

**Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. Isenberg)

**Kalziumwellen in Agarose-Gel mit resuspendierten Vesikeln
des sarkoplasmatischen Retikulums:
Einfluss der Vesikeldichte auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Oliver Knauf
geboren am 31.07.1978 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. M. Wussling

Gutachter: Prof. Dr. M. Wussling (Halle)
Prof. Dr. E. Peschke (Halle)
Prof. Dr. W. Linke (Münster)

Verteidigung: 19.01.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011452

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000011452>]

Kalzium nimmt eine zentrale Stellung innerhalb zellulärer Signalkaskaden ein. Ähnlich anderen Signal-Ionen und -Molekülen geht eine Erhöhung der zytosolischen Konzentration im Allgemeinen mit einer Aktivierung von spezifischen Zellfunktionen einher. Für die Ausbreitung von Kalziumsignalen spielt die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) eine wichtige Rolle. Vesikel des SR sind an der Entstehung von elementaren Ereignissen wie Kalziumsparks, Kalziumoszillationen und Kalziumwellen beteiligt.

Den Hintergrund dieser Arbeit bilden frühere Erkenntnisse, wonach sich Cluster von kalziumbeladenen SR-Vesikeln in einem Agarose-Gel wie ein erregbares Medium verhalten, in dem sich räumlich-zeitliche Kalziummuster ausbreiten.

In einer dreidimensionalen, hexagonalen Anordnung ist der Abstand benachbarter kugelförmiger Objekte konstant. Auch SR-Vesikel können als solche Objekte angesehen werden und es wurde erwartet, dass es eine nichtlineare Beziehung zwischen dem Abstand der Cluster zueinander und der Proteinkonzentration gibt.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Agarose-Gele mit eingebetteten SR-Vesikeln zum Erstarren gebracht und fixiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen brachten jedoch keine Bestätigung der erwarteten Beziehung zwischen dem mittleren SR-Vesikelabstand und der vesikulären Proteinkonzentration. Im Gegensatz dazu zeigte sich lichtmikroskopisch eine proteinkonzentrationsabhängige Anordnung von SR-Vesikelclustern, die durch eine lineare Funktion beschrieben werden kann. Stabile Kalziumwellen traten bei SR-Proteinkonzentrationen zwischen 7 und 16,32 mg/ml auf. Die Geschwindigkeit der Wellenausbreitung zeigte ein Optimum bei etwa 12 mg/ml und erreichte Werte von bis zu 60 $\mu\text{m/s}$. Der entsprechende Abstand zwischen benachbarten Kalziumfreisetzungseinheiten (CRU) wurde mit 4 μm berechnet. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass der Prozess der Kalziumsignal-Übertragung in dem beschriebenen Reaktions-Diffusions-System in einem relativ kleinen Bereich von Diffusionslängen optimal ist. Eine Änderung dieser Strecke um $\pm 2\mu\text{m}$ bewirkte eine Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 40%. Es scheint, als wäre der Abstand zwischen den CRU (Cluster von Ryanodin-Rezeptoren) ein empfindlicher Parameter bezüglich der Ausbreitung von Kalziumsignalen. Ein suboptimales Funktionieren des Reaktions-Diffusions-Systems in lebenden Zellen könnte einen negativen Effekt auf die Ausbreitung von intrazellulären Kalziumsignalen und somit auf die Zellfunktion haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Zielstellung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Fluoreszenzmessung	5
2.1.1. Fluoreszenzfarbstoff	5
2.1.2. Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	5
2.2. Präparation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums	8
2.3. Herstellung eines Agarose-Gels mit homogen eingebetteten Zellorganellen	8
2.3.1. Vorbereitung des Agarose-Gels	8
2.3.2. Transfer von SR-Vesikeln in das Agarose-Gel	9
2.3.3. Bearbeiten der Präparate	9
2.4. Mikroskopische Untersuchungen	10
2.4.1. Herstellung der Präparate und Fixierung	10
2.4.2. Einbettung in Kunststoff	11
2.4.3. Anfertigen der Schnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung	12
2.4.4. Anfertigen der Schnitte zur elektronenmikroskopischen Untersuchung	13
2.5. Auswertung und computergestützte Bildverarbeitung	14
2.5.1. Messung der Wellengeschwindigkeit	14
2.5.2. Abstandsbestimmung	14
3. Ergebnisse	18
3.1. Eigenschaften von Kalziumwellen in Myokardzellen der Ratte	18
3.2. Spatio-temporale Kalziumstrukturen in Agarose-Gelen mit eingebetteten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR)	23
3.2.1. Vermeintliche Kalziumoszillationen	23
3.2.2. Kalziumwellen	24

3.3.	Kalziumoszillationen und Kalziumwellen in Abhängigkeit von der Vesikelproteinkonzentration	29
3.3.1.	Theorie der Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration	29
3.3.2.	Überprüfung der Theorie zur Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration	32
3.4.	Lokale und globale Verteilung der SR-Vesikel in Abhängigkeit von der Vesikelproteinkonzentration	36
3.5.	Einfluss des mittleren Abstandes von Kalziumfreisetzungseinheiten auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit	40
4.	Diskussion	43
4.1.	Kalziumeinstrom und kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (CICR)	43
4.2.	Spatio-temporale Kalziummuster und deren Eigenschaften in Reaktions-Diffusions-Systemen	47
4.2.1.	Intensitätsprofile propagierender Ca^{2+} - Wellen	47
4.2.2.	Refraktärverhalten	48
4.2.3.	Auslöschung aufeinander zulaufender Kalziumwellen durch Kollision	48
4.2.4.	Frequenzabhängigkeit der Wellengeschwindigkeit (Dispersionsrelation)	49
4.2.5.	Geschwindigkeit-Krümmungs-Beziehung	50
4.3.	Verteilung der Kalziumfreisetzungseinheiten innerhalb des Agarose – Gels	51
4.4.	Kalziumsignalausbreitung im Agarose-Gel mit eingebetteten Clustern von SR-Vesikeln	52
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Thesen	65

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
c	Geschwindigkeit ebener Wellen
Ca ²⁺	ionales Kalzium
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i> (kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung)
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CRU	<i>calcium release unit</i> (Kalziumfreisetzungseinheit)
D	effektiver Diffusionskoeffizient
ECC	<i>excitation-contraction-coupling</i>
ECCE	<i>excitation-coupled Ca²⁺ entry</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fluo-3 AM	Fluo-3 Acetoxymethylester
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphat-sensitiver Rezeptor
K	Krümmung
K _d	Dissoziationskonstante
mRyR	mitochondrialer Ryanodin-sensitiver Rezeptor
mCICR	<i>mitochondrial calcium-induced calcium release</i>
N	Normalgeschwindigkeit
n	Anzahl der Messwerte
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PTP	<i>permeability transition pore</i>
ROI	<i>region of interest</i> (näher betrachteter Bildausschnitt)
RyR	Ryanodin-sensitiver Rezeptor
SERCA	SR- Ca ²⁺ -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TT	transversals Tubulussystem

Feststehende, fremdsprachige Begriffe sind klein und *kursiv* geschrieben.

1. Einleitung und Zielstellung

Zahlreiche zelluläre Prozesse werden durch Kalzium kontrolliert, welches hauptsächlich im endoplasmatischen / sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR) gespeichert wird, einer intrazellulären Organelle mit „Quellen“ und „Senken“ für Kalzium. Einmal freigesetzt, diffundiert das zytosolische Kalzium von Orten erhöhter Konzentration zu benachbarten ER/SR-„Ca²⁺-Quellen“ (Ryanodin-sensitive oder Inositol-1,4,5-triphosphat-sensitive Kalzium-Kanäle) und induziert eine weitere Kalziumfreisetzung (Ehrlich, 1995; Marks, 1997; Mikoshiba, 1997; Berridge et al., 1999; Bootman et al., 2001). Dieser Mechanismus wird als „kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung“ (CICR) bezeichnet. Schließlich wird das freie Kalzium von ATP-getriebenen Pumpen, den SERCAs, die sich in den Membranen des SR/ER und der Zellmembran befinden aus dem Zytosol herausgepumpt (Clapham, 1995). Diese intrazellulären Kalziumbewegungen führen zu Phänomenen wie Ca²⁺-Oszillationen und auch Ca²⁺-Wellen. Letztere wurden zuerst in Eiern von *Medaka* beobachtet (Ridgeway et al., 1977) und später auch in Herzzellen (Wier et al., 1987; Wier und Blatter, 1991; Lipp und Niggli, 1993; Clapham und Sneyd, 1995; Hongo et al., 1995; Trafford et al., 1995; Wussling und Salz, 1996; Ishida et al., 1999; Subramanian et al., 2001), in *Xenopus* Oozyten (Lechleiter et al., 1991; Fontanilla und Nuccitelli, 1998), in Hepatozyten (Nathanson et al., 1994), in Chondrozyten des Gelenkknorpels (D'Andrea und Vittur, 1995) und auch in Zellen anderer Organe (Sell et al., 2002; Worth et al., 2003). Die Geschwindigkeit, mit der sich Kalziumwellen ausbreiten, wurde in Zellen verschiedener Spezies und bei unterschiedlicher Temperatur in einem Bereich von 3 bis zu 160 µm/s beobachtet (Jaffe, 1993 und 2002). Beispielsweise breiten sich Kalziumwellen in befruchteten Eiern von *Xenopus laevis* mit 20 µm/s aus (Camacho und Lechleiter, 1993). Dagegen wandern Kalziumwellen in Nervenzellen von Säugetieren mit Geschwindigkeiten von über 100 µm/s, in retinalen Zellen von neugeborenen Frettchen sind es zum Beispiel 160 µm/s (Stellwagen et al., 1999). Sowohl in adulten wie auch in embryonalen Kardiomyozyten können sich bei erhöhter Kalziumkonzentration leicht spontane Kalziumwellen entwickeln (Cheng et al., 1993; Haberland et al., 2000). Sie zeigen einen steilen Anstieg und einen flachen Abfall der Fluoreszenzintensität, breiten sich mit 80 bis 100µm/s aus und löschen sich aufgrund von Refraktärität nach Kollision vollständig aus (Ishida et al., 1990; Wussling et al., 1997).

Eine Voraussetzung für die Entwicklung räumlich-zeitlicher Kalziummuster ist nicht die Integrität lebender Zellen sondern das Vorhandensein eines Reaktions-Diffusions-

Systems. Letzteres ist bereits gegeben, wenn Vesikel des SR homogen oder inhomogen in Agarose-Gel, mit einer Zusammensetzung ähnlich der des Zytosols, eingebettet sind. In einem solchen System mit einem scheinbaren Kalzium-Diffusions-Koeffizienten von $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Gel mit SR-Vesikeln) oder $150 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Gel mit SR-Vesikeln und Mitochondrien) breiten sich Kalziumwellen mit Geschwindigkeiten von etwa $40 \mu\text{m}/\text{s}$ oder sogar mehr aus (Wussling et al., 1999 und 2001). Es wurde bereits früher gezeigt, dass Mitochondrien erregbare Zellorganellen sind, die fortlaufende Depolarisationen und Kalziumwellen erzeugen können (Icha et al., 1997). Während energiereiche Mitochondrien Kalziumwellen beschleunigen, verlangsamt Thapsigargin, ein spezifischer Hemmstoff der SR-Kalzium-Pumpen (SR- Ca^{2+} -ATPasen), die Wellengeschwindigkeit (Wussling et al., 1999; Landgraf et al., 2001). Räumlich-zeitliche Kalziummuster in Gelen mit isolierten Zellorganellen unterliegen, ähnlich den lebenden Zellen, dem generellen Prinzip der Selbstorganisation in erregbaren Medien, das durch ein Reaktions-Diffusions-Modell simuliert werden kann (Podhaisky und Wussling, 2004). Dieses Modell sagt eine biphasische Abhängigkeit der Geschwindigkeit von Kalziumwellen vom Abstand benachbarter, kalziumfreisetzender Einheiten voraus. Aber hierzu gibt es noch keine entsprechenden experimentellen Daten.

