähr 60 %.

Die Röntgenpulverdiffraktogramme der Proben sind in Abbildung 4.1.3-4 zu sehen. Sie zeigen alle die typischen Reflexe von Hydroxylapatit. Des Weiteren sind keine anderen Phasen zu erkennen. Nur die Reflexe der Probe L1 sind schlecht zu erkennen. Da sich der Anteil von organischem Material nicht von den anderen Proben unterscheidet, deutet dies auf eine geringere Kristallinität hin. Das Material von Probe L1 wurde direkt nach der Bildung gesammelt. In der Literatur berichtet eine Studie an Hühnerknochen, dass die Kristallinität des Hydroxylapatits mit dem Alter zunimmt.^[163] Dies könnte eine Erklärung für die geringere Kristallinität von Probe L1 sein. Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung wurde von den verbreiterten Reflexen die Kristallitgröße bestimmt (Tabelle 4.1.3-4). Es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Auch

die in der Literatur beschriebenen Kristallitgrößen ähneln den der Wirbellagen (Tabelle 4.1.3-5).^[4,162]

Alle Proben zeigen ebenfalls eine anisotrope Kristallitgröße. Reflexe der Netzebenen (hk0) zeigen im Vergleich zu den Reflexen der Netzebenen (00l) eine kleinere Kristallitgröße (hk0 ca. 6,5 nm; 00l ca. 20 nm). Die Kristallitgröße für Reflexe der Netzebenen (hkl) liegt zwischen diesen beiden Werten. Dies spricht für eine Verlängerung der Kristallite entlang der c-Achse.^[1,4] Dies wurde auch schon durch Elektronenbeugung an einzelnen Knochenpartikeln gezeigt.^[164] Auch frühere Studien für Knochen zeigten diese Ergebnisse.^[165-168]

Tabelle 4.1.3-2: Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse (in Gew.-%).

Probe	Wasser	Organische Bestandteile	Kohlendioxid	Carbonat	Carbonat-apatit
L1	4,6	18,1	5,8	7,9	77,3
L2a	4,3	21,1	2,7	3,7	74,6
L3a	2,6	20,8	2,6	3,5	76,6
L2b	4,8	13,5	2,5	3,4	81,7
L3b	7,6	20,6	1,9	2,6	71,9
L4b	2,7	21,4	2,6	3,5	75,9

Tabelle 4.1.3-3: In der Literatur angegebene Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse (in Gew.-%).

Probe	Wasser	Organische Bestandteile	Kohlendioxid	Carbonat	Carbonat-apatit
Knochen ^[1]	10	25	k.A.	7,4	65
Kallus ^[4]	6,9 ^[4]	47,7	k.A.	0,8	45,4
Tumor ^[4]	5,7 ^[4]	21,2	k.A.	3,1	73,1

Tabelle 4.1.3-4: Berechnete Partikelgrößen von Carbonatapatit für die angegebenen Reflexe in nm.

Reflex (hkl)	(002)	(310)	(222)	(213)	(004)
Position [$^{\circ}2\theta$]	19,8	30,2	35,5	37,5	40,2
L1	21	---	---	---	---
L2a	21	6	16	13	21
L3a	21	7	15	13	19
L4a	20	6	14	12	18
L2b	23	6	16	14	19
L3b	20	7	15	12	20
L4b	22	7	14	13	20

Tabelle 4.1.3-5: In der Literatur angegebene Partikelgrößen von Carbonatapatit für die Reflexe in nm.

Reflex (hkl)	(002)	(310)	(222)	(213)	(004)
Position [$^{\circ}2\theta$]	19,8	30,3	35,5	36,5	40,3
Kallus ^[4]	20	8	15	12	18
Tumor ^[4]	21	8	16	12	18
Truthan- knochen ^[162]	24	8	k.A.	k.A.	k.A.

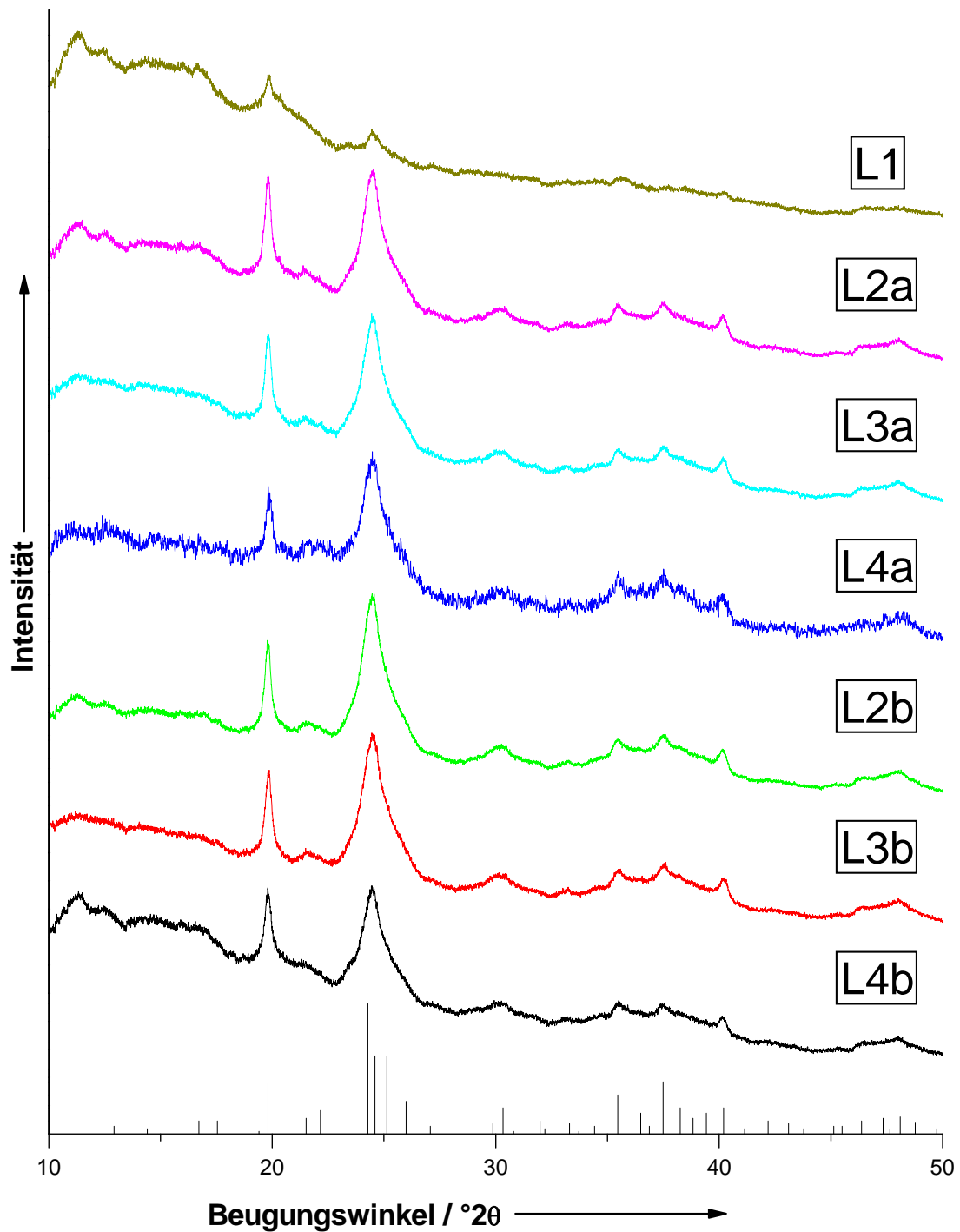


Abbildung 4.1.3-4: Diffraktogramme ($\lambda=1.18344 \text{ \AA}$) der Knochenproben und die Reflexpositionen/-intensitäten von Hydroxylapatit der ICDD-Referenz 09-0432 (unten).

4.1.4 Der Einfluss von Fetuin-A auf die Mineralisation im Knochen

Für den Stoffwechsel von Tieren sind eine Reihe von Elementen und Verbindungen essentiell. Ein Element ist Calcium, welches nicht nur für den Bau von Knochen oder Zähnen, sondern auch für verschiedene Zellfunktionen benötigt wird. Auch Phosphat wird nicht nur für den Knochenbau benötigt. Fast der gesamte Energiestoffwechsel nutzt energiereiche Phosphate (Pyrophosphat) als Energieträger (z. B. im Adenosintriphosphat; ATP). Aber auch bei vielen anderen Zellfunktionen wird Phosphat benötigt. Es ist Bestandteil der DNS (Desoxyribonukleinsäure), RNS (Ribonukleinsäure) oder von regulatorischen Phosphoproteinen. Aufgrund des hohen Bedarfs dieser beiden Stoffe ist der Körper gezwungen, große Mengen aufzunehmen und zu transportieren. Da Calcium und Phosphat im Körper nicht getrennt transportiert werden können, stellt dies ein großes Problem dar.^[169]

Die Konzentration von Calcium und Phosphat überschreitet im Blut das Löslichkeitsprodukt für Hydroxylapatit (HAP) bei weitem.^[1,170] Bei der Verhinderung der Präzipitation spielen Fetuine eine wichtige Rolle. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Fetuin-A, auch bekannt als α_2 -HS-Glykoprotein (AHSG).^[171] Während das Gen von Fetuin-A schon sehr lange bekannt ist, wurde erst vor wenigen Jahren das Gen des eng verwandten Fetuin-B im Genom von Menschen, Ratten und Mäusen entdeckt. Während Fetuin-A nur in der Leber gebildet wird, können eine Reihe von epithelialen sekretorischen Organen zusätzlich Fetuin-B bilden. Beide Vertreter sind Inhibitoren der Hydroxylapatit-präzipitation, wobei Fetuin-B eine geringere Inhibition als Fetuin-A zeigt. Fetuin-B scheint zusätzlich andere Funktionen im Körper zu erfüllen.^[172,173] So können sich beispielsweise Mäuse mit ausgeschaltetem Fetuin-B Gen nicht fortpflanzen.^[174] Homologe Proteine wurden in allen untersuchten Wirbeltieren gefunden.^[175-179] Jahnen-Dechent et al. hatten aufgrund erster Untersuchungen Fetuin-A als extrazellulären Inhibitor der Calcifizierung eingeordnet.^[180] In

diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fetuin-A die Präzipitation von HAP inhibiert. Abbildung 4.1.4-1 zeigt zwei Experimente dieser Studie. Es wurde der Einfluss der Fetuin-A Konzentration auf die Präzipitation untersucht (A). Hier wurde eine Lösung aus Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (50 mM), Calciumchlorid (4,8 mM) und Dinatriumhydrogenphosphat (1,6 mM) mit verschiedenen Mengen Fetuin bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Zu erkennen ist eine sprunghafte Verringerung der Präzipitation bei Konzentrationen um 0,5 mM. Im zweiten Versuch wurde der Einfluss der Inkubationszeit untersucht (B). Dazu wurde die oben beschriebene Lösung ohne Fetuin-A (■) und mit Konzentrationen von 1 μM (◆) und 5 μM (●) bei 37 °C inkubiert. In der Kontrolle (ohne Fetuin-A) ist nach zwei Stunden das Maximum erreicht. Die Zugabe von Fetuin-A bewirkte eine dosisabhängige Verzögerung der Präzipitation, bei der das Maximum erst nach vier beziehungsweise zehn Stunden erreicht wurde. Die Konzentration von Fetuin-A im Blutserum liegt bei 10 mM.^[180]

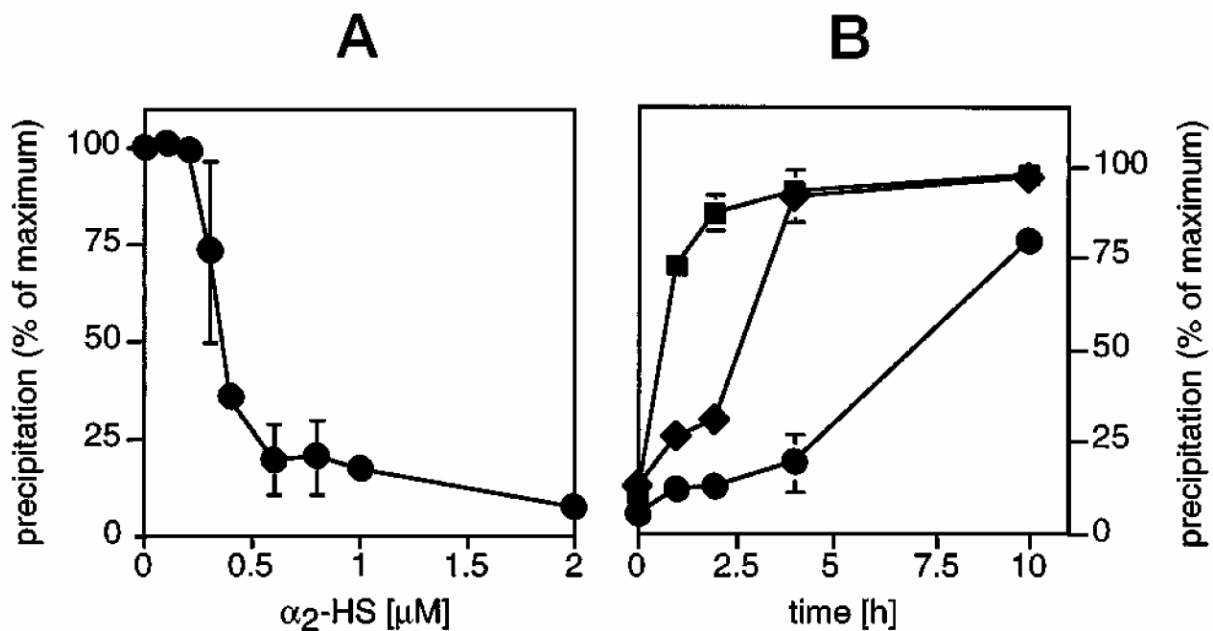


Abbildung 4.1.4-1: A: Inhibition der Präzipitation in Abhängigkeit von der Fetuin-A Konzentration (α_2 -HS); B: Inhibition in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Fetuinkonzentrationen (■ = 0 μM , ◆ = 1 μM , ● = 5 μM).^[180]

Es folgte daraufhin die Zucht eines Mausphänotyps, bei dem das Fetuin-A Gen ausgeschaltet wurde (AHS $G^{-/-}$). In Abbildung 4.1.4-2 sind zum Vergleich Röntgenaufnahmen einer 9 Monate alten Wildtyp-Maus und einer Fetuin-A knockout-Maus gezeigt. Die Fetuin-A knockout-Maus zeigt eine Calcifizierung des Weichgewebes, welche bei allen untersuchten Mäusen auftrat.^[181,182] Eine erste klinische Studie zeigte einen hohen Mortalitätsfaktor für Dialysepatienten mit Fetuin-A Mangel.^[183]

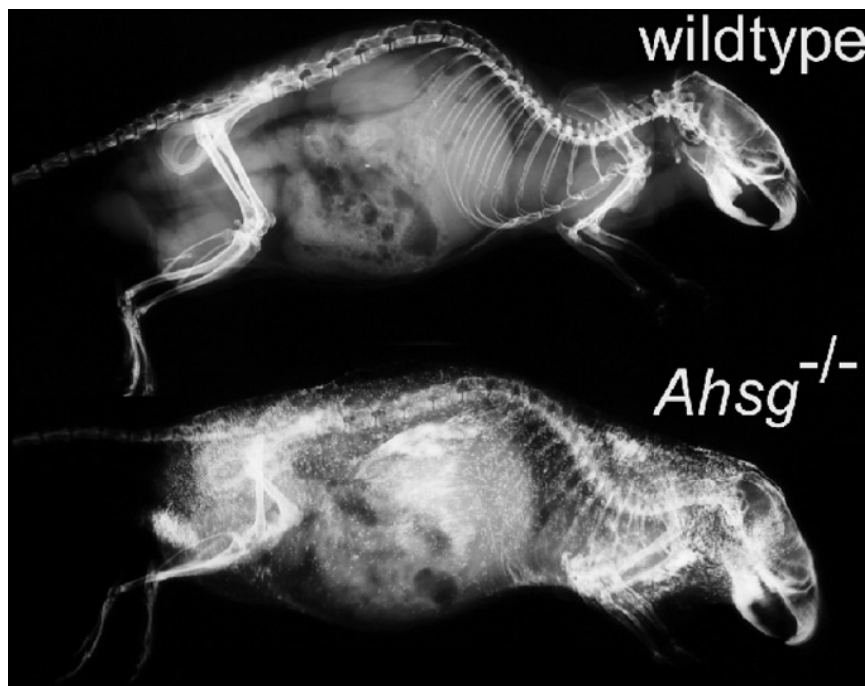


Abbildung 4.1.4-2: Röntgenbilder einer 9 Monate alten Wildtyp-Maus und Fetuin-A knockout Maus.^[169]

Um zu klären, wie Fetuin das Fällen von Calciumphosphat verhindert, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Diese haben gezeigt, dass Calciumphosphat unter physiologischen Bedingungen kolloidal über einen Zeitraum von 24 Stunden in Lösung gehalten werden kann.^[184] In dieser Zeit muss es verwendet oder ausgeschieden sein.^[169,185,186]

Hier sollte nun ermittelt werden, ob Fetuin einen Einfluss auf die Mineralisation bei der Knochenbildung hat. Es wurden Oberschenkelknochen (Femur) von sieben Mäusen untersucht (Tabelle 4.1.4-1). Die Knochen stammten von einer

männlichen Fetuin-A knockout-Maus (FA), einer weiblichen Fetuin-B knockout-Maus (FB), vier männlichen und einer weiblichen Wild-Typ Maus (WT). Alle Tiere stammten aus der Züchtung des Arbeitskreises W. Jahnen-

Tabelle 4.1.4-1: Liste der Tiere, von denen die Knochen stammten.

Probe	Geburtsdatum	Alter der Maus
WT1 (m)	09.11.2004	3 Monate
WT2 (m)	18.10.2004	4 Monate
WT3 (m)	10.05.2004	5 Monate
WT4 (m)	20.01.2004	12 Monate
WT5 (w)	04.02.2005	2 Monate
FA (m)	05.05.2004	9 Monate
FB (w)	04.02.2005	2 Monate

Dechent der RWTH Aachen. Mittels der thermogravimetrischen Analyse und der Röntgenpulverdiffraktometrie wurden die Zusammensetzungen und die Größe der Kristalle ermittelt. Für die thermogravimetrische Analyse wurden die Proben mit 3 K min^{-1} auf 1000 °C unter Sauerstoffatmosphäre erwärmt. Tabelle 4.1.4-2 zeigt die Ergebnisse für die Knochen aller Tiere. Der Wassergehalt der Knochen liegt bei fünf Proben zwischen 6 % und 7 %, die Proben FA und WT3 zeigen einen Gehalt von 3,8 % und 3,2 %. Wiederum fünf Proben bestehen aus ca. 20 % organischen Bestandteilen, hier weichen die Proben WT3 und WT5 mit einem Anteil von ca. 10 % ab. Der Carbonatgehalt ist in allen Knochen ähnlich und liegt zwischen 1,4 % und 2,5 %. Auch diese Ergebnisse wurden mit einem Kallus (neu gebildetes Knochengewebe nach einer Fraktur) und einem von Krebs befallenen Knochen (im weiteren als Tumor bezeichnet)^[4] und Knochen allgemein^[1] verglichen. Da die Zusammensetzung der Mausknöchel vergleichbar mit der Zusammensetzung der Wirbelteile des Lachses ist

(Tabelle 4.1.3-2), zeigt auch hier der Vergleich mit Knochen allgemein eine ähnliche Zusammensetzung. Allerdings wird hier der Carbonatanteil der in der Literatur^[1] beschriebenen Zusammensetzung von keiner Probe erreicht. Der Kallus hat ebenfalls im Vergleich einen geringeren Mineralanteil und nur sehr wenig Carbonat (Tabelle 4.1.4-3). Der Tumor zeigt auch für die Mausknöchel die gleiche Zusammensetzung. Der Mineralgehalt von ungefähr 60 % in Truthahnknöchel liegt hier ebenfalls etwas unter dem Mineralgehalt der Mausknöchel.^[162]

Die Röntgenpulverdiffraktogramme der Knochenproben sind in Abbildung 4.1.4-3 zu sehen. Sie zeigen alle wie erwartet die typischen Reflexe von Hydroxylapatit. Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung wurde von den verbreiterten Reflexen die Kristallitgröße bestimmt (Tabelle 4.1.4-4). Alle Proben haben eine ähnliche Größe untereinander sowie mit den in der Literatur beschriebenen Kristallitgrößen (Tabelle 4.1.4-5).^[4,162] Auch hier zeigen alle Proben die gleiche Anisotropie in der Kristallitgröße.^[1,4,164-168]

Durch die hier beschriebenen Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen den Knochen gefunden werden. Ein Einfluss von Fetuin auf die Mineralisierung im Knochen konnte deshalb nicht nachgewiesen werden. Auszuschließen ist eine Funktion allerdings nicht, da bei fehlendem Fetuin andere Proteine oder Enzyme dessen Aufgaben übernommen haben könnten. Es wären daher weitere Experimente nötig, um hier eine Aussage treffen zu können.

Tabelle 4.1.4-2: Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse (in Gew.-%).

Probe	Wasser	Organische Bestandteile	Kohlendioxid	Carbonat	Carbonat-apatit
WT5	6,8	23,9	1,4	2,0	69,3
WT4	6,4	10,3	2,0	2,7	83,3
WT3	3,2	10,8	2,2	3,0	86,1
WT2	7,0	19,2	2,5	3,3	73,8
WT1	6,3	20,4	2,2	3,0	73,3
FB	6,7	21,2	1,8	2,5	72,1
FA	3,8	20,4	1,9	2,6	75,8

Tabelle 4.1.4-3: In der Literatur angegebene Ergebnisse der thermogravimetrischen Analyse (in Gew.-%).

Probe	Wasser	Organische Bestandteile	Kohlendioxid	Carbonat	Carbonat-apatit
Knochen ^[1]	10	25	k.A.	7,4	65
Kallus ^[4]	6,9 ^[4]	47,7	k.A.	0,8	45,4
Tumor ^[4]	5,7 ^[4]	21,2	k.A.	3,1	73,1

Tabelle 4.1.4-4: Berechnete Partikelgrößen von Carbonatapatit für die angegebenen Reflexe in nm.

Reflex (hkl)	(002)	(310)	(222)	(213)	(004)
Position [$^{\circ}2\theta$]	25,9	39,9	46,7	49,4	53,1
WT5	20	---	----	---	---
WT4	21	5	15	12	22
WT3	19	5	16	12	22
WT2	23	6	15	12	20
WT1	22	6	15	13	19
FB	21	5	15	11	21
FA	20	6	15	12	21

Tabelle 4.1.4-5: In der Literatur angegebene Partikelgrößen von Carbonatapatit für die Reflexe in nm.

Reflex (hkl)	(002)	(310)	(222)	(213)	(004)
Position [$^{\circ}2\theta$]	25,9	39,8	46,7	48,1	53,3
Kallus ^[4]	20	8	15	12	18
Tumor ^[4]	21	8	16	12	18
Truthan- knochen ^[162]	24	8	k.A.	k.A.	k.A.

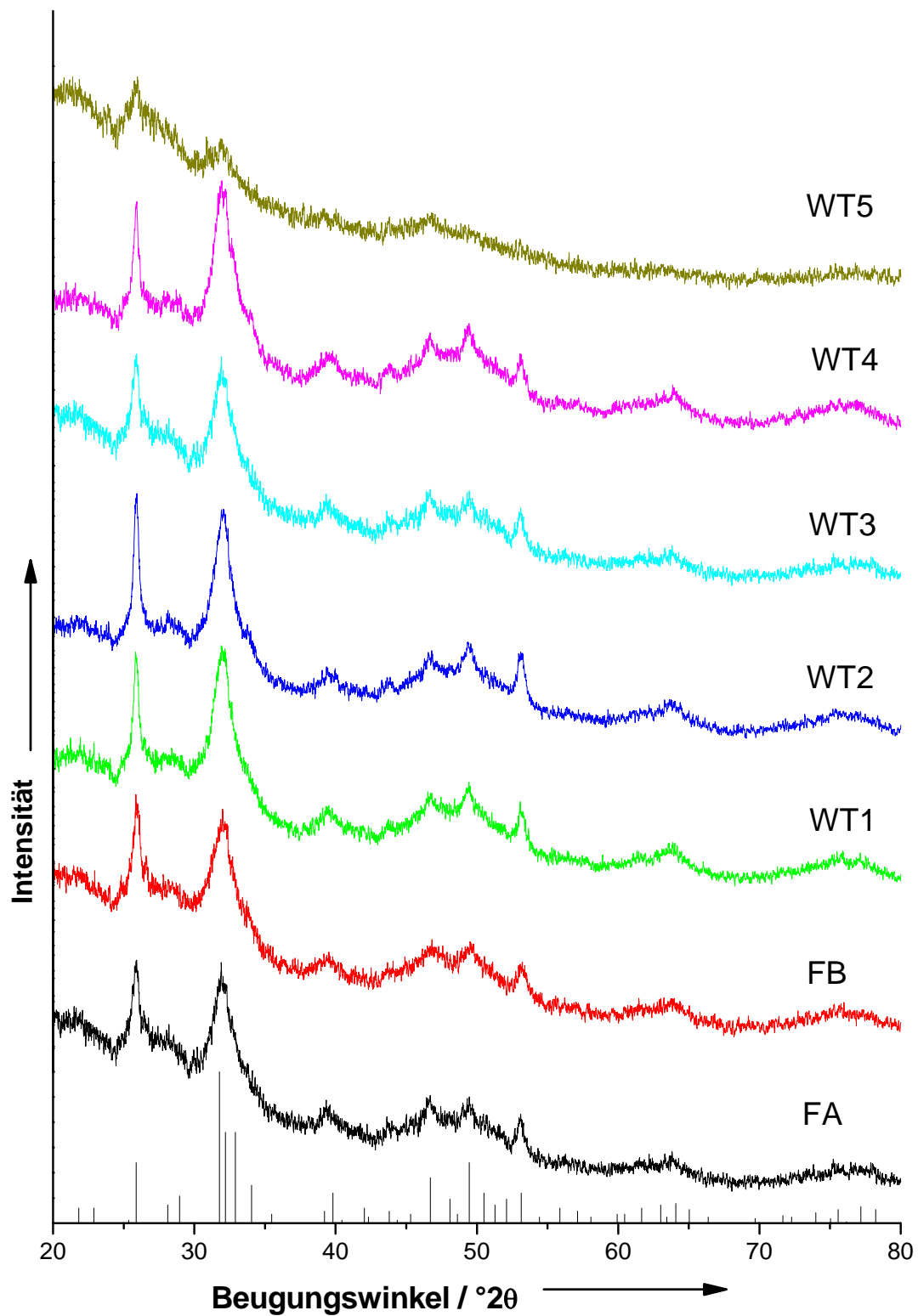


Abbildung 4.1.4-3: Diffraktogramme ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) der Knochenproben und der Hydroxylapatit Referenz (unten).

4.1.5 Vergleich eines fluorotischen mit einem gesunden Zahn

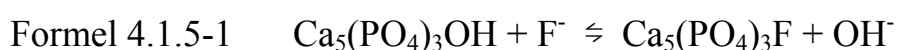
Zähne können durch Medikamente oder andere Pharmazeutika auf verschiedene Art beeinflusst werden. Dazu gehören die Verfärbung (innerlich oder äußerlich) sowie ein substanziieller Schaden (im Enamel, Dentin oder Zahnzement) und eine Veränderung der Empfindlichkeit der Zähne.^[187,188]

Die äußerliche Verfärbung der Zähne entsteht erst nach der Odontogenese und kann wieder entfernt werden. Ursachen hierfür können beispielsweise Chlorhexidin,^[189-193] Amoxicillin,^[194] Coamoxiclav (Amoxicillin und Clavulansäure)^[195] oder ätherische Öle^[196,197] sein. Im Gegensatz zur äußerlichen Verfärbung entsteht die innerliche während der Odontogenese und ist permanent. Sie kann beispielsweise durch Fluoride,^[198-202] Tetracyclin,^[203,204] Minocyclin^[205-210] oder Ciprofloxacin^[211] verursacht werden.

Beispiele für substanziielle Schäden sind Karies, Erosion oder Missbildungen. Karies entsteht zum Beispiel durch zuckerhaltige flüssige Medikamente^[212] oder Medikamente die die Speichelproduktion reduzieren.^[187,213,214] Die Ursachen für eine Erosion können beispielsweise Aspirin^[215], Mundwasser^[216,217] sowie Medikamente gegen gastroösophagealen Rückfluss^[218] oder Asthma^[219] sein. Auch Fluoride stehen im Verdacht einen strukturellen Schaden zu verursachen.^[187]

Eine übliche Nebenwirkung des Bleichen der Zähne mit Peroxiden ist eine Veränderung der Zahnempfindlichkeit.^[220-226]

Durch die Substitution des Hydroxid-Anions durch Fluorid im Apatit des Zahnschmelzes erhöht sich einerseits die Säurebeständigkeit der Zähne, andererseits kann Fluorid einen negativen Effekt auf die Zahnentwicklung haben.^[198]



Ist die Aufnahme von Fluorid zur Zeit der Schmelzbildung und -reifung zu hoch, so entstehen mattweiße Verfärbungen.^[199] Man spricht hier von Fluorose. Sie ist dabei umso mehr ausgeprägt, je höher die Fluoriddosis war.^[200-202] Eine normale Aufnahmemenge von Fluorid während der Zahnbildung (von der Geburt bis zum achten Lebensjahr) liegt zwischen 0,03 und 0,1 Milligramm Fluorid pro Kilogramm Körpergewicht und Tag.^[227,228]

In diesem Kapitel wurden ein fluorotischer und ein gesunder Zahn (Abbildung 4.1.5-1) mittels SR μ CT verglichen. Beide Zähne wurden von Prof. A. Klocke vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. In der Abbildung sind beim fluorotischen Zahn deutlich die weißen Verfärbungen zu erkennen. Die Daten wurden an der Beamline W2 bei einer Energie von 50 keV aufgenommen. Dabei mussten auf Grund der Länge der Zähne jeweils 5 Höhenstufen beim gesunden (ca. 2 cm lang) und beim fluorotischen Zahn (ca. 2 cm) aufgenommen werden. Die Voxelkantenlänge nach der Rekonstruktion betrug 12,94 μ m. Leider haben sich die Proben während der Messung bewegt. Daraus resultiert ein Versatz an den Grenzflächen der einzelnen Höhenstufen, dieser ist in den Abbildungen 4.1.5-2 und 4 zu sehen, die verschiedene SR μ CT-Darstellungen zeigen.

Abbildung 4.1.5-2 zeigt den gesunden Zahn in drei verschiedenen Darstellungen. In der Mitte ist der komplette Zahn zu sehen. In der linken Darstellung sind nur Voxel zu sehen, die dieselbe Abschwächung wie Dentin zeigen. Neben dem Dentin ist zusätzlich der äußere Rand des Enamels zu sehen. Der Grund dafür liegt in der Methode und Datenverarbeitung selbst. Wenn der Rand eines Objektes ein Pixel der CCD-Kamera nicht vollständig verdeckt, resultiert daraus ein Voxel mit einem geringeren Abschwächungskoeffizienten (LAC). Außerdem kann ebenfalls ein Voxel mit geringerem LAC beim Binning entstehen, wenn dabei „leere“ Voxel mit Voxeln eines hohen LAC kombiniert werden. Im rechten Teil ist nur die Enamelschicht zu sehen.



Abbildung 4.1.5-1: Bilder der beiden untersuchten Zähne. Oben: der gesunde Zahn. Unten: der fluorotische Zahn. Durch die Beleuchtung beim Fotografieren ist die Farbe des gesunden Dentins und Enamels ins Rötliche verfälscht worden.

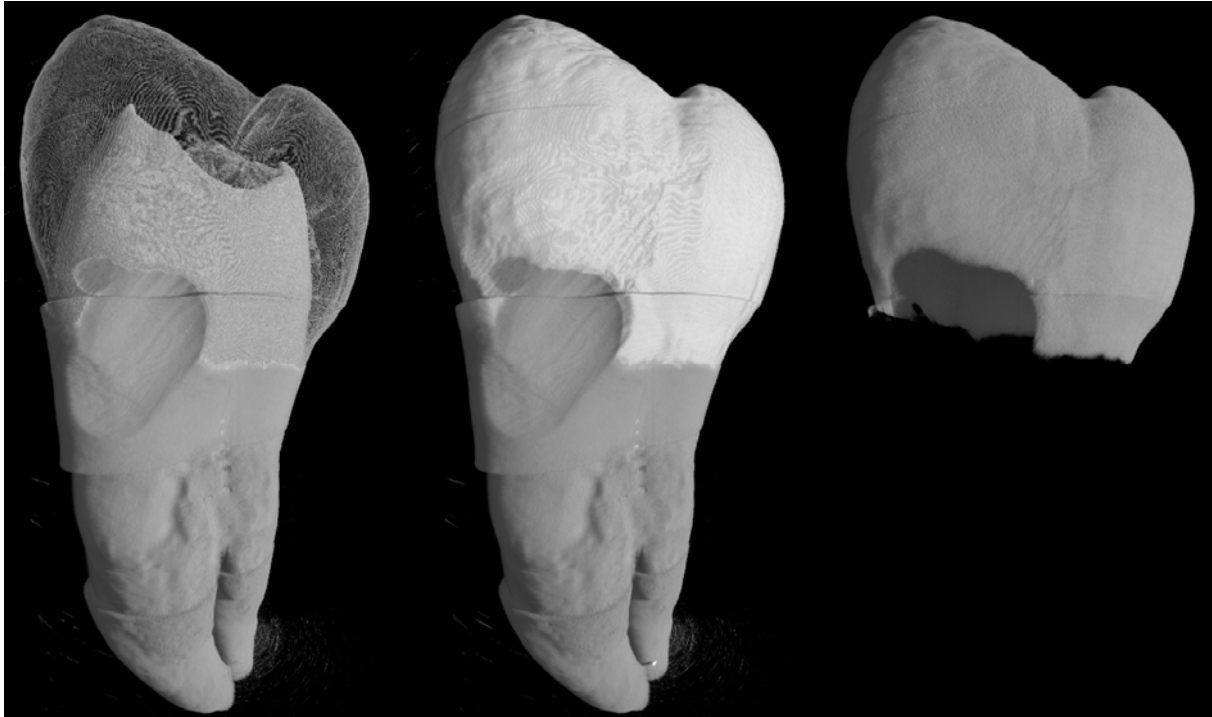


Abbildung 4.1.5-2: SR μ CT-Aufnahme des gesunden Zahns. Mitte: Kompletter Zahn. Links: Dentin. Rechts: Enamel.