Es wird beispielsweise von Felder und Franzini-Armstrong (2002) beschrieben, dass in Skelettmuskelfasern vom Frosch Kalziumwellen an der Kopplung von Erregung und Kontraktion beteiligt sind. Hierbei gelangt Kalzium über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ) in den transversalen Tubuli (TT, Einstülpungen des Sarkolemm) aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol. Dem TT unmittelbar gegenüber befinden sich Cluster, die aus „junctional RyRs“ bestehen. Aufgrund des Triggerkalziums aus dem Interstitium kommt es zum Kalziumausstrom über die „junctional RyRs“. Das dort freigesetzte Ca^{2+} diffundiert zu benachbarten Clustern, die aus „parajunctional RyRs“ bestehen. Dem Mechanismus des CICR folgend, findet auch an dieser Stelle Kalziumfreisetzung via RyR statt (Zhou et al., 2003; Felder und Franzini-Armstrong, 2002).

Gleichfalls wurde gezeigt, dass Kalziumwellen eine bedeutende Rolle in der physiologischen Funktion von Muskelzellen des Herzvorhofs, Schrittmacherzellen und Purkinje-Fasern zukommt (Blatter et al., 2003). Herzvorhofzellen fehlt es an transversalen Tubuli, so dass sich Kalziumwellen über eine relativ große Entfernung von der Peripherie ins Zellinnere ausbreiten müssen (Hüser et al., 1996). In Vorhofzellen der Katze wurden Cluster von Ryanodin-Rezeptoren gefunden, die mit einem durchschnittlichen Abstand von ca. $2 \mu\text{m}$ regelmäßig in den Membranen des SR angeordnet sind, ähnlich einem

dreidimensionalen Gitter (Kockskämper et al., 2001). Es ist naheliegend anzunehmen, dass in solchen Zellen der Abstand benachbarter Kalziumfreisetzungseinheiten den Reaktions-Diffusions-Mechanismus kritisch beeinflusst.

Eine Aktivierung von subsarkolemmal verzweigten Ca^{2+} -Ausbreitungsstellen, gewöhnlich initiiert durch ein Aktionspotential, resultiert in einer signifikanten Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Peripherie der Zelle und der Ausbreitung einer Kalziumwelle in einer regenerativen Art (CICR) und mit einer ungewöhnlich hohen Ausbreitungsgeschwindigkeit von ungefähr 250 $\mu\text{m/s}$ hin zum zentralen, unverzweigten SR (Sheehan und Blatter, 2003). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Kalziumwellen, induziert durch Schwankungen der zytosolischen Kalziumkonzentration, die Entstehung von Arrhythmien des Vorhofs bewirken (Kockskämper und Blatter, 2002). Was verschiedene Geschwindigkeiten von Kalziumwellen für die physiologische oder pathophysiologische Zellfunktion auch bedeuten mögen, es stellt sich die Frage, wie der Abstand benachbarter Kalziumfreisetzungseinheiten den CICR-Mechanismus beeinflusst? In Gelen mit homogen verteilten SR-Vesikeln hängt das Wellenmuster von verschiedenen Parametern ab, zum Beispiel von der totalen Kalziumkonzentration im Gel (Krannich, 2001).

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, systematisch zu untersuchen, wie groß der Konzentrationsbereich von SR-Vesikelprotein im Gel ist, in dem Kalziumwellen entstehen können. Zweitens soll geklärt werden, ob es eine Beziehung zwischen der SR-Vesikelproteinkonzentration und dem mittleren Abstand zwischen benachbarten Kalziumfreisetzungseinheiten gibt. Und drittens ist von Interesse, wie sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von genau dieser Distanz verhält. Es ist zu erwarten, dass Gelpräparate mit einer SR-Vesikelproteinkonzentration unter einer gewissen Schwelle keine Kalziumwellen entstehen lassen. Mit anderen Worten, Gelpräparate sind nicht erregbar, wenn der Abstand zwischen benachbarten Kalziumfreisetzungseinheiten einen kritischen Wert überschreitet. Letzter soll bestimmt werden.

Zusammenfassung der Zielstellungen:

1. Erfassung räumlich-zeitlicher Kalziumsignale (Oszillationen und Wellen) und relativer Fluoreszenzintensitäten in Agarose-Gelen mit eingebetteten SR-Vesikeln mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie
2. Untersuchung räumlich-zeitlicher Kalziumsignale in Abhängigkeit von der Vesikelproteindichte
3. Ermittlung der Relation von Vesikelproteinkonzentration und mittlerem Vesikelabstand
4. Überprüfung des Einflusses des mittleren Vesikelabstandes auf die Kalziumsignalausbreitung, insbesondere auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit
5. Morphologische Verifizierung des experimentell ermittelten Vesikelabstandes mit Hilfe der Elektronenmikroskopie
6. Untersuchung der Morphologie im lichtmikroskopischen Bereich hinsichtlich der (grobstrukturellen) Einflüsse auf die Kalziumsignalausbreitung.

2. Material und Methoden

2.1. Fluoreszenzmessung

2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Fluoreszenzmessung zur Erfassung räumlich-zeitlicher Kalziummuster stehen hochempfindliche Kalziumindikatoren zur Verfügung. Deren allgemeine Eigenschaft ist es, nach Bindung von Kalziumionen und Anregung mit relativ kurzwelligem Licht ($\lambda = 488 \text{ nm}$) zu fluoreszieren. Als besonders geeignet für die Untersuchungen der Agarose-Gelpräparate erwies sich das Fluochrom Fluo-4 ($K_d = 345 \text{ nM}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda = 516 \text{ nm}$). Für die Untersuchungen an Ventrikelmyokardzellen der Ratte wurde das Fluochrom Fluo-3 AM ($K_d = 390 \text{ nM}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda = 526 \text{ nm}$) verwendet (nach Haugland, 1996). Die in dieser Arbeit eingesetzten Kalziumindikatoren wurden von Molecular Probes (Eugene, USA) bezogen.

2.1.2. Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Das vom kalziumsensitiven Marker emittierte Licht wird über eine am Mikroskop angebrachte CCD-Kamera erfasst. Durch die Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (InSight-Plus, Meridian), das mit einem Durchlichtmikroskop (Olympus IMT-2) gekoppelt wurde, lassen sich Lichtintensitätsdaten aus einer definierten Schichtdicke des zu untersuchenden Objektes gewinnen (Brakenhoff et al., 1985; Brakenhoff et al., 1989). Die Schichtdicke ist vom verwendeten Objektiv und der Größe der Schlitzblende abhängig.

Die Abbildung 1 zeigt den Strahlengang im verwendeten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Der Laser dient als Quelle für das monochromatische Anregungslicht ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Nach Passage eines dichroitischen Spiegels (transparent für das Anregungslicht und reflektierend für das emittierte Licht) erreicht das Laserlicht über einen doppelseitigen drehbaren Spiegel (Scan-Spiegel) und ein Linsensystem das Messobjekt. Die dabei entstehenden Fluoreszenzsignale kehren auf inversem Weg über den Scan-

Spiegel zum dichroitischen Spiegel zurück. Dieser leitet sie zur Schlitzblende, deren Breite die Schichtdicke der Konfokalebene bestimmt.

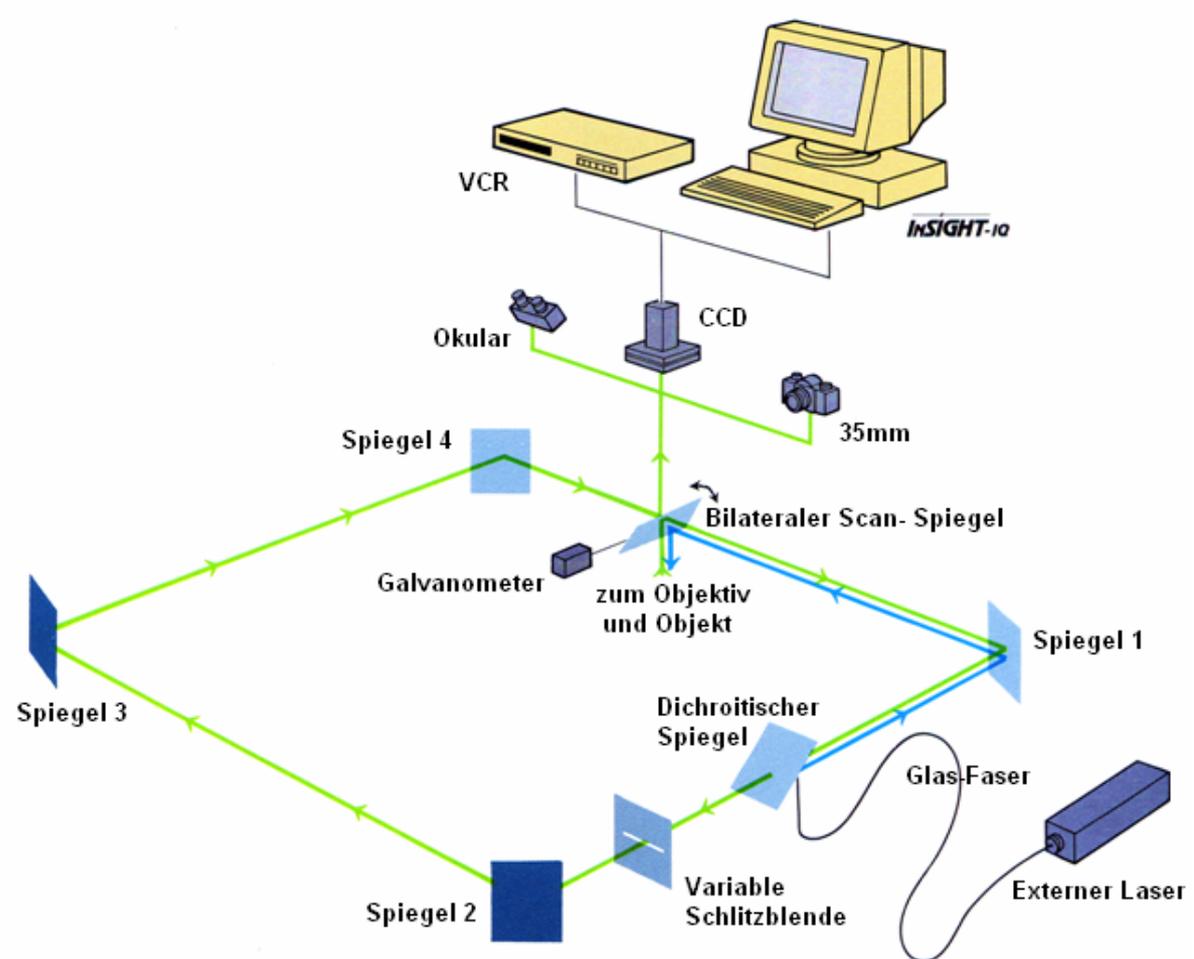


Abbildung 1 Strahlengang im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Die Fluoreszenzsignale werden über weitere Spiegel und letztlich über den Scan-Spiegel durch Linsensysteme zur CCD-Kamera geleitet. Das beschriebene Scanningsystem erlaubt die Erfassung von 100 Bildern pro Sekunde. Die Bilder könnten bei entsprechender Speicherkapazität auf dem Computer über einen „Frame Grabber“ gespeichert werden. Dadurch, dass die Messsignale zuerst auf einem Videoband aufgenommen wurden, um sie zu einem späteren Zeitpunkt als Einzelbilder in einen Rechner einzulesen, beträgt die zeitliche Auflösung der Fluoreszenzsignale 40 ms, was der üblichen Frequenz von Videobildern (25 Hz, PAL) entspricht.

Die Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Fluoreszenzmessplatzes. Die einzelnen Teile des Messsystems und deren Herkunft sind in der Legende der Abbildung 2 näher bezeichnet.

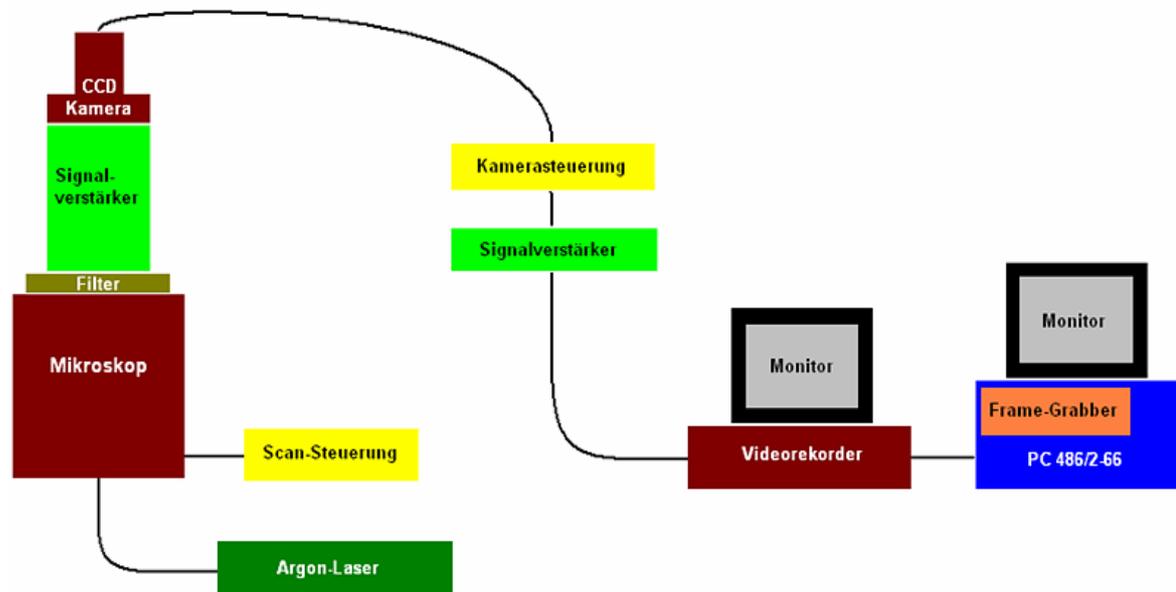


Abbildung 2 Schematischer Messplatzaufbau.

Folgende aufgeführte Teilsysteme waren Bestandteile des Messplatzes:

- Mikroskop mit Filter: IMT-2, Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan mit Objektiven 10x, 40x, 100x [NA = 1,25]
- Scanning Unit und Steuerung: Insight, Meridian Instruments, Okemos, MI, USA
- Signalverstärker und Steuerung: GenIIsys, Dage-MIT Inc., Michigan City, IN, USA
- CCD-Kamera (756 x 581 Pixel): CCD72E, Dage-MIT Inc., Michigan City, IN, USA
- Kamerasteuerung: DSP200, Dage-MIT Inc., Michigan City, IN, USA
- Videorekorder: AG-7330, Panasonic
- PC 486/2-66 (32MB RAM) mit Frame Grabber
- Laser: luftgekühlter Argonlaser ($\lambda=488\text{nm}$) Modell 532, Omnicrome, Chino, CA, USA

2.2. Präparation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums

Die Vesikel wurden aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskeln (*M. longissimus dorsi*) adulter Hausschweine im Institut für Angewandte Physiologie der Universität Ulm isoliert (Methode nach Mickelson et al., 1986)

Dazu wurden 25g tiefgefrorenen Muskelgewebes in folgender Lösung bei 0°C aufgetaut (mM): NaCl 100; Na-EGTA 0,5; Na-HEPES 30; Pefabloc 0,2; Aprotinin 1×10^{-4} ; Leupeptin 0,001; Pepstatin A 0,001; Benzamidin 1; pH 7,2. Im Waring Blender wurde der Muskel 4 x 25s hochtourig homogenisiert und anschließend 30 min zentrifugiert (5000 x g; Festwinkel). Der Überstand wurde durch ein doppeltes Gazetuch gefiltert und 60 min ultrazentrifugiert (25000 x g; Festwinkel). Das Pellet wurde in einer eisgekühlten Lösung folgender Zusammensetzung resuspendiert (mM): KCl 600; Saccharose 250; K-EGTA 0,1; CaCl₂ 0,09; K-Pipes 10; pH 7,0 und die Inhibitoren wie in obiger Lösung. Nach einer Stunde leichten Schüttelns auf Eis wurde diese Suspension für 60 min ultrazentrifugiert (32000 x g; Festwinkel). Das Pellet wurde in ca. 1-2 ml Saccharose (300mM) und K-Pipes (10mM) bei einem pH-Wert von 7,0 aufgenommen, portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden auf Trockeneis verschickt. In Halle wurden sie bei -80°C gelagert und standen so für die Versuche zur Verfügung.

Der Proteingehalt dieser Proben wurde im Institut für Angewandte Physiologie der Universität Ulm nach Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951).

2.3. Herstellung eines Agarose-Gels mit homogen eingebetteten Zellorganellen

2.3.1. Vorbereitung des Agarose-Gels

Es wurde ausschließlich Agarose-Gel Typ VII (low gelling temperature; Sigma Aldrich Co., Heidelberg) verwendet. Agarose wurde in der Konzentration 10mg/ml in Aqua bidest. gelöst, im Wasserbad auf eine Temperatur von 100°C gebracht und 5 min gekocht. Nach Abkühlung auf 37°C stand ein Agarose-Gel bei dieser Temperatur in flüssiger Form für mehrere Stunden an einem Versuchstag zur Verfügung.

Vor dem Einbringen der SR-Vesikel erfolgte die Einstellung eines „zytosolischen“ Milieus innerhalb des Agarose-Gels. Zu diesem Zweck wurden 21 µl des Agarose-Gels mit 5 µl einer Stammlösung und 0,7 µl Fluo-4 (500 µM) gemischt. Zusammensetzung der

Stammlösung (mM): KCl 630; MgCl₂ 31,5; Na₂ATP 25,2; Kreatinphosphat 63; EGTA 0,25; Pipes 126; pH 7,2 (Sigma Aldrich Co.).

2.3.2. Transfer von SR-Vesikeln in das Agarose-Gel

Nachdem zum Gel Pufferlösung und der Kalziumindikator Fluo-4 zugegeben wurden, wurde in ein bestimmtes Volumen dieser Suspension ein adäquates Volumen von SR-Vesikeln überführt und sorgfältig vermischt. Unter der Vorstellung und Absicht homogener Verteilung der Vesikel im Gel-System wurde auf schonende aber intensive Durchmischung beider Komponenten durch mehrfaches Resuspendieren geachtet.

Unabhängig von der angestrebten Proteinkonzentration im Gel wurde die Gesamtmenge des vorbereiteten Präparates auf 24,7µl festgesetzt, entsprechend wurden Vesikel durch Agarose Gel ersetzt. Das Gel und die jeweiligen Zusätze wurden vor jedem Experiment frisch zubereitet. Die Zusammensetzung des untersuchten Gel-Systems lautete (mM): KCl 100; MgCl₂ 5; Na₂ATP 4; Phosphokreatin 10; EGTA 0,04; Pipes 20; CaCl₂ 0,025 bis 0,41 (abhängig von der SR-Vesikel Proteinkonzentration); Fluo-4 10 und 0,4% Agarose Gel.

2.3.3. Bearbeiten der Präparate

Vom so bereiteten Protein-Gel-Gemisch wurden vier Portionen zu je 6µl entnommen und auf je einem Objektträger zu einem etwa 4mm großen Ausstrich aufgetragen, um eine angestrebte Schichtdicke des Präparates von 100-200µm zu erzielen. Eines der Präparate wurde sofort der Untersuchung mit dem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop zugeführt, die weiteren wurden in einer feuchten Kammer bei 37°C und vor Licht geschützt gelagert. Nacheinander wurden alle Präparate systematisch mit dem Mikroskop abgerastert. Die mögliche Dauer der Messungen wurde durch das Austrocknen des Gels limitiert. Höhere Proteinkonzentrationen führten zu einem schnelleren Trocknen und Gelieren des Präparates und damit zur Verschlechterung der Reproduzierbarkeit repetitiver Kalziumwellen. Gute Muster konnten vorwiegend innerhalb der ersten 20 Minuten im frischen Präparat beobachtet werden.

Im Verlauf der Versuchsreihen hat es sich bewährt, jeweils nur ein Präparat auszustreichen und das übrige Protein-Gel-Gemisch bis zur Abarbeitung des einen

Präparates zurück ins Wasserbad bei 37°C unter Lichtabschluss zu geben. Auf diese Weise konnte das Austrocknen des Gels maximal verzögert werden. Die Abnahme der Beobachtungshäufigkeit von Kalziumwellen über die Zeit des Mikroskopierens konnte hierbei aber nicht beeinflusst werden.