Die Enamelschicht des gesunden Zahnes (rechts in Abbildung 4.1.5-2) ist in Abbildung 4.1.5-3 von oben (rechts) und unten (links) zu sehen. Die Vertiefungen in der Ansicht von oben stellen Fissuren (Vertiefungen) dar, in denen oft Karies entsteht.

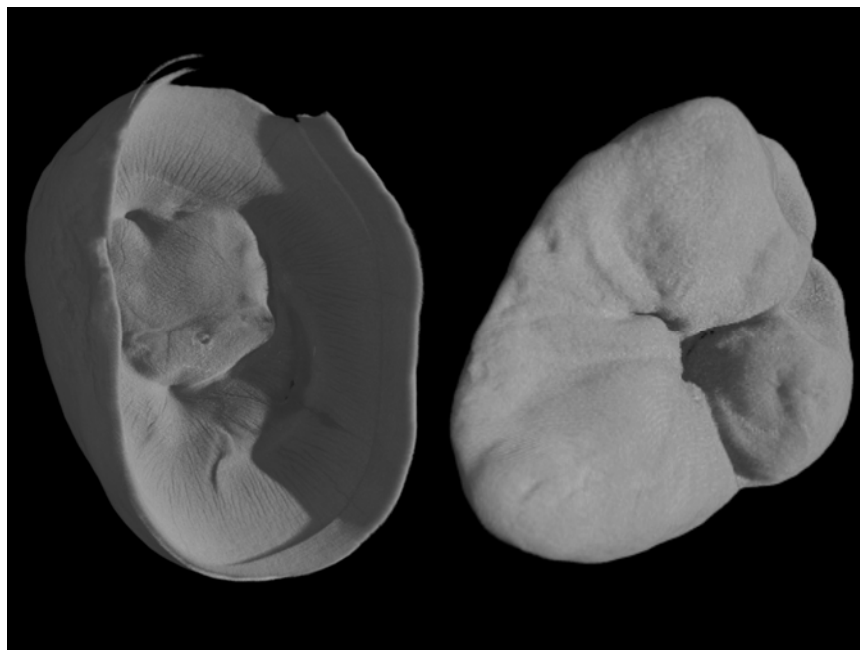


Abbildung 4.1.5-3: SR μ CT-Aufnahme des gesunden Zahns. Darstellung der Enamelschicht von oben (rechts) und unten (links).

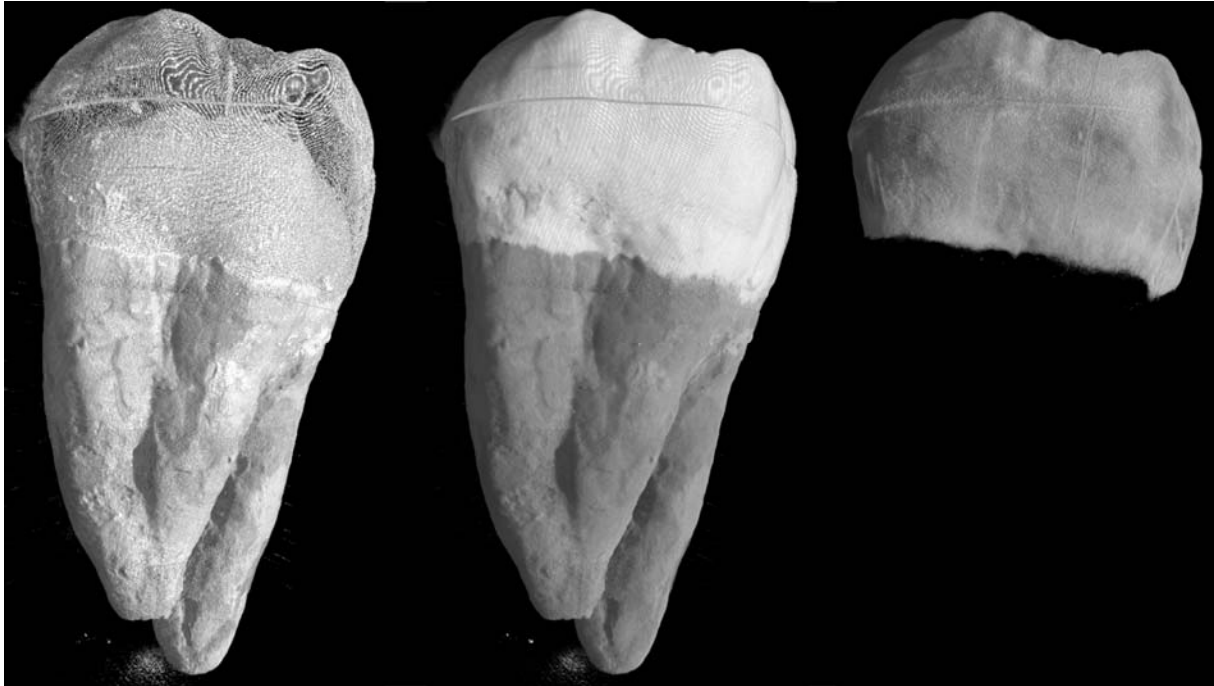


Abbildung 4.1.5-4: SR μ CT-Aufnahme des fluorotischen Zahns. Mitte: Kompletter Zahn. Links: Dentin. Rechts: Enamel.

Die Abbildungen 4.1.5-4 und 5 zeigen analog zum gesunden den fluorotischen Zahn. Es sind hier keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zähnen zu erkennen.

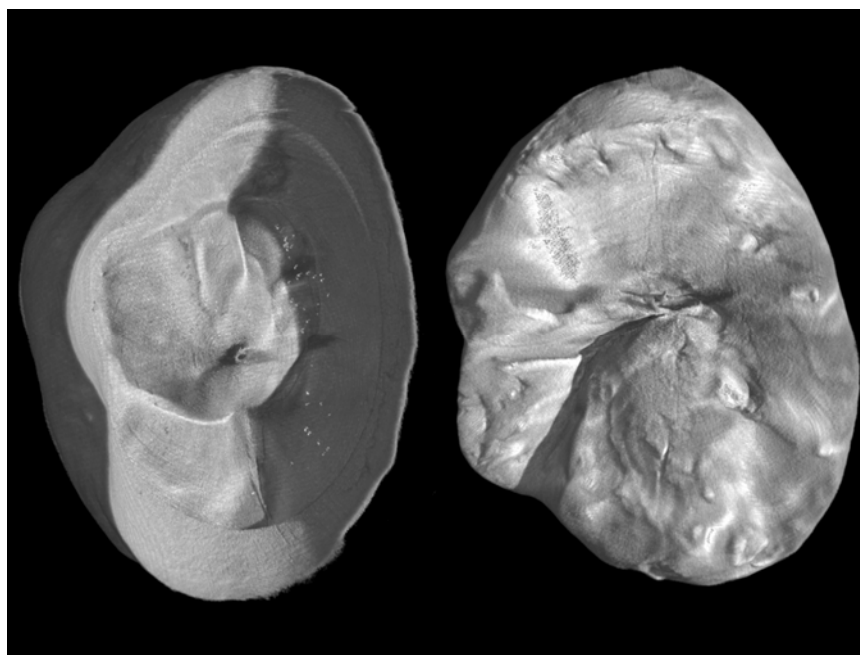


Abbildung 4.1.5-5: SR μ CT-Aufnahme des fluorotischen Zahns. Darstellung der Enamelschicht von oben (rechts) und unten (links).

Abbildung 4.1.5-6 zeigt sowohl den gesunden (links) als auch den fluorotischen Zahn (rechts). Beide Zähne wurden virtuell aufgeschnitten und zeigen sowohl im Dentin als auch im Enamel keine Unterschiede in der Mineralisierung.

Betrachtet man die Histogramme der SR μ CT-Daten (Abbildung 4.1.5-7), so zeigen das Dentin des gesunden (GD) und des fluorotischen Zahn (FD) einen gleichen Absorptionsbereich. Auch das Enamel des gesunden (GE) und des fluorotischen Zahnes (FE) besitzen einen vergleichbaren Absorptionsbereich. Da die Zähne ein unterschiedliches Volumen haben und das Volumen des Enamels nicht in direktem Zusammenhang mit dem Volumen des Dentins steht, sind die beobachteten Unterschiede in der Gesamtzahl der Voxel sowie dem Verhältnis

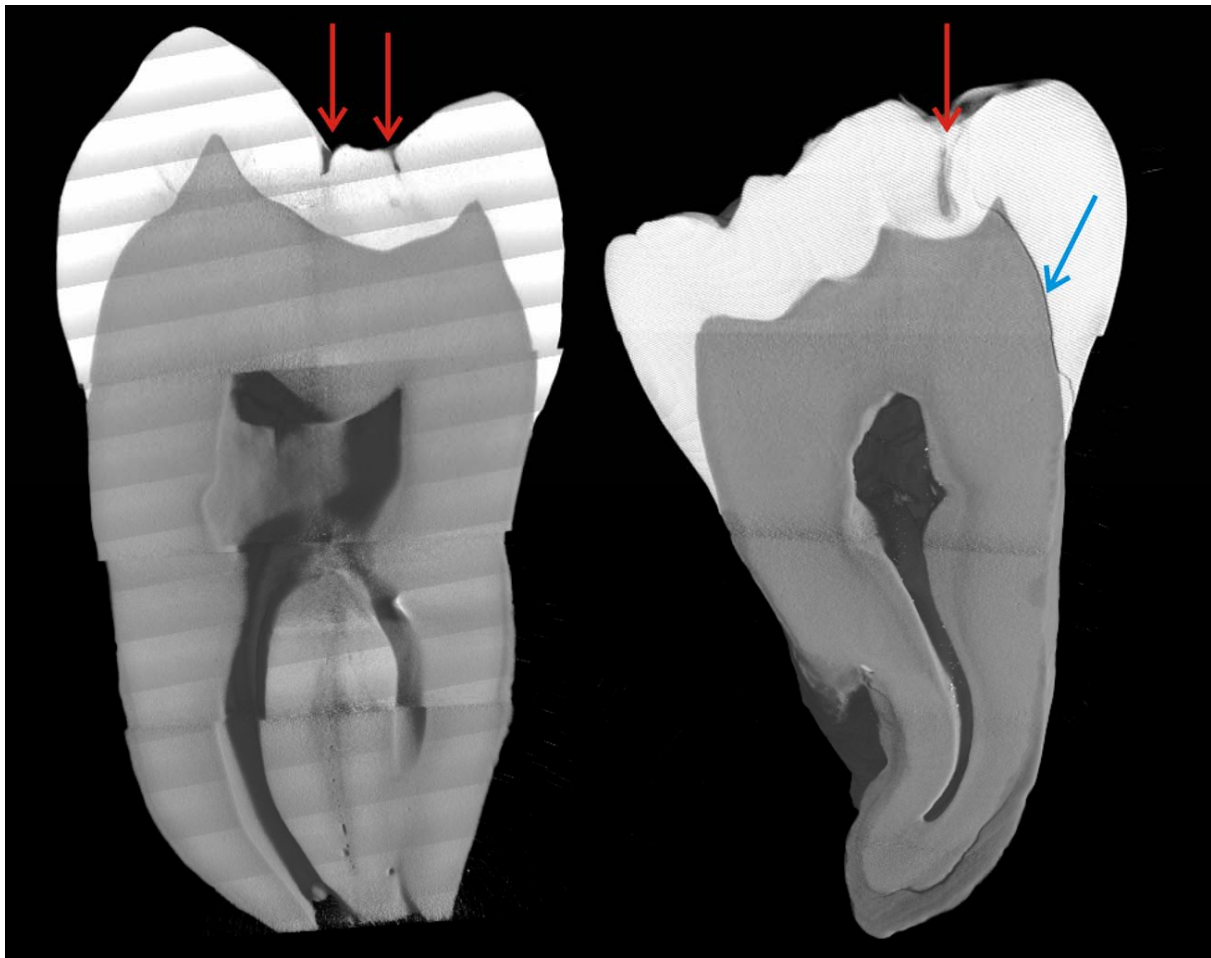


Abbildung 4.1.5-6: SR μ CT-Aufnahme des gesunden (links) und fluorotischen Zahnes (rechts). Darstellung der virtuell aufgeschnittenen Zähne. Es sind deutlich Enamel und Dentin zu erkennen. Im inneren Hohlraum befindet sich die Pulpa. Außerdem sind im Enamel beider Zähne Fissuren zu erkennen (rote Pfeile). Der Riss im fluorotischen Zahn (blauer Pfeil) ist wahrscheinlich durch die Präparation entstanden. Die Streifen in der Darstellung des gesunden Zahns sind durch die Darstellung entstandene Artefakte.

der Voxelzahl für Dentin und Enamel nicht vergleichbar. In einer Studie von Fearne et al. wurde die Mineralisation der Zähne von Kindern mit Hypomineralisation durch ein geringes Geburtsgewicht und der Zähne von gesunden Kindern verglichen. Dazu wurde *digital backscattered electron imaging* und Mikrocomputertomographie angewendet. Hier konnte gezeigt werden, dass Hypomineralisation zu unterschiedlichen Mineraldichten und so zu unterschiedlicher Absorption führt.^[229]

Ein in der Literatur^[187] vermuteter Unterschied der Mineralisationsdichte bei fluorotischen Zähnen konnte hier nicht bestätigt werden.

Durch diese Studie konnte dennoch gezeigt werden, dass auch für große Proben mit einem sehr hohen Mineralgehalt, also auch einer sehr hohen Absorption diese Methode sehr gute Ergebnisse liefert. Komplette Rattenzähne wurden in

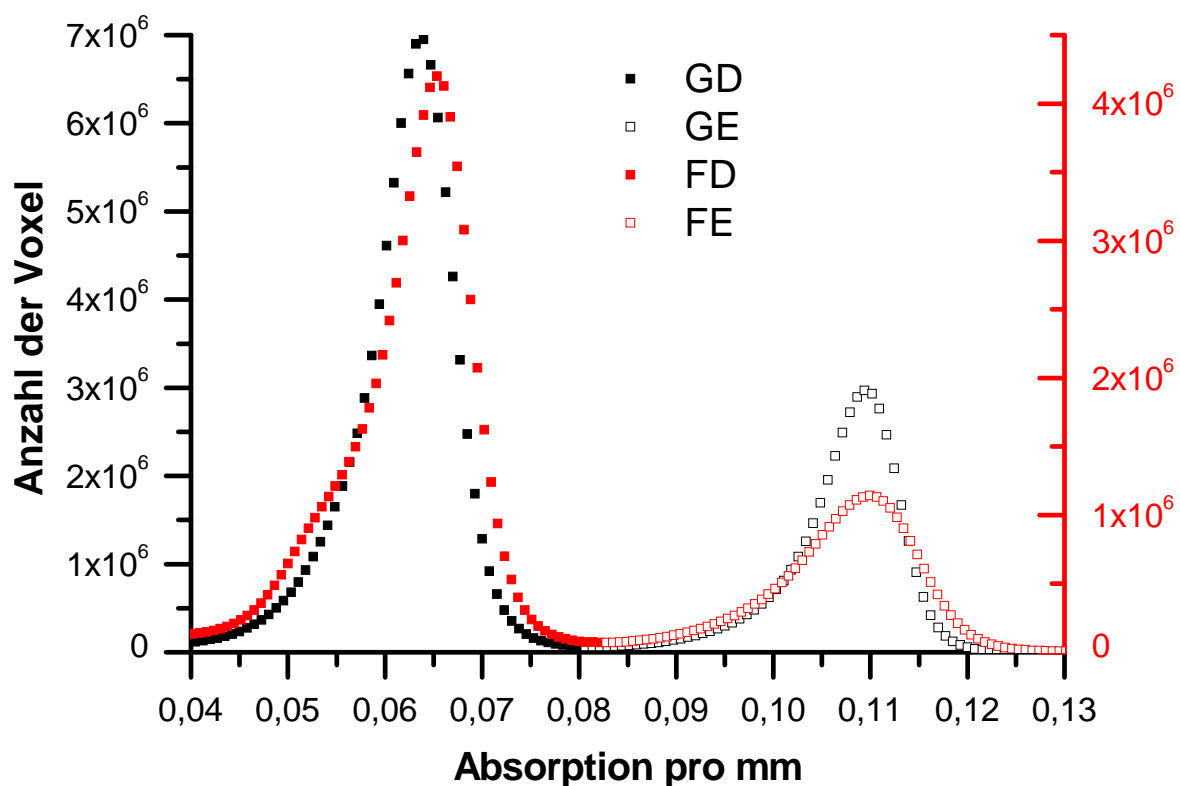


Abbildung 4.1.5-7: SRμCT-Histogramm des Enamels (xE) und Dentins (xD) des gesunden (Gx) bzw. des fluorotischen Zahns (Fx)).

der Literatur beschrieben,^[230] ansonsten findet man meist nur Studien bei denen kleinere Zahnschnitte untersucht wurden.^[231-233] Dort besteht wieder der Nachteil, dass beim Schneiden des Zahnes Präparationsartefakte entstehen können. Ein Vorteil ist allerdings die höhere Auflösung (1,5 µm), die durch eine kleinere Probe erreicht werden kann.^[231]

4.2 Calciumcarbonat

4.2.1 Isopoden

Mit der Bezeichnung Isopoda wird eine Ordnung von Tieren beschrieben, die zur Unterklasse der höheren Krebse (Malacostraca) gehören. Die übergeordnete Einordnung sind die Klasse Crustacea und der Stamm Gliederfüßer (Arthropoda). In ihr sind 80 % aller tierischen Lebensformen, wie unter anderem Insekten, Spinnen, Skorpione oder Tausendfüßer, eingeordnet. Gliederfüßer leben in nahezu allen Lebensräumen, von den Polen bis in Wüsten, von Gebirgsgipfeln bis tief in den Ozean, sogar unterirdisch oder in anderen Lebewesen. Die Arthropoden entwickelten sich im Kambrium vor mehr als 500 Millionen Jahren. Im Laufe der Zeit entwickelten sich viele Taxa, von denen einige auch schon wieder ausgestorben sind, wie beispielsweise die Trilobiten. Auf Grund von Fossilien wird vermutet, dass der Stamm der Euthycarcinoiden die ersten Lebewesen waren, die an Land lebten.^[89]

In der Unterklasse Malacostraca finden sich 75 % aller Crustaceaen. Neben den Isopoden (Asseln) sind in dieser Gruppe Flohkrebse und die bekannten dekapoden Krebse mit den Krabben, Hummern und Langusten eingeordnet.

Von den Isopoden leben 3600 Arten an Land und 5400 im Wasser.^[234]

Abbildung 4.2.1-1 zeigt eine SR μ CT-Aufnahme von *Porcellio scaber*. Bei dieser Aufnahme sind nur die mineralisierten Teile des Integuments abgebildet. Es ist die Mineralisation des Kopfes (H) mit dem zweiten Paar Antennen (A2), der Thoraxsegmente (1-7), des Pleons (P), der Pereiopoden (PP) und der uropoden Exopodite (UE) zu sehen. Auch die Augen (E) und die Tuberkel (Pfeile) sind gut mineralisiert.^[118] *Porcellio scaber* spielt in der Biomineralisation eine wichtige Rolle als Modellorganismus, der überwiegend

Calciumcarbonat (Calcit und amorphes Calciumcarbonat) in das Exoskelett einbaut.^[7,235]

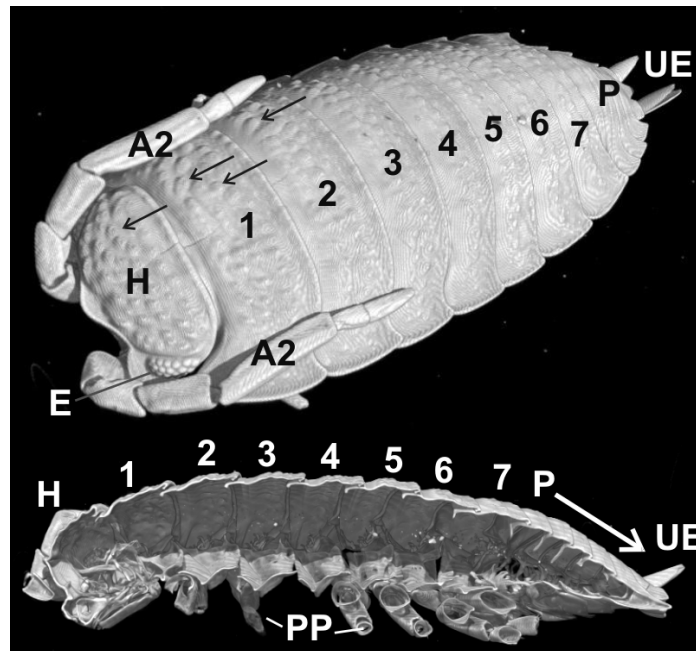


Abbildung 4.2.1-1: SR μ CT-Überblick über *P. scaber* (oben) und ein virtueller Schnitt durch das Tier (unten).

4.2.1.1 Häutung von Isopoden

Isopoden haben wie alle Arthropoden ein Exoskelett (Kutikula). Dieses hat den Nachteil, dass es nicht mit dem Tier wachsen kann. Um diesen Nachteil auszugleichen, wirft das Tier periodisch die Kutikula ab und bildet eine größere. Diesen Vorgang nennt man Häutung (Ecdysis). Sie beginnt durch die Bildung einer neuen Epikutikula durch die Ablösung der alten Kutikula von den Epidermiszellen und die Bildung einer neuen Epikutikula durch diese Zellen.^[89] Die Epikutikula stellt später die äußerste Schicht dar. Sie erhält durch einen hohen Anteil an Lipiden eine wachsartige Beschaffenheit und scheint so den Wasserverlust zu verhindern. Sie hat einen geringen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. Nach ihrer Bildung beginnen Enzyme mit dem Abbau der alten Kutikula. Schon während des Abbaus beginnen Epidermiszellen mit der Bildung einer Prokutikula, welche aus Chitin und einer Proteinmatrix

besteht. In diese wird später das Mineral, welches für die mechanische Stabilität sorgt, eingelagert. Der Abbau eines Teiles der alten Kutikula erfolgt über Poren in der neu gebildeten Kutikula. Nach dem die weitestgehend abgebaute Kutikula abgeworfen wurde, beginnt das Tier durch die Aufnahme von Wasser anzuschwellen und so die neue noch elastische Kutikula zu weiten. Die Volumenänderung und die Änderungen der Zusammensetzung der Hämolymphe während der Häutung wurde von Ziegler et al. bei *Ligia pallasii* untersucht.^[236]

Bei Isopoden kann die Häutung in zwei Abschnitte geteilt werden. Im ersten Abschnitt wird der hintere Teil (posterior) und anschließend der vordere Teil (anterior) abgestreift.^[237]

Durch den Abwurf der alten Hülle verliert das Tier das dort eingelagerte Calcium. Für Tiere in marinen Lebensräumen stellt dies kein Problem dar, da im Seewasser genügend Calcium gelöst vorliegt.^[238] Terrestrische Isopoden, die unabhängig von aquatischen Lebensräumen sind, können Calcium nur mit der Nahrung aufnehmen und müssen daher mit Calcium haushalten. Aus diesem Grund wird vor der Häutung ein Teil des Calciumcarbonats der alten Kutikula resorbiert, gelagert und zum Aufbau der neuen Kutikula verwendet.^[239] Der Fluss des Calciums während der Häutung ist für *Porcellio scaber*, *Oniscus asellus* und *Ligia hawaiiensis* gut untersucht.^[237,240-244] Abbildung 4.2.1-2 zeigt dies schematisch.

Die Vorbereitungen für die Häutung beginnen etwa eine Woche vor dem Abwurf der posterioren Kutikula mit dem Lösen des dortigen Calciumcarbonats (Premoult Phase). Es wird anschließend zwischen dem anterioren sternalen Epithel (ASE) und der „alten“ Kutikula (C) der ersten vier Sternite gelagert (CaD; Abbildung 4.2.1-3). Die Lage der sternalen Kalkspeicher von *Porcellio scaber* ist auch in Abbildung 4.2.1-4 zu sehen. Die SR μ CT Aufnahmen zeigen Tiere in der intermoult (A, B) und premoult Phase (C, D). In den Teilen B und D

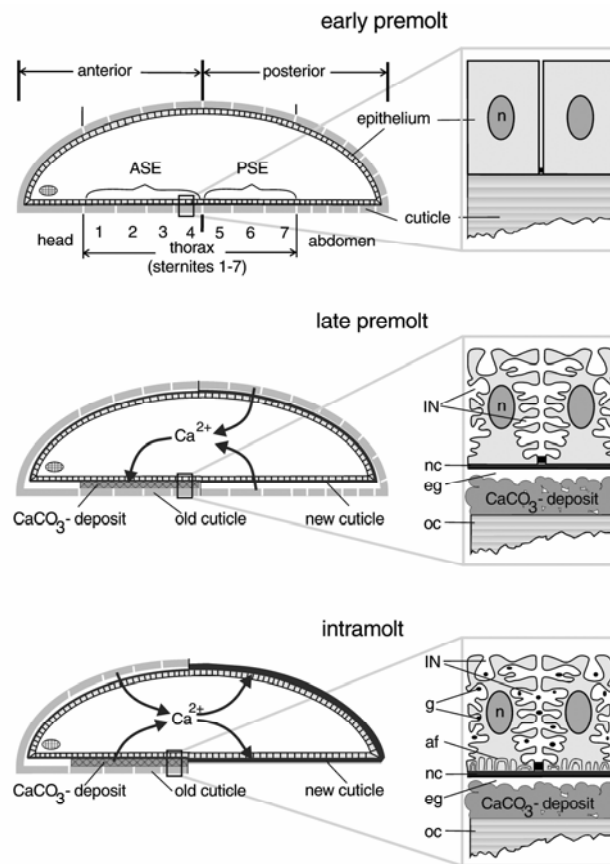


Abbildung 4.2.1-2: Darstellung des Calciumflusses während der Häutungsphasen.^[118]

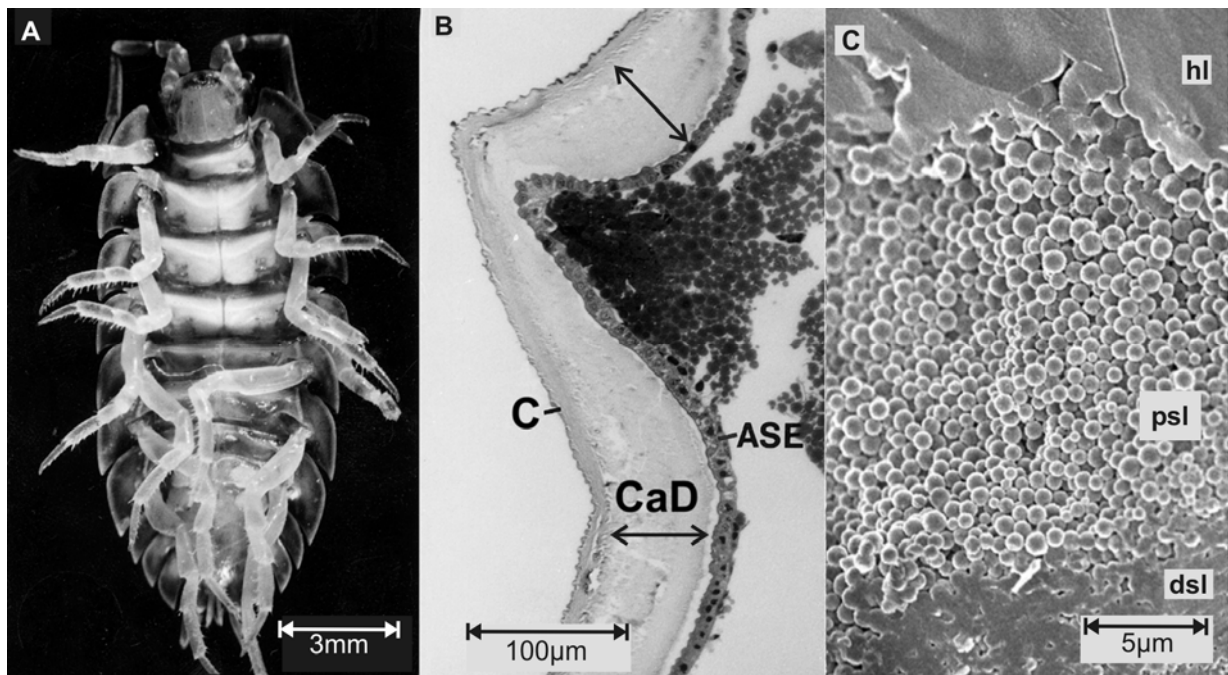


Abbildung 4.2.1-3: REM Aufnahmen von *P. scaber*. A: Position der sternalen Calciumcarbonat Lager. B: Sagittaler Schnitt durch ein anteriores Sternit. C: Struktur des Calciumcarbonats im sternalen Lager.^[118]

wurden die schwächer absorbierenden Gewebsschichten ausgeblendet und so die sternalen Lager sichtbar gemacht, die während der premoult Phase gebildet wurden. Die Position der Lager variieren in der Gruppe der Arthropoden,^[245-248] wobei die meisten terrestrischen Isopoden Calciumcarbonat auf diese Art während der Häutung lagern.^[237,249-251] Strukturell können innerhalb der sternalen Kalkspeicher drei Schichten unterschieden werden. Innen am anterioren sternalen Epithel befindet sich eine homogene Schicht (hl), in der Mitte eine Schicht aus Kugeln (psl) und außen an der alten Kutikula eine Schicht von verschmolzenen Kugeln (dsl). Das Calciumcarbonat liegt hier amorph vor (ACC). EXAFS Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Nahordnung vorhanden ist, die dem Calcit ähnelt.^[38] Daraus resultiert eine die höhere Löslichkeit von ACC im Vergleich zu den kristallinen Phasen.^[252] Durch die vergrößerte Oberfläche, resultierend aus der Speicherung in Kugelform, wird der Lösevorgang beschleunigt.^[253,254] Aus diesen Gründen wird ACC in Organismen oft als Speicherform des Calciumcarbonats verwendet.^[38,87,253,255-257] Auf- und Abbau der sternalen Kalkspeicher erfolgt über das anteriore sternale Epithel, dessen Zellen sich während der Häutung zu Transportepithelzellen differenzieren.^[242,258] Dabei wird während des Aufbaus der Kalkspeicher die Oberfläche der basolateralen Plasmamembran durch ein Netzwerk interstitieller Kanäle (IN; Abbildung 4.2.1-2) vergrößert. Während der Resorption der Kalkspeicher wird zusätzlich auch die apikale Plasmamembran durch zahlreiche Einfaltungen vergrößert.^[258-261] Prinzipiell kann der Transport sowohl parazellulär als auch transzellulär erfolgen. Eine Erhöhung des zellulären Calciumgehaltes und eine vermehrte Expression der Gene, die für die calciumtransportierenden Mechanismen nötig sind, wie beispielsweise die der Calcium-ATPase und des Calcium/Natrium Austauschers deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil des Transports transzellulär verläuft.^[262-267]

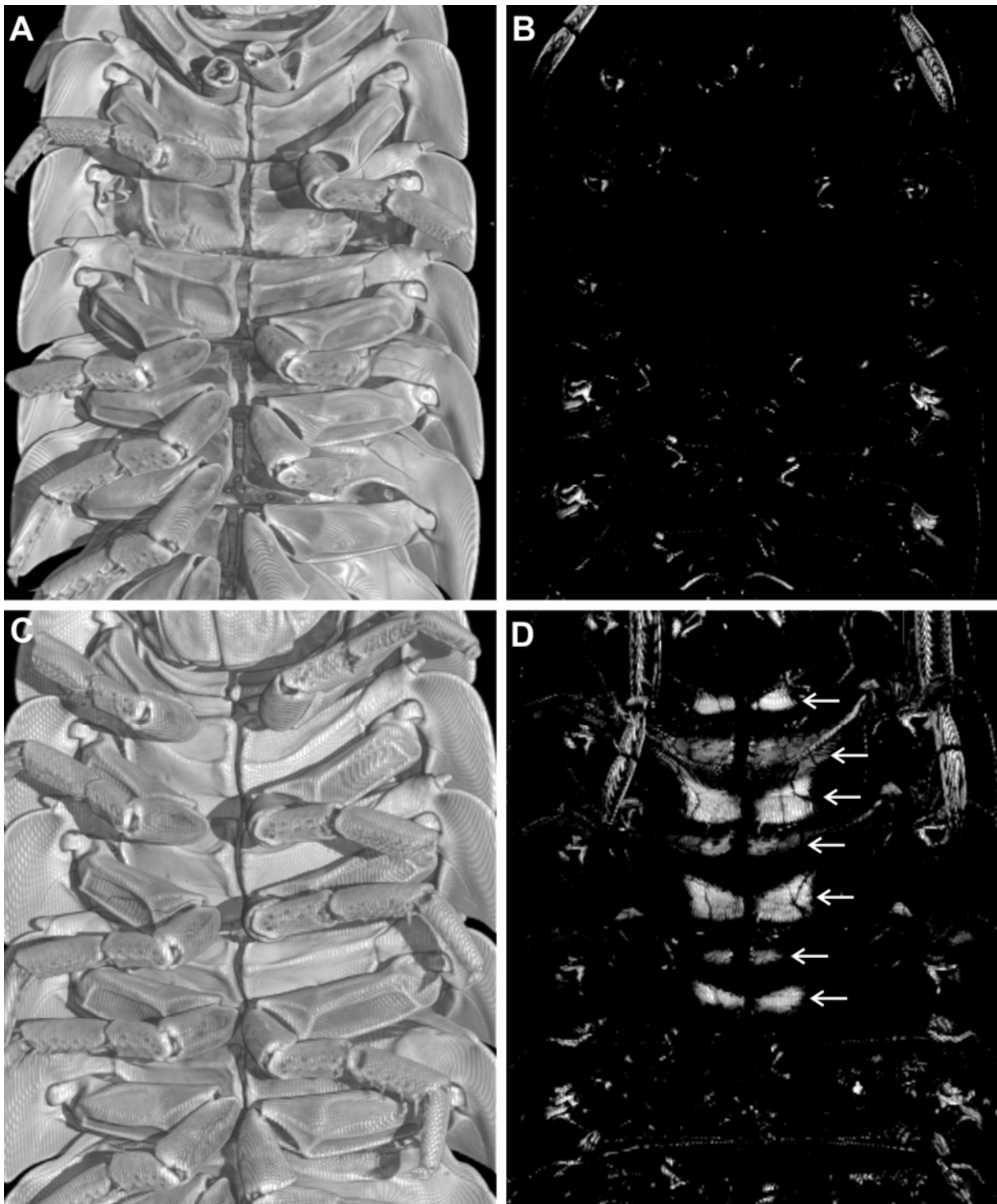


Abbildung 4.2.1-4: SR μ CT von *P. scaber* mit Blick auf die ventrale Seite. A+B Intermoult-Phase; C+D Premoult-Phase mit ACC-Speichern in den Sterniten (Pfeile).