2.4. Mikroskopische Untersuchungen

2.4.1. Herstellung der Präparate und Fixierung

Das Herstellen der Präparate erfolgte genauso wie oben beschrieben, damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist. Einzig auf die Zugabe des Kalziumindikators wurde verzichtet, da dieser hier keine Rolle spielte. Am Gesamtansatz wurde ebenso nichts verändert, das Volumen des fehlenden Indikators wurde durch Stammlösung ersetzt. Wie bereits beschrieben, erfolgte das Aufbringen des Protein-Gel-Gemisches auf Objektträger. Das fertige Präparat musste nun für die weitere Aufarbeitung fixiert werden. Hierfür empfahl das Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle, ein standardisiertes Verfahren aus dem institutseigenen Labor anzuwenden. Die Fixierung sollte mit Glutaraldehyd erfolgen (3%ig in PO_4 -Puffer, Herstellung: 3ml 25%iges Glutaraldehyd + 22ml PO_4 -Puffer nach Schultz-Karlsson). Im weiteren Verlauf ergab sich das Problem, dass gerade bei niedrigeren Proteinkonzentrationen das Präparat vom Glutaraldehyd fortgeschwemmt bzw. aufgelöst wurde. Hier wurde versucht, sich eine Eigenschaft des Protein-Gel-Gemisches zu Nutze zu machen, die zu früherem Zeitpunkt eher hinderlich für das Arbeiten war. Die Erkenntnis, dass die Gele nach kurzer Zeit zu gelieren beginnen, ergab in dem Fall die Möglichkeit eine ausreichende Stabilität des Präparates zu erreichen, um es in seiner ursprünglichen Form fixieren zu können. Folgendes Vorgehen hatte sich dabei bewährt: Das Aufbringen der Präparate auf Objektträger erfolgte wie beschrieben. Die Präparate ruhten anschließend bei Raumtemperatur (in diesem Fall 26°C), um leicht anzutrocknen. Die Zeit hierfür lag bei 5 bis 10 Minuten, je nach Proteinkonzentration, Wassergehalt und der Ausgangskonsistenz. Auf langsames Austrocknen in einer feuchten Kammer wurde unter der Vorstellung verzichtet, dass bei raschem Trocknen nur die äußersten Schichten des Präparates erreicht werden, und somit die Vesikelverteilung zum Zentrum hin weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Nach der Dauer des Antrocknens wurden die Präparate auf dem Objektträger in ein

Bad von Glutaraldehyd gegeben und noch auf dem Objektträger anfixiert. Etwa eine halbe Stunde reichte aus, damit das Präparat formstabil wurde. Nun konnte es mit Hilfe einer Rasierklinge behutsam vom Objektträger abgelöst werden und im Glutaraldehyd verbleiben. Die Fixierung in dieser Lösung erfolgte über 4 Stunden, anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Im letzten Schritt wurde 3mal mit PO_4 -Puffer gespült. Nach dem letzten Spülen konnte das Präparat in der Pufferlösung im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

2.4.2. Einbettung in Kunststoff

Zum späteren Untersuchen mit dem Elektronenmikroskop war es notwendig, das Objekt in einen Kunststoff einzubetten, ultra-dünn zu schneiden und doppelt zu kontrastieren. Zur Einbettung wurde Durcupan verwendet, ein Gemisch aus folgenden Komponenten: (Anteile in %) Epoxydharz 48,5; Härter 48,5; Beschleuniger 2; Dibutylphtalat 1. Alle Komponenten wurden bei Zimmertemperatur zusammengeführt und gründlich verrührt. Nach 15minütiger Erwärmung bei 70°C und nochmaligem Verrühren war die Durcupanmischung gebrauchsfertig. Alle Präparate einer Konzentration wurden zusammen in einem Gefäß behandelt. Im Durchschnitt wurde mit je fünf Präparaten einer Konzentration gearbeitet. Das Procedere erstreckte sich über drei Tage, zusammengehörige Arbeitsschritte durften nicht unterbrochen werden. Am ersten Tag wurde mit einprozentiger OsO_4 -Säure über 2 Stunden nachfixiert, anschließend wurde zweimal mit PO_4 -Puffer gespült. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit Alkohol in aufsteigender Konzentration entwässert. Die Reihe umfasste die Konzentrationen 20%, 50%, 70%, 80% Alkohol in Na-Cacodylatpuffer. Jede Konzentration wirkte 30 Minuten auf die Objekte, die Lagerung über Nacht erfolgte in 80%iger Alkohollösung. Am folgenden Tag wurde die Entwässerung fortgeführt mit zweimaligem Wechsel auf 100%igen Alkohol mit einer Einwirkzeit von jeweils 1 Stunde. Im Anschluss daran erfolgte die zweimalige Zugabe von Propylenoxid für jeweils 15 Minuten. Hierbei ist die Arbeit unter dem Abzug vorgeschrieben. Im Folgenden begann die schrittweise Durchdringung der Präparate mit dem Kunststoff. Hierzu wurde im ersten Schritt eine Mischung aus 3 Teilen Propylenoxid und 1 Teil Durcupan angewendet, Einwirkzeit 1 Stunde. Im Folgenden wurde der Anteil von Durcupan von 50% und weiter auf 75% angehoben, auch jede dieser Mischungen musste 1 Stunde einwirken. Am dritten Arbeitstag wurde reines Durcupan

zur Durchdringung eingesetzt, zweimal gewechselt und eine Einwirkzeit von je 2 Stunden bei 40-45°C im Wärmeschrank eingehalten. Nun erfolgte die Einbettung der Präparate in Kapseln. Die Objekte wurden in vorgefertigte Formen überführt und diese mit reinem Durcupan aufgefüllt. Die Aushärtung gelang bei 65°C im Wärmeschrank über 48 Stunden. Alternativ kann man eine Schnellpolymerisation erreichen, und zwar bei 65°C über Nacht und 100°C für eine Stunde am nächsten Morgen. Das Resultat waren in Kunststoffkapseln eingebettete Präparate.

2.4.3. Anfertigen der Schnitte für lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Kunststoffkapseln mit den eingebetteten Präparaten wurden manuell angefräst. Ziel war es, den umgebenden Kunststoff abzutragen und das Präparat nahezu freizulegen. Nun wurden mit Hilfe eines Glasmessers (Reichert-Jung Ultracut E, Wien) Semi-Dünnschnitte mit einer Schichtdicke von 0,35µm angefertigt. Um ein Knicken und Einrollen der Schnitte zu verhindern, wurden diese in eine mit Wasser gefüllte Auffangwanne hinein geschnitten. Aus dem gleichen Grund wurden die Schnitte auf einen großen Wassertropfen auf einem Objektträger übertragen. Es wurde entschieden, 6 Schnitte aus verschiedenen Tiefen eines Präparates herzustellen, auch unter dem Gesichtspunkt einer homogenen Verteilung. Zum Anfixieren der Schnitte an den Objektträger aus Glas genügte es, diesen auf eine Heizplatte zu geben, um das Wasser zum Verdunsten zu bringen. Auf diese Weise konnte eine plane Auflage der Schnitte ohne Überlagerung mehrerer Schichten erreicht werden. Nach erreichter Durchtrocknung erfolgte eine Färbung mit Toluidinblau-Lösung (Herstellung: 3g NaHCO₃ in 120ml Aqua bidest. lösen, 80ml Glycerin hinzugeben und mischen, 1g Toluidinblau einrühren und Lösung filtrieren). Die Färbezeit betrug 3 min auf der Heizplatte bei 90°C. Das Anfärben der Proteine mit Toluidinblau verbesserte die Identifizierung von Vesikelclustern im Gelpräparat. Die Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Verteilung von SR-Vesikelclustern in einem Präparat mit einer Proteinkonzentration von 10,5 mg/ml.

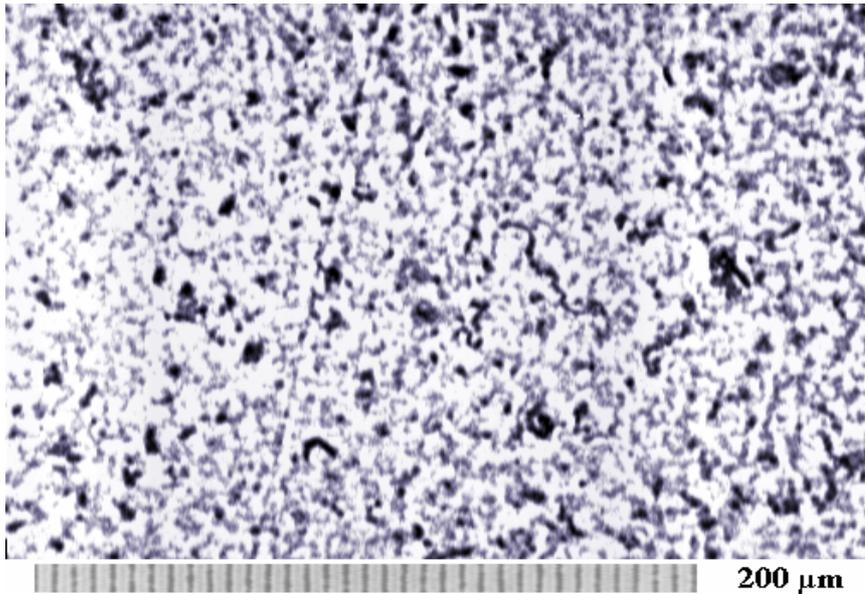


Abbildung 3 Lichtmikroskopische Aufnahme von SR-Vesikelclustern.
(20-fache Objektivvergrößerung; Schichtdicke 0,35 μ m; Proteinkonzentration: 10,5 mg/ml; Anfärbung der Proteine mit Toluidinblau.)

Die angefertigten Semi-Dünn-Schnitte dienten dazu, einen geeigneten Bereich im Präparat zu selektieren, der durch Ultra-Dünn-Schnitte weiter aufgearbeitet werden sollte, um ihn der Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop zugänglich zu machen. Einen weiteren wertvollen Nutzen erkannte man erst später, als eine intensive Betrachtung mit dem Lichtmikroskop und das Ausmessen verschiedener Größen erfolgte.

2.4.4. Schnitte für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Nach dem Festlegen auf einen geeigneten Bereich des Präparates im Lichtmikroskop und einem Zieltrimmen wurden von dieser Stelle Ultra-Dünn-Schnitte mit einer Schichtdicke von 55nm angefertigt (Reichert-Jung Ultracut E, Wien). Die Schnitte wurden auf Blenden (befilmte Trägernetze), die Objektträger des Elektronenmikroskops, überführt und auf diesen doppelkontrastiert. Die Doppelkontrastierung gelang mit einer 5%igen Uranylacetat-Lösung und Bleizitrat nach einem Rezept aus dem Anatomischen Institut in Göttingen, zu gleichen Teilen bestehend aus Bleinitrat, Bleiacetat, Bleicitrat. Herstellung: Diese drei Komponenten in 90ml Aqua bidest. lösen, 3g Natriumcitrat hinzugeben (Lösung wird milchig), mit 4 Plättchen NaOH klären und 40ml Aqua bidest. dazugeben, Lösung filtrieren, verschließen und kühl aufbewahren. Im ersten Schritt wurden die

Präparate für 7 Minuten in Uranylacetat kontrastiert und mit Aqua bidest. abgespritzt. Als nächstes erfolgte die Kontrastierung in Bleizitrat, wiederum für 7 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit 0,02 M NaOH- Lösung kurz abgespült und wiederum sorgfältig mit Aqua bidest. abgespritzt.

2.5. Auswertung und computergestützte Bildverarbeitung

2.5.1. Messung der Wellengeschwindigkeit

Alle beobachteten Kalziumsignale wurden mittels analogen Videorecorders auf S-VHS Band aufgezeichnet. Die so gespeicherten Abläufe wurden anschließend unter Verwendung der Software „Image 1.43“, „Quick Capture“ und „IP Lab Spectrum QC“ als Einzelbilder mit definierten zeitlichen Abständen auf einem „Macintosh Quadra 800“ digitalisiert.

Zur Berechnung der Wellengeschwindigkeit wurden zwei Bilder ein und derselben Welle zu unterschiedlichen Zeitpunkten herangezogen. Mit dem gleichen Objektiv (40x), das zur Beobachtung der Kalziumsignale am Konfokalmikroskop diente, wurde ein Gitter mit bekannter Gitterkonstante aufgezeichnet, ausgemessen und der Pixelabstand in μm umgerechnet. Analog zu Wussling und Salz (1996) konnte die Geschwindigkeit aus dem Pixelabstand und dem bekannten Zeitabstand beider Bilder ermittelt werden.

2.5.2. Bestimmung des mittleren Abstandes benachbarter Vesikel oder Vesikelcluster

Es wurde eine halbautomatisierte Bestimmung des Abstandes zwischen benachbarten Vesikelclustern gewählt, die im Lichtmikroskop zu erkennen waren, beziehungsweise zwischen einzelnen Vesikeln, die im Elektronenmikroskop detektieren werden konnten. Im ersten Schritt wurden Fotoaufnahmen von allen zu untersuchenden Präparaten angefertigt. Die $0,35\mu\text{m}$ dicken Semi-Dünn-Schnitte waren sehr gut der lichtmikroskopischen Exploration zugänglich. Am besten eignete sich hierbei ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung. Eine angeschlossene CCD-Kamera ermöglichte die Anfertigung digitaler Bilder, die auf der Festplatte eines IICI-Macintosh Computers gespeichert wurden. Das komplette System bestand aus der CCD-Kamera (C3077) mit

Kontrolleinheit (C2400), einem zusätzlichen Kontroller (II) und einem Argus-10 Bildprozessor (alle Komponenten von Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Zusätzlich zu den Präparaten wurde ebenso ein Eichgitter mit bekannter Gitterkonstante bei gleicher Vergrößerung abfotografiert. Die digitalisierten Bilder wurden auf Papier ausgedruckt. Die Ultra-Dünn-Schnitte mit einer Schichtdicke von 55nm konnten mit dem Elektronenmikroskop betrachtet werden. Der integrierte Printer des verwendeten Elektronenmikroskops (EM 902 A, Zeiss, Oberkochen) ermöglichte die direkte Photodokumentation des eingestellten Bildausschnittes mit zugehörigem Maßstab.

Im nächsten Schritt wurden die Mittelpunkte aller Vesikelcluster (Lichtmikroskopie) beziehungsweise aller Vesikel (Elektronenmikroskopie) auf jeweils eine Folie pro angefertigtem Fotoausdruck übertragen. Es wurde also eine Transparentfolie über das Foto gelegt und per Hand nach bestem Geschick mit einem Permanentstift ein Punkt auf die Folie gesetzt, der dem Mittelpunkt des jeweiligen Vesikels bzw. Vesikelclusters entsprach. Auf diese Weise konnten durchschnittlich 5 Folien pro Konzentration und Mikroskopiermethode angefertigt werden. Der Maßstab wurde auf jede Folie in Form eines Balkens aufgezeichnet. Die Abbildungen 4 und 5 machen diesen Schritt deutlich. Darin sind die Originalfotos und die jeweils erstellten Folien dargestellt, die zur weiteren Auswertung verwendet wurden.

Die Folien wurden eingescannt und das Ergebnis war eine Bilddatei, die eine Punktwolke abbildete. Um die rechnergestützte Auswertung zu ermöglichen, entwickelte H. Podhaisky, ein im Team mitarbeitender Mathematiker, eigens zu diesem Zweck ein Programm (vergleiche Podhaisky und Wussling, 2004; Wussling, Aurich, Knauf, Podhaisky, 2004). Die Technologie basierte auf einer Schwarz-Weiß-Bilderkennung, bestehend aus einem 100 Zeilencode, programmiert mit ANSI-C. Das Programm lief auf einem PC mit Intel Pentium 4- Prozessor mit 2,4 GHz und benötigte auf diesem System 3 Sekunden zur Berechnung eines Bildes. Das Programm konstruierte Boxen um die von Hand gesetzten Punkte und berechnete den Mittelpunkt jeder dieser Boxen. Als Ergebnis wurde pro Folie eine Punktliste ausgegeben, die die (x, y)-Koordinaten der Vesikelmittelpunkte aufzeigte. Zusätzlich wurde noch die Länge des Maßstabes ermittelt.

Mit dem Programm Mathematica 4.1 (Wolfram Research) wurde anhand dieser Koordinaten nach dem Satz des Pythagoras, siehe Abbildung 6, der Abstand eines Punktes P_1 zu jedem anderen Punkt mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet:

$$P_1 = (x_1, y_1), P_2 = (x_2, y_2), \quad d(P_1, P_2) = \sqrt{[(x_1-x_2)^2 + (y_1-y_2)^2]}.$$

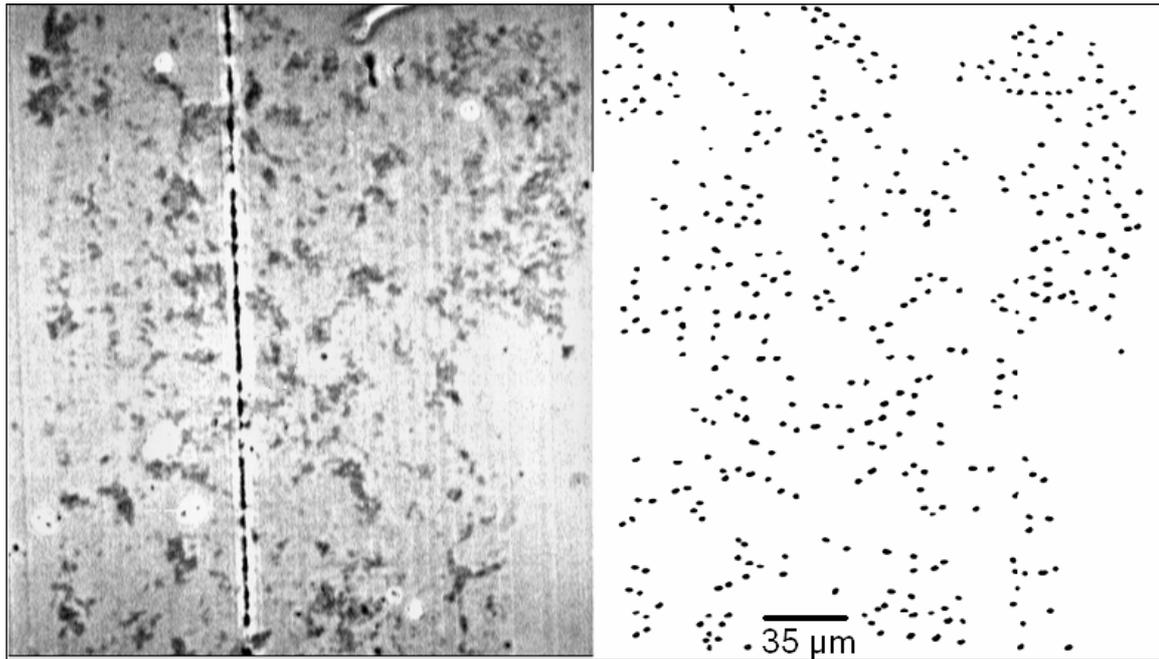


Abbildung 4 Im linken Teil der Abbildung ist das lichtmikroskopische Bild eines Gel-Präparates mit Vesikelproteinkonzentration von 9 mg/ml dargestellt. (Erkennbar ist die Clusterbildung der SR-Vesikel. Die vertikale Linie im Foto des Präparates ist ein Artefakt, das vom Anfertigen der Semi-Dünn-Schnitte resultiert.) Der rechte Teil der Abbildung zeigt eine Folie, auf die die Mittelpunkte der Vesikelcluster des lichtmikroskopischen Fotos übertragen wurden.

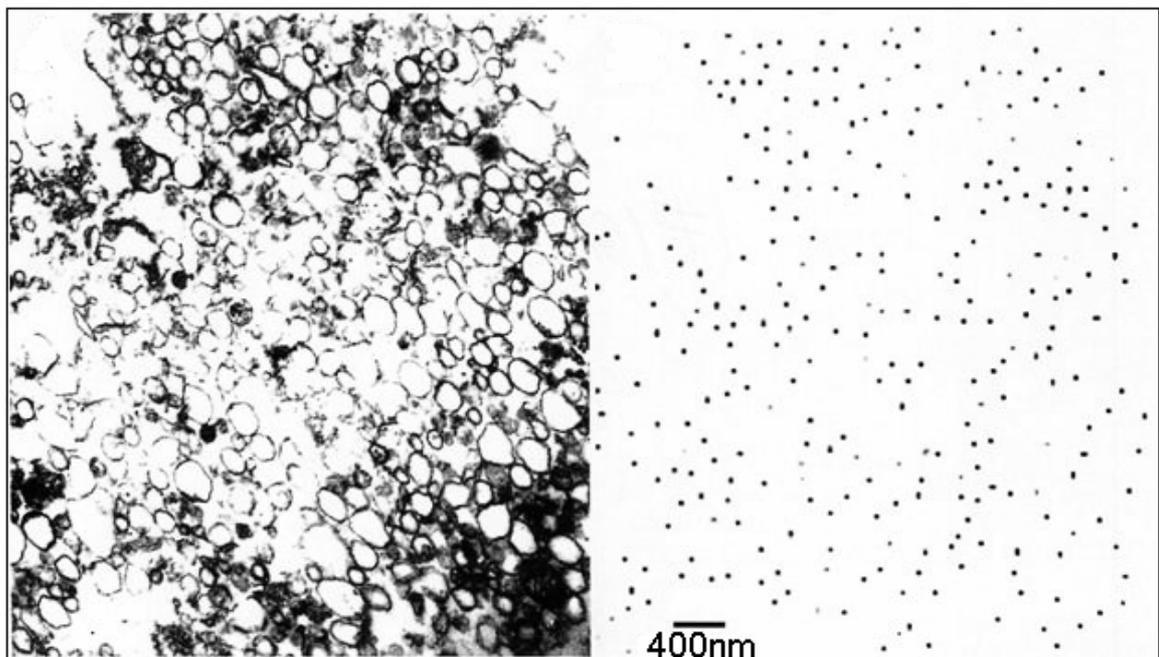


Abbildung 5 Im linken Teil dieser Abbildung ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von einzelnen SR-Vesikeln zu sehen, der rechte Teil zeigt die erstellte Folie, die aus dem Übertrag der Mittelpunkte aller erkennbaren SR-Vesikel des linken Bildes resultiert.

In die Endbetrachtung wurde allerdings nur der kleinste Abstand einbezogen, der dem Abstand zum nächsten Nachbarn entspricht. Der Rest entfiel, ebenso $d=0$.