Die Zeit vom Abwurf der posterioren Kutikula bis zum Abwurf der anterioren Kutikula wird intramoult-Phase genannt. In dieser Phase, die ungefähr einen Tag dauert, werden die sternalen Speicher und die anteriore Kutikula demineralisiert und mit diesem Material die neue posteriore Kutikula mineralisiert.

Um Calciumcarbonatreste in den abgeworfenen Teilen (Exuvie) nutzen zu können, fressen die Tiere diese auf. So steht dann auch genügend Mineral zur Verfügung, um die neue anteriore Kutikula zu mineralisieren.

Diesen Vorgang durchleben die Tiere in regelmäßigen Abständen, *Porcellio scaber* beispielsweise häutet sich alle sechs Wochen. Der Zeitraum zwischen zwei Häutungsabschnitten nennt sich intermoult-Phase.^[268] Bei einer Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren^[269] würde sich ein Tier also etwa 15-25 Mal Häuten.

4.2.1.2 Untersuchung der Kutikula von *Porcellio scaber* während der Häutung

Um das Verständnis über die Häutung von Isopoden zu erweitern, wird hier die Mineralisierung der Kutikula von *Porcellio scaber* zu verschiedenen Zeitpunkten während der Häutung untersucht. Dazu wurden quantitative Röntgenpulverdiffraktometrie, Atomabsorptionsspektroskopie und Mikrocomputertomographie angewendet. Die Kutikula der Tiere wurden von Dr. A. Ziegler (Universität Ulm) gesammelt. Dabei wurden die Tergite mehrerer Tiere einer Phase vereint.

Mit den Daten der Pulverdiffraktometrie wurde eine Rietveldverfeinerung durchgeführt. Ein typisches Diffraktogramm ist in Abbildung 4.2.1-5 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind die gemessenen Daten (Kreise) und die berechneten Daten (Linie) zu sehen. Die Differenz zwischen den beiden ist im unteren Teil abgebildet. Zusätzlich sind dazwischen noch die Reflexpositionen

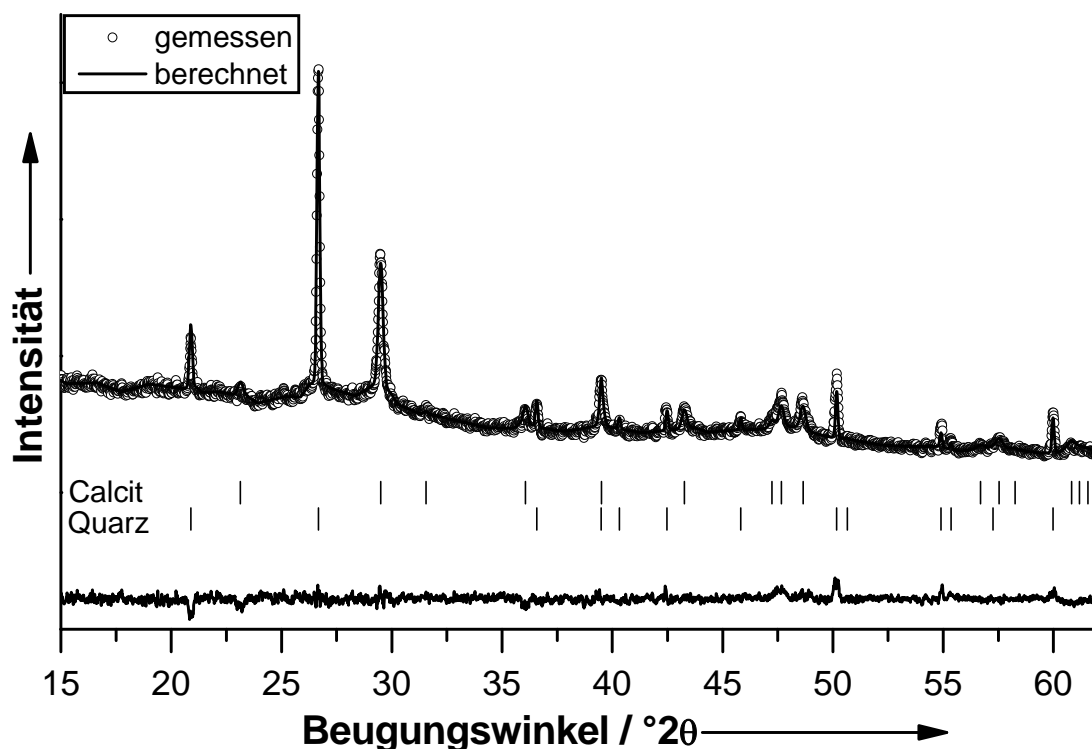


Abbildung 4.2.1-5: Diffraktogramm nach der Rietveldverfeinerung der posterioren Kutikula in der späten premoult-Phase.

von Quarz und Calcit. Da in der Probe noch ACC erwartet wird, sollte noch ein Halo (durch amorphes Material) zu sehen sein. Dieser ist hier nicht zu erkennen, da zu der Probe noch hochkristalliner Quarz zugegeben wurde und die Signale des Quarzes viel intensiver sind als der Halo.

Für die quantitative Pulverdiffraktometrie wurde ein Teil der Probe vor der Messung mit einer bestimmten Menge Quarz vermischt. Die Rietveldverfeinerung (RV) der Daten liefert den Phasenanteil zwischen Quarz und Magnesium-Calcit der Mischung. Daraus lässt sich die Masse des kristallinen Magnesium-Calcits in der Mischung berechnen.

Formel 4.2.1-1

$$m(\text{Mg - Calcit}) = \frac{m(\text{Quarz}) \cdot w(\text{Mg - Calcit, RV})}{w(\text{Quarz, RV})}$$

$m(\text{Quarz})$	Quarzeinwaage zur Mischung in mg
$w(\text{Quarz, RV})$	Anteil von Quarz in der Mischung in Gew.-%
$w(\text{Mg-Calcit, RV})$	Anteil von Magnesium-Calcit in der Mischung in Gew.-%
$m(\text{Mg-Calcit})$	Masse des Magnesium-Calcits in der Mischung in mg

Mit der Probeneinwaage zur Mischung kann nun der Anteil von Magnesium-Calcit in der Probe bestimmt werden.

Formel 4.2.1-2

$$w(\text{Mg - Calcit}) = \frac{m(\text{Mg - Calcit}) \cdot 100 \%}{m(\text{Probe})}$$

$m(\text{Probe})$	Einwaage der Kutikula zur Mischung in mg
$w(\text{Mg-Calcit})$	Anteil von Magnesium-Calcit in der Probe in Gew.-%

Die zweite Information, die die Rietveldanalyse in Kombination mit der Methode nach Goldsmith^[111] liefert, ist der Gehalt von Magnesium im Mg-Calcit. Mit diesen Informationen kann die molare Masse von Magnesium-Calcit errechnet werden.

Formel 4.2.1-3

$$M(\text{Mg - Calcit}) = \frac{(100 \% - x) \cdot 100,0872 + x \cdot 84,3412}{100 \%}$$

x Gehalt von Magnesium im Mg-Calcit in mol%

$M(\text{Mg-Calcit})$ Molare Masse von Magnesium-Calcit in g mol^{-1}

mit $M(\text{CaCO}_3) = 100,0872 \text{ g mol}^{-1}$ und $M(\text{MgCO}_3) = 84,3412 \text{ g mol}^{-1}$.

Nun kann der Magnesiumgehalt im Magnesium-Calcit errechnet werden.

Formel 4.2.1-4

$$w(\text{Mg in Mg - Calcit}) = \frac{x \cdot 24,305}{M(\text{Mg - Calcite})}$$

$w(\text{Mg in Mg-Calcit})$ Magnesiumgehalt im Magnesium-Calcit bezogen auf Magnesium-Calcit in Gew.-%

mit $M(\text{Mg}) = 24,305 \text{ g mol}^{-1}$

So kann weiterhin die Konzentration des Magnesiums, welches im Calcit gebunden ist, bezogen auf die gesamte Probe bestimmt werden.

Formel 4.2.1-5

$$w(\text{Mg aus Mg - Calcit}) = \frac{w(\text{Mg - Calcit}) \cdot w(\text{Mg in Mg - Calcit})}{100 \%}$$

$w(\text{Mg aus Calcit})$ Im Magnesium-Calcit gebundenes Magnesium
bezogen auf die gesamte Probe in Gew.-%

Die Atomabsorptionsspektroskopie liefert den Calciumgehalt der Probe. Studien von Becker et al. haben gezeigt, dass die Kutikula auch amorphes Calciumphosphat enthält.^[7] Aus diesem Grund müsste der Calciumcarbonatgehalt durch eine thermogravimetrische Analyse bestimmt werden, was leider durch die sehr geringe Probenmenge (<10 mg) hier nicht möglich war. Es wird daher der Gehalt an Calciumcarbonat in der Probe mit Hilfe des Calciumgehaltes bestimmt.

Formel 4.2.1-6

$$w(\text{CaCO}_3) = \frac{w(\text{Ca}) \cdot 100,0872}{40,078}$$

$w(\text{Ca})$ Calciumgehalt der Probe in Gew.-%

$w(\text{CaCO}_3)$ Calciumcarbonatgehalt in der Probe in Gew.-%

mit $M(\text{CaCO}_3) = 100,0872 \text{ g mol}^{-1}$ und $M(\text{Ca}) = 40,078 \text{ g mol}^{-1}$.

Der Gehalt von ACC kann anschließend durch Subtraktion des Gehaltes von Magnesium-Calcit vom Gesamtgehalt von Calciumcarbonat bestimmt werden.

Formel 4.2.1-7

$$w(\text{ACC}) = w(\text{CaCO}_3) - w(\text{Mg - Calcit})$$

$w(\text{ACC})$ ACC-Gehalt in der Probe in Gew.-%

Tabelle 4.2.1-1 zeigt die Zusammensetzung der anterioren und posterioren Kutikula während der Häutung. Die Berechnung der Zusammensetzung der Kutikula ist hier allerdings mit Fehlern behaftet. Zum Einen wird der Anteil des in ACP gebundenen Calciums vernachlässigt, so dass der Gesamtgehalt von Calciumcarbonat geringer ist als berechnet. So ist der Anteil von ACC in Wirklichkeit etwas geringer. Wie bereits erwähnt sind auf Grund der geringen Probemengen keine weiteren Analysen möglich. Des Weiteren enthält die Kutikula einen geringen Magnesiumanteil (ca. 0,5 %), von dem ungefähr 0,1 % im Mg-Calcit gebunden ist. Dadurch wird wieder etwas Calcium frei, welches im Calcit durch Magnesium substituiert wird. Dieses würde den berechneten Anteil von ACC geringfügig erhöhen. Da der Effekt durch den ACP-Gehalt größer ist, fällt der ACC-Gehalt insgesamt um geschätzte 5 % geringer aus als berechnet. Da aber im weiteren Verlauf das Verhältnis von ACC zu Calcit diskutiert wird und die Bestimmung des Calcits sich durch die Annahmen nicht verändert, ändern sich zwar die Absolut-Verhältnisse, aber der grundsätzliche Verlauf während der Häutung bleibt unverändert.

In den Abbildungen 4.2.1-6 und 4.2.1-7 wird das Verhältnis von ACC zu Calcit des anterioren und des posterioren Teils während der Häutung dargestellt. Zu Beginn (bis zum Abwurf der posterioren Kutikula) ist eine Zunahme in der anterioren Kutikula zu sehen, da in dieser Phase ein Transfer von Calciumcarbonat von posterior nach anterior stattfindet (1-2). Analog dazu ist eine Abnahme posterior (A-C) zu sehen. Mit dem Abwurf der posterioren Kutikula wird ACC von anterior nach posterior transportiert, um die neue Kutikula zu mineralisieren. Aus diesem Grund ist für die anteriore Kutikula eine Abnahme des Verhältnisses bis zu ihrem Abwurf zu sehen (3-5). Die neue posteriore Kutikula enthält viel neu eingelagertes ACC (D), welches nach dem Abwurf der anterioren Kutikula teilweise zurück transportiert wird, um die neue Kutikula zu mineralisieren (E). Durch das Fressen der Exuvie (abgeworfene Kutikula) steht weiteres Calciumcarbonat zur Verfügung, welches sowohl

anterior als auch posterior als ACC eingelagert wird (6-7, F). Durch eine Phasenumwandlung von ACC zu Calcit verkleinert sich das Verhältnis von ACC zu Calcit wieder und erreicht 2 Tage nach dem Abwurf der anterioren Kutikula wieder ungefähr den Ausgangswert (8, G-H).

Tabelle 4.2.1-1: Zusammensetzung der Kutikula von *P. scaber* während der Häutung. Angegeben ist jeweils der Massenanteil w in Gew.-% (bezogen auf die Feuchtmasse). Die Spalte „Teil“ gibt an, ob es sich um den anterioren oder posterioren Abschnitt handelt.

Phase	Teil	Ca	Mg	Mg in Mg-Calcit	Mg nicht in Mg-Calcit	CaCO ₃	krist. Mg-Calcit	ACC	ACC / Calcit $w:w$
frühe Premoult	ant	18,9	0,6	0,1	0,5	47,3	19,0	28,3	1,5
	post	20,0	0,6	0,1	0,5	49,9	21,1	28,8	1,4
späte Premoult	ant	21,6	0,7	0,1	0,6	53,9	17,7	36,2	2,0
	post	21,7	0,6	0,2	0,4	54,1	35,2	18,9	0,5
Häutung posterior	ant	21,0	0,6	0,1	0,5	52,5	19,6	32,9	1,7
Exuvie posterior	post	25,5	0,6	0,1	0,5	63,7	45,8	17,9	0,4
Intramoult	ant	21,0	0,6	0,1	0,5	52,5	29,3	23,2	0,8
	post	23,1	0,6	0,1	0,5	57,6	18,9	38,7	2,1
Exuvie anterior	ant	25,3	0,7	0,1	0,6	63,3	38,3	25,0	0,7
Häutung anterior	post	21,8	0,6	0,1	0,5	54,5	24,0	30,5	1,3
frühe Postmoult	ant	24,0	0,6	0,1	0,5	60,0	20,6	39,4	1,9
	post	22,0	0,5	0,1	0,4	54,9	16,3	38,6	2,4
1 Tag nach der Häutung	ant	22,5	0,6	0,1	0,5	56,2	15,6	40,6	2,6
	post	24,3	0,5	0,1	0,4	60,7	19,5	41,2	2,1
2 Tage nach der Häutung	ant	21,1	0,5	0,1	0,4	52,7	22,9	29,8	1,3
	post	21,8	0,5	0,1	0,4	54,5	20,8	33,7	1,6

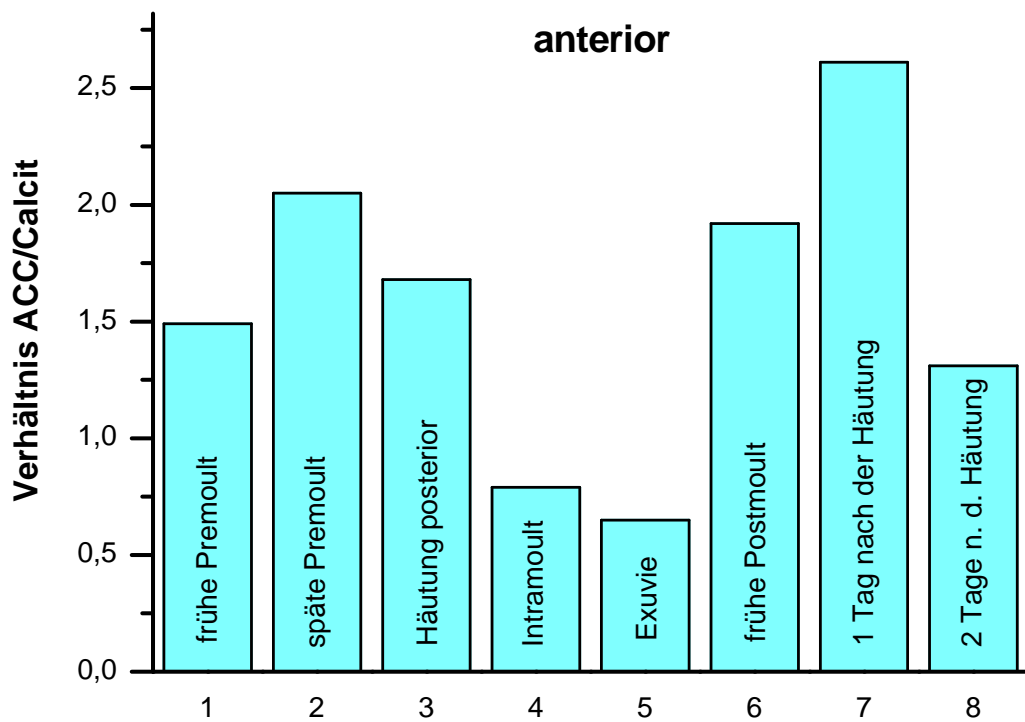


Abbildung 4.2.1-6: Veränderung des ACC/Calcit-Verhältnisses in der anterioren Kutikula während der Häutung.

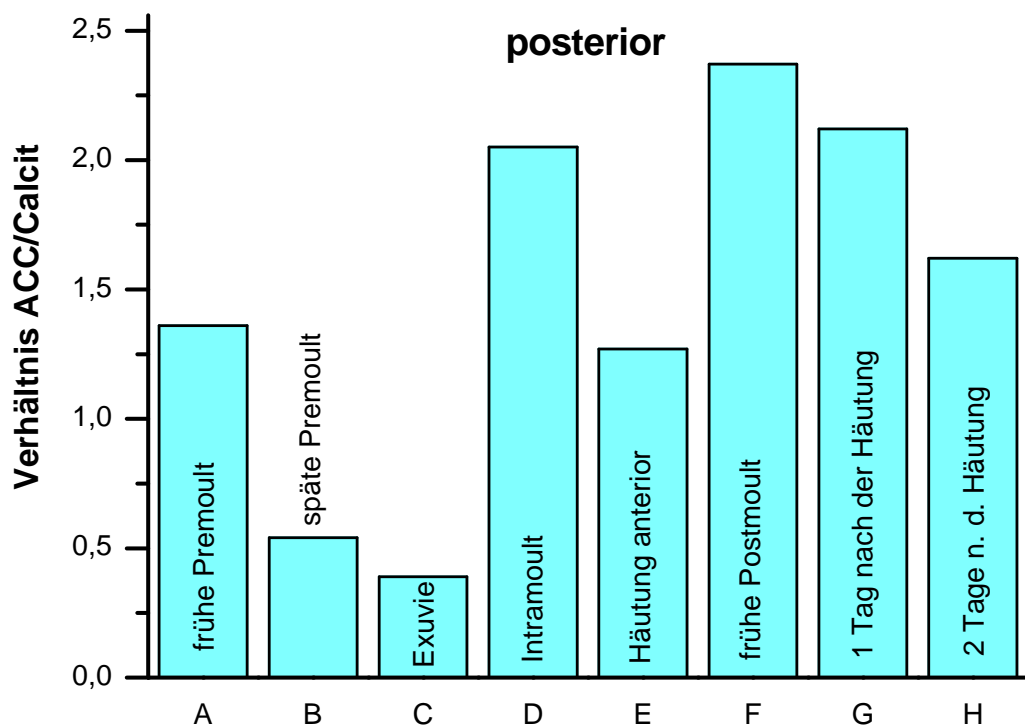


Abbildung 4.2.1-7: Veränderung des ACC/Calcit-Verhältnisses in der posterioren Kutikula während der Häutung.

Die SR μ CT Aufnahmen von *P. scaber* (fixiert von Dr. A. Ziegler) wurden bei einer Energie von 19 keV erstellt. Dabei mussten auf Grund der Länge (5,5-7 mm) der Tiere 3-4 Höhenstufen aufgenommen werden. Die Voxelkantenlänge nach der Rekonstruktion betrug 3,28 μ m. Es wurden Tiere in sieben verschiedenen Phasen des Häutungsprozesses sowie die abgeworfene Kutikula (Exuvie) untersucht. Abbildung 4.2.1-8 zeigt die Aufnahmen von Asseln kurz nach dem Abwurf der posterioren (A, B) beziehungsweise anterioren (C, D) Kutikula als Übersicht (A, C) und als Schnitt (B, D) durch das Tier. Man sieht deutlich, dass die frisch gehäutete Hälfte des Tieres noch nicht wieder mineralisiert ist. Dennoch sind diese Teile schwach zu sehen, da die Epikutikula eine höhere Abschwächung der Röntgenstrahlung als die Organe bewirkt und so eine entsprechende Darstellung gewählt werden kann. Des Weiteren sind die gefüllten sternalen Kalkspeicher (gelber Pfeil) zu sehen. Wie bereits erwähnt, fressen die Tiere ihre abgeworfene Kutikula wieder auf, um das verlorene Calciumcarbonat wieder verwerten zu können. In Abbildung 4.2.1-8 B und C sieht man das Calciumcarbonat der posterioren Kutikula im Darm des Tieres (roter Pfeil). Außerdem sind die Mitteldarmdrüsen (Hepatopancreas) zu sehen (blauer Pfeil). Ihr Gewebe zeigt eine höhere Abschwächung, da sie vermutlich das Calciumcarbonat vom Darm in den Körper transportieren. Diese Funktion wurde bereits für *Ligia italica* nachgewiesen.^[270]

Die abgeworfenen Exuvien der in Abbildung 4.2.1-8 gezeigten Tiere sind in Abbildung 4.2.1-9 zu sehen. Es fällt auf, dass die dorsale Seite immer noch mineralisiert ist, während die ventrale Seite posterior vollständig und anterior fast vollständig abgebaut wurde.

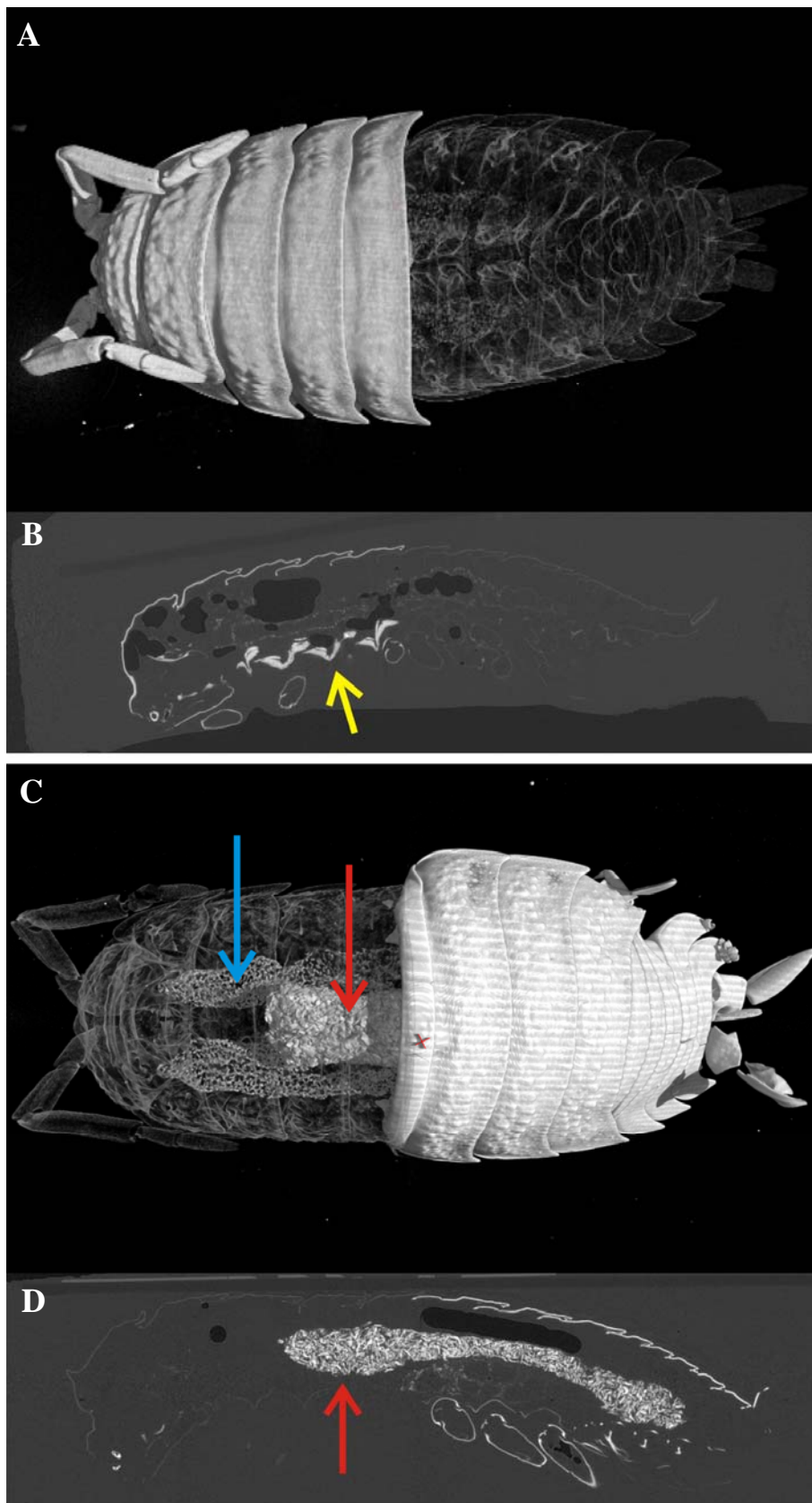


Abbildung 4.2.1-8: SR μ CT Aufnahmen kurz nach dem Abwurf der posterioren (A, B) beziehungsweise anterioren Kutikula (C, D).

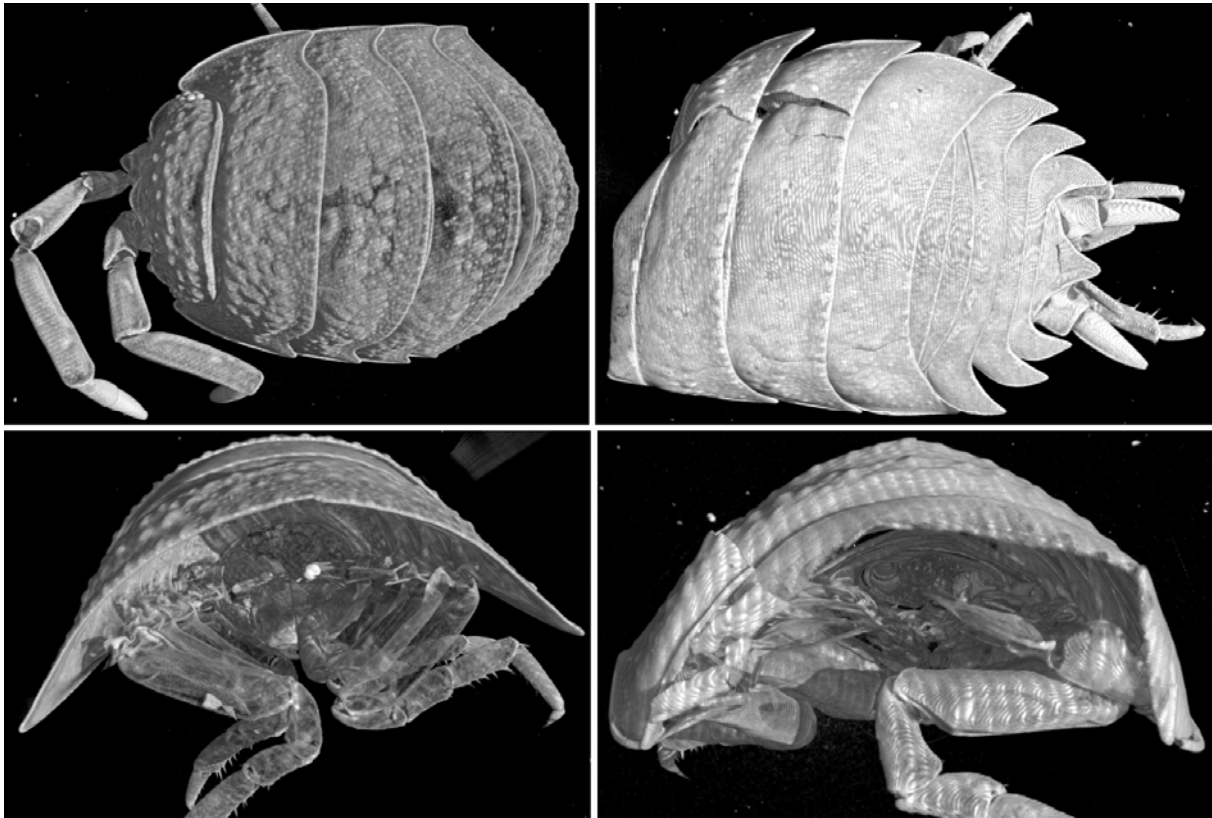


Abbildung 4.2.1-9: SR μ CT-Aufnahmen der anterioren (links) und posterioren Exuvie (rechts) von oben (oben) und in die Exuvie (unten).

In den SR μ CT-Datensätzen ist die Abschwächung der Röntgenstrahlung jedes Voxels als Absorption pro Millimeter angegeben. Die Kutikula der Tiere liegt im Bereich von 0,25 bis 0,80. Die Anzahl der Voxel (n) dieses Bereiches wurde jeweils für die anteriore und posteriore Hälfte sowie die Exuvien ermittelt. Die Trennung der anterioren und posterioren Hälfte wurde an der Grenze zwischen dem vierten und fünften Sternit durchgeführt.

Formel 4.2.1-8
$$n_{ges} = \sum_{i=0,25}^{0,80} n_{(i)}$$

Aus der Summe der Voxel (n_{ges}) für die Körperhälften kann mit Hilfe der Voxelkantenlänge dann das anteriore $V(A)$ und posteriore Volumen $V(P)$ der Kutikula bestimmt werden. Es wird für jedes Tier daraus der Volumenanteil, $w(A)$ bzw. $w(P)$ der anterioren und posterioren Hälfte berechnet.

Formel 4.2.1-9

$$w(A) = \frac{V(A)}{V(A) + V(P)}$$

Im Folgenden wird versucht, die Dicke der Kutikula der Tiere zu vergleichen. Dazu wurde die Länge, Breite und Höhe der Tiere gemessen. Mit der Annahme, dass die Assel ein in der xy-Ebene geteilter Ellipsoid (Abbildung 4.2.1-10) ist, kann das Gesamtvolumen der Tiere abgeschätzt werden. Dabei entspricht die Länge L dem Durchmesser in x-Richtung und die Breite B dem Durchmesser in y-Richtung. Da angenommen wurde, dass die Form der Assel einem Ellipsoiden entspricht, welcher in der xy-Ebene geteilt wurde, entspricht die Höhe H dem Radius in z-Richtung.