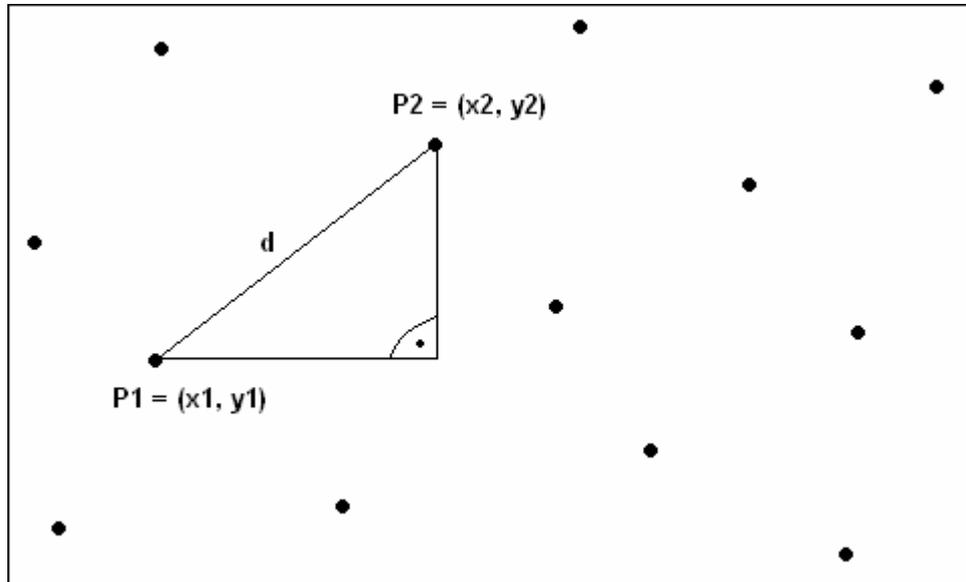


Abbildung 6 Berechnung des Abstandes d nach dem Satz des Pythagoras.

So wurde mit jedem Punkt verfahren und am Ende ein mittlerer Abstand ermittelt. Die berechneten Abstände wurden im Verhältnis zur Balkenlänge angegeben. Belegt man nun die Länge des Balkens mit dem Zahlenwert des Maßstabes, erfolgt die Ausgabe der Abstände ebenfalls als absolute Längenangabe.

3. Ergebnisse

3.1. Eigenschaften von Kalziumwellen in Myokardzellen der Ratte

Um grundlegende Eigenschaften von Kalziumwellen zu verstehen und diese später in Gelen zu untersuchen, erschien es wichtig, spatio-temporale Kalziummuster zuerst an lebenden Zellen zu betrachten. Hierzu diente bereits umfangreich vorhandenes Videomaterial von Kalziumwellen und -oszillationen, die an isolierten Herzzellen der Ratte beobachtet wurden. Die Abbildung 7 zeigt eine Myokardzelle bei 100facher Objektivvergrößerung. In Bild A erkennt man in der rechten Hälfte der Zelle eine gewisse Grundfluoreszenz, die mit der zytosolischen Kalziumkonzentration korreliert. Im linken Teil der Zelle sind zwei Foci deutlich erhöhter Intensität zu sehen. Diese mit „1“ und „2“ bezeichneten Foci entstanden spontan und zufällig. Dieses Bild wurde als Startpunkt zweier sich im Folgenden aus den beiden Foci entwickelnden Wellen definiert. Teilbild B zeigt die Situation 200 ms später. Ausgehend von den Foci „1“ und „2“ haben sich zwei zirkuläre Kalziumwellen ausgebildet, von denen nur der jeweils innerhalb der Zelle liegende Teil sichtbar wird und deren Wellenfronten im linken Teil des Bildes aufeinander zu laufen. An der Stelle des Focus „1“ ist bereits eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen, was einer Erniedrigung der Kalziumkonzentration durch Aufnahme von Kalzium in intrazelluläre Speicher entspricht. Bild C beschreibt die Vorgänge weitere 200 ms später. Es ist der Zeitpunkt kurz nach Beginn der Kollision beider Wellen dargestellt. Die linke Welle hatte bereits den linken Außenrand der Zelle erreicht und die Fluoreszenz hat dort deutlich abgenommen. Im Bereich des Zusammentreffens der Fronten beider Wellen ist ein Areal deutlich erhöhter Fluoreszenzintensität zu erkennen. In diesem Bild, wie auch im folgenden Teilbild D, ist eine grundlegende Eigenschaft von Reaktions-Diffusions-Wellen zu beobachten. Solche Wellen löschen sich nach Kollision gegenseitig aus. Der Grund hierfür ist im Öffnungsverhalten von Ionenkanälen zu finden. Diese sind nach stattgehabter Öffnung für eine gewisse Zeit refraktär, also unerregbar und stehen damit nicht für die Generation von Ionenströmen zu Verfügung. Mechanische Wellen dagegen interferieren bei Kollision und können mit veränderten Merkmalen wie Wellenlänge und Amplitude weiterlaufen. Zum Vergleich stelle man sich zwei Wellen auf einer Wasseroberfläche vor. In Bild C erkennt man nun an Stelle des Focus „2“ eine Region des Intensitätsabfalls. Auch dieser Bereich ist nun refraktär und die Welle kann nicht wieder zurücklaufen. Die Wellenausbreitung

nach rechts, in bisher nicht erregte Bereiche der Zelle kann ungestört ablaufen. Bild D zeigt die Myokardzelle 600 ms nach Beginn der Entstehung der Kalziumwellen. Der linke Teil der Zelle ist vollständig refraktär, so dass sich die fortlaufende Kalziumwelle nur nach rechts weiter ausbreiten kann.

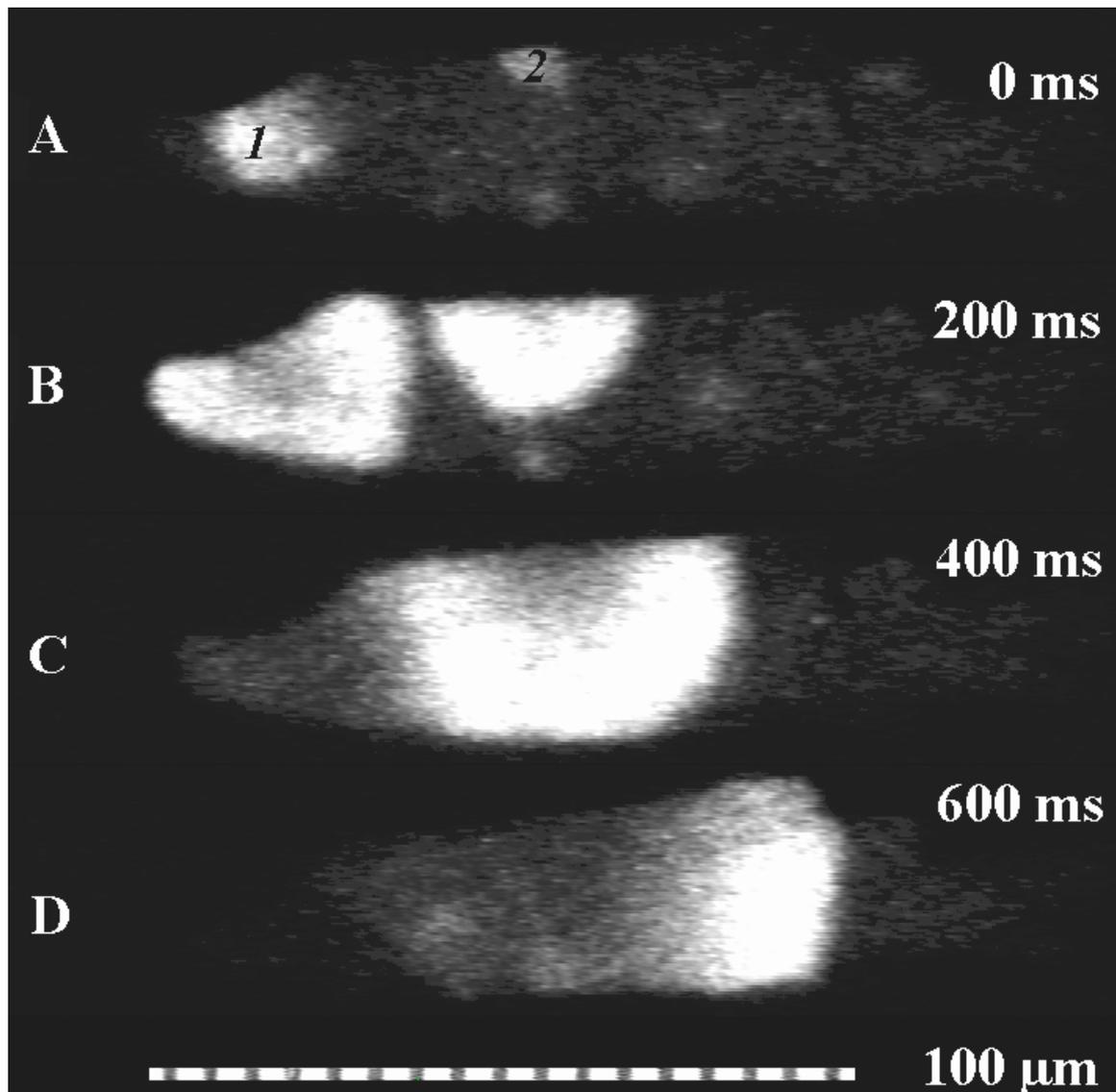


Abbildung 7 Myokardzelle der Ratte.

(Aus den „Hot Spots“ 1 und 2 entwickelt sich jeweils eine Kalziumwelle. Beide Wellen kollidieren etwa bei $t = 300$ ms ab Entstehung (Bild B kurz vor, Bild C nach Kollision) und löschen sich gegenseitig aus (Bild D). Im rechten Teil der Zelle breitet sich die Kalziumwelle ungehindert aus. (Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahmen; extrazelluläre Kalziumkonzentration $c=3,6$ mM; Kalziumindikator: Fluo-3 AM; Objektiv: 100fach))

In der Abbildung 8 ist eine weitere Ratten-Myokardzelle dargestellt. Es ist die Ausbreitung einer von links nach rechts laufenden Kalziumwelle in dieser Zelle zu

verschiedenen Zeitpunkten nach ihrer Entstehung abgebildet. Im ersten Teilbild ist im linken Randbereich der Zelle ein Focus erhöhter Fluoreszenzintensität erkennbar. Zur Verdeutlichung ist dieser mit „1“ bezeichnet. Der Zeitpunkt $t = 0$ s wurde als Startpunkt der Welle definiert, die sich im Folgenden aus dem Focus „1“ heraus entwickelt. In den weiteren Teilbildern der Abbildung 8 ist die Ausbreitung der Welle in Zeitabständen von jeweils 400 ms von Bild zu Bild dokumentiert. Im letzten Teilbild, zum Zeitpunkt $t = 2$ s, hat die Welle die Zelle durchlaufen, und es ist nur eine geringe Grundfluoreszenz im gesamten Zytosol erkennbar. Da der Bereich, den die Welle gerade durchlaufen hat, refraktär ist, besteht auch nicht die Möglichkeit, dass die Welle am Rand der Zelle „reflektiert“ wird und sich erneut eine propagierende Welle ausbildet.