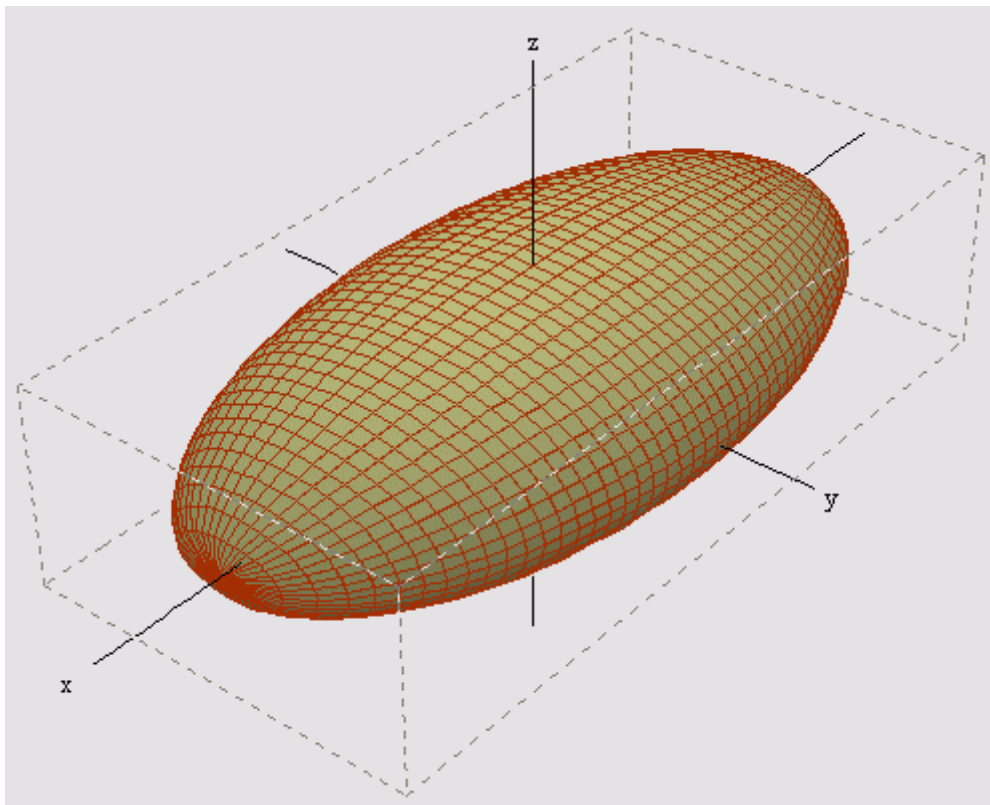


Abbildung 4.2.1-10: Darstellung eines Ellipsoids. *P. Scaber* hat näherungsweise die Form eines in der xy-Ebene geteilten Ellipsoiden. (www.wikipedia.de)

$$\text{Formel 4.2.1-10} \quad V_{Assel} = V_{Ellipsoid} / 2 = \left(\frac{4}{3} \pi \cdot \frac{L}{2} \cdot \frac{B}{2} \cdot H \right) / 2 = \frac{1}{6} \pi LBH$$

Nimmt man nun eine gleichmäßige Verteilung der Kutikula um den Asselkörper an, kann man eine Formel für das innere Volumen des Tieres aufstellen. Da die Dicke d sehr viel kleiner als Höhe, Breite und Länge des Tieres ist, können Terme mit d^2 und d^3 näherungsweise gleich Null gesetzt werden.

Formel 4.2.1-11

$$\begin{aligned} V_{innen} &= \frac{1}{6} \pi (L - 2d)(B - 2d)(H - 2d) \\ &= \frac{1}{6} \pi LBH - \frac{1}{6} \pi (LB + LH + HB) 2d + \frac{1}{6} \pi (L + B + H) 4d^2 - 8d^3 \\ &\quad \text{mit } d^2 = 0 \text{ und } d^3 = 0 \\ &= \frac{1}{6} \pi LBH - \frac{1}{3} \pi (LB + LH + HB) d \end{aligned}$$

Das Volumen der Kutikula berechnet sich aus der Differenz vom Asselvolumen und innerem Volumen.

Formel 4.2.1-12

$$\begin{aligned} V_{Kutikula} &= V_{Assel} - V_{innen} \\ &= \frac{1}{3} \pi (LB + LH + HB) d \end{aligned}$$

Durch Umstellen erhält man eine Formel zur Berechnung der Dicke.

$$\text{Formel 4.2.1-13} \quad d = \frac{3 \cdot V_{Kutikula}}{\pi (LB + LH + HB)}$$

Tabelle 4.2.1-2 zeigt das Volumen der Kutikula sowie den Anteil der entsprechenden Teile an der gesamten Kutikula und die Abmessungen der Tiere einschließlich der berechneten Dicken der Kutikula. Die berechnete Dicke der Kutikula stimmt recht gut mit Einzelmessungen in den SR μ CT-Daten überein, Die Einzelmessungen weichen um $\pm 7 \mu\text{m}$ von der berechneten Dicke ab. Dabei lassen sich einige Stellen finden, deren Dicke größer ist. Eine Mittelwertbildung mittels Einzelmessungen ist durch die unregelmäßige Dicke der Kutikula, wie beispielsweise bei Tuberkeln (Pfeile in Abbildung 4.2.1-1) oder sternalen Lagern, sehr schwierig.

In Abbildung 4.2.1-11 wird der Volumenanteil der anterioren und posterioren Kutikula während der Häutung verglichen. Dabei wurde der Anteil der Exuvie zum zugehörigen Teil addiert. Wir sehen hier eine Zunahme des Anteils für die anteriore Kutikula bis zur posterioren Häutung. Von da an nimmt der Anteil ab, bis die anteriore Kutikula selbst abgeworfen wird (Häutung anterior). Einen Tag nach der Häutung entspricht der Anteil der anterioren Kutikula ungefähr dem Anteil zu Beginn der Häutung. Diese Ergebnisse deuten auf die vermutete Verschiebung der des Minerals zwischen der anterioren und posterioren Kutikula hin. Dabei wird die Kutikula nicht vollständig demineralisiert. In den Exuvien findet sich immer noch ein Mineralanteil von 20 %.

In Abbildung 4.2.1-12 wurde die berechnete Dicke der Kutikula gegen das Volumen des Tieres aufgetragen. Es ist eine dickere Kutikula bei größeren Tieren zu erkennen. Man kann einen linearen Zusammenhang vermuten. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regression liegt bei 0,95.

Tabelle 4.2.1-2: Ergebnisse der quantitativen Mikrocomputertomographie.
Die Spalte „Teil“ gibt an, ob es sich um den anterioren, posterioren Abschnitt oder die Exuvie handelt.

Phase	Teil	Volumen Kutikula [mm ³]	Anteil [Vol.-%]	Länge [mm]	Höhe [mm]	Breite [mm]	Volumen Assel [mm ³]	Berechnete Dicke der Kutikula [µm]
frühe Premoult	ant	0,54	57%	6,63	1,37	2,94	13,95	28
	post	0,41	43%					
späte Premoult	ant	0,65	60%	7,27	1,28	3,11	15,17	29
	post	0,43	40%					
Häutung posterior	Exuvie	0,09	22%	5,64	0,96	2,64	7,51	16
	ant	0,29	76%					
	post	0,01	2%					
Intramoult	ant	0,39	53%	6,83	1,05	2,94	11,02	23
	post	0,34	47%					
Häutung anterior	Exuvie	0,17	23%	6,69	1,13	3,24	12,79	22
	ant	0,03	4%					
	post	0,55	73%					
1 Tag nach der Häutung	ant	0,34	52%	6,57	1,11	2,84	10,83	22
	post	0,32	48%					
2 Tage nach der Häutung	ant	0,52	53%	6,33	1,27	3,53	14,84	27
	post	0,46	47%					

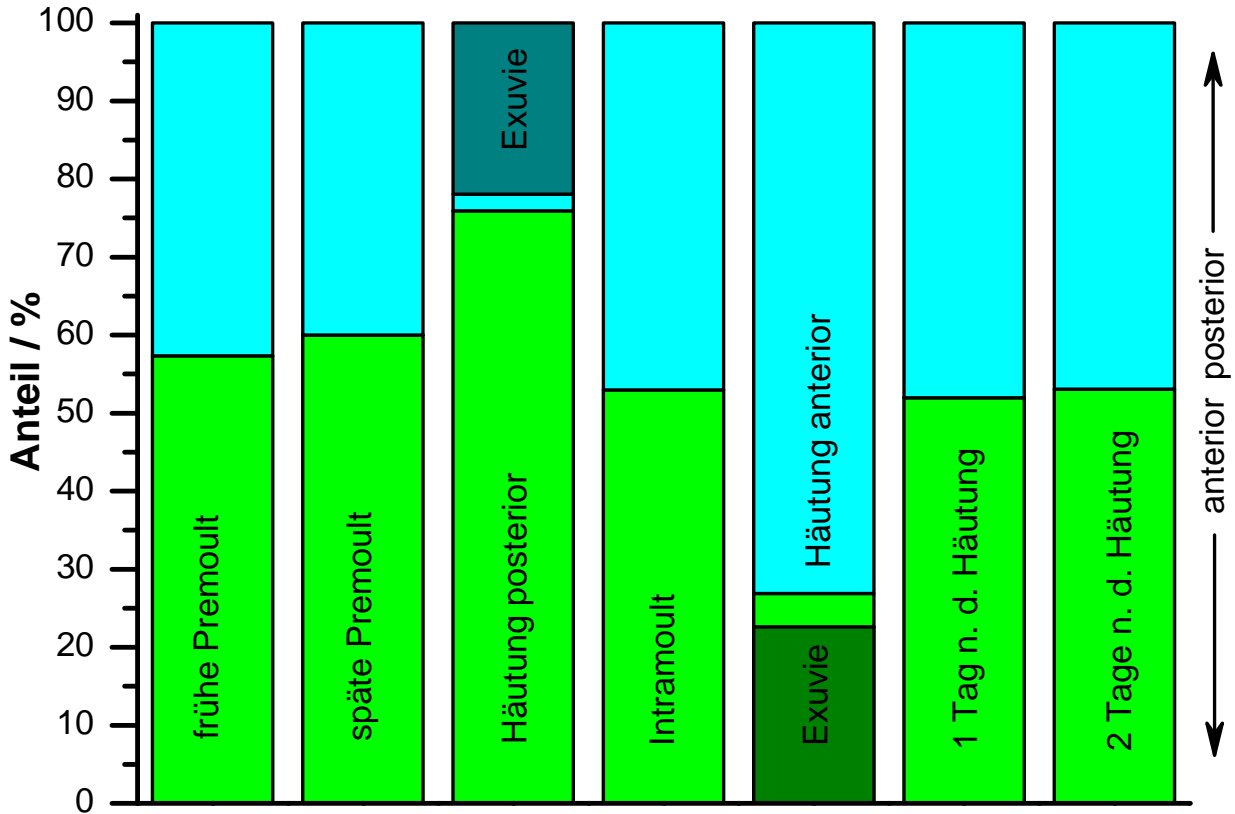


Abbildung 4.2.1-11: Darstellung des Volumenanteils der anterioren und posterioren Kutikula sowie der Exuvien während der Häutung.

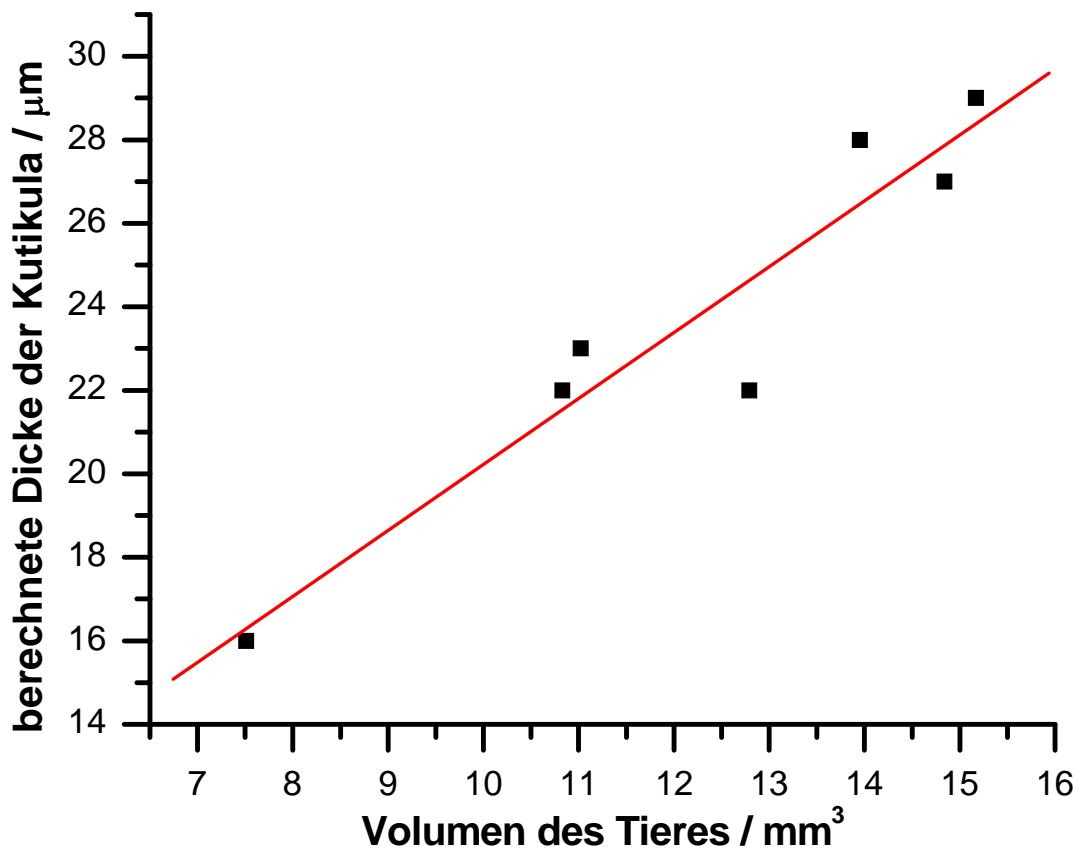


Abbildung 4.2.1-12: Darstellung der Kutikuladicke im Vergleich zum Gesamtvolumen des Tieres.

Abbildung 4.2.1-13 zeigt eine graphische Übersicht des Häutungsvorganges. Dort sind die Tiere der untersuchten Phasen der Häutung sowie die entsprechenden Exuvien zu sehen. In den Schnittbildern der premoult Phasen und der posterioren Häutung sind die sternalen Lager zu erkennen. In der Intramoultphase wurden diese aufgelöst und das Mineral in die posteriore Kutikula eingebaut. Zusätzlich sind zu jedem Tier der Gehalt an ACC und Magnesiumcalcit dargestellt. Die Exuvien werden nach ihrem Abwurf vom Tier gefressen und das Mineral somit wiederverwertet (gepunkteter Pfeil).

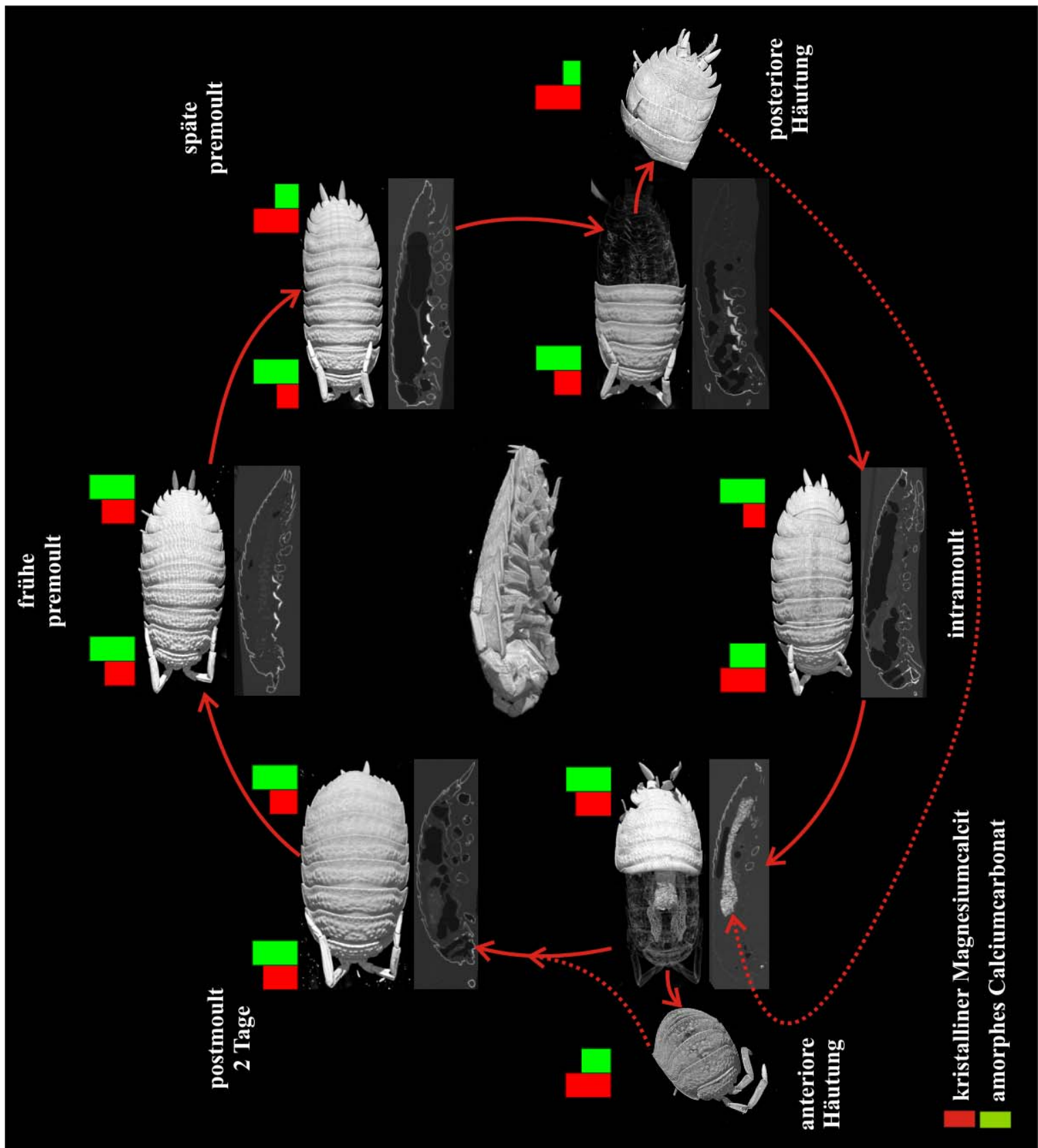


Abbildung 4.2.1-13: Schematische Übersicht des Häutungsvorgangs.

4.2.1.3 Vergleich von terrestrischen und marinen Isopoden^[271]

Hier werden nun die Unterschiede in der Zusammensetzung der Kutikula zwischen terrestrischen und marinen Isopoden beschrieben. In einer vorangegangenen Studie von Becker et. al wurde die Kutikula der terrestrischen Isopoden *Porcellio scaber* und *Armadillidium vulgare* analysiert. Der Mineralanteil besteht aus Magnesium-Calcit, ACC^[41,81] und amorphem Calciumphosphat (ACP).^[7] Dabei wurden die ersten Versuche unternommen, die Zusammensetzung der Kutikula mit dem Fluchtverhalten zu korrelieren. Dies soll hier fortgeführt und zusätzlich ein Vergleich mit dem Lebensraum durchgeführt werden.

Ein biologischer Unterschied zwischen terrestrischen und marinen Isopoden ist die Bildung von sternalen Speichern während der Häutung, welche bei marinen Isopoden ausbleibt. Aus diesem Grund scheinen diese Lager eine Anpassung an ein Leben an Land zu sein. Der Anteil von ACC in der Kutikula ist hier noch nicht untersucht worden. Es finden sich aber Magnesium und Phosphat in unterschiedlichen Konzentrationen in den Kutikula aller Crustaceen.^[245,263,272,273]

Ein Teil des Magnesiums der Isopoden substituiert das Calcium im Calcit, deshalb wird hier von Magnesium-Calcit gesprochen.^[7] Es wird auch vermutet, dass Magnesium zur kinetischen Stabilisierung (d. h. Verhinderung der Kristallisation) des ACC beiträgt.^[255,274,275] Die Funktion des Calciumphosphates in der Kutikula ist dagegen unbekannt. *In vitro* Experimente unter physiologischen Bedingungen haben gezeigt, dass geringe Mengen an Phosphat die Kristallisation von Calcit verhindern.^[276,277] Es ist also eine Rolle bei der ACC Bildung genauso denkbar wie eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Kutikula. Unterschiede in der Zusammensetzung der Kutikula verschiedener Arten könnten einen weiteren Aufschluss über die Anpassung an biologische Bedürfnisse geben. Dazu wurde die Kutikula von vier terrestrischen und vier marinen Isopoden untersucht (Tabelle 4.2.1-3) und die Ergebnisse von quantitativer Pulverdiffraktometrie (XRD), Thermogravimetrie (TG) und

Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) kombiniert.^[7] Die Kutikula der Tiere wurden von Dr. A. Ziegler (Universität Ulm) gesammelt. Dabei wurde die Kutikula mehrerer Tiere einer Art vereint.

Tabelle 4.2.1-3: Untersuchte Arten (*N*: Anzahl der untersuchten Tiere).

Art	Kutikula	Fluchtverhalten	Fundort	<i>N</i>
Oniscidae (terrestrial):				
<i>Philoscia muscorum</i> (Scopoli, 1763)	dünn	<i>Runner</i>	Garten, Illerrieden (südlich von Ulm, Deutschland)	16
<i>Oniscus asellus</i> Linnaeus, 1758	dick	<i>Clinger/Runner</i>	Garten, Witzighausen (südlich von Ulm, Deutschland)	5
Porcellionidae (terrestrial):				
<i>Porcellio spinicornis</i> Say, 1818	dick	<i>Clinger/Runner</i>	Garten, Holzschwang (südlich von Ulm, Deutschland)	5
Armadillidae (terrestrial):				
<i>Armadillo officinalis</i> Duméril, 1804	sehr dick	<i>Roller</i>	Lambia Gebirge, Peloponnes, Griechenland	3
Valvifera (marine)				
<i>Idotea balthica</i> (Pallas, 1772)	weich und lederartig	versteckt sich im Seegras	Ostsee, Kiel, Deutschland	6
<i>Pentidotea wosnesenskii</i> Brandt, 1851	weich und lederartig, sehr zäh	versteckt sich im Seegras	Brady's beach, Bamfield, BC, Canada	5
Flabellifera (marine)				
<i>Sphaeroma serratum</i> (Fabritius, 1787)	sehr dick	<i>Roller</i>	Mittelmeer, Strand nördlich von Luka Novigrad, Croatia, und Strunjanski Zaliv, Slovenien	5
<i>Gnorimosphaeroma oregonensis</i> (Dana, 1853)	sehr dick	<i>Roller</i>	Pachena beach, Bamfield, BC, Canada	5

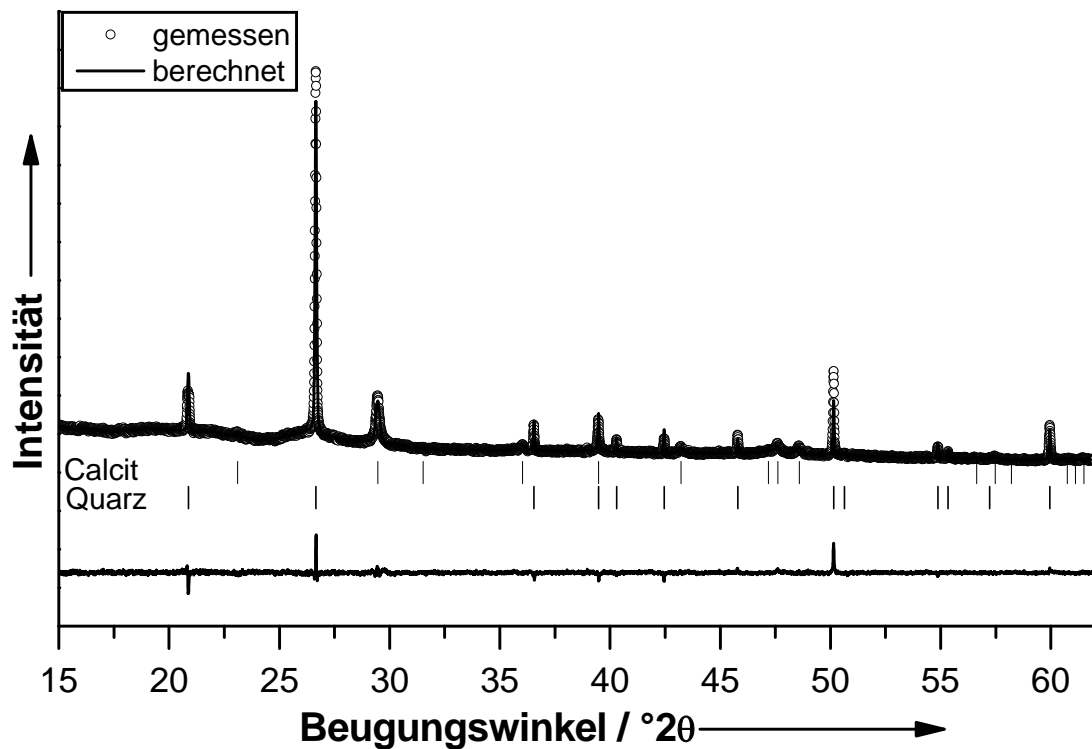


Abbildung 4.2.1-14: Diffraktogramm nach der Rietveldverfeinerung der Kutikula von *Philoscia muscorum*.

An Hand der Daten der Pulverdiffraktometrie wurde eine Rietveldverfeinerung durchgeführt. Ein typisches Diffraktogramm ist in Abbildung 4.2.1-14 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind die gemessenen Daten (Kreise) und die berechneten Daten (Linie) zu sehen. Die Differenz zwischen den beiden ist im unteren Teil abgebildet. Zusätzlich sind dazwischen noch die Reflexpositionen von Quarz und Calcit. Da in der Probe noch ACC erwartet wird, sollte noch ein Halo (durch amorphes Material) zu sehen sein. Dieser ist hier nicht zu erkennen, da zu der Probe noch hochkristalliner Quarz zugegeben wurde und die Signale des Quarzes viel intensiver sind als der Halo. Die quantitative Rietveldverfeinerung der Daten liefert wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben den Anteil von kristallinem Magnesium-Calcit, $w(\text{Mg-Calcit})$ [mg] in der Probe (Formel 4.2.1-1 bis 2) und den Anteil des in Mg-Calcit gebundenen Magnesiums (Formel 4.2.1-3 bis 5).

Für die Thermogravimetrie wurden die Proben unter Sauerstoffatmosphäre mit 3 K min^{-1} auf 1000 °C erhitzt. Die Abbildung 4.2.1-15 und 16 zeigen die Thermogramme der untersuchten Arten, die nach ihrem Lebensraum aufgeteilt wurden. Zu sehen sind dort das Verdampfen des Wassers (60 und 200 °C), die Zersetzung des organischen Materials (200 bis 550 °C) und die Decarboxylierung des Carbonats (550 bis 750 °C). Die Temperaturangaben sind hier nur als ungefähre Bereiche anzusehen. Für die Berechnungen wurden die genauen Stufen für jede Probe einzeln analysiert. Durch die Decarboxylierung tritt Kohlenstoffdioxid, $w(\text{CO}_2)$ in Gew.-% aus der Probe aus. Durch den daraus resultierenden Masseverlust kann der Gehalt an Calciumcarbonat, $w(\text{CaCO}_3)$ in Gew.-%, in der Probe bestimmt werden.

Formel 4.2.1-14

$$w(\text{CaCO}_3) = \frac{w(\text{CO}_2) \cdot 100,0872}{44,0098}$$

mit $M(\text{CaCO}_3) = 100,0872 \text{ g mol}^{-1}$ und $M(\text{CO}_2) = 44,0098 \text{ g mol}^{-1}$.

Da der Gehalt von Calciumcarbonat durch die Thermogravimetrie und der Gehalt von Magnesium-Calcit durch die quantitative Pulverdiffraktometrie bekannt sind, kann nun der Gehalt von ACC, $w(\text{ACC})$ in Gew.-%, wie im Abschnitt 4.2.1.2 (Formel 4.2.1-7) beschrieben durch einfache Subtraktion bestimmt werden. Allerdings wurde hier der Gehalt von Calciumcarbonat durch Thermogravimetrie und nicht durch Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt.

Becker et al. haben festgestellt, dass nicht das gesamte durch AAS ermittelte Calcium in Calciumcarbonat gebunden ist.^[7] Die Diffraktogramme von Rückständen der thermogravimetrischen Analyse zeigen neben den erwarteten Reflexen von Calcium- und Magnesiumoxid noch weitere Signale. Abbildung 4.2.1-17 zeigt die calcinierte Kutikula von *Gnorimosphaeroma oregonensis* als Beispiel. Ein Teil der Reflexe kann Calciumhydroxid zugeordnet werden, welches vermutlich bei der Vorbereitung zur Diffraktometrie entsteht. Um die

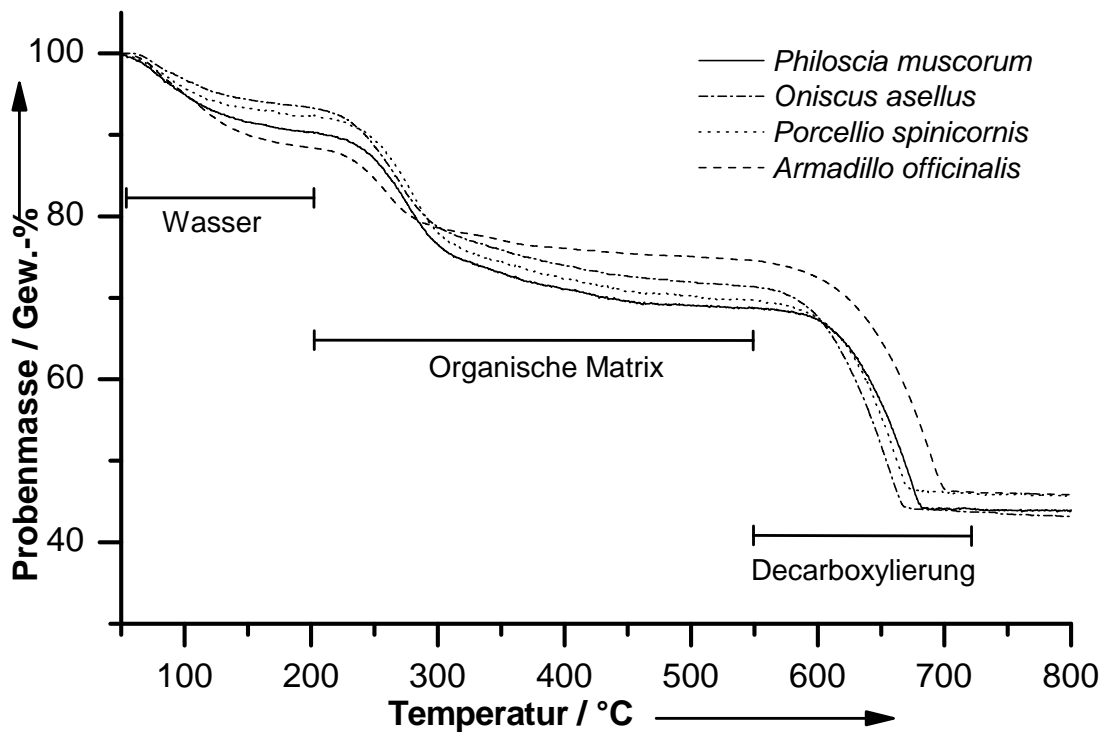


Abbildung 4.2.1-15: Thermogramme der Kutikula der terrestrischen Arten.

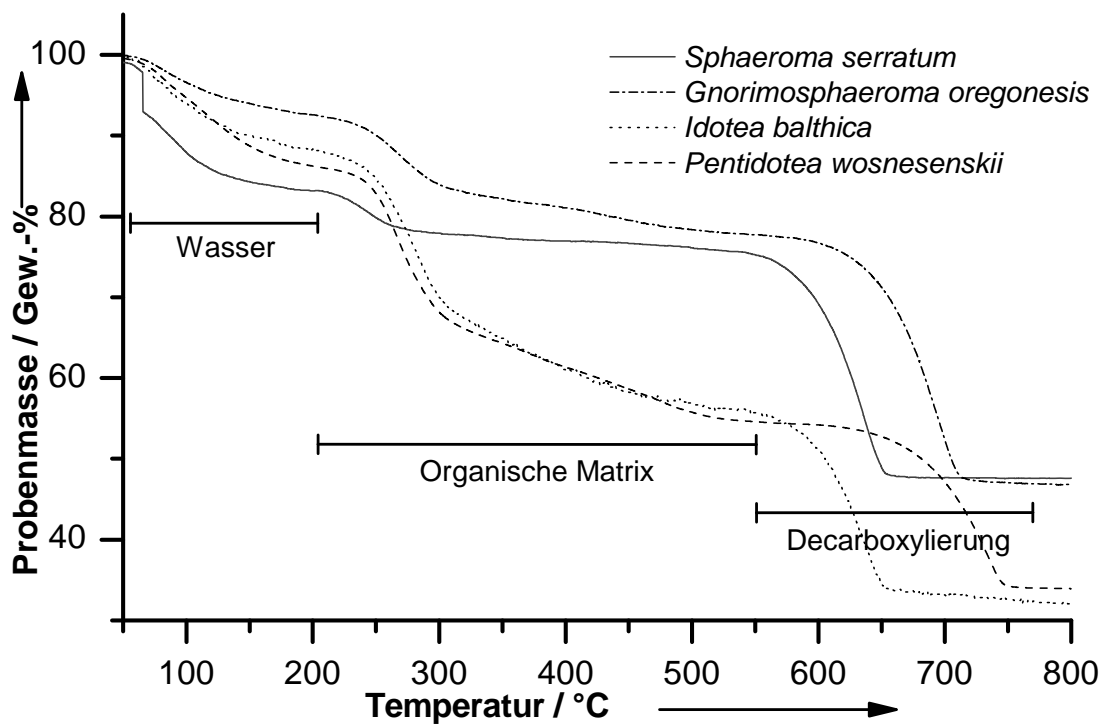


Abbildung 4.2.1-16: Thermogramme der Kutikula der marinen Arten.

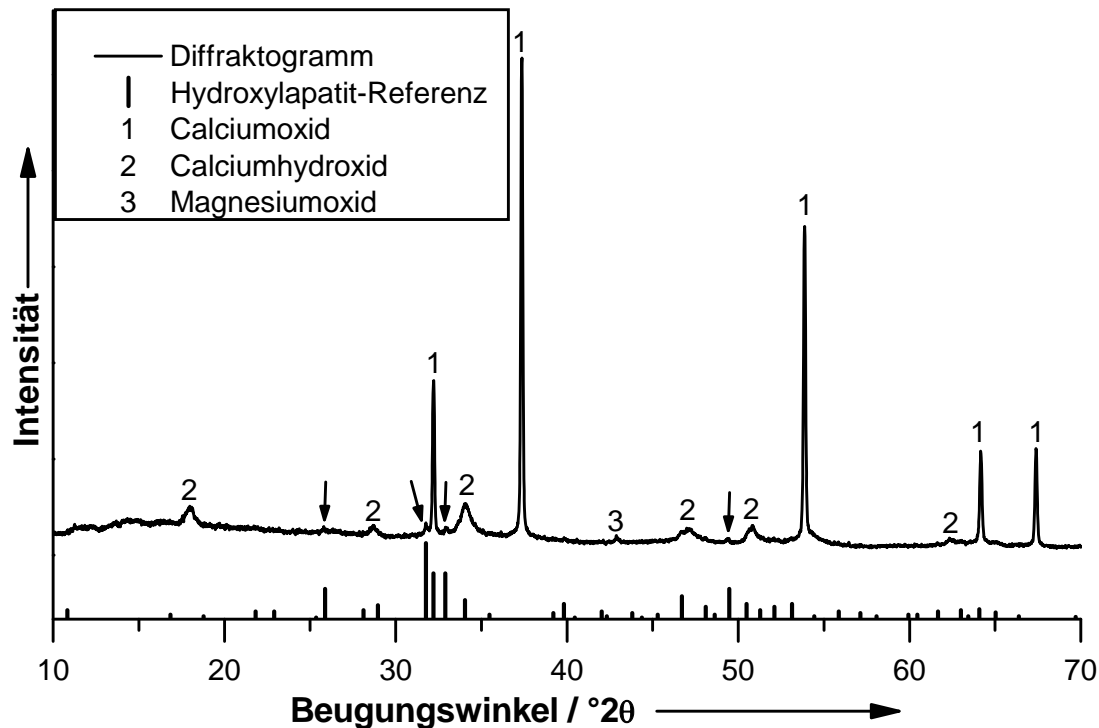


Abbildung 4.2.1-17: Pulverdiffraktogramm der bei 1000 °C calcinierten Kutikula von *Gnorimosphaeroma oregonensis* (oben) und der Reflexe für HAP (unten). Die Pfeile markieren die sichtbaren HAP-Reflexe.

Probe für die Messung auf der Kaptonfolie zu fixieren, wird ein Tropfen Aceton auf die Probe getropft. Offenbar enthielt dieses Aceton eine kleine Menge Wasser (aus der Atmosphäre). So konnte das Wasser mit Calciumoxid, welches bei der thermogravimetrischen Analyse durch Decarboxylierung aus Calciumcarbonat entsteht, zu Calciumhydroxid reagieren. Sehr schwach, aber dennoch deutlich sind außerdem Reflexe von Hydroxylapatit (HAP) zu sehen (Pfeile).

Da die Reflexe in den Diffraktogrammen für die Rietveldverfeinerung nicht zu sehen sind, wird im Folgenden davon ausgegangen, dass HAP in der Kutikula als amorphes Calciumphosphat (ACP) vorliegt und während der thermogravimetrischen Analyse in die kristalline Phase umgewandelt wird. Um den Gehalt, $w(\text{ACP})$ in Gew.-%, nun berechnen zu können, wird angenommen, dass ACP die gleiche stöchiometrische Zusammensetzung wie HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ($M = 502,3103$) hat.^[7,278]

$$\text{Formel 4.2.1-15} \quad w(\text{ACP}) = \frac{w(\text{Ca, Rest})}{40,078} \cdot \frac{502,3103}{5}$$

mit $M(\text{Ca}) = 40,078 \text{ g mol}^{-1}$ und $w(\text{Ca, Rest})$ in Gew.-%, als Calciumgehalt, der nicht im Calciumcarbonat gebunden ist.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.1-4 und 5, sowie in Abbildung 4.2.1-18 und 19 zu sehen. Dabei werden zusätzlich die aus der Literatur^[7] entnommenen Daten für *Porcellio scaber* und *Armadillidium vulgare* dargestellt. Der Gesamtgehalt in Tabelle 4.2.1-5 setzt sich aus den Anteilen von Magnesium-Calcit, ACC, organischer Matrix, Wasser, Magnesium (nicht im Magnesium-Calcit) und ACP zusammen. Die Diagramme in den Abbildungen beschränken sich auf die organische Matrix, Magnesium-Calcit, ACC und HAP.

Tabelle 4.2.1-4: Zusammensetzung der Kutikula. Angegeben ist jeweils der Massenanteil w in Gew.-%, Teil 1.

Spezies	Ca	Mg	Wasser	Organische Matrix	Gesamt Mineral	CaCO ₃	Mg-Calcit	ACC
<i>Oniscus asellus</i>	27,1	0,46	6,0	20,3	73,7	55,0	15,0	40,0
<i>Philoscia muscorum</i>	25,4	0,49	10,5	21,2	68,3	56,0	17,5	38,5
<i>Porcellio spinicornis</i>	24,0	0,47	8,0	22,5	69,5	55,4	17,3 ^[279]	38,1
<i>Porcellio scaber</i> ^[7]	24,3	0,71	8,0	24,8	67,2	49,6	14,5	35,0
<i>Armadillidium vulgare</i> ^[7]	29,8	0,72	9,7	11,7	78,6	64,8	10,8	54,0
<i>Armadillo officinalis</i>	25,0	0,72	11,6	13,8	74,6	63,6	14,5	49,0
<i>Idothea baltica</i>	16,9	1,13	11,6	32,6	55,8	50,7	11,6	39,2
<i>Pentidothea wosnesenskii</i>	19,3	1,31	13,8	31,8	54,3	45,4	3,5	41,9
<i>Spheroma serratum</i>	21,5	2,25	12,9	10,5	76,6	64,1	12,3	51,8
<i>Gnorimosphaeroma oregonese</i>	28,6	1,79	7,8	15,0	77,2	68,3	53,0	15,3

Tabelle 4.2.1-5: Zusammensetzung der Kutikula. Angegeben ist jeweils der Massenanteil w in Gew.-%, wenn nichts anderes angegeben ist, Teil 2.

Spezies	ACC/ Calcit $w:w$	Mg/ Ca $w:w$	MgCO ₃ in Mg- Calcit [mol%]	Mg in Mg- Calcit	Mg nicht in Mg- Calcit	Ca nicht in CaCO ₃	ACP	Gesamt - gehalt
<i>Oniscus asellus</i>	2,66	0,017	1,86	0,07	0,39	5,1	12,8	94,5
<i>Philoscia muscorum</i>	2,19	0,019	1,14	0,05	0,44	3,0	7,5	95,6
<i>Porcellio spinicornis</i>	2,20	0,020	1,65 ^[279]	0,07 ^[279]	0,40	1,8	4,6	91,0
<i>Porcellio scaber</i> ^[7]	2,41	0,029	3,63	0,13	0,58	4,5	11,2	94,1
<i>Armadillidium vulgare</i> ^[7]	5,00	0,024	3,30	0,09	0,63	3,8	9,7	96,5
<i>Armadillo officinalis</i>	3,37	0,029	3,29	0,12	0,60	0,0	0,0	89,5
<i>Idothea baltica</i>	3,39	0,067	3,88	0,11	1,02	0,0	0,0	95,9
<i>Pentidothea wosnesenskii</i>	11,83	0,068	6,88	0,06	1,25	1,2	2,9	95,2
<i>Spheroma serratum</i>	4,21	0,105	5,64	0,17	2,08	0,0	0,0	89,6
<i>Gnorimosphaeroma oregonese</i>	0,29	0,063	5,56	0,72	1,07	1,2	3,1	95,3

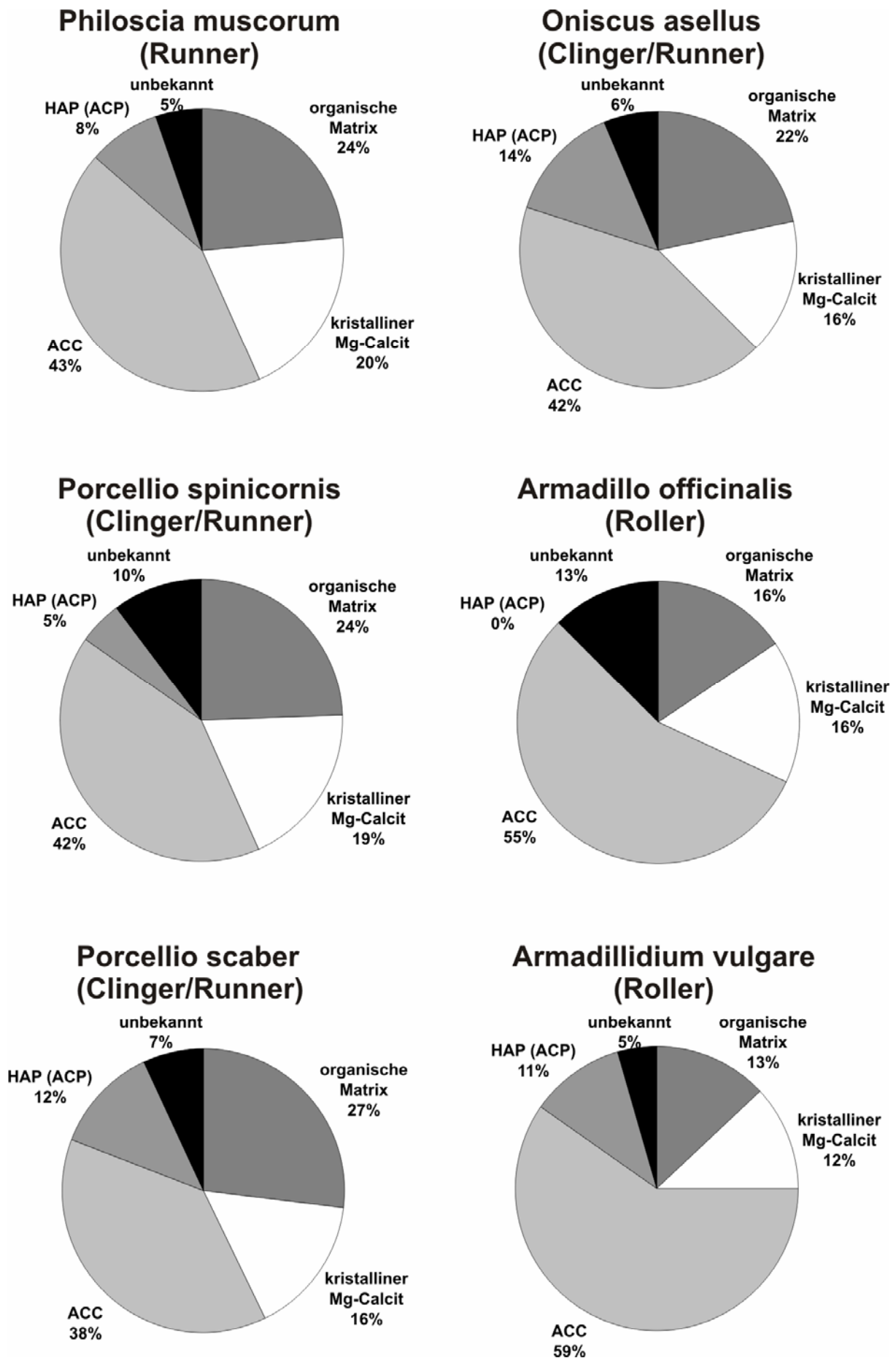


Abbildung 4.2.1-18: Graphische Übersicht der Zusammensetzung der Kutikula von sechs terrestrischen Isopoden.

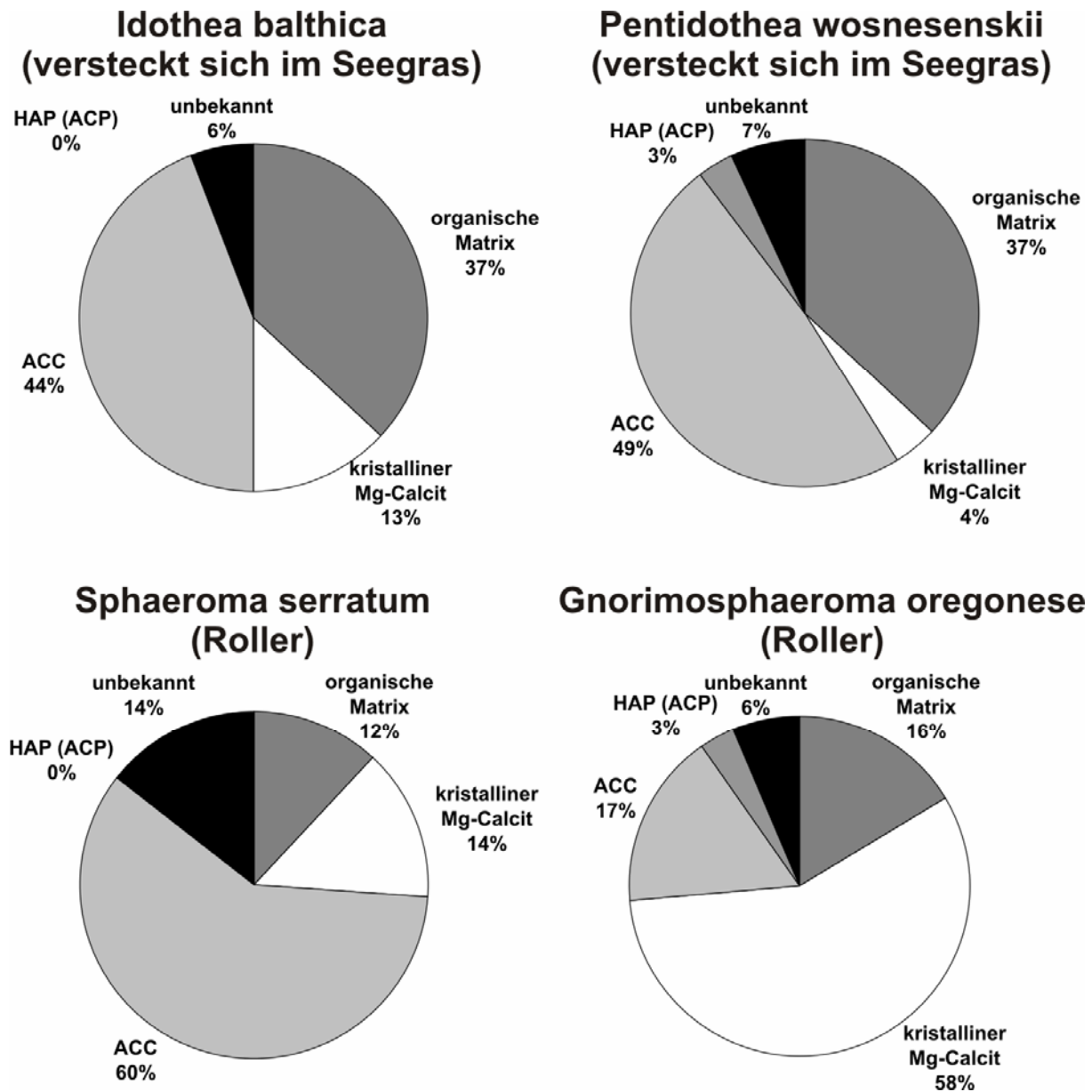


Abbildung 4.2.1-19: Graphische Übersicht der Zusammensetzung der Kutikula von vier marinen Isopoden.

Beim Vergleich der Kutikulazusammensetzung ist zu erkennen, dass diese bei den marinen Isopoden stärker variiert. Der Grund dafür könnten die vielen verschiedenen Lebensräume für marine Isopoden sein. Terrestrische Isopoden dagegen leben in feuchten bis halbtrockenen Lebensräumen und ernähren sich ähnlich. Diese Tatsache ist eine weitere Bestätigung für die Vermutung, dass sich die Zusammensetzung der Kutikula je nach Funktion entwickelt hat.^[7]

Terrestrische Isopoden können je nach Verhalten und Lebensweise in Gruppen eingeteilt werden. Als Schutz vor Fressfeinden rollen sich *Armadillo officinalis* and *Armadillidium vulgare* (Roller) zu einer Kugel zusammen und schützen so ihre weiche Innenseite. Sie haben kurze Beine und Antennen, die sich so leichter in der Kugel unterbringen lassen. Ihre Bewegung ist langsam und die Kutikula ist glatt, hart und dick. So ist es für Angreifer schwierig, die Kutikula zu brechen oder das Tier zu „entrollen“. Im Gegensatz dazu stehen Tiere wie *Philoscia muscorum*^[280], die vor ihren Feinden weglaufen (Runner). Sie können sich nicht zu einer Kugel zusammenrollen und haben lange Beine, um schneller laufen zu können. Die dritte Variante ist das Anheften des Tieres an den Untergrund (Clinger).^[280] Die Tiere dieser Gruppe zeichnen sich durch einen flachen Körper aus, der oft durch Tuberkel verstärkt wird und dessen Enden sehr flach sind. So ist es schwer, das Tier vom Untergrund zu lösen.^[280] Die Flucht ist für diese Gruppe eine zweite Option. Vergleicht man nun die Zusammensetzung der Clinger, *Oniscus asellus*, *Porcellio spinicornis* und *Porcellio scaber* mit der Zusammensetzung des Runners *P. muscorum*, so findet man nur geringe Unterschiede. Die Roller *A. officinalis* und *A. vulgare* dagegen haben weniger organische Matrix und dafür mehr Mineral in Form von ACC. Auch hier wird vermutet, dass ACC wegen der höheren Löslichkeit verwendet wird.^[80] Dadurch ist die Demineralisierung und Mineralisierung des Calciumcarbonates während der Häutung einfacher.

Die marinen Arten *Idotea balthica* und *Pentidotea wosnesinskii* haben eine andere Verteidigungsstrategie. Sie leben auf Pflanzen und sind in der Lage, die Farbe ihres Untergrundes anzunehmen. Sie haben eine flexible und zähe Kutikula. *I. balthica* lebt an den Küsten des atlantischen Ozean, der Ostsee, des Mittelmeeres und des Schwarzen Meeres. *P. wosnesenskii* lebt in felsigen Gezeitenzonen des nördlichen pazifischen Ozeans. Die Kutikula dieser Art ist besonders lederartig. Hier findet man verglichen mit den terrestrischen Arten einen geringen Mineralanteil und einen hohen organischen Anteil. Auffällig ist,

dass die Kutikula von *P. wosnesenskii* einer hohen mechanischen Beanspruchung ausgesetzt ist, und dass der Anteil von Magnesium-Calcit sehr gering ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass Magnesium-Calcit die Kutikula härter und spröder macht. Beides sind Eigenschaften, die bei dieser Art ungünstig sind. Der Anteil der organischen Matrix der marinen Roller, *Sphaeroma serratum* und *Gnorimosphaeroma oregonensis*, ist vergleichbar mit dem der terrestrischen Roller und geringer als bei den anderen marinen Arten. Es scheint, als sei der Vergleich von Verhalten und Zusammensetzung der Kutikula für terrestrische und marine Arten ähnlich. Unerwartet ist allerdings die Tatsache, dass *S. serratum* einen hohen Anteil von ACC und *G. oregonensis* einen sehr geringen Anteil davon besitzt. Marine Isopoden bilden im Gegensatz zu terrestrischen vor der Häutung keine sternalen Calciumcarbonat-Speicher, da sie Calcium über die Kiemen aufnehmen können, was bereits für Decapoden nachgewiesen wurde.^[281,282] Es ist also nicht nötig einen hohen ACC Anteil zu verwenden, um den Vorteil der besseren Löslichkeit bei der Häutung nutzen zu können. Das deutet auf eine Funktion für ACC für die mechanischen Eigenschaften hin.

Unter den marinen Arten haben die Roller einen höheren Anteil an Magnesium, wovon ein großer Teil zur Bildung von Magnesium-Calcit verwendet wird. Durch den Einbau von Magnesium wird der Calcit härter.^[7] Hier findet sich eine Übereinstimmung mit der Vermutung für die terrestrische Art *Armadillidium vulgare*^[7], dass die Magnesium-Calcit Bildung einen funktionellen Grund hat. Der Magnesiumgehalt ist allgemein bei den marinen Isopoden höher als bei den terrestrischen Isopoden. Der Grund könnte in der fünfmal höheren Magnesiumkonzentration (50 mmol L^{-1}), gegenüber der Calciumkonzentration (10 mmol L^{-1}) im Meerwasser, liegen. Der Gehalt an ACP ist in marinen Isopoden geringer als in den terrestrischen Spezies. Eine Ausnahme stellt dabei *Armadillo officinalis* dar, welches kein ACP aufweist. Da die Bestimmung von ACP sehr indirekt ist, müssen diese Ergebnisse allerdings mit Vorsicht

betrachtet werden. Eine vergleichbare Analyse des Exoskeletts des amerikanischen Hummers *Homarus americanus* und der Krabbe *Cancer pagurus* zeigten zwischen 50 und 88 % Mineral, bestehend aus Magnesium-Calcit und ACP.^[283]

4.2.1.4 Untersuchung weiterer Isopoden

In vorangegangenen Studien konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Kutikula mit Verhalten und Lebensraum verglichen werden kann.^[7,271] Aus diesem Grund wurde die Studie fortgesetzt und weitere Arten wie zuvor in Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben analysiert (Tabelle 4.2.1-6). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.2.1-7, 8, und 9 zu sehen. Für diese Ergebnisse muss eine biologische Begutachtung noch durchgeführt werden. Es fällt allerdings auf, dass *Asellus aquaticus* und *Megalorchestia californiana* kein Calcit in der Kutikula aufweisen. Eine weitere Auffälligkeit ist die Tatsache, dass der unbekannte Anteil bei allen Arten, bis auf *Tylos europaeus* (1 %) zwischen 5 und 15 % liegt. Die Ergebnisse müssen nun mit Lebensraum, Abstammung und Verhalten abgeglichen werden, um eine Interpretation zu ermöglichen.

Tabelle 4.2.1-6: Übersicht der untersuchten Arten.

Ordnung	Unterordnung	Familie	Spezies
Isopoda	Oniscidea (terrestrisch)	Ligiidae	<i>Ligia oceanica</i> <i>Ligia Italica</i> <i>Ligidium hybnum</i>
		Tylidae	<i>Tylos europaeus</i> <i>Helleria brevicornis</i>
		Synochaeta	<i>Titanethes albus</i>
		Crinochaeta	<i>Alloniscus perconvexus</i> <i>Oniscus asellus</i> <i>Philoscia muscorum</i> <i>Porcellio spinicornis</i> <i>Porcellio scaber</i> <i>Porcelio albinus</i> <i>Armadillidium vulgare</i> <i>Armadillo officinalis</i> <i>Hemilepistus reaumurii</i>
	Valvifera (marin)		<i>Idothea baltica</i> <i>Pentidothea wosnesenskii</i>
	Flabellifera (marin)	Sphaeromatidae	<i>Spheroma serratum</i> <i>Gnorimosphaeroma oregonese</i>
	Asellota (Süßwasser)	Asellidae	<i>Asellus aquaticus</i>
Amphipoda			<i>Gammarus rösellei</i> <i>Megalorchestia californiana</i>

Tabelle 4.2.1-7: Zusammensetzung der Kutikula. Angegeben ist jeweils der Massenanteil *w* in Gew.-%, Teil 1.

Spezies	Ca	Mg	Wasser	Organische Matrix	Gesamt-mineral	CaCO ₃	Mg-Calcit	ACC
<i>Ligia oceanica</i>	20,6	0,55	8,0	31,2	60,8	46,2	11,1	35,1
<i>Ligia Italica</i>	18,9	0,56	6,8	30,6	62,6	49,9	4,6	45,3
<i>Ligidium hybnum</i>	22,0	0,16	9,1	23,2	67,6	50,1	9,7 ^[279]	40,4
<i>Tylos europaeus</i>	27,5	0,96	11,4	19,3	69,3	63,4	21,1	42,3
<i>Helleria brevicornis</i>	28,5	0,49	12,3	12,2	75,5	67,7	15,9	51,8
<i>Titanethes albus</i>	24,5	0,17	7,6	24,0	68,3	52,1	9,6	42,5
<i>Alloniscus perconvexus</i>	22,8	0,92	11,9	20,7	67,4	59,0	18,8	40,3
<i>Oniscus asellus</i> ^[271]	27,1	0,46	6,0	20,3	73,7	55,0	15,0	40,0
<i>Philoscia muscorum</i> ^[271]	25,4	0,49	10,5	21,2	68,3	56,0	17,5	38,5
<i>Porcellio spinicornis</i> ^[271]	24,0	0,47	8,0	22,5	69,5	55,4	17,3 ^[279]	38,1
<i>Porcellio scaber</i> ^[7]	24,3	0,71	8,0	24,8	67,2	49,6	14,5	35,0
<i>Porcelio albinus</i>	26,8	0,75	8,0	14,7	77,3	62,7	46,1	16,6
<i>Armadillidium vulgare</i> ^[7]	29,8	0,72	9,7	11,7	78,6	64,8	10,8	54,0
<i>Armadillo officinalis</i> ^[271]	25,0	0,72	11,6	13,8	74,6	63,6	14,5	49,0
<i>Hemilepistus reaumurii anterior</i>	26,0	0,73	10,9	18,8	70,2	60,6	37,1	23,4
<i>Hemilepistus reaumurii posterior</i>	27,3	0,71	7,3	18,1	74,6	63,3	57,0	6,3
<i>Idothea baltica</i> ^[271]	16,9	1,13	11,6	32,6	55,8	50,7	11,6	39,2
<i>Pentidothea wosnesenskii</i> ^[271]	19,3	1,31	13,8	31,8	54,3	45,4	3,5	41,9
<i>Spheroma serratum</i> ^[271]	21,5	2,25	12,9	10,5	76,6	64,1	12,3	51,8
<i>Gnorimosphaeroma oregonese</i> ^[271]	28,6	1,79	7,8	15,0	77,2	68,3	53,0	15,3
<i>Asellus aquaticus</i>	25,3	0,15	8,3	17,4	74,2	54,9	0,0	54,9
<i>Gammarus rösellie</i>	23,0	0,60	7,9	27,9	64,2	52,9	3,8	49,1
<i>Megalorchestia californiana</i>	17,1	0,88	12,1	36,8	51,1	28,7	0,0	28,7

Tabelle 4.2.1-8: Zusammensetzung der Kutikula. Angegeben ist jeweils der Massenanteil w in Gew.-%, wenn nichts anderes angegeben ist, Teil 2.

Spezies	ACC/ Calcit $w:w$	Mg/Ca $w:w$	MgCO ₃ in Mg- Calcit [mol%]	Mg in Mg- Calcit	Mg nicht in Mg- Calcit	Ca nicht in CaCO ₃	HAP (ACP)	Gesamt -gehalt
<i>Ligia oceanica</i>	3,15	0,026	4,07	0,11	0,43	2,1	5,3	91,2
<i>Ligia Italica</i>	9,92	0,029	2,94	0,03	0,52	0,0	0,0	87,8
<i>Ligidium hybnum</i>	4,17	0,007	0,56 ^[279]	0,01 ^[279]	0,14	2,0	5,0	87,5
<i>Tylos europaeus</i>	2,01	0,035	4,29	0,22	0,73	2,1	5,1	100,0
<i>Helleria brevicornis</i>	3,25	0,017	1,02	0,04	0,45	1,3	3,4	96,0
<i>Titanethes albus</i>	4,40	0,007	0,19	0,00	0,16	3,6	9,1	93,0
<i>Alloniscus perconvexus</i>	2,14	0,040	2,56	0,12	0,80	0,0	0,0	92,5
<i>Oniscus asellus</i> ^[271]	2,66	0,017	1,86	0,07	0,39	5,1	12,8	94,5
<i>Philoscia muscorum</i> ^[271]	2,19	0,019	1,14	0,05	0,44	3,0	7,5	95,6
<i>Porcellio spinicornis</i> ^[271]	2,20	0,020	1,65 ^[279]	0,07 ^[279]	0,40	1,8	4,6	91,0
<i>Porcellio scaber</i> ^[7]	2,41	0,029	3,63	0,13	0,58	4,5	11,2	94,1
<i>Porcelio albinus</i>	0,36	0,028	5,10	0,58	0,17	1,7	4,3	89,9
<i>Armadillidium vulgare</i> ^[7]	5,00	0,024	3,30	0,09	0,63	3,8	9,7	96,5
<i>Armadillo officinalis</i> ^[271]	3,37	0,029	3,29	0,12	0,60	0,0	0,0	89,5
<i>Hemilepistus reaumurii anterior</i>	0,63	0,028	5,92	0,54	0,19	1,8	4,4	95,0
<i>Hemilepistus reaumurii posterior</i>	0,11	0,026	5,34	0,75	0,00	2,0	5,0	93,6
<i>Idothea baltica</i> ^[271]	3,39	0,067	3,88	0,11	1,02	0,0	0,0	95,9
<i>Pentidothea wosnesenskii</i> ^[271]	11,83	0,068	6,88	0,06	1,25	1,2	2,9	95,2
<i>Spheroma serratum</i> ^[271]	4,21	0,105	5,64	0,17	2,08	0,0	0,0	89,6
<i>Gnorimosphaeroma oregonese</i> ^[271]	0,29	0,063	5,56	0,72	1,07	1,2	3,1	95,3
<i>Asellus aquaticus</i>	----	0,006	0,00	0,00	0,15	3,3	8,2	89,0
<i>Gammarus rösellie</i>	13,09	0,026	1,44	0,01	0,58	1,8	4,5	93,8
<i>Megalorchestia californiana</i>	----	0,051	0,00	0,00	0,88	5,6	14,1	92,7

Tabelle 4.2.1-9: Zusammensetzung der Kutikula ohne Wasser [Gew.-%] analog zu den Kreisdiagrammen in Abschnitt 4.2.1.3.

Spezies	Organische matrix	Mg-Calcit	ACC	HAP (ACP)	unbekannt	Gesamt
<i>Ligia oceanica</i>	34	12	38	6	10	90
<i>Ligia Italica</i>	33	5	49	0	14	86
<i>Ligidium hybnum</i>	26	11	44	5	14	86
<i>Tylos europeus</i>	22	24	48	6	1	99
<i>Helleria brevicornis</i>	14	18	59	4	5	95
<i>Titanethes albus</i>	26	10	46	10	8	92
<i>Alloniscus perconvexus</i>	24	21	46	0	9	91
<i>Oniscus asellus</i> ^[271]	22	16	43	14	6	94
<i>Philoscia muscorum</i> ^[271]	24	20	43	8	5	95
<i>Porcellio spinicornis</i> ^[271]	24	19	41	5	10	90
<i>Porcellio scaber</i> ^[7]	27	16	38	12	7	93
<i>Porcelio albinus</i>	16	50	18	5	11	89
<i>Armadillidium vulgare</i> ^[7]	13	12	60	11	5	95
<i>Armadillo officinalis</i> ^[271]	16	16	55	0	13	87
<i>Hemilepistus reaumurii anterior</i>	21	42	26	5	6	94
<i>Hemilepistus reaumurii posterior</i>	20	61	7	5	7	93
<i>Idothea baltica</i> ^[271]	37	13	44	0	6	94
<i>Pentidothea wosnesenskii</i> ^[271]	37	4	49	3	7	93
<i>Spheroma serratum</i> ^[271]	12	14	59	0	14	86
<i>Gnorimosphaeroma oregonese</i> ^[271]	16	57	17	3	6	94
<i>Asellus aquaticus</i>	19	0	60	9	12	88
<i>Gammarus rösellie</i>	30	4	53	5	7	93
<i>Megalorchestia californiana</i>	42	0	33	16	9	91

4.2.2 Die Schalenbildung der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* im embryonalen Stadium^[284]

Biomphalaria glabrata ist eine tropische Süßwasserschnecke, die einen Durchmesser von bis zu 2 cm erreichen kann. Sie ist ein Überträger der Tropenkrankheit Bilharziose. Die Schale der ausgewachsenen Schnecke ist unter den Gesichtspunkten der Biochemie^[285-289] und der Mineralogie gut untersucht.^[8,34,35,290-292] Das in die Schale eingebaute Calciumcarbonat liegt hier fast ausschließlich als Aragonit vor.^[8] 48 Stunden nach der Eiablage beginnt die Schalenbildung mit der Bildung des Periostrakums. Erstes ACC wird etwa sechs bis zwölf Stunden später dort eingelagert. Aus ACC bildet sich dann Aragonit,^[35] in guter Übereinstimmung mit gängigen Modellen der Biomineralisation.^[41,293] Nach fünf bis sechs Tagen schlüpfen die Embryonen. Die Form der frisch gebildeten Schale und der Mineralisierungsprozess ist hier von besonderem Interesse und wurde bereits von Marxen et al. mit Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie (REM und TEM) in Kombination mit *electron spectroscopic imaging* (ESI), Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) und Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) untersucht.^[35] Da diese Untersuchungsmethoden eine Probenpräparation erfordern, können durch die zur Präparation verwendeten Methoden Präparationsartefakte nicht ausgeschlossen werden. In einer anderen vorangegangenen Studie wurde bereits die SR μ CT an einem 120 Stunden (fünf Tage) alten Embryo angewendet und gezeigt, dass diese Methode auch hier vielversprechend ist.^[291] In dieser Studie sind nun SR μ CT Daten direkt mit REM und EDX Daten kombiniert worden. Dazu wurden ausgewachsene und neu geschlüpfte Schnecken (*Biomphalaria glabrata*; Say, 1818) vom Stamm Puerto Rico bei 28 °C von Dr. J. Marxen vom Biozentrum Grindel der Universität Hamburg gezüchtet. Die frisch gelegten Eier wurden separiert und nach 60, 72, 96 und 120 Stunden auf 8 °C gekühlt. Die Embryonen wurden dann zum Einbetten aus der Eihülle herauspräpariert.