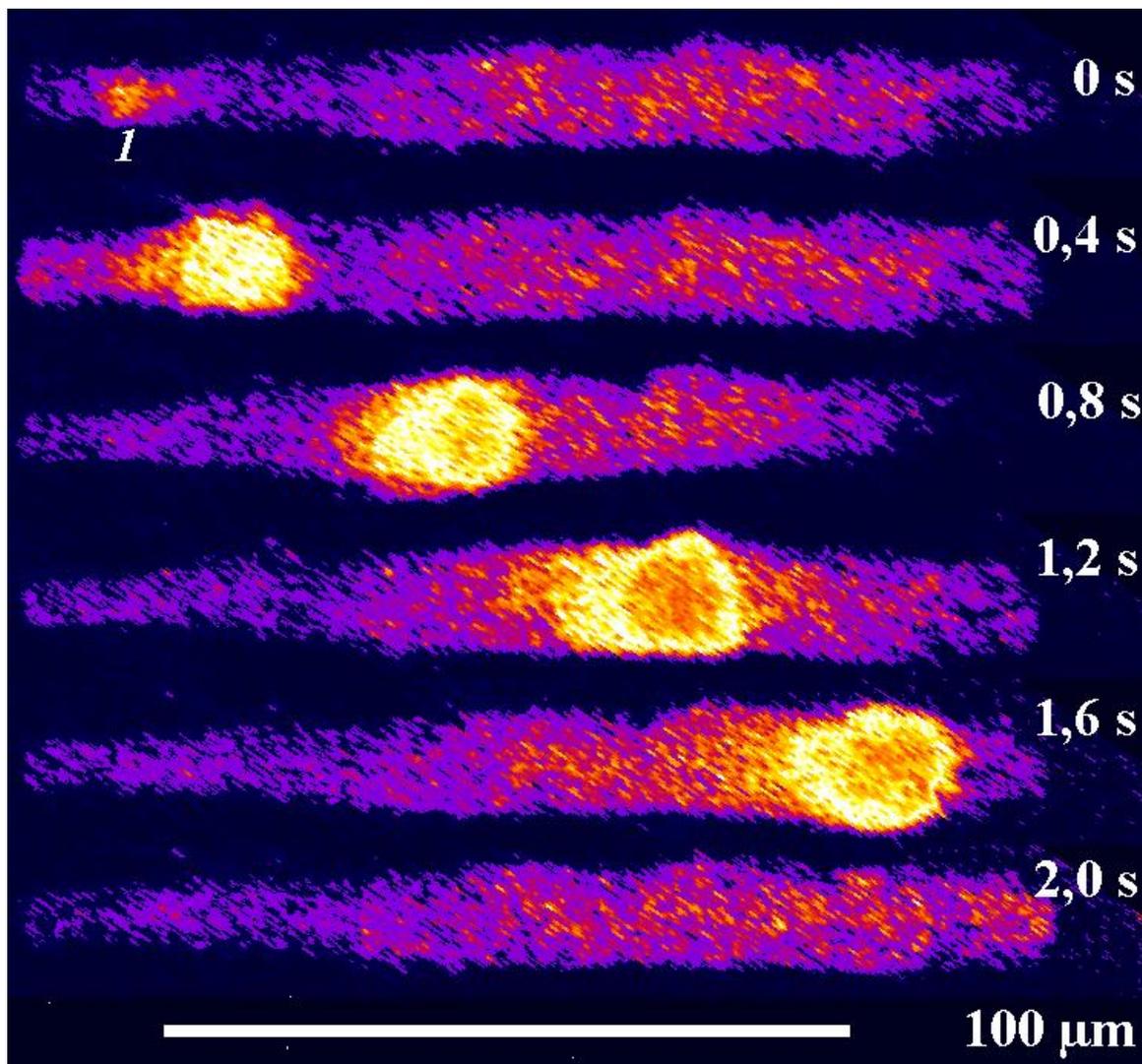


Abbildung 8 Myokardzelle der Ratte.

(Aus dem Focus „1“ hat sich eine Kalziumwelle entwickelt, die sich von links nach rechts in der Zelle ausbreitet. Methodische Details wie in Legende Abb. 7.)

Anhand des Kalibrierungsbalkens, der in der Abbildung eine Länge von 100 μm darstellt, kann man sich über die Geschwindigkeit dieser Welle orientieren. Durch die Berechnung von Weg geteilt durch Zeit kann man eine Geschwindigkeit von etwa 80 $\mu\text{m/s}$ abschätzen. Um die Charakteristik der in der Abbildung 8 beschriebenen Welle genauer betrachten zu können, war es notwendig, ein Intensitätsprofil dieser Welle zu erstellen. Ausgewählt wurde die Darstellung der sich ausbreitenden Kalziumwelle zum Zeitpunkt $t = 1000$ ms ab Startpunkt, gezeigt in der Abbildung 9. In diesem Moment stellt sich die Kalziumwelle in optimaler Fluoreszenzintensität dar. Teil A der Abbildung 9 gibt die Lage der Myokardzelle unter dem Mikroskop zum Zeitpunkt der Beobachtung wieder. Zur weiteren Analyse sollte die Zelle horizontal ausgerichtet sein. Teil B zeigt die modifizierte Darstellung nach Rotation um 34° . Des Weiteren erkennt man eine blau hervorgehobene Rechteckfläche.

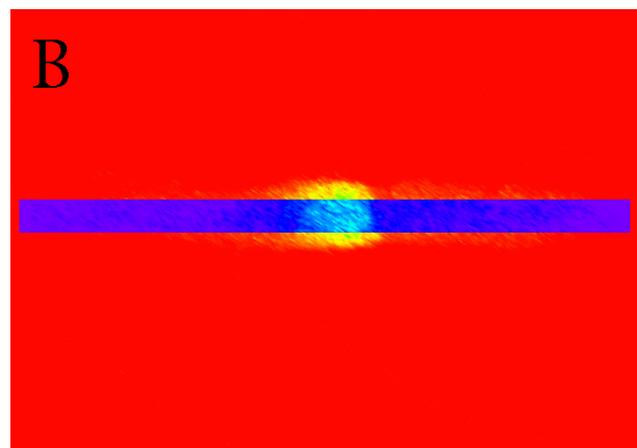
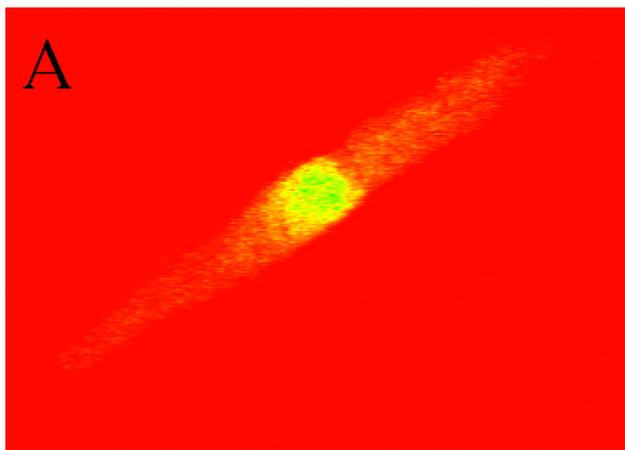


Abbildung 9A und B Kalziumwelle in einer Ratten-Myokardzelle.
(Bild A zeigt die Lage der Zelle zum Zeitpunkt der Beobachtung. Bild B ist die um 34° rotierte Darstellung mit einem ausgewählten ROI (Region Of Interest), um das Intensitätsprofil dieser Welle zu erzeugen.)

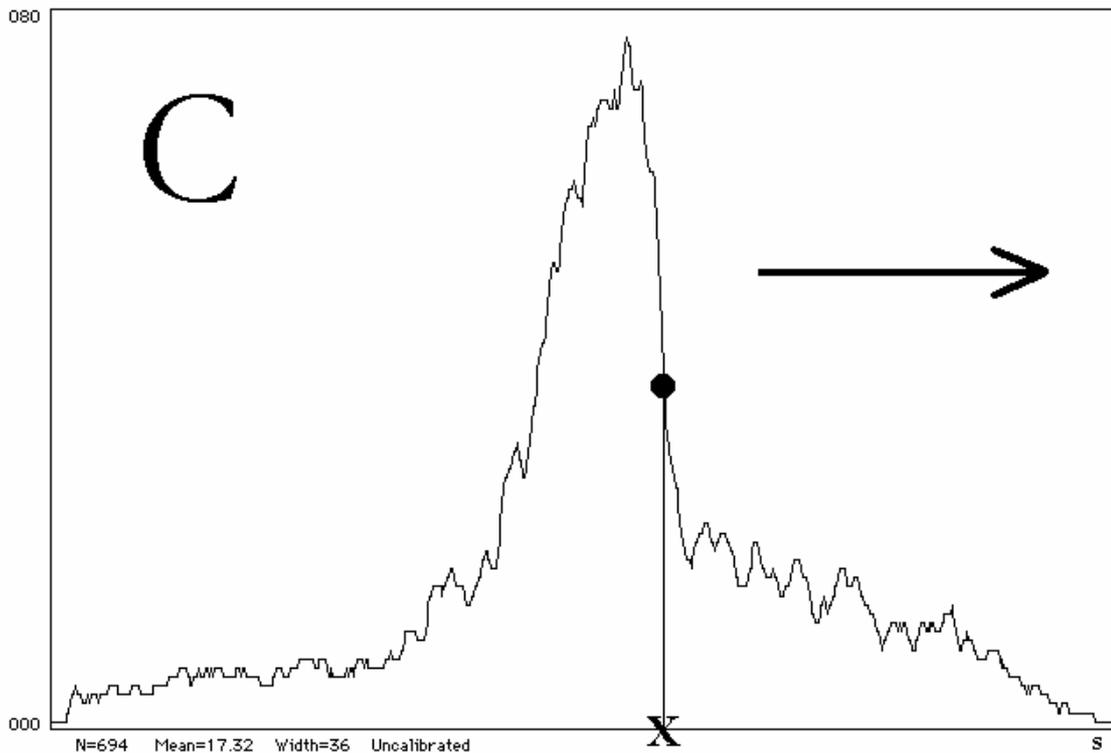


Abbildung 9C Darstellung des Intensitätsprofils der beobachteten Kalziumwelle. (Der Pfeil zeigt die Ausbreitungsrichtung der Welle an. Zur genauen Berechnung der Ausbreitungsgeschwindigkeit kann die Markierung bei halber Intensität zu verschiedenen Zeiten und an unterschiedlichen Orten herangezogen werden. Die Position der Welle zum derzeitigen Zeitpunkt wird hier einfach mit „X“ bezeichnet, weil die Abszissenachse nicht kalibriert wurde.)

Dieses ROI (Region Of Interest) wurde über die ganze Länge der Zelle gelegt und von diesem ausgewählten Bereich ein Intensitätsprofil erstellt. Diese Analyse wurde mit dem Programm „Image 1.43“ durchgeführt.

Die Abbildung 9C zeigt das aus dem ROI der Abbildung 9B gewonnene Intensitätsprofil der Kalziumwelle zum Zeitpunkt $t = 1000$ ms ab Startpunkt. Der Pfeil weist die Richtung, in die sich die Wellenfront fortbewegt. Dieses Intensitätsprofil zeigt ein Charakteristikum, das allen beobachteten Kalziumwellen gemeinsam ist. Es ist ein starker Anstieg der Intensität zu erkennen und ein flacher Abfall auf der Rückseite. Es wurde eine Markierung bei halbmaximaler Intensität und ihr den Punkt „X“ auf der Abszissenachse zugewiesen. Die Abszisse repräsentiert den Weg, den die Kalziumwelle zurücklegt und ist nicht kalibriert, so dass „X“ die Position der Welle zum momentanen Zeitpunkt markiert. Solche Intensitätsprofile bieten die Möglichkeit, die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Wellen exakt zu bestimmen. Hierzu müssen mehrere Profile zu verschiedenen, bekannten Zeiten angefertigt und die Abszisse mit Hilfe eines Eichgitters bei gleicher Objektivvergrößerung kalibriert werden. Anhand der Formel $v = s/t$ kann die

Ausbreitungsgeschwindigkeit berechnet werden. Die Untersuchung von propagierenden Kalziumwellen in Myokardzellen soll aber nicht der Kern dieser Arbeit sein.