Zusätzlich wurden geschlüpfte Schnecken analysiert, und zwar sowohl fünf Tage (= 240 Stunden nach der Eiablage), als auch vier Wochen nach dem Schlüpfen. Alle Proben wurden in Spurrmedium eingebettet (von Dr. J. Marxen).^[294] Die SR μ CT-Messungen wurden bei 17 keV (240 h/4 Wochen), 12 keV (72 h) und 10 keV (60 h/96 h) durchgeführt. Für die Tiere wurde jeweils die Energie gewählt, die den besten Kontrast lieferte. In Tabelle 4.2.2-1 ist eine Übersicht der SR μ CT-Daten gezeigt. Dabei steht M für die Vergrößerung (engl. *magnification*) und B für den Binningfaktor. Über das Volumen pro Voxel, $V(\text{Voxel})$ [μm^3] und der Anzahl der Voxel, $N(\text{Voxel})$ [1] in der Schale wird dann das Volumen der Schale, $V(\text{Schale})$ [μm^3] bestimmt (Formel 4.2.2-1). Da die Schale von *B. glabrata* fast komplett aus Aragonit besteht, kann näherungsweise mit dem Schalenvolumen und der Dichte von Aragonit ($2,95 \text{ g cm}^{-3}$) das Gewicht der Schale, $m(\text{Schale})$ [μg] bestimmt werden (Formel 4.2.2-2).

$$\text{Formel 4.2.2-1} \quad V(\text{Schale}) = N(\text{Voxel}) \cdot V(\text{Voxel})$$

$$\text{Formel 4.2.2-2} \quad m(\text{Schale}) = \frac{V(\text{Schale}) \cdot 2,95 \mu\text{g}}{10^6 \mu\text{m}^3}$$

Durch die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Embryos 60 Stunden nach der Befruchtung in Kombination mit *electron spectroscopic imaging* kann eine 200 nm dicke Calciumcarbonatschicht bei einem Gesamtdurchmesser von 120 μm nachgewiesen werden.^[35] Diese kann nicht durch SR μ CT gezeigt werden, da sie zu dünn ist. Beim 72 h Embryo ist die Schale zwar gewachsen, bedeckt aber noch nicht den ganzen Embryo. Abbildung 4.2.2-2 zeigt die entsprechende REM- (A) und SR μ CT-Aufnahme (B). In der REM-Aufnahme sind die Schale (S), die Schalenkante (MR), ein Fuß (F), die Lungenhöhle (PC), die Kammlinie der

Tabelle 4.2.2-1: Übersicht der SR μ CT Daten, inklusive des Gewichts der Schalen (mit M als Vergrößerung und B dem Binningfaktor).

Alter	M	B	Voxel- kanten- länge [μm]	Volumen pro Voxel [μm^3]	Voxel in der Schale [1]	Volumen der Schale [μm^3]	Gewicht der Schale [μg]
72 h	6,0	1	1,49	3,32	$6,54 \cdot 10^4$	$2,17 \cdot 10^5$	0,64
96 h	4,7	1	1,91	7,02	$4,63 \cdot 10^5$	$3,25 \cdot 10^6$	9,59
120 h	6,0	1	1,51	3,41	$3,02 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^7$	30,3
240 h	4,7	2	3,83	56,2	$1,77 \cdot 10^6$	$9,92 \cdot 10^7$	293
4 Wochen	2,9	2	6,18	235,9	$2,93 \cdot 10^6$	$6,92 \cdot 10^8$	2041

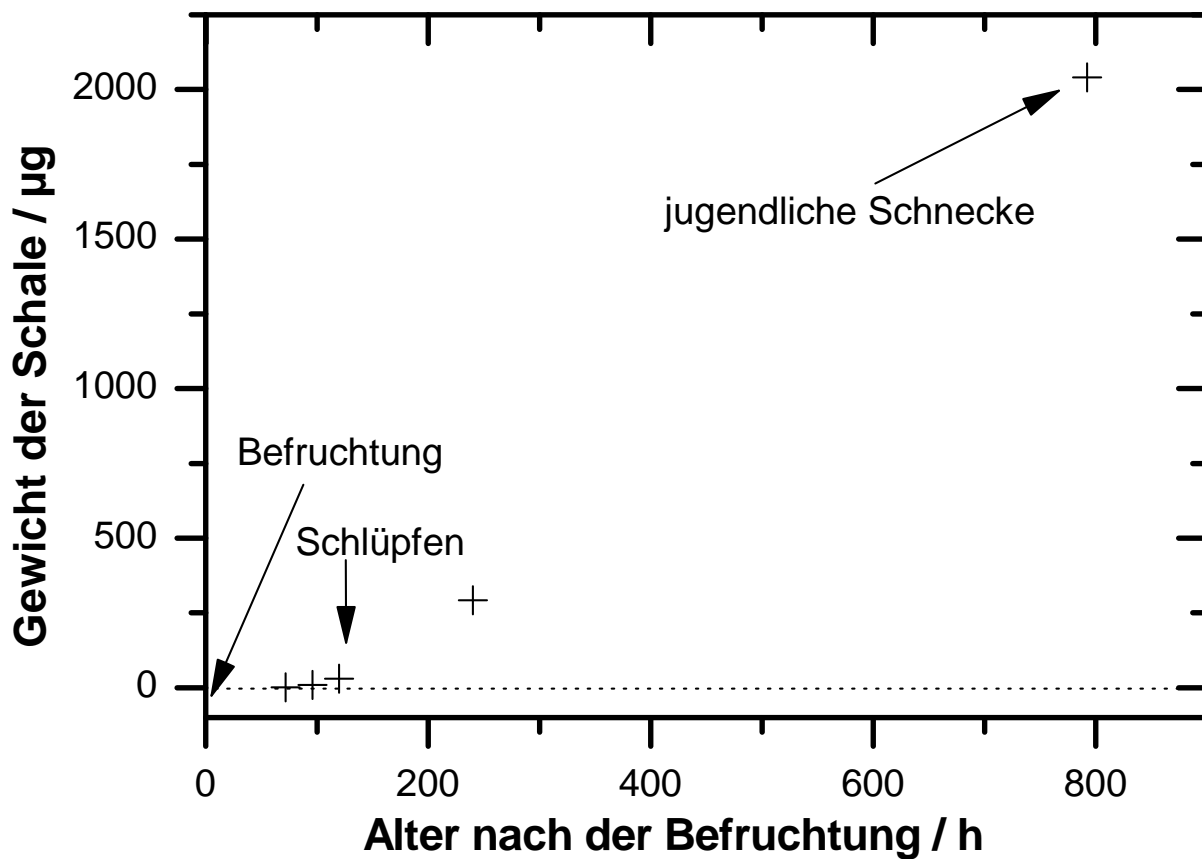


Abbildung 4.2.2-1: Abhängigkeit der Schalenmasse vom Alter.

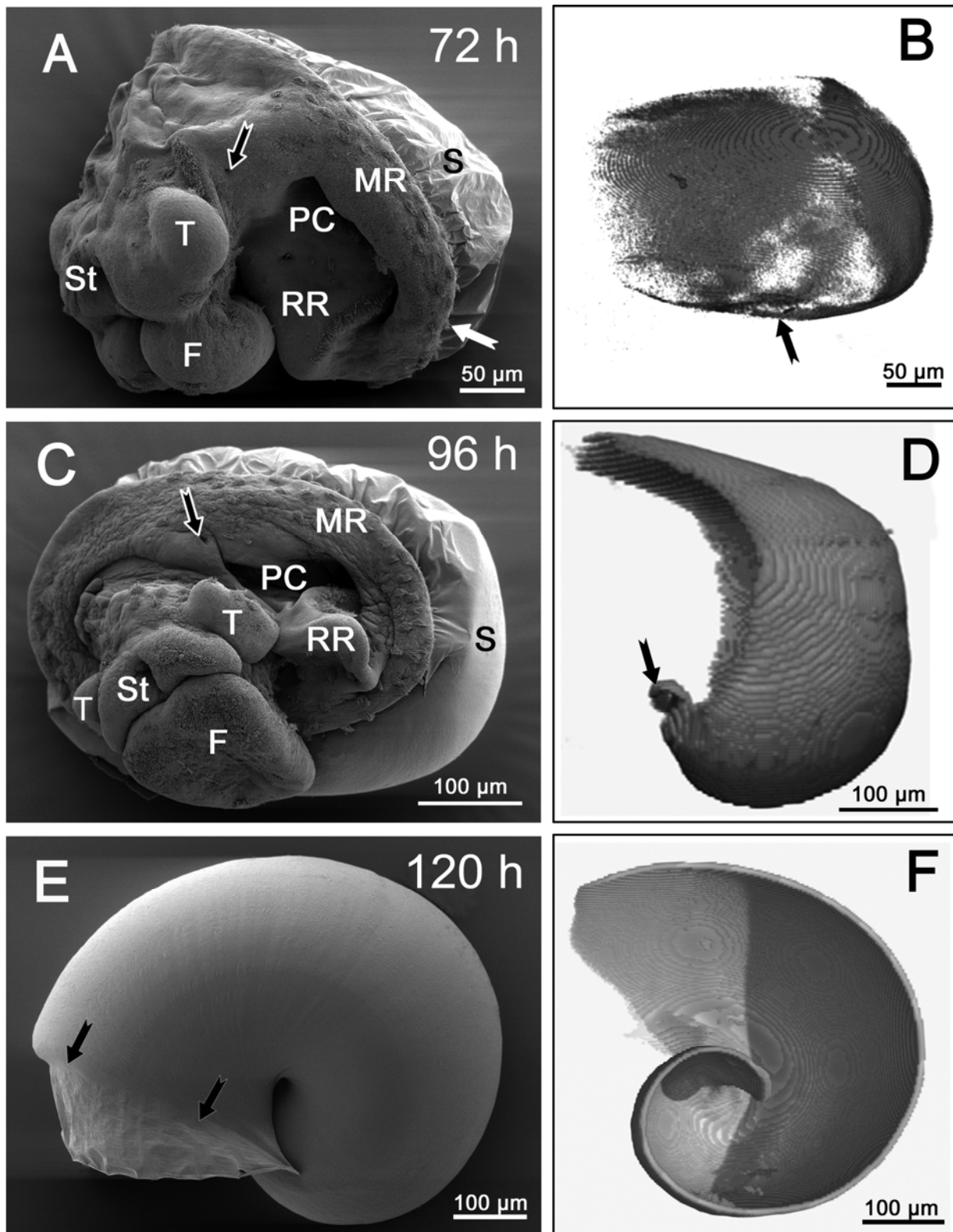


Abbildung 4.2.2-2: REM- (A, C, E) und SR μ CT-Bilder (B, D, F) von Embryonen von *B. glabrata* (A, C und E wurden aus Lit. [35] entnommen; D und F wurden von O. Prymak erstellt).^[284]

Mantelhöhle (RR), das Stomodaeum (St), die Tentakel (T) und der Anus (schwarzer Pfeil) zu sehen. Es kann auch der Beginn der ersten Schalenwindung erkannt werden (weißer Pfeil). In der SR μ CT-Aufnahme sind die ovale Form (350 μ m·450 μ m) und der Startpunkt der Schalenwindung (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Die vorhandene Krümmung geht hier verloren, ist aber in den Originaldaten gut zu sehen. Die Schale ist in diesem Stadium an der dicksten Stelle etwas unter 3 μ m dünn.

Die Schale des Embryos von 96 h umschließt bereits fast das ganze Tier. Die REM-Aufnahme (C) zeigt wieder das Gewebe des Embryos. Auf der SR μ CT-Abbildung (D) sind die erste Windung der Schale und der Startpunkt der Schalenwindung (schwarzer Pfeil) zu sehen.

Betrachtet man die Schale des 120 h Embryos (E, F), so sieht man eine voll entwickelte Schale mit anderthalb Windungen und einem Durchmesser von

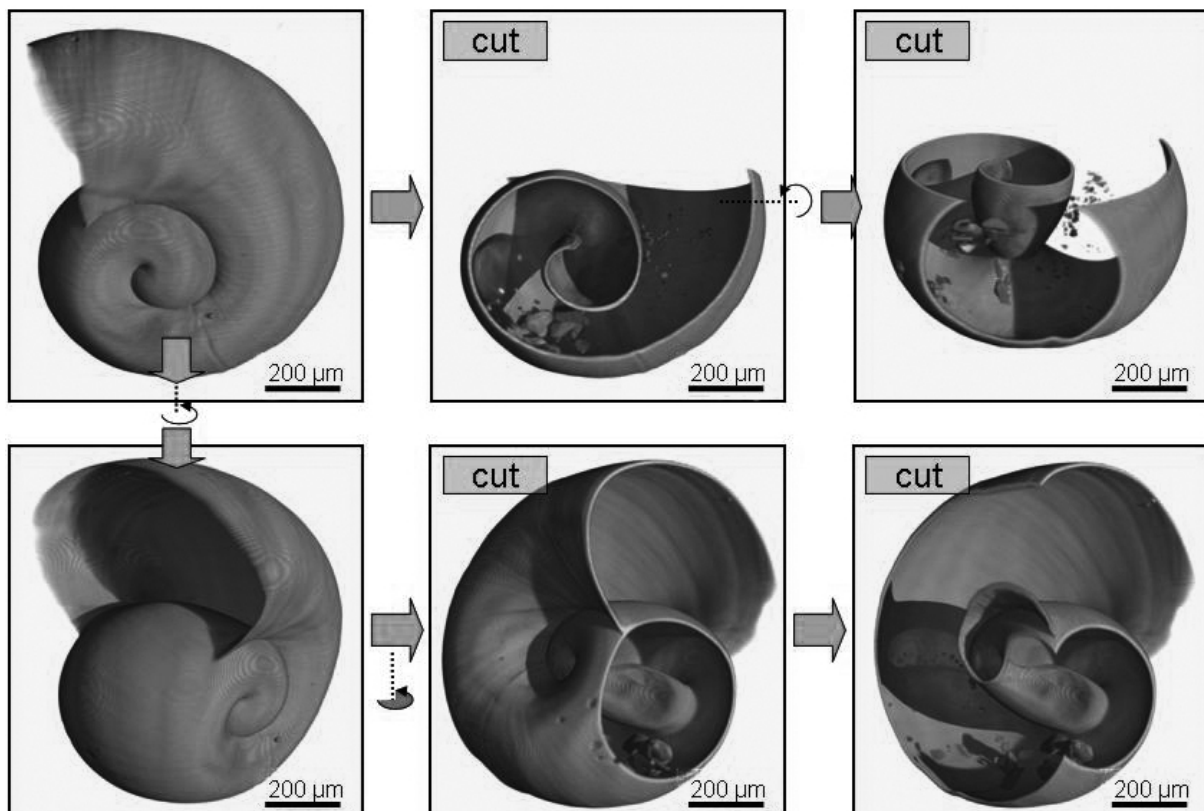


Abbildung 4.2.2-3: *B. glabrata*, 5 Tage nach dem Schlüpfen aus dem Ei in aus verschiedenen Blickwinkeln und Schnitten (Abbildung: O. Prymak).^[284]

650 μm . Die Schnecke ist nun bereit, das Ei zu verlassen. An die Öffnung der Schale (schwarze Pfeile) schließt sich das Periostracum an. Es ist der jüngste Teil der Schale. Deshalb ist es noch sehr weich und fast nicht mineralisiert. Aus diesem Grund ist es auch nicht in der SR μ CT-Aufnahme zu sehen, welche hier einen sagittalen Schnitt darstellt.

Durch das Auszählen der mineralisierten Voxel der Schale kann das Gewicht der Schale in Abhängigkeit vom Alter gezeigt werden (Tabelle 4.2.2-1 und Abbildung 4.2.2-1).

Die Schnecke hat fünf Tage nach dem Schlüpfen zwei Windungen und einen Durchmesser von 1 mm (Abbildung 4.2.2-3). Nach vier Wochen drei Windungen und einen Durchmesser von 3 mm (Abbildung 4.2.2-4). Bei

beiden Schnecken sind unregelmäßige Objekte im Inneren der Schale zu sehen die nicht mit dieser verbunden sind

(Pfeil in Abbildung 4.2.2-4). Vielmehr befinden sie sich in der Region, in der auch der Magen liegt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich um Calciumphosphatsteine oder Silikatsteine handelt. ^[284]

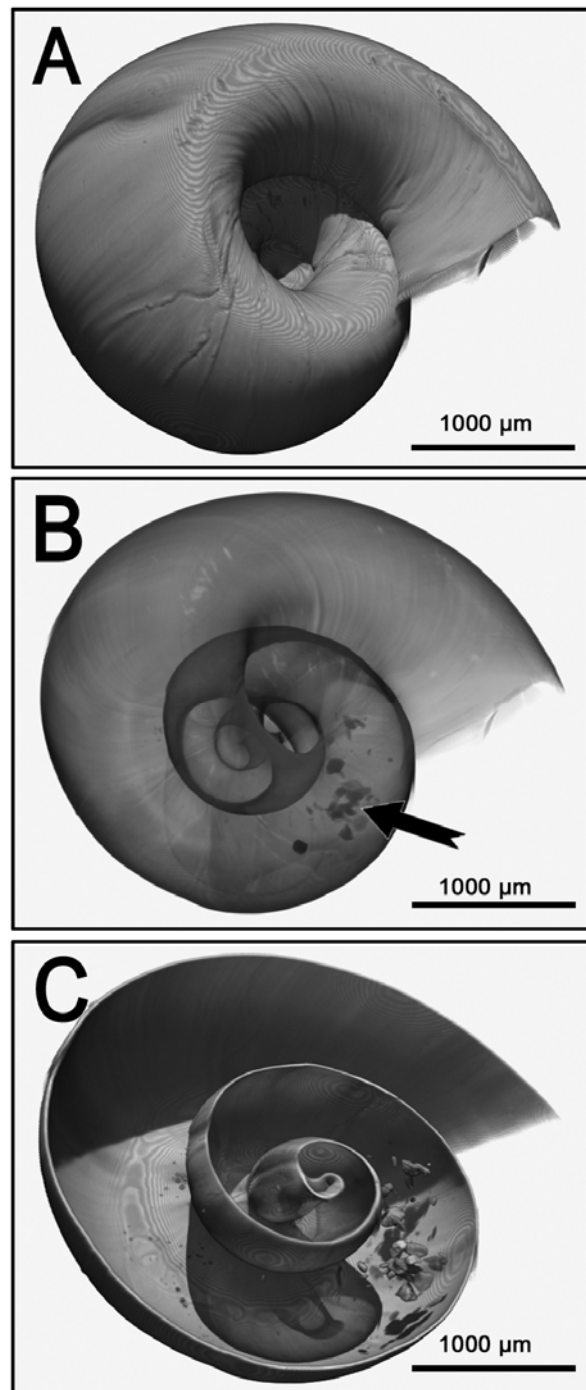


Abbildung 4.2.2-4: *B. glabrata*, vier Wochen nach dem Schlüpfen. A seitliche Ansicht; B transparente Ansicht; C virtueller Blick in die Schale (Abbildung: O. Prymak). ^[284]

4.2.3 Untersuchung der Schale der Australseepocke (*Elminius modestus*)

Elminius modestus wird biologisch in die Ordnung der Rankenfußkrebse (Cirripedia) eingeordnet, die zur Klasse der Krebstiere (Crustacea) gehört. Sie kann einen Durchmesser von etwa 10 mm und ein Alter von 12 bis 18 Monaten erreichen.^[295,296] Ursprünglich stammt die Australseepocke aus der gemäßigten Zone der Südhalbkugel,^[297] von der sie vermutlich mit Schiffsbewuchs nach Europa gebracht wurde. Hier wurde sie 1944 im Ärmelkanal das erste mal beobachtet^[296] und besiedelt heute auch deutsche Küstengewässer.^[295] Sie ist vom oberen Gezeitenbereich bis in etwa 17 m Tiefe zu finden.^[295,298] Da die Australseepocke frostempfindlich ist, wird eine starke Vermehrung im flachen Wattenmeer durch Ausfrieren im Winter eingedämmt.^[299]

Für die Untersuchungen wurden zwei Australseepocken von Dr. M. Molis von der Biologischen Anstalt Helgoland (BAH) in der Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung verwendet. Ein Tier wurde durch einen Stempel beschädigt, um die Heilung der Schale zu untersuchen. Die SR μ CT-Aufnahmen wurden bei Energien von 30 und 35 keV erstellt. Dabei mussten auf Grund der Größe der Tiere zwei Höhenstufen aufgenommen werden. Die Voxelkantenlänge nach der Rekonstruktion betrug 6,8 μ m und 6,5 μ m.

Abbildung 4.2.3-1 zeigt die SR μ CT-Aufnahme bei 30 keV. Hier wurde das Tier zusammen mit dem Träger aus Polycarbonat, auf dem es gewachsen ist, untersucht. In der Abbildung ist eine Übersicht der Australseepocke zu sehen. Sie besitzt ein Gehäuse, welches nach oben durch zwei kleine Platten (rote Pfeile) geöffnet werden kann.

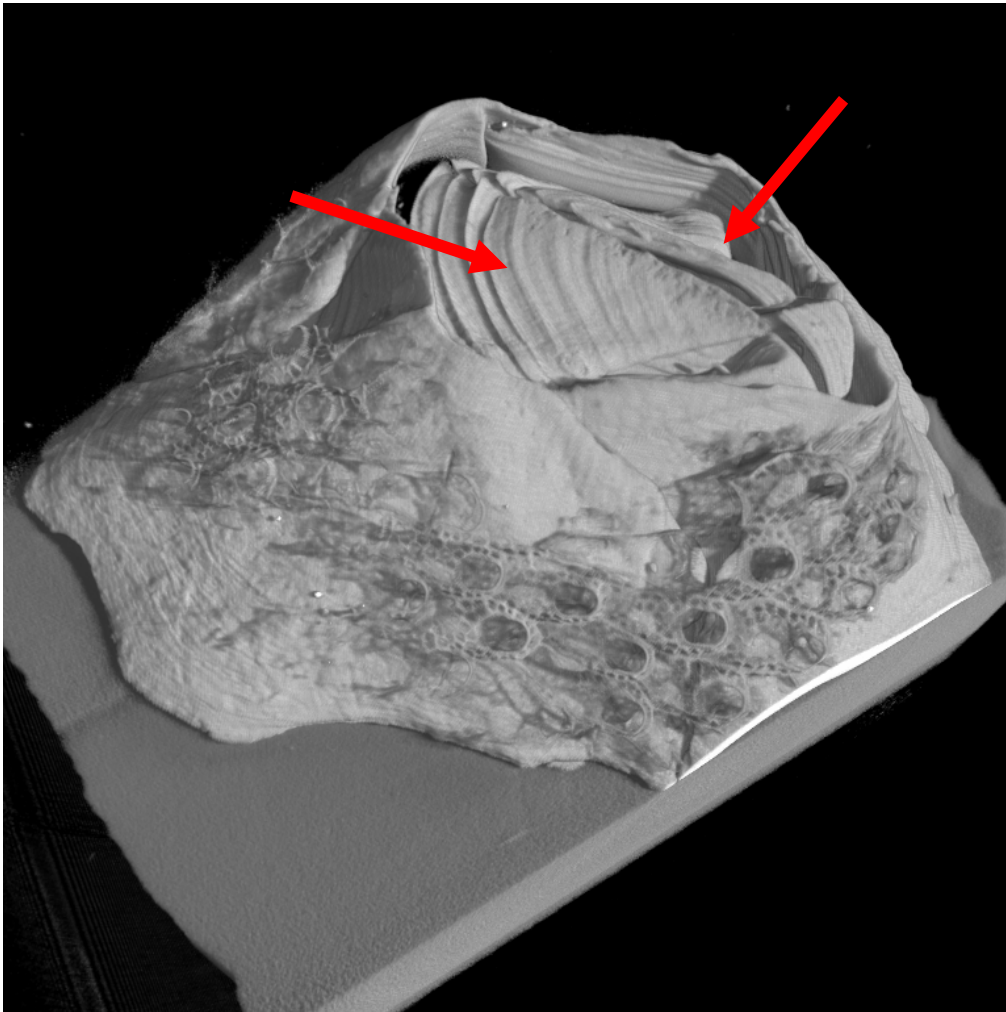


Abbildung 4.2.3-1: SR μ CT-Aufnahmen (30 keV) einer Australseepocke auf einem Träger aus Polycarbonat.

In Abbildung 4.2.3-2 ist ebenfalls die Aufnahme bei 30 keV dargestellt. Hier wurde die Seepocke virtuell aufgeschnitten. Im linken Teil ist der gesamte Querschnitt und im rechten Teil eine Vergrößerung der Gehäusekante (roter Pfeil) zu sehen. Das Gehäuse läuft zur Kante keilförmig zusammen.^[295] Die Kante des Gehäuses liegt nicht direkt auf dem Träger auf, sondern hat einen Abstand von etwa 60 μm .

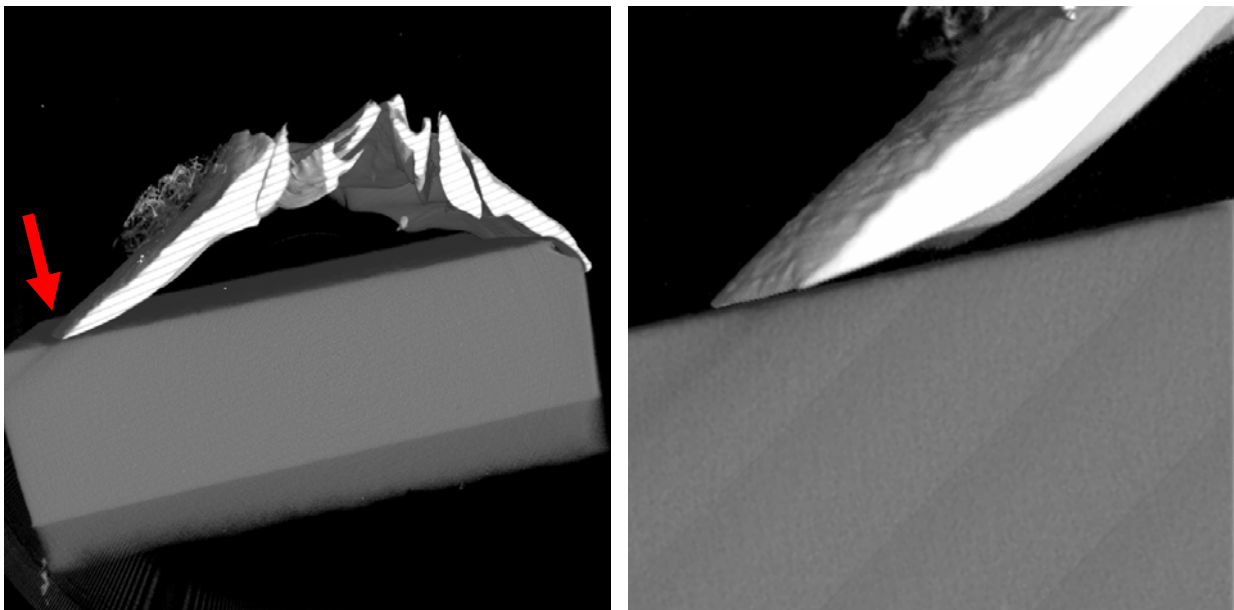


Abbildung 4.2.3-2: SR μ CT-Aufnahmen (30 keV) einer Australseepocke auf einem Träger aus Polycarbonat. Links: Schnitt durch das Tier. Rechts: Vergrößerung der Gehäusekante.

Vom Gehäuse wurde an diesem Schnitt ein Profil der Dicke erstellt. Dazu wurde nahe der Kante begonnen, die Dicke (Abbildung 4.2.3-3, blau) in definierten Abständen (rot) zu messen. Die letzte Messung erfolgte an der gelben Markierung. Zusätzlich wurde der Winkel (grün) an der Spitze mit 23° bestimmt. Das Profil der Dicke ist in Abbildung 4.2.3-4 dargestellt. Man sieht einen steilen linearen Anstieg im Bereich der keilförmigen Spitze (schwarz), welche eine Länge von ca. 560 μm aufweist. Im weiteren Verlauf ist nur noch ein leichter Anstieg der Dicke zu erkennen (rot).

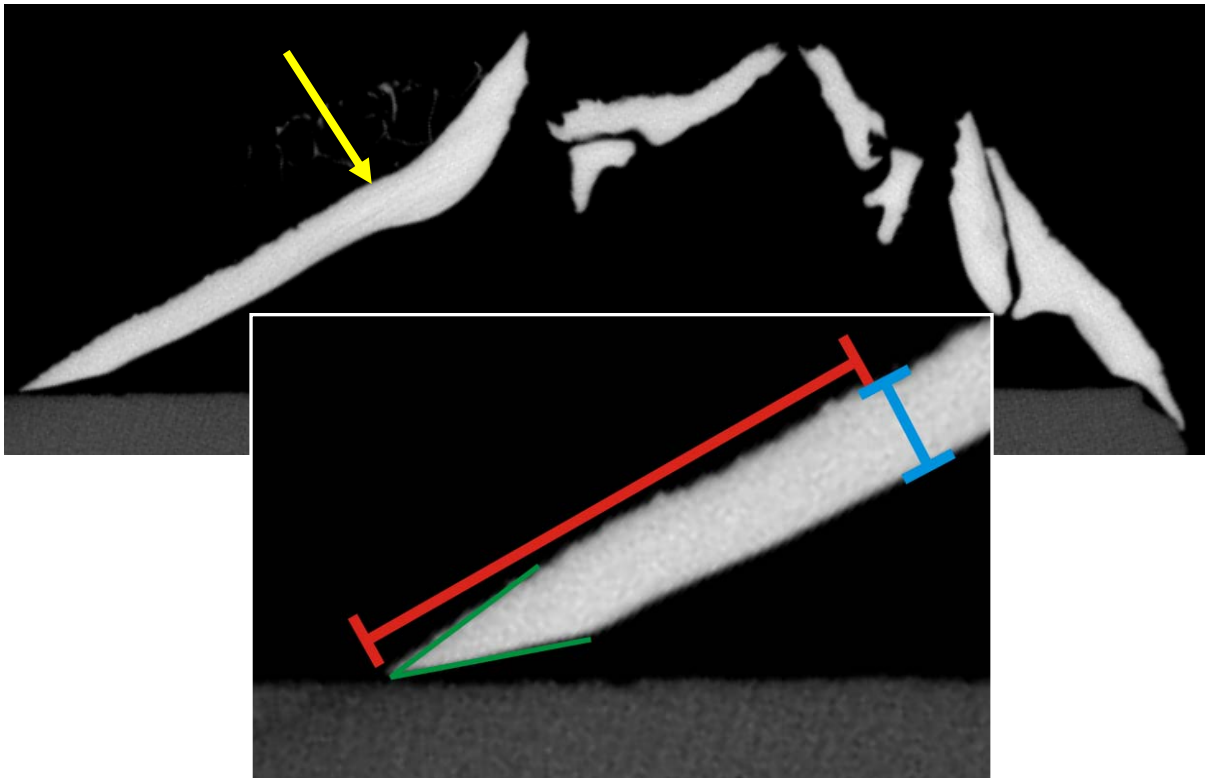


Abbildung 4.2.3-3: SR μ CT-Aufnahmen (30 keV) einer Australseepocke auf einem Träger aus Polycarbonat. Messung der Dicke (blau) in definierten Abständen zur Kante (rot) bis zur gelben Markierung. Bestimmung des Kantenwinkels (grün).

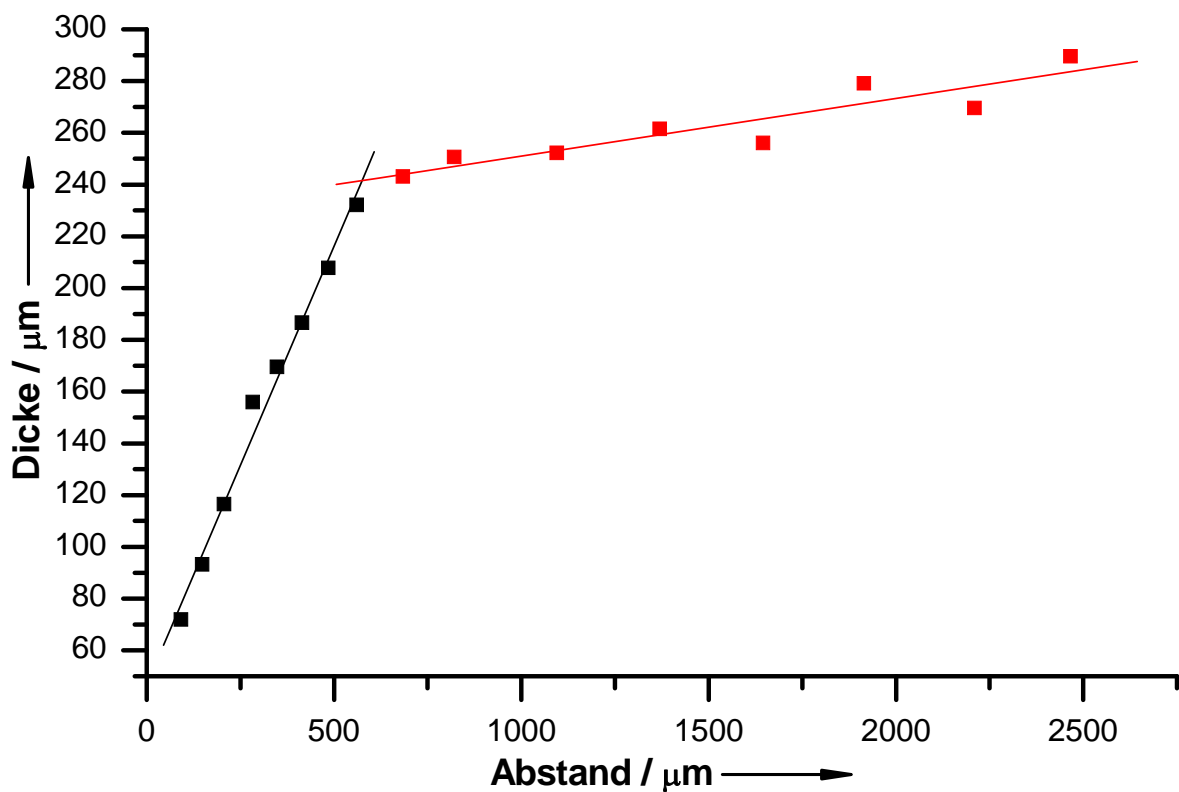


Abbildung 4.2.3-4: Darstellung der Dicke des Gehäuses bei verschiedenen Abständen zur Kante. Schwarz: keilförmiger Beginn; Rot: weiterer Verlauf.

Das beschädigte Tier ist in Abbildung 4.2.3-5 zu sehen. Die Daten wurden bei 35 keV aufgenommen. Im linken Teil ist ein Blick frontal auf die durch einen Stempel verursachte Beschädigung gezeigt (roter Pfeil). Im rechten Teil sieht man einen Querschnitt durch die beschädigte Stelle. Es ist zu erkennen, dass das Tier bereits mit der Reparatur begonnen hat, da die Bruchkanten bereits wieder mit dem Gehäuse verbunden sind (rosa Pfeile). Ein Querschnitt der Australseepocke in Höhe der Beschädigung ist in Abbildung 4.2.3-6 dargestellt. Es sind die Grenzflächen zwischen den vier Gehäuseplatten^[295] zu sehen (blaue Pfeile).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die SR μ CT geeignet ist, den Heilungsprozess und die Mineralisation des Gehäuses der Australseepocke zu untersuchen.

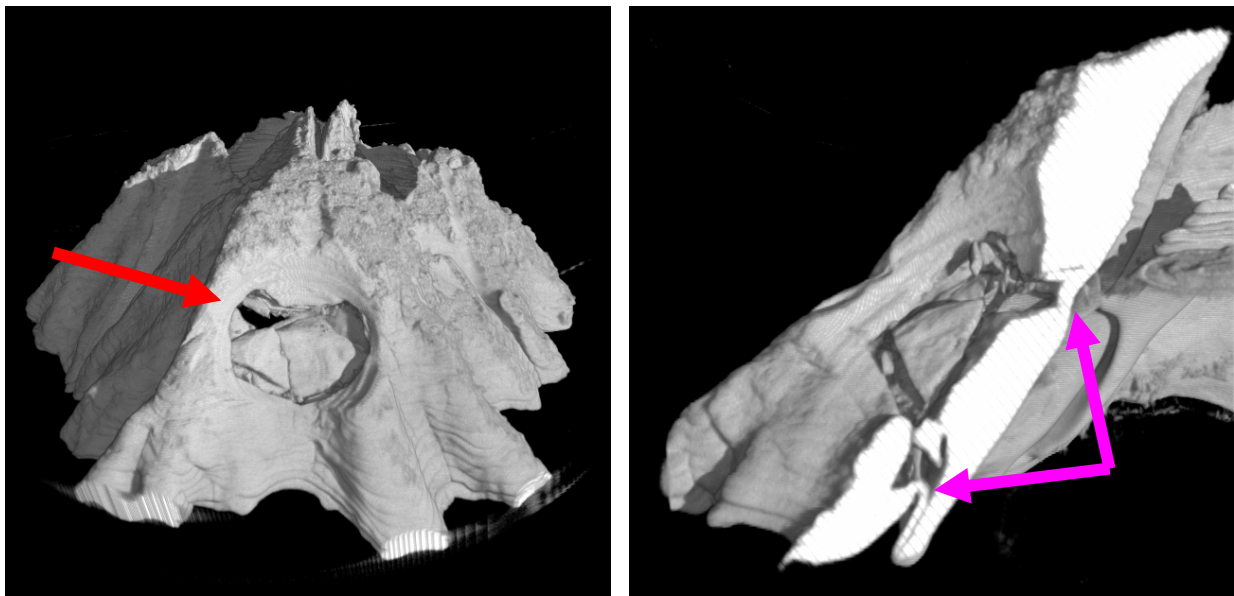


Abbildung 4.2.3-5: SR μ CT-Aufnahmen (35 keV) einer Australseepocke die beschädigt wurde. Links: Übersicht mit Blick auf die Beschädigung. Rechts: Vergrößerung und Querschnitt durch die beschädigte Stelle.

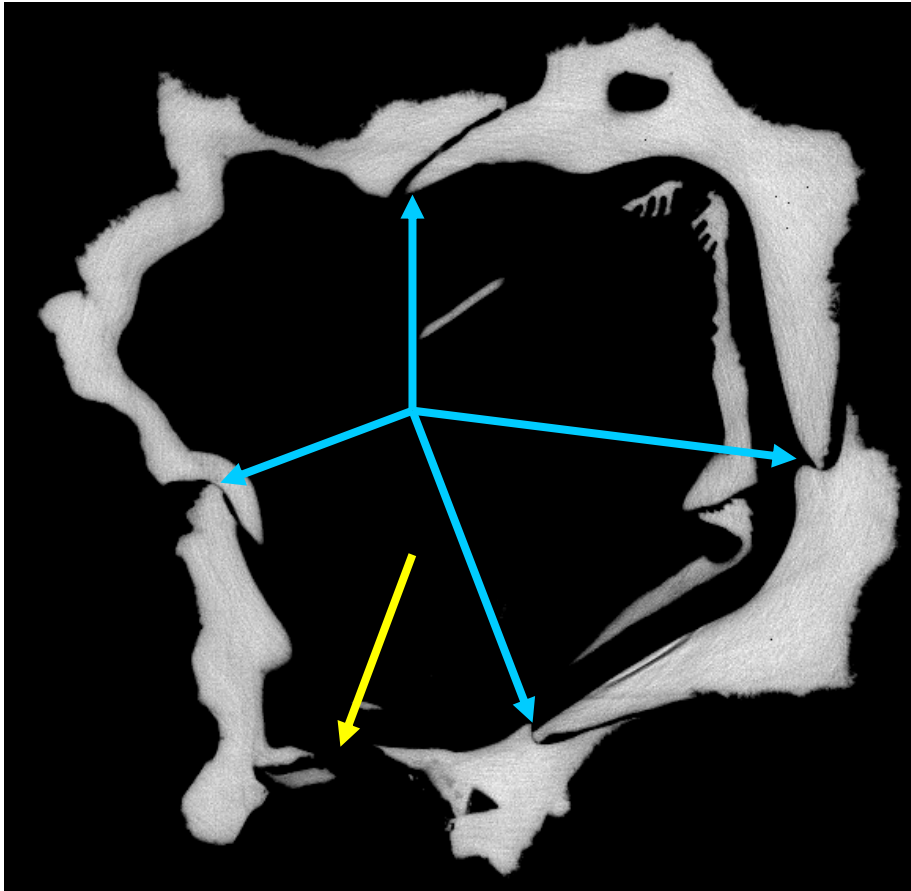


Abbildung 4.2.3-6: Querschnitt durch die beschädigte Australseepocke. Der gelbe Pfeil markiert die Beschädigung. Die vier blauen Pfeile deuten auf die Grenzflächen zwischen den Gehäuseplatten.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mehrere Projekte beschrieben, bei denen Röntgenpulverdiffraktometrie und/oder Mikrocomputertomographie mit Synchrotronstrahlung eingesetzt wurden.

Die Untersuchung des Zebrahärlings hat gezeigt, dass auch die hochauflösende SR μ CT für „große“ Objekte, wie einen drei Zentimeter langen Fisch, möglich ist. Der Zebrahärling selber eignet sich gut als Modelorganismus für die Untersuchung des Mineralisationsprozesses in Zähnen, da diese permanent ersetzt werden. Hier könnte der Einfluss verschiedener biologischer Faktoren und Umwelteinflüsse untersucht werden. Die Zahnbildung im Zebrahärling ist ein schneller Prozess, der in ca. neun bis elf Tagen abläuft. Somit könnte auch der Einfluss der Umweltbedingungen auf die Zahnbildung in diesem Organismus untersucht werden.

Ein anderer Modelorganismus in der Biologie ist der Medaka. Da das Genom und der Aufbau der Zellen unter den Wirbeltieren hoch konserviert sind, eignen sich Fische wie der Medaka und der Zebrahärling gut als Modelorganismen um Knochenkrankheiten zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde das Skelett eines gesunden und eines Medaka mit idiopathischen Deformationen untersucht. Es ist von höheren Wirbeltieren bekannt, dass die Verformung der Wirbelsäule durch missgebildete oder fehlende Teile hervorgerufen werden kann.^[300] Die Ursache der Deformierung des Medakas dieser Arbeit waren deformierte Knochen. Die Deformation betraf nicht nur die Wirbelsäule, sondern auch andere Knochen wie beispielsweise die Rippen. SR μ CT ist hier eine hervorragend geeignete Methode, da eine Untersuchung mit Hilfe der Alizarin-Rot-Färbung beim Zebrahärling gezeigt hat, dass damit die Knochenstruktur verändert wird.^[301,302] Um die Umstände der idiopathischen Deformierung genauer zu untersuchen, könnten SR μ CT Experimente an Embryonen und jungen Fischen bei verschiedenen Stadien weitere Informationen liefern.

Im Projekt das im Folgenden beschrieben wird, wurden Teile von Lachswirbeln untersucht, die während der Wirbelbildung nacheinander gebildet wurden. Die Teile wurden mit Röntgenpulverdiffraktometrie und Thermogravimetrie untersucht. Es konnte nur ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Der Carbonatgehalt des zu Beginn gebildeten Minerals war doppelt so hoch wie bei den anderen Proben. Nach Aussage der Projektpartner wird dieses Material nicht von Osteoblasten mineralisiert, somit könnte dies der Grund für den Unterschied sein. Ansonsten stimmten Kristallgröße und Zusammensetzung weitestgehend untereinander und verglichen mit humanen Knochen überein.

Analog zu den Wirbelteilen wurden Mausknochen untersucht. Diese Knochen stammten von normalen und sogenannten Fetuin A-knock-out Mäusen. Bei den knock-out Mäusen allgemein handelt es sich um Tiere, bei denen ein Gen ausgeschaltet wurde. In diesem Fall wurde das Gen für Fetuin-A ausgeschaltet. Fetuin-A verhindert im Körper das Ausfallen von Hydroxylapatit. Projektpartner hatten Fetuin-A im Knochen nachgewiesen und deshalb eine Beteiligung bei der Knochenbildung vermutet. Die Knochen der verschiedenen Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede in Zusammensetzung und Kristallitgröße. Auf Grund der Ergebnisse konnte eine Funktion des Fetuin-A bei der Knochenbildung nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um einen Aufschluss zu liefern.

Fluorotische Zähne entstehen, wenn bei der Odontogenese zu viel Fluorid aufgenommen wird. Sie zeigen eine Verfärbung des Enamels und Dentins. Der Vergleich eines fluorotischen mit einem gesunden Zahn mittels SR μ CT zeigte nicht die erwarteten Unterschiede in der Mineralisation.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Untersuchung der Kutikula verschiedener Asselarten dar. Das Exoskelett dieser Tiere muss verschiedenen Ansprüchen dienen. Außerdem muss es, da es nicht mitwächst, von Zeit zu Zeit abgeworfen und erneuert werden. Um den Mineralisationsprozess zu verstehen, wurde die Mineralisation der Kutikula von *Porcellio scaber* bei verschiedenen

Zeitpunkten der Häutung untersucht. Es wurden die anteriore und die posteriore Hälfte der Tiere miteinander verglichen. Mittels Röntgenpulverdiffraktometrie und AAS wurde das Verhältnis von ACC/Calcit bestimmt und über die Häutung verfolgt. Die Gesamtmineralisation wurde mittels quantitativer Auswertung der SR μ CT-Daten ermittelt. Hier werden die präsentierten Ergebnisse noch durch Ramanspektroskopie und Elektronenmikroskopie durch die Projektpartner erweitert. Danach erfolgt die biologische Bewertung. Wie schon erwähnt, sind die Ansprüche an die Kutikula von Tier zu Tier je nach Verhalten und Lebensraum unterschiedlich. In der Untersuchung der Kutikula von *Porcellio scaber* und *Armadillidium vulgare*^[7] wurde ein Zusammenhang zwischen Verhalten und Zusammensetzung der Kutikula beobachtet. In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung zusätzlich mit dem Lebensraum verglichen. Dazu wurden vier weitere terrestrische und vier marine Spezies untersucht. Die Unterschiede zwischen „Rollern“ und „non-Rollern“ sind sowohl terrestrisch als auch marin gleich. Der hohe Gehalt von ACC in terrestrischen Tieren kann durch die schlechte Verfügbarkeit von Calciumcarbonat während der Häutung erklärt werden. ACC hat eine höhere Löslichkeit wie Calcit, was für die Demineralisation von Vorteil ist. Für die marinen Spezies kann dies nicht erklärt werden. Da der Zusammenhang zwischen Verhalten und Zusammensetzung der Kutikula weiter untersucht werden sollte, wurden weitere Tiere analog analysiert. Für diese Ergebnisse steht die biologische Bewertung noch aus.

Die Untersuchung der Embryonen von *Biomphalaria glabrata* durch SR μ CT und Rasterelektronenmikroskopie zeigt die Entwicklung der Schale bei verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Es konnte das Gewicht der Schale verglichen mit dem Alter der Tiere dargestellt werden.

Es wurden noch SR μ CT-Aufnahmen von zwei Australseepocken erstellt, von denen eine gezielt beschädigt wurde. In diesem Projekt kann die Mineralisation und Selbstheilung des Gehäuses durch weitere Studien untersucht werden. Zusätzlich wäre es sinnvoll, das Gehäuse auch mit Röntgenpulver-

diffraktometrie und durch thermogravimetrische Analysen zu untersuchen, um weitere Informationen zu erhalten.

Die hochauflösende Röntgenpulverdiffraktometrie mit Synchrotronstrahlung zeigte sich für diese Arbeit als besonders nützlich, da die quantitative Phasenanalyse durch das gute Verhältnis des Signals zum Untergrundrauschen sowie eine geringe Geräteverbreiterung der Reflexe genauere Ergebnisse liefert. Auch die Bestimmung der Kristallitgröße mit der Scherrer-Gleichung wird dadurch genauer.

Als ergänzende Methode für Studien auf dem Gebiet der Biomineralisation eröffnet die auf Synchrotronstrahlung basierende Mikrocomputertomographie neue Möglichkeiten. Die Auflösung der Computertomographie allgemein reicht von 1-2 mm für Proben in der Größenordnung von mehreren Dezimetern für medizinische Computertomographie.^[303] Bei Laborquellen liegt die Auflösung bei wenigen 10 μm (Größenordnung: wenige Zentimeter).^[304-307] Für SR μ CT liegt sie bei 1-3 μm (Größenordnung: wenige Millimeter).^[115,291,307,308] Es wurde auch schon von einer Auflösung von 700 nm berichtet.^[309] Ein Vergleich von Laborgeräten und Mikrocomputertomographie mit Synchrotronstrahlung zeigte eine höhere Auflösung und weniger Artefakte für SR μ CT.^[230] Das Einsatzgebiet der Computertomographie allgemein ist unter anderem die Untersuchung von Knochen^[306,310-317], Zähnen,^[232,233,291,318,319] Kontaktflächen von Implantaten^[115,307,320-326] und anderen Biomineralien.^[291,304,305,327-329] Ein Nachteil für die SR μ CT ist allerdings die lange Messzeit, besonders für große Proben (von drei bis zu 36 Stunden), da der Zugriff auf Strahlzeit am HASYLAB limitiert ist. Die beeindruckenden Ergebnisse rechtfertigen jedoch diesen Aufwand.

6. Literatur

- [1] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation. Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*, Teubner, Wiesbaden, **2003**.
- [2] H. Tiemann, I. Sötje, G. Jarms, C. Paulmann, M. Epple, B. Hasse, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 1266.
- [3] H. C. Lichtenegger, T. Schöberl, M. H. Bartl, H. Waite, G. D. Stucky, *Science* **2002**, 298, 389.
- [4] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, *Thermochim. Acta* **2000**, 361, 131.
- [5] K. Kawasaki, T. Suzuki, K. M. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 11356.
- [6] D. Raabe, C. Sachs, P. Romano, *Acta Mater.* **2005**, 53, 4281.
- [7] A. Becker, A. Ziegler, M. Epple, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2005**, 1814.
- [8] B. Hasse, H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker, M. Epple, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3679.
- [9] W. Wiltschko, R. Wiltschko, *J. Comp. Physiol. A* **2005**, 191.
- [10] G. Fränkel, *J. Comp. Physiol. A* **1925**, 2, 658.
- [11] J. Aizenberg, A. Takachenko, S. Weiner, L. Addadi, G. Hendeler, *Nature* **2001**, 412.
- [12] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford University Press, New York, **1989**.
- [13] S. Mann, *J. Mater. Chem.* **1995**, 5, 935.
- [14] S. Mann, *Biomimetic materials chemistry*, VCH, Weinheim, **1996**.
- [15] S. Mann, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 3953.
- [16] E. Baeuerlein, *Biomineralization*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [17] S. Mann, *Biomineralization*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.

- [18] E. Baeuerlein, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 636.
- [19] F. C. Meldrum, *Int. Mater. Rev.* **2003**, *48*, 187.
- [20] E. Baeuerlein, Wiley-VCH, Weinheim, New York, **2004**.
- [21] S. Albeck, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11691.
- [22] J. Aizenberg, G. Lambert, L. Addadi, S. Weiner, *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 222.
- [23] J. Aizenberg, J. Hanson, T. F. Koetzle, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 881.
- [24] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, *271*, 67.
- [25] B. A. Gotliv, S. Weiner, L. Addadi, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 522.
- [26] B. M. Waggoner, *Paleo. Bios.* **1996**, *17*, 20.
- [27] B. M. Tebo, H. A. Johnson, J. K. McCarthy, A. S. Templeton, *Trends in Microbiology* **2005**, *13*, 421.
- [28] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 159.
- [29] F. Bosselmann, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2007**.
- [30] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3260.
- [31] K. Abendroth, *Der Osteoblast: Funktion und Hormonelle Regulation*, Springer, Heidelberg, **1992**.
- [32] H. Cölfen, M. Antonietti, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5714.
- [33] S. Weiner, W. Traub, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1984**, *304*, 425.
- [34] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 980.
- [35] J. C. Marxen, W. Becker, D. Finke, B. Hasse, M. Epple, *J. Molluscan Studies* **2003**, *69*, 113.
- [36] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jäger, H. Cölfen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 12653.

- [37] N. Watabe, V. R. Meenakshi, P. L. Blackwelder, E. M. Kurtz, D. G. Dunkelberger, *Mechanisms of biomineralization in the invertebrates and plant*, University South Carolina Press, Columbia, **1976**.
- [38] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2003**, 551.
- [39] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3977.
- [40] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 43.
- [41] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959.
- [42] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Vol. 18*, Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [43] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **1999**, 10, 169.
- [44] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, F. C. M. Driessens, J. A. Planell, S. M. Best, *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **1999**, 10, 177.
- [45] H. B. van Rees, M. Mengeot, E. Kostiner, *Mater. Res. Bull.* **1973**, 8, 1307.
- [46] A. S. Posner, A. Perloff, A. F. Diorio, *Acta Crystallogr.* **1958**, 11, 308.
- [47] J. C. Elliott, P. E. Mackie, R. A. Young, *Science* **1973**, 180, 1055.
- [48] P. Layrolle, A. Lebugle, *Chem. Mater.* **1996**, 8, 134.
- [49] A. S. Posner, *Clin. Orthop.* **1985**, 200.
- [50] R. Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Karger, Basel, **1991**.
- [51] T. Kanazawa, *Inorganic phosphate materials*, Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [52] J. E. Leitsch, Dissertation, Philipps-Universität (Marburg), **2003**.
- [53] H. Mayer, A. Scutt, E. Wingender, *Z. Orthopädie* **1992**, 130, 276.
- [54] J. Wolff, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, Hirschwald, Berlin, **1892**.

- [55] J. M. H. Dibbets, *One Century of Wolff's law*, University of Michigan, Ann Harbor, **1992**.
- [56] D. Felsenberg, *Pharmazie in unserer Zeit* **2001**, 30, 488.
- [57] T. N. Katagiri, N. Takahashi, *Oral. Dis.* **2002**, 8, 147.
- [58] R. Burkhardt, *Osteologie* **1992**, 1, 139.
- [59] M. Schoppet, K. T. Preissner, L. C. Hofbauer, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, 22, 549.
- [60] H. Reichel, *Endokrine und parakrine Wirkungen von 1,25(OH)2D3*, Springer, Heidelberg, **1992**.
- [61] D. A. Corral, M. Amling, M. Priemel, E. Loyer, S. Fuchs, P. Ducy, R. Baron, G. Karsenty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 13835.
- [62] B. K. Berkowitz, A. Boyde, R. M. Frank, H. J. Höhling, J. Nalbundian, C. H. Tonge, *Handbook of Microscopic Anatomy, Vol. 6*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, **1988**.
- [63] H. Leonhardt, *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1985**.
- [64] G. H. Schumacher, *Anatomie für Stomatologen, Lehrbuch und Atlas I. Teil*, Barth Verlag, Leipzig, **1984**.
- [65] C. M. Sturdevant, T. M. Roberson, H. O. Heymann, J. R. Sturdevant, *The Art and Science of Operative Dentistry*, Mosby Verlag, St. Louis-Baltimore-Berlin, **1995**.
- [66] W. Ketterl, *Endodontie in: Praxis der Zahnheilkunde, Vol. 3*, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, **1987**.
- [67] C. Ten, *Oral histology: Development, structure and function*, Mosby Verlag, St. Louis, **1980**.
- [68] J. Papendorf, Dissertation, Heinrich-Heine Universität (Düsseldorf), **2007**.
- [69] T. Loerting, M. H. Moore, R. K. Khanna, *Spectrochim. Acta Part A* **1991**, 47, 255.

- [70] W. Dreybrodt, *Processes in Karst systems - Physics, chemistry and geology*, Springer-Verlag, Berlin, **1988**.
- [71] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **2004**.
- [72] M. Luckas, J. Krissmann, *Thermodynamik der Elektrolytlösungen*, Springer, Berlin **2001**.
- [73] E. N. Maslen, V. A. Streltsov, N. R. Streltsova, *Acta Crystallogr.* **1993**, B 49, 636.
- [74] B. Dickens, J. S. Boewen, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1971**, A 75, 27.
- [75] D. Jarosch, G. Heger, *Tschermaks Mineral. Petrogr. Mitt.* **1986**, 35, 127.
- [76] S. R. Kamhi, *Acta Crystallogr.* **1963**, 16, 770.
- [77] H. Effenberger, *Monatsh. Chem.* **1981**, 112, 899.
- [78] K. F. Hesse, H. Kueppers, E. Suess, *Z. Kristallogr.* **1983**, 163, 227.
- [79] J. Aizenberg, D. A. Muller, J. L. Grazul, D. R. Hamann, *Science* **2003**, 299, 3963.
- [80] L. Brecevic, A. E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **1989**, 98, 504.
- [81] C. Günther, A. Becker, G. Wolf, M. Epple, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2005**, 631, 2830.
- [82] K. Sawada, *Pure & Appl. Chem.* **1997**, 69, 921.
- [83] L. N. Plummer, E. Busenberg, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1982**, 46, 1011.
- [84] H. Pauly, *Naturens Verden (Copenhagen)* **1963**, 168–192.
- [85] J. H. F. Jansen, C. F. Woensdregt, M. J. Kooistra, S. J. van der Gaast, *Geology* **1987**, 15, 245.
- [86] E. Suess, W. Balzer, K. F. Hesse, P. J. Müller, C. A. Ungerer, G. Wefer, *Science* **1982**, 216, 1128.
- [87] M. G. Taylor, K. Simkiss, G. N. Greaves, M. Okazaki, S. Mann, *Proc. R. Soc. Lond. B* **1993**, 252, 75.
- [88] E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. R. Soc. London B* **1997**, 264, 461.

- [89] N. F. Hadley, *Sci. Am.* **1986**, 7, 98.
- [90] Y. Bouligand, *Tissue & Cell* **1972**, 4, 189.
- [91] P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe, *Acta Biomater.* **2007**, 3, 301.
- [92] F. R. Elder, A. M. Gurewitsch, R. V. Langmuir, H. C. Pollock, *J. Appl. Phys.* **1947**, 18, 810.
- [93] F. R. Elder, A. M. Gurewitsch, R. V. Langmuir, H. C. Pollock, *Phys. Rev.* **1947**, 71, 829.
- [94] F. R. Elder, R. V. Langmuir, H. C. Pollock, *Phys. Rev.* **1948**, 74, 52.
- [95] A. Hofmann, *The physics of synchrotron radiation*, Cambridge university press, Cambridge, **2004**.
- [96] P. J. Duke, *Synchrotron radiation*, Oxford university press, Oxford, **2000**.
- [97] K. Wille, *Physik der Teilchenbeschleuniger und Synchrotronstrahlungsquellen; Eine Einführung*, Teubner Verlag, **2002**.
- [98] J. D. Jackson, *Classical electrodynamics*, John Wiley & Sons, Inc, **1999**.
- [99] T. Donath, University of Hamburg (Hamburg), **2006**.
- [100] H. P. Klug, L. E. Alexander, *X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials*, Wiley-Interscience, New York, **1974**.
- [101] M. Knapp, C. Baetz, H. Ehrenberg, H. Fuess, *J. Synchr. Rad.* **2004**, 11, 328.
- [102] M. Knapp, V. Joco, C. Baetz, H. H. Brecht, A. Berghaeuser, H. Ehrenberg, H. von Seggern, H. Fuess, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.* **2004**, A521, 565.
- [103] P. Scherrer, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* **1918**, 2, 98.
- [104] H. M. Rietveld, *J. Appl. Cryst.* **1969**, 2, 65.
- [105] H. M. Rietveld, *Acta Crystallogr.* **1967**, 22, 151.
- [106] W. Abriel, R. Nesper, *Z. Kristallogr.* **1993**, 205, 99.
- [107] L. B. McCusker, R. B. von Dreele, D. E. Cox, D. Louer, P. Scardi, *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 36.

- [108] J. Rodriguez-Carvajal, *Abstracts of the Satellite Meeting on Powder Diffraction of the XV Congress of the IUCr, Toulouse, France* **1990**, 127.
- [109] A. Le Bail, H. Duroy, J. L. Fourquet, *Mater. Res. Bull.* **1988**, 23, 447.
- [110] A. Gualtieri, *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, 33, 267.
- [111] J. R. Goldsmith, D. L. Graf, *Am. Mineral.* **1958**, 43, 84.
- [112] O. Prymak, H. Tiemann, I. Sötje, J. C. Marxen, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, F. Beckmann, T. Donath, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, 10, 688.
- [113] R. H. Huesman, G. T. Gullberg, W. L. Greenberg, T. F. Budinger, *RECLBL Library users manual: Donner algorithms for reconstruction tomography.* **1977**, Lawrence Berkeley Laboratory.
- [114] F. Beckmann, T. Donath, T. Dose, T. Lippmann, R. V. Martins, J. Metge, A. Schreyer, *SPIE Proc.* **2004**, 5535.
- [115] T. Donath, F. Beckmann, R. G. J. C. Heijkants, O. Brunke, A. Schreyer, *SPIE Proc.* **2004**, 5535, 775.
- [116] H. K. Cammenga, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1171.
- [117] F. Neues, W. H. Arnold, J. Fischer, F. Beckmann, P. Gängler, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, 37, 426.
- [118] F. Neues, A. Ziegler, M. Epple, in *Biom mineralisation: Biological Aspects and Structure Formation* (Ed.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [119] G. S. Gerhard, E. J. Kauffman, X. Wang, R. Stewart, J. L. Moore, C. J. Kasales, E. Demidenko, K. C. Cheng, *Exp. Gerontol.* **2002**, 37, 1055.
- [120] C. Nuesslein-Vollhart, R. Dahm, *Zebrafish*, Oxford University Press, Oxford, **2002**.
- [121] N. C. Bird, P. M. Mabee, *Dev. Dynam.* **2003**, 228, 337.
- [122] Y. van de Peer, J. S. Taylor, J. Joseph, A. Meyer, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 109.
- [123] P. C. Yelick, T. F. Schilling, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2002**, 13, 308.

- [124] T. L. Payne-Ferreira, P. C. Yelick, *Dev. Dyn.* **2003**, 228, 683.
- [125] H. R. Crollius, J. Weissenbach, *Genome Res.* **2005**, 15, 1675.
- [126] S. Berghmans, C. Jette, D. Langenau, K. Hsu, R. Stewart, T. Look, J. P. Kanki, *Biotechniques* **2005**, 39, 227.
- [127] A. P. Sandhu, A. M. I. Lam, D. B. Fenske, L. R. Palmer, M. Johnston, P. R. Cullis, *Anal. Biochem.* **2005**, 341, 156.
- [128] D. M. Hentschel, J. V. Bonventre, *Curr. Mol. Med.* **2005**, 5, 537.
- [129] T. L. Payne, Z. Skobe, P. C. Yelick, *J. Dent. Res.* **2001**, 80, 1968.
- [130] J. D. Bartlett, S. E. Dwyer, E. Beniash, Z. Skobe, T. L. Payne-Ferreira, *J. Dent. Res.* **2005**, 84, 832.
- [131] L. Verreijdt, E. Vandervennet, J. Y. Sire, A. Huysseune, *Connect. Tissue Res.* **2002**, 43, 109.
- [132] F. Z. Cui, X. M. Wang, in *Biomineralisation: Biological Aspects and Structure Formation* (Ed.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [133] S. J. Du, V. Frenkel, G. Kindschi, Y. Zohar, *Dev. Biol.* **2001**, 238, 239.
- [134] X. M. Wang, F. Z. Cui, J. Ge, Y. Zhang, C. Ma, *Biomaterials* **2002**, 23, 4557.
- [135] S. Fisher, P. Jagadeeswaran, M. E. Halpern, *Dev. Biol.* **2003**, 264, 64.
- [136] G. S. Gerhard, *Exp. Gerontol.* **2003**, 38, 1333.
- [137] T. Piotrowski, T. F. Schilling, M. Brand, Y. J. Jiang, C. P. Heisenberg, D. Beuchle, H. Grandel, F. J. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warga, C. Nuesslein-Vollhart, *Development* **1996**, 123, 345.
- [138] T. F. Schilling, T. Piotrowski, H. Grandel, M. Brand, C. P. Heisenberg, Y. J. Jiang, D. Beuchle, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, M. C. Mullins, F. J. van Eeden, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, J. Odenthal, R. M. Warga, T. Trowe, C. Nuesslein-Vollhart, *Development* **1996**, 123, 329.

- [139] J. Y. Sire, F. Allizard, O. Babiari, J. Bourguignon, A. Quilhac, *J. Anat.* **1997**, *190*, 545.
- [140] C. B. Kimmel, C. T. Miller, C. B. Moens, *Dev. Biol.* **2001**, *233*, 239.
- [141] C. van der Heyden, K. Wautier, A. Huysseune, *Arch. Oral Biol.* **2001**, *46*, 1051.
- [142] K. Wautier, C. Van der Heyden, A. Huysseune, *Arch. Oral Biol.* **2001**, *46*, 67.
- [143] A. Huysseune, C. Van der Heyden, J. Y. Sire, *Anat. Embryol. (Berl.)* **1998**, *198*, 289.
- [144] A. Huysseune, J. Y. Sire, *Cell Tissue Res.* **2004**, *315*, 85.
- [145] A. Huysseune, I. Thesleff, *Bioessays* **2004**, *26*, 665.
- [146] F. Neues, R. Goerlich, J. Renn, F. Beckmann, M. Epple, *J. Struct. Biol.* **2007**, *160*, 236–240.
- [147] J. Renn, C. Winkler, M. Scharl, R. Fischer, R. Goerlich, *Protoplasma* **2006**, *229*, 209.
- [148] S. B. Wise, D. W. Stock, *Evol. Dev.* **2006**, *8*, 511.
- [149] Y. Nemoto, K. Higuchi, O. Baba, A. Kudo, Y. Takano, *Bone* **2007**, *40*, 399.
- [150] K. F. Gorman, F. Breden, *Comp. Biochem. Physiol C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *145*, 28.
- [151] P. E. Witten, A. Hansen, H. B.K., *J. Morphol.* **2001**, *250*, 197.
- [152] T. U. Wagner, J. Renn, T. Riemensperger, J. N. Volff, R. W. Koster, R. Goerlich, M. Scharl, C. Winkler, *Space* **2003**, *32*, 1459.
- [153] J. Renn, S. M., J. N. Volff, R. Goerlich, M. Scharl, C. Winkler, *Gene* **2006**, *372*, 208.
- [154] R. J. Wassersug, *Stain Technology* **1976**, *51*, 131.
- [155] G. Dingerkus, L. D. Uhler, *Stain Technology* **1977**, *52*, 229.
- [156] S. Ekanayake, B. K. Hall, *Am. J. Anat.* **1988**, *182*, 241.
- [157] S. Fisher, P. Jagadeeswaran, M. E. Halpern, *Dev. Biol.* **2003**, *264*, 64.

- [158] X. M. Wang, F. Z. Cui, J. Ge, Y. Wang, *J. Struct. Biol.* **2004**, *145*, 236.
- [159] K. F. Gorman, S. J. Tredwell, F. Breden, *Spine* **2007**, *32*, 735.
- [160] K. Nordvik, Dissertation, Universität Bergen (Norwegen), **2007**.
- [161] K. Nordvik, H. Harald Kryvi, G. K. Totland, S. Grotmol, *J. Anat.* **2005**, *206*, 103.
- [162] A. Bigi, E. Foresti, R. Gregorini, A. Ripamonti, N. Roveri, J. S. Shah, *Calcif. Tissue Int.* **1992**, *50*, 439.
- [163] M. J. Glimcher, *Rev. Mineral. Geochem.* **2006**, *64*, 223.
- [164] V. Ziv, H. D. Wagner, S. Weiner, *Bone* **1996**, *18*, 417.
- [165] L. W. Fisher, E. D. Eanes, L. J. Denholm, B. R. Heywood, J. D. Termine, *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *40*, 282.
- [166] R. Z. Legeros, J. P. Legeros, in *Phosphate Minerals* (Eds.: J. O. Nriagu, P. B. Moore), Springer, Berlin, Heidelberg, **1984**, p. Chapter 12.
- [167] D. J. Simmons, J. E. Russel, M. D. Grynpras, *Bone Mineral* **1986**, *1*, 485.
- [168] V. Ziv, I. Sabanay, T. Arad, W. Traub, S. Weiner, *Microscop. Res. Technol.* **1996**, *33*, 203.
- [169] W. Jahnen-Dechent, *BIOspektrum* **2004**, *10*, 254.
- [170] W. F. Neuman, *Fundam. Clin. Bone Physiol.* **1980**, 83.
- [171] K. O. Pedersen, *Nature* **1944**, *154*, 575.
- [172] E. Oliver, E. Soury, P. Ruminy, A. Husson, F. Parmentier, M. Daveau, J. P. Salier, *Biochem. J.* **2000**, *350*, 589.
- [173] B. Daneke, S. Gräber, C. Schäfer, A. Heiss, M. Wöltje, W. Jahnen-Dechent, *Biochem. J.* **2003**, *376*, 135.
- [174] J. Wessling, Dissertation, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen **2007**.
- [175] J. T. Triffit, U. Gebauer, B. A. Ashton, M. E. Owen, J. J. Reynolds, *Nature* **1976**, *262*, 226.
- [176] J. T. Triffit, M. E. Owen, B. A. Ashton, J. M. Wilson, *Calcif. Tissue Res.* **1978**, *26*.

- [177] B. A. Ashton, H.-J. Hohling, J. T. Triffitt, *Calcif. Tissue Res.* **1976**, 22, 27.
- [178] I. R. Dickson, M. K. Bagga, *Connect. Tissue Res.* **1985**, 14, 77.
- [179] T. Ohnishi, O. Nakamura, M. Ozawa, N. Arakaki, T. Muramatsu, Y. Daikuhara, *J. Bone Miner. Res.* **1993**, 8, 367.
- [180] T. Schinke, C. Amendt, A. Trindl, O. Pöschke, W. Müller-Esterl, W. Jahnen-Dechent, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 20789.
- [181] W. Jahnen-Dechent, T. Schinke, A. Trindl, W. Müller-Esterl, F. Sablitzky, S. Kaiser, M. Blessing, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 31496.
- [182] C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Müller-Esterl, T. Schinke, W. Jahnen-Dechent, *J. Clin. Invest.* **2003**, 112, 357.
- [183] M. Ketteler, P. Bongartz, R. Westenfeld, J. E. Wildberger, A. H. Mahnken, R. Böhm, T. Metzger, C. Wanner, W. Jahnen-Dechent, J. Floege, *Lancet* **2003**, 361, 827.
- [184] A. Heiss, A. Du Chesne, B. Denecke, J. Grötzinger, K. Yamamoto, T. Renné, W. Jahnen-Dechent, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 13333.
- [185] H. P. Jersmann, I. Dransfield, S. P. Hart, *Clin. Sci.* **2003**, 105, 273.
- [186] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 4110.
- [187] C. J. Tredwin, C. Scully, J.-V. Bagan-Sebastian, *J. Dent. Res.* **2005**, 84, 596.
- [188] R. J. Billings, R. J. Berkowitz, G. Watson, *Teeth Pediatrics* **2004**, 113, 1120.
- [189] J. Jensen, *Scand. J. Dent. Res.* **1977**, 85, 334.
- [190] J. Jensen, *Scand. J. Dent. Res.* **1978**, 86, 87.
- [191] M. Addy, S. Prayitno, L. Taylor, S. Cadogan, *J. Periodontal Res.* **1979**, 14, 403.
- [192] M. Addy, W. R. Roberts, *J. Clin. Periodontol.* **1981**, 8, 220.
- [193] S. Prayitno, M. Addy, *J. Periodontal Res.* **1979**, 14, 397.

- [194] R. H. Meyboom, M. M. Verduijn, M. G. Steenvoorden, J. A. Dekens-Konter, E. P. van Puijenbroek, *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* **1996**, *140*, 207.
- [195] M. Garcia-Lopez, M. Martinez-Blanco, I. Martinez-Mir, V. Palop, *Pediatrics* **2001**, *108*, 819.
- [196] J. Moran, D. Pal, R. Newcombe, M. Addy, *Clin. Prev. Dent.* **1991**, *13*, 31.
- [197] M. Addy, S. A. Mahdavi, T. Loyn, *J. Dent.* **1995**, *23*, 95.
- [198] K. A. Hiller, G. Wilfart, G. Schmalz, *Caries Res.* **1998**, *32*, 405.
- [199] P. K. DenBesten, *J. Public Health. Dent.* **1999**, *59*, 247.
- [200] H. T. Dean, in *Fluoride and dental health*. (Ed.: F. R. Moulton), American Association for the Advancement of Science, Washington DC, **1942**, pp. 23.
- [201] S. A. Eklund, B. A. Burt, A. I. Ismail, J. J. Calderone, *J. Am. Dent. Assoc.* **1987**, *114*, 324.
- [202] O. Fejerskov, F. Manji, V. Baelum, *J. Dent. Res.* **1990**, *69*, 692.
- [203] C. A. Olsen, H. D. J. Riley, *J. Pediatr.* **1966**, *68*, 783.
- [204] J. Guggenheimer, *Compend. Contin. Ed. Dent.* **1984**, *5*, 245.
- [205] M. A. Driscoll, M. J. Rothe, L. Abrahamian, J. M. Grant-Kels, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, *28*, 595.
- [206] I. D. Wolfe, J. Reichmeister, *Cutis* **1984**, *33*, 457.
- [207] A. E. Cale, P. D. Freedman, H. Lumerman, *J. Periodontol.* **1988**, *59*, 112.
- [208] M. A. Dodd, E. J. Dole, W. G. Troutman, D. A. Bennahum, *Ann. Pharmacother.* **1998**, *32*, 887.
- [209] C. C. Cheek, H. O. Heymann, *J. Esthet. Dent.* **1999**, *11*, 43.
- [210] B. E. McKenna, P. J. Lamey, J. G. Kennedy, J. Bateson, *Dent. Update* **1999**, *26*, 160.
- [211] P. Lumbiganon, K. Pengsaa, T. Sookpranee, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1991**, *10*, 619.
- [212] I. C. Mackie, E. Bentley, *Dent. Update* **1994**, *21*, 192.
- [213] C. Scully, *Oral. Dis.* **2003**, *9*, 165.

- [214] C. Scully, J. V. Bagan, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2004**, *15*, 221.
- [215] M. McCracken, S. J. O'Neal, *J. Prosthodont* **2000**, *9*, 95.
- [216] H. Pontefract, J. Hughes, K. Kemp, R. Yates, R. G. Newcombe, M. Addy, *J. Clin. Periodontol.* **2001**, *28*, 319.
- [217] I. A. Pretty, W. M. Edgar, S. M. Higham, *J. Dent.* **2003**, *31*, 313.
- [218] D. W. Bartlett, B. G. Smith, *Drugs Today* **1998**, *34*, 231.
- [219] E. A. O'Sullivan, M. E. J. Curzon, *BMJ* **1998**, *317*, 820.
- [220] L. Tam, *J. Can. Dent. Assoc.* **1999**, *65*, 201.
- [221] L. Tam, *J. Can. Dent. Assoc.* **1999**, *65*, 453.
- [222] V. B. Haywood, R. H. Leonard, C. F. Nelson, W. D. Brunson, *J. Am. Dent. Assoc.* **1994**, *125*, 1219.
- [223] J. R. Schulte, D. B. Morrissette, E. J. Gasior, M. V. Czajewski, *J. Am. Dent. Assoc.* **1994**, *125*, 1330.
- [224] R. H. Leonard, V. B. Haywood, C. Phillips, *Quintessence Int.* **1997**, *28*, 527.
- [225] S. C. Cohen, C. Chase, *J. Endod.* **1979**, *5*, 134.
- [226] D. Nathanson, C. Parra, *Compend. Educ. Contin. Dent.* **1987**, *8*, 490.
- [227] S. R. Grobler, C. W. van Wyk, D. Kotze, *Caries Res.* **1986**, *20*, 284.
- [228] O. Fejerskov, K. W. Stephen, A. Richards, R. Speirs, *Caries Res.* **1987**, *21*, 452.
- [229] J. M. Fearn, J. C. Elliott, F. S. L. Wong, G. R. Davis, A. Boyde, S. J. Jones, *Anat. Embryol.* **1994**, *189*, 375.
- [230] A. J. Olejniczak, P. Tafforeau, T. M. Smith, H. Temming, J.-J. Hublin, *Am. J. Phys. Anthropol.* **2007**, *134*, 130.
- [231] S. R. Stock, A. E. M. Vieira, A. C. B. Delbem, M. L. Cannon, X. Xiao, F. De Carlo, *J. Struct. Biol.* **2007**, doi:10.1016/j.jsb.2007.10.006, (in press).
- [232] S. E. P. Dowker, J. C. Elliott, G. R. Davis, R. M. Wilson, P. Cloetens, *Caries Res.* **2004**, *38*, 514.

- [233] S. E. P. Dowker, J. C. Elliott, G. R. Davis, R. M. Wilson, P. Cloetens, *Eur. J. Oral Sci.* **2006**, *114 (Suppl. 1)*, 353.
- [234] H. Schmalfuss, *Stuttg. Beitr. Naturk. Serie A* **2003**, *654*, 1.
- [235] G. Luquet, F. Marin, *C. R. Palevol* **2004**, *3*, 515.
- [236] A. Ziegler, T. Grospietsch, T. H. Carefoot, J. P. Danko, M. Zimmer, I. Zerbst-Boroffka, S. C. Pennings, *J. Comp. Physiol.* **2000**, *170B*, 329.
- [237] B. Messner, *Crustaceana* **1965**, *9*, 285.
- [238] D. S. Neufeld, J. N. Cameron, *J. Exp. Biol* **1993**, *184*, 1.
- [239] L. M. Passano, in *The physiology of Crustacea* (Ed.: T. H. Watermann), Academic Press, New York, **1960**, pp. 473.
- [240] A. Ziegler, F. H. E. Scholz, *J. Comp. Physiol.* **1997**, *B167*, 536.
- [241] C. G. H. Steel, *Can. J. Zool.* **1993**, *71*, 4.
- [242] A. Ziegler, *Cell Tiss. Res.* **1996**, *284*, 459.
- [243] A. Ziegler, *Tissue & Cell* **1997**, *29*, 63.
- [244] A. Ziegler, M. Hagedorn, G. A. Ahearn, T. H. Carefoot, *J. Comp. Physiol.* **2007**, *177*, 99.
- [245] P. Greenaway, *Biol. Rev.* **1985**, *60*, 425.
- [246] S. Sparks, P. Greenaway, *J. Exp. Biol.* **1984**, *113*, 43.
- [247] F. Graf, J. C. Meyran, *J. Morphol.* **1983**, 1.
- [248] F. Graf, *Arch. Zool. Exp. Gen.* **1978**, *119*, 143.
- [249] W. Herold, *Zoologisches Jahrbuch für Anatomie und Ontogenie der Tiere* **1913**, *35*, 457.
- [250] K. W. Verhoeff, *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* **1940**, *37*, 126.
- [251] C. G. H. Steel, *Can. J. Zool.* **1982**, *60*, 429.
- [252] L. Brecevic, A. E. Nielson, *J. Cryst. Growth* **1989**, *98*, 504.
- [253] A. Ziegler, *J. Struct. Biol.* **1994**, *112*, 110.
- [254] H. Fabritius, A. Ziegler, *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 281.

- [255] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 32.
- [256] S. Raz, O. Testeniere, A. Hecker, S. Weiner, G. Luquet, *Biol. Bull.* **2002**, *203*, 269.
- [257] H. Fabritius, P. Walther, A. Ziegler, *J. Struct. Biol.* **2005**, *150*, 190.
- [258] A. Ziegler, *Cell Tiss. Res.* **1997**, *29*, 63.
- [259] A. Ziegler, E. Merz, *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 263.
- [260] J. Glötzner, A. Ziegler, *Arthropod Structure & Development* **2000**, *29*, 241.
- [261] M. Hagedorn, A. Ziegler, *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 1935.
- [262] A. Ziegler, *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, *45*, 437.
- [263] A. Ziegler, *Cell Calcium* **2002**, *31*, 307.
- [264] M. Hagedorn, D. Weihrauch, D. W. Towle, A. Ziegler, *J. Exp. Biol.* **2003**, *206*, 2167.
- [265] A. Ziegler, D. Weihrauch, D. W. Towle, M. Hagedorn, *Cell Calcium* **2002**, *32*, 131.
- [266] A. Ziegler, D. Weihrauch, M. Hagedorn, D. W. Towle, R. Bleher, *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 1749.
- [267] A. Ziegler, D. Weihrauch, D. W. Towle, *Zoology* **2001**, *104*, 67.
- [268] D. Drobne, J. Strus, *Env. Toxicol. Chem.* **1996**, *15*, 126.
- [269] H. E. GRUNER, in *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile, Vol. 53* (Eds.: M. Dahl, F. Peus), Gustav Fischer Verlag, Jena **1965/66**.
- [270] J. Strus, A. Blejec, *Isopod systematics and evolution*, A.A.Balkema, Brookfield, **2001**.
- [271] F. Neues, A. Ziegler, M. Epple, *Cryst. Eng. Comm.* **2007**, *9*, 1245.
- [272] P. Compère, G. Goffinet, *Tissue Cell* **1987**, *19*, 839.
- [273] K. K. Vijayan, A. D. Diwan, *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, *114A*, 91.

- [274] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, F. C. Meldrum, *J. Cryst. Growth* **2003**, 254, 206.
- [275] S. Raz, P. C. Hamilton, F. H. Wilt, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, 13, 480.
- [276] B. N. Bachra, O. R. Trautz, S. L. Simon, *Arch. Biochem. Biophys.* **1963**, 103, 124.
- [277] M. M. Reddy, *J. Cryst. Growth* **1977**, 41, 287.
- [278] F. Boßelmann, M. Epple, I. Sötje, H. Tiemann, in *Biomineralisation: Biological Aspects and Structure Formation* (Ed.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [279] A. Becker, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2005**.
- [280] H. Schmalfuss, *Symp. Zool. Soc. Lond.* **1984**, 53, 49.
- [281] D. S. Neufeld, J. N. Cameron, *J. Exp. Biol.* **1992**, 171, 283.
- [282] J. N. Cameron, C. M. Wood, *J. Exp. Biol.* **1985**, 114, 181.
- [283] F. Boßelmann, P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe, M. Epple, *Thermochim. Acta* **2007**, 463, 65.
- [284] J. Marxen, O. Prymak, F. Beckmann, F. Neues, M. Epple, *J. Molluscan Studies* **2007**, in press.
- [285] J. C. Marxen, W. Becker, *Comp. Biochem. Physiol.* **1997**, 118B, 23.
- [286] J. C. Marxen, M. Hammer, T. Gehrke, W. Becker, *Biol. Bull.* **1998**, 194, 231.
- [287] J. C. Marxen, W. Becker, *Comp. Biochem. Physiol.* **2000**, 127B, 235.
- [288] J. C. Marxen, M. Nimtz, W. Becker, K. H. Mann, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1650, 92.
- [289] J. C. Marxen, P. E. Witten, D. Finke, O. Reelsen, M. Rezgaoui, W. Becker, *Invertebrate Biol.* **2003**, 122, 313.
- [290] A. Becker, W. Becker, J. C. Marxen, M. Epple, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2003**, 629, 2305.

- [291] O. Prymak, H. Tiemann, I. Sötje, J. C. Marxen, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, F. Beckmann, T. Donath, M. Epple, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 688.
- [292] S. Weiner, I. Sagi, L. Addadi, *Science* **2005**, *309*, 1027.
- [293] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 478.
- [294] H. Spurr, *J. Ultra. Res.* **1969**, *26*, 31.
- [295] G. Luther, *Helgolander Meeresuntersuchungen* **1987**, *41*, 1.
- [296] D. J. Crisp, *J. mar. biol. Ass. U.K.* **1958**, *37*, 483.
- [297] B. A. Foster, *Tuatara* **1967**, *15*, 75.
- [298] D. R. Houghton, H. G. Stubbings, *J. Anita. Ecol.* **1963**, *32*, 193.
- [299] H. Kühl, *Proc. Symp. Crustacea, mar. biol. Ass. India.* **1967**, *3*, 965.
- [300] D. Jaskwich, R. M. Ali, T. C. Patel, D. W. Green, *Curr. Opin. Pediatr.* **2000**, *12*, 61.
- [301] A. Fleming, M. Sato, P. Goldsmith, *J. Biomol. Screen.* **2005**, *10*, 823.
- [302] R. Barrett, C. Chappell, M. Quick, A. Fleming, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 651.
- [303] R. A. Ketcham, W. D. Carlson, *Comput. Geosci.* **2001**, *27*, 381.
- [304] S. R. Stock, J. Barss, T. Dahl, A. Veis, J. D. Almer, *J. Struct. Biol.* **2002**, *139*, 1.
- [305] S. R. Stock, J. Barss, T. Dahl, A. Veis, J. D. Almer, F. De Carlo, *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *72*, 555.
- [306] S. R. Stock, K. I. Ignatiev, S. A. Foster, L. A. Forman, P. H. Stern, *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 185.
- [307] G. H. van Lenthe, H. Hagenmüller, M. Böhner, S. J. Hollister, L. Meinel, R. Müller, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2479.
- [308] F. Beckmann, U. Bonse, T. Biermann, *Proc. SPIE* **1999**, *3772*, 179.
- [309] W. Schneiders, A. Reinstorf, W. Pompe, R. Grass, A. Biewener, M. Holch, H. Zwipp, S. Rammelt, *Bone* **2007**, *40*, 1048.

- [310] R. J. Fajardo, T. M. Ryan, J. Kappelman, *Am. J. Phys. Anthropol.* **2002**, *118*, 1.
- [311] D. L. Kopperdahl, E. F. Morgan, T. M. Keaveny, *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 801.
- [312] S. Nuzzo, F. Peyrin, P. Cloetens, J. Baruchel, G. Boivin, *Med. Phys.* **2002**, *29*, 2672.
- [313] S. R. Stock, D. Blackburn, M. Gradassi, H. G. Simon, *Dev. Dynam.* **2003**, *226*, 410.
- [314] P. Weiss, L. Obadia, D. Magne, X. Bourges, C. Rau, T. Weitkamp, I. Khairoun, J. M. Bouler, D. Chappard, O. Gauthier, G. Daculsi, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4591.
- [315] J. H. Kinney, J. S. Stölken, T. S. Smith, J. T. Ryaby, N. E. Lane, *Bone* **2005**, *36*, 193.
- [316] M. Tzaphlidou, R. Speller, G. Royle, J. Griffiths, A. Olivo, S. Pani, R. Longo, *Appl. Rad. Isotop.* **2005**, *62*, 569.
- [317] R. J. Fajardo, R. Müller, *Am. J. Phys. Anthropol.* **2001**, *115*, 327.
- [318] F. S. Wong, J. C. Elliot, P. Anderson, *J. Anat.* **2000**, *196*, 405.
- [319] S. Zabler, P. Cloetens, P. Zaslansky, *Optics Lett.* **2007**, *32*, 2987.
- [320] M. Assad, F. Likibi, P. Jarzem, M. A. Leroux, C. Coillard, C. H. Rivard, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2004**, *35*, 219.
- [321] D. Tadic, F. Beckmann, T. Donath, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2004**, *35*, 240.
- [322] M. Bohner, G. H. van Lenthe, S. Grünenfelder, W. Hirsiger, R. Evison, R. Müller, *Biomaterials* **2005**, *26*, 6099.
- [323] O. Prymak, D. Bogdanski, M. Köller, S. A. Esenwein, G. Muhr, F. Beckmann, T. Donath, M. Assad, M. Epple, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5801.
- [324] S. Vanis, O. Rheinbach, A. Klawonn, O. Prymak, M. Epple, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, *37*, 469.

- [325] R. Cancedda, A. Cedola, A. Giuliani, V. Komlev, S. Lagomarsino, M. Mastrogiacomo, F. Peyrin, F. Rustichelli, *Biomaterials* **2007**, 28, 2505.
- [326] A. C. Jones, C. H. Christoph H. Arns, A. P. Sheppard, D. W. Hutmacher, B. K. Milthorpe, M. A. Knackstedt, *Biomaterials* **2007**, 28, 2491.
- [327] S. R. Stock, S. Nagaraja, J. Barss, T. Dahl, A. Veis, *J. Struct. Biol.* **2003**, 141, 9.
- [328] E. Martin-Badosa, D. Amblard, S. Nuzzo, A. Elmoutaouakkil, L. Vico, F. Peyrin, *Radiology* **2003**, 229, 921.
- [329] S. V. N. Jaecques, H. van Oosterwyck, L. Muraru, T. van Cleynenbreugel, E. de Smet, M. Wevers, I. Naert, J. Vander Sloten, *Biomaterials* **2004**, 25, 1683.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ACC	Amorphes Calciumcarbonat
ACP	Amorphes Calciumphosphat
AHSG	α_2 -HS-Glykoprotein
ASE	Anteriores sternales Epithel
ATP	Adenosintri-phosphat
BAH	Biologische Anstalt Helgoland
BDMA	N-Benzyldimethylamin
CDHA	Calciumdefizitärer-Hydroxylapatit
DCPA	Dicalciumphosphat-Anhydrat
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DORIS	Doppelringspeicher
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ESEM	<i>Environmental scanning electron microscopy</i>
ESI	<i>Electron spectroscopic imaging</i>
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie
FLASH	<i>Free-Electron Laser</i> in Hamburg
FIB	<i>focused ion beam</i>
HAP	Hydroxylapatit
HASYLAB	Hamburger Synchrotronstrahlungslabor

HERA	Hadron-Elektron-Ring-Anlage
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
LINAC	Linearbeschleuniger
LAC	Linearer Abschwächungskoeffizient
MCPA	Monocalciumphosphat-Anhydrat
MCPM	Monocalciumphosphat-Monohydrat
MNA	1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonensäureanhydrid
OBI	Ortsfest auslesbarer Bildplattendetektor
OCP	Octacalciumphosphat
PETRA	Positron-Elektron-Tandem-Ring-Anlage
PIA	Positronen-Intensitäts-Akkumulator
PLM	Polarisations-Lichtmikroskopie
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR μ CT	Mikrocomputertomographie, basierend auf Synchrotronstrahlung
TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TG	Thermogravimetrie
TTCP	Tetracalciumphosphat
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie

7.2 Publikationsliste

Buchkapitel

F. Neues, F. Beckmann, A. Ziegler, M. Epple, "The application of synchrotron radiation-based micro computer tomography in biomineralization", in "Biomineralisation: Biological Aspects and Structure Formation" (Editor: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim 2007, p. 369-380.

Referierte Publikationen

S. Polarz, F. Neues, M. W. E. van den Berg, W. Grünert, L. Khodeir, "Mesosynthesis of ZnO-Silica Composites for Methanol Nanocatalysis", **Journal of the American Chemical Society**. **127** (2005) 12028-12034

F. Neues, W. H. Arnold, J. Fischer, F. Beckmann, P. Gängler, M. Epple, "The skeleton and pharyngeal teeth of zebrafish (*Danio rerio*) as a model of biomineralization in vertebrates", **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik** **37** (2006) 426-431.

F. Neues, R. Goerlich, J. Renn, F. Beckmann, M. Epple, "Skeletal deformations in medaka (*Oryzias latipes*) visualized by synchrotron radiation micro-computer tomography (SR μ CT)", **Journal of Structural Biology** **160** (2007) 236-240.

F. Neues, A. Ziegler, M. Epple, "The composition of the mineralized cuticle in marine and terrestrial isopods: A comparative study", **Crystal Engineering Communications** **9** (2007) 1245-1251.

J.C. Marxen, O. Prymak, F. Beckmann, F. Neues, M. Epple, "Embryonic shell formation in the snail *Biomphalaria glabrata*: A comparison between scanning electron microscopy (SEM) and synchrotron radiation micro computer tomography (SR μ CT)", **Journal of Molluscan Studies (in press)**

F. Neues, M. Epple, "X-ray micro computer tomography for the study of biomineralized endo- and exoskeletons of animals", **Chemical Reviews (Review, submitted, invited)**

Sonstige Publikationen

F. Neues, A. Ziegler, T. Donath, J. Fischer, F. Beckmann, M. Epple, "Mikrotomographie an Biomineralien", HASYLAB-Jahresbericht 2006.

F. Neues, A. Ziegler, M. Epple, "Analysis of the composition of the mineralized cuticle in isopods", HASYLAB-Jahresbericht 2007.

F. Neues, R. Goerlich, J. Renn, F. Beckmann, M. Epple, "Synchrotron radiation micro computer tomography (SR μ CT) as high resolution technique to study skeletal deformations in medaka (*Oryzias latipes*)", HASYLAB-Jahresbericht 2007.

Poster und Vorträge

8th International Symposium Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, 21.-23.09.2005, Essen, F. Neues, M. Epple, J. Fischer, F. Beckmann, "Biomineralization in zebrafish (*Danio Rerio*) shown by scanning electron microscopy and synchrotron radiation computer Microtomography" (**P**)

2006 MRS Fall Meeting, Boston, USA, 27.11.-01.12.2006, F. Neues, A. Becker, A. Ziegler, M. Epple, "Structure and formation of the cuticle of woodlice – tough biomineralized structures in animals" (**P**)

2006 MRS Fall Meeting, Boston, USA, 27.11.-01.12.2006, F. Neues, P. Gängler, W. Arnold, J. Fischer, F. Beckmann, M. Epple, "Development of the skeleton and pharyngeal teeth of zebrafish (*Danio rerio*) as a model of biomineralization in vertebrates" (**P**)

7th International Symposium on Terrestrial Isopods, 28.03.-31.03.2007, Tunis (Tunesien), S. Hild, F. Neues, A. Becker, M. Epple, A. Ziegler, "Phosphate distribution in the tergite cuticle of *Porcellio scaber*" (**V**)

Workshop "3d Image Analysis and Modeling of Microstructures", Kaiserslautern, 25.-26.04.2007, M. Epple, F. Neues, "Synchrotron microcomputer tomography of biomineralized tissues and organisms" (**V, invited**)

Neujahrskolloquium des Fachbereichs Chemie und des Ortsverbandes Essen-Duisburg der GDCh, 09.01.2008, F. Neues, "Untersuchung der Häutungsstadien von *Porcellio scaber* mit Hilfe von Synchrotronstrahlung" (**V**)

7.3 Lebenslauf

Name: Frank Neues

Geburtsdatum: 07. Januar 1975

Geburtsort: Tönisvorst

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet; eine Tochter



Werdegang:

- Seit Februar 2005
Doktorand an der Universität Duisburg-Essen
- August 2004 - Januar 2005
Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ruhr-Universität Bochum
- September 1995 - März 2004
Studium an der Bergischen Universität Wuppertal
Abschluss: Diplom-Chemiker
- Juli/August 1995
Tätigkeit als Chemikant bei der Firma Stockhausen GmbH in Krefeld
- August 1994 - Juli 1995
Fachoberschule für Technik an den gewerblichen Schulen der Stadt
Mönchengladbach; Abschluss: Fachhochschulreife
- Januar 1994 - Juli 1994
Chemikant bei der Bayer AG im Werk Uerdingen (Krefeld)
- September 1991 - Januar 1994
Verkürzte Ausbildung zum Chemikanten bei der Bayer AG im Werk Uerdingen
(Krefeld)
- 1985 - 1991
Städtische Realschule in Willich-Schiefbahn
- 1981 - 1985
Katholische Grundschule in Willich-Anrath

7.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Anwendung von Synchrotronstrahlung zur Charakterisierung von
Biomaterialien“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Januar 2008

Frank Neues

7.5 Danksagung

Hier möchte ich nun die Gelegenheit ergreifen und mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Prof. Dr. Matthias Epple für die Gelegenheit bei ihm promovieren zu dürfen und die hervorragende Betreuung.

Für die Übernahme des Koreferats bedanke ich mich bei Prof. Dr. Christian Mayer.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken, bei Prof. Dr. W. H. Arnold und Prof. Dr. P. Gängler (Witten/Herdecke) für die Unterbringung und Vorbereitung der Zebrabärblinge, bei Prof. Dr. R. Goerlich (Aachen) und Dr. J. Renn (Singapur) für den gesunden und den deformierten Medaka, bei Prof. Dr. G. Totland (Bergen, Norwegen) für die Lachswirbelsegmente, bei Prof. Dr. W. Jahnen-Dechent und Dr. A. Heiss (Aachen) für die Mausknochen, bei Prof. Dr. A. Klocke (Hamburg) für den gesunden und den fluorotischen Zahn, bei Dr. A. Ziegler (Ulm) für das Präparieren der Kutikula der Asseln und das Einbetten von *P. scaber* für die SR μ CT, bei Dr. J. Marxen (Hamburg) für das Einbetten der Emryonen von *B. glabrata*, bei Dr. O. Prymak (Essen) für die Vorarbeiten und die Aufnahme der SR μ CT-Daten von *B. glabrata* (Alter: 96 h, 120 h, 240 h und 4 Wochen), bei Dr. M. Molis (Helgoland) für die Australseepocken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern für die Hilfe bei den biologischen Fragestellungen und die angenehme Zusammenarbeit.

Für die direkte Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich den folgenden Personen danken:

Bei Dipl.-Ing. S. Boukercha für die Hilfestellung am Rasterelektronenmikroskop,

bei K. Brauner und V. Hiltenkamp für AAS-Messungen,

bei Dr. C. Bähz und D. Trots für ihre Unterstützung bei der Aufnahme der Pulverdiffraktogramme am HASYLAB,

bei Dr. F. Beckmann, Dr. T. Donath, J. Fischer und J. Herzen für ihre Unterstützung bei der Aufnahme und der Rekonstruktion der SR μ CT-Daten am HASYLAB,

bei allen die mich als Messknechte am HASYLAB unterstützt haben: Dr. A. Becker, Dr. F. Boßelmann, Dr. O. Prymak, M. Neumann, H. Nebel, H. Urch, T. Annen, S. Kittler, J. Schwiertz, P. D. Dinkel, M. Neumeier und P. Kaempfe,

bei D. Hagmeyer für Hilfe bei der Untersuchung der Mausknochen,

bei B. Nota für das Eliminieren der Bürokratie.

Bei allen Mitarbeitern/innen im AK Epple möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen bedanken.

Alle, die hier ungenannt bleiben, bitte ich um Nachsicht.

Ein großer Dank gilt meiner Frau Andrea, ohne ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihre Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.