3.2. Spatio-temporale Kalziumstrukturen in Agarose-Gelen mit eingebetteten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR)

3.2.1. Vermeintliche Kalziumoszillationen

Bisher wurde das Phänomen der Entstehung von Kalziumwellen in Myokardzellen der Ratte beobachtet, also in zellbiologisch weitgehend intakten und lebenden Zellen. Es soll sich nun der Idee zugewandt werden, jene Zellorganellen isoliert zu betrachten, denen die Schlüsselrolle bei der Entstehung spatio-temporaler Kalziummuster in Zellen zugeschrieben wird. Es geht im Folgenden um präparatorisch isolierte Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), die in einem Agarose-Gel eingebettet wurden.

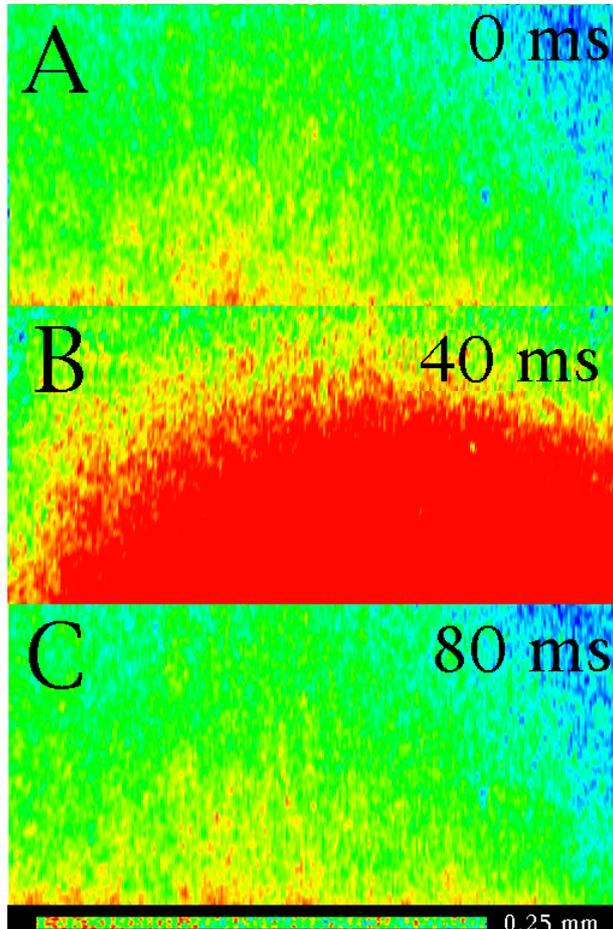


Abbildung 10 Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln.

(Abbildung einer vermeintlichen Kalziumoszillation, die 40 ms nach Beginn ihre maximale Ausdehnung und maximale Fluoreszenzintensität erreicht.

Vesikelproteinkonzentration von 13mg/ml; Objektivvergrößerung: 40-fach; Kalziumindikator: Fluo-4; Pseudofarben; Zunahme der Intensität von blau nach rot.)

In der Abbildung 10 sind Ausschnitte eines solchen Vesikel-Gel-Präparats mit einer Vesikelproteinkonzentration von 13 mg/ml dargestellt. Das abgebildete Ereignis wurde anfangs als eine Kalziumoszillation gedeutet. Die Grafik wurde in drei Teilbilder A, B und C unterteilt, die in einem zeitlichen Abstand von 40 ms aufeinander folgen. Die Sequenz in der Abbildung 10 zeigt unter A einen angeschnittenen Bereich erhöhter Fluoreszenzintensität am unteren Bildrand. Innerhalb von 40 ms hat sich die Fluoreszenz ausgebreitet, bleibt aber lokal begrenzt, siehe Bild B. Weitere 40 ms später, in Bild C ersichtlich, hat sich der stark fluoreszierende Bereich wieder verkleinert, ohne eine loslaufende Kalziumwelle auszubilden. Ein solches Phänomen, bei dem sich ein fluoreszierendes Areal abrupt vergrößert und sich wieder zurückzieht, dabei aber stets lokal begrenzt bleibt, bezeichnet man als Kalziumoszillation.

In weiteren Experimenten konnte erkannt werden, dass solche Phänomene mit sehr hohen Ausbreitungsgeschwindigkeiten auf Artefakte zurückzuführen sind, wie zum Beispiel einen Lichtreflex oder andere Störfaktoren.

3.2.2. Kalziumwellen

Wie in lebenden Zellen ließen sich auch im Agarose-Gelpräparat mit eingebetteten SR-Vesikeln Kalziumwellen beobachten.

In der Abbildung 11 ist ein Ausschnitt eines Gels mit annähernd homogen verteilten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums abgelichtet. Auch hier repräsentieren die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten die extrasarkoplasmatische Kalziumkonzentration. In diesem Beispiel wird die maximale Intensität gelb dargestellt und die niedrigsten Intensitätswerte sind mit der Farbe schwarz belegt. Die Kenntnis der Farbcodierung ist in diesem Falle maßgeblich hinweisend zur Unterscheidung zwischen erregten und nicht erregten Arealen. Solche folgen in der Darstellung mehrfach aufeinander. Die Abbildung 11 ist eine Momentaufnahme zu einem Zeitpunkt, als wiederholt Kalziumwellen im Gel generiert wurden und zeigt in diesem Augenblick drei Wellen im Bildausschnitt. Die schwarz codierten Areale zwischen den aufeinander folgenden Wellen sind als refraktäre Bereiche anzusehen. Die dort lokalisierten Ionenkanäle können so lange keinen Kalziumausstrom aus dem SR ermöglichen, bis ATP-getriebene Kalzium-Pumpen, die sich in den Vesikelmembranen befinden, wieder einen transmembranösen Kalziumgradienten aufgebaut haben.

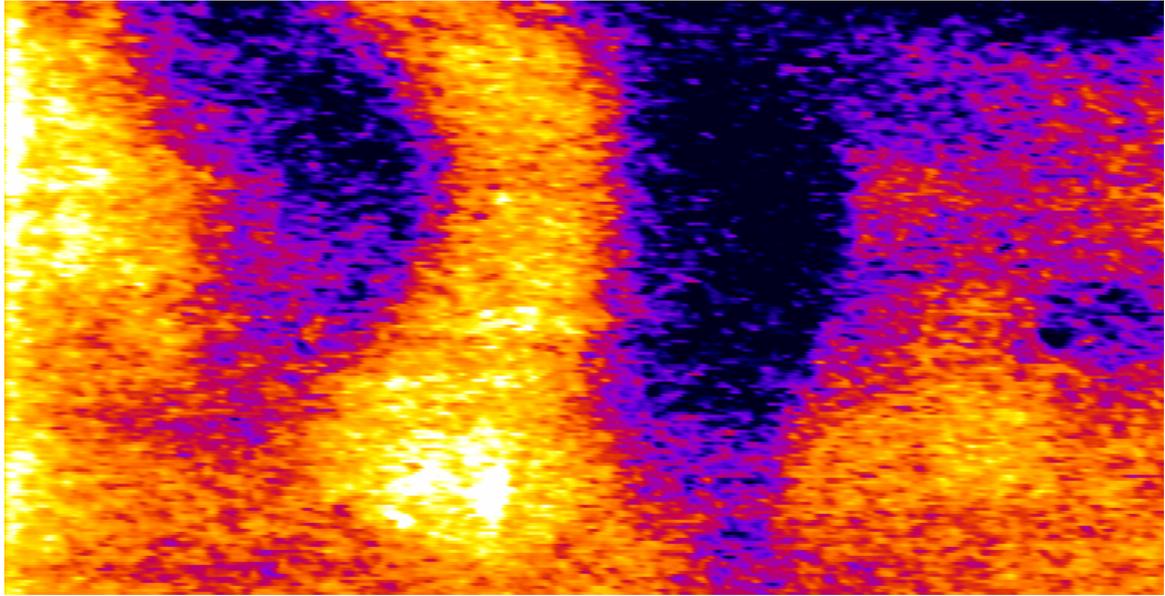


Abbildung 11 Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln.
 (Ausbildung repetitiver Kalziumwellen, die sich im Bild von rechts nach links ausbreiten.
 Objektivvergrößerung: 40-fach)

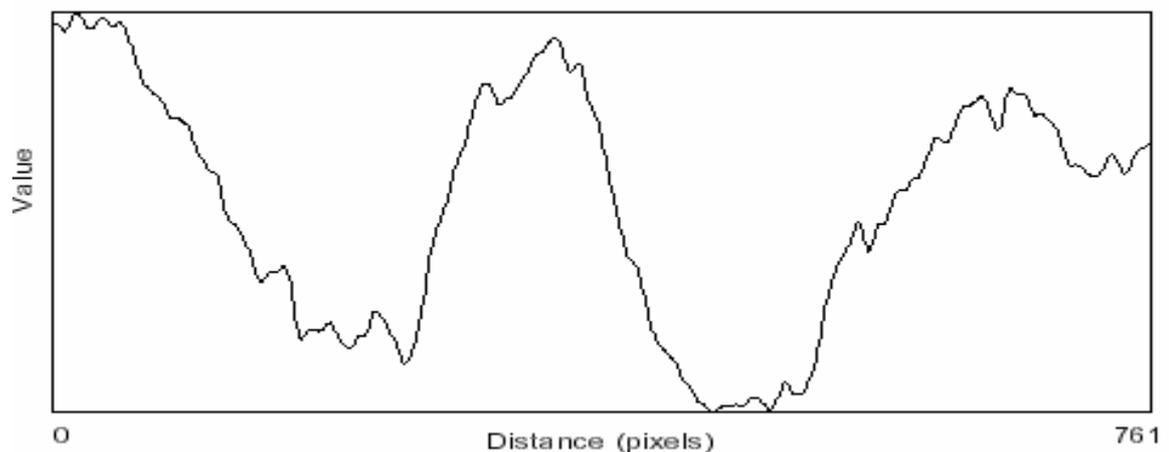


Abbildung 12 Intensitätsprofil der drei Kalziumwellen aus Abbildung 11 zur Verdeutlichung der erregten und der refraktären Bereiche.
 (Ausbreitungsrichtung von rechts nach links im Bild.)

Um einen noch besseren Überblick über die drei Kalziumwellen im Gel in der Abbildung 11 zu erlangen, wurde ein Intensitätsprofil erstellt, das alle abgebildeten Wellen erfasst. Dieses Profil ist in der Abbildung 12 aufgezeichnet, wo die Ordinatenachse die Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten bedeutet. Das Intensitätsprofil sichert so die Zuordnung der Kalziumwellen in der Abbildung 11 zusätzlich. Die folgende Abbildung 13 soll die Dynamik der Vorgänge im Agarose-Gel wiedergeben.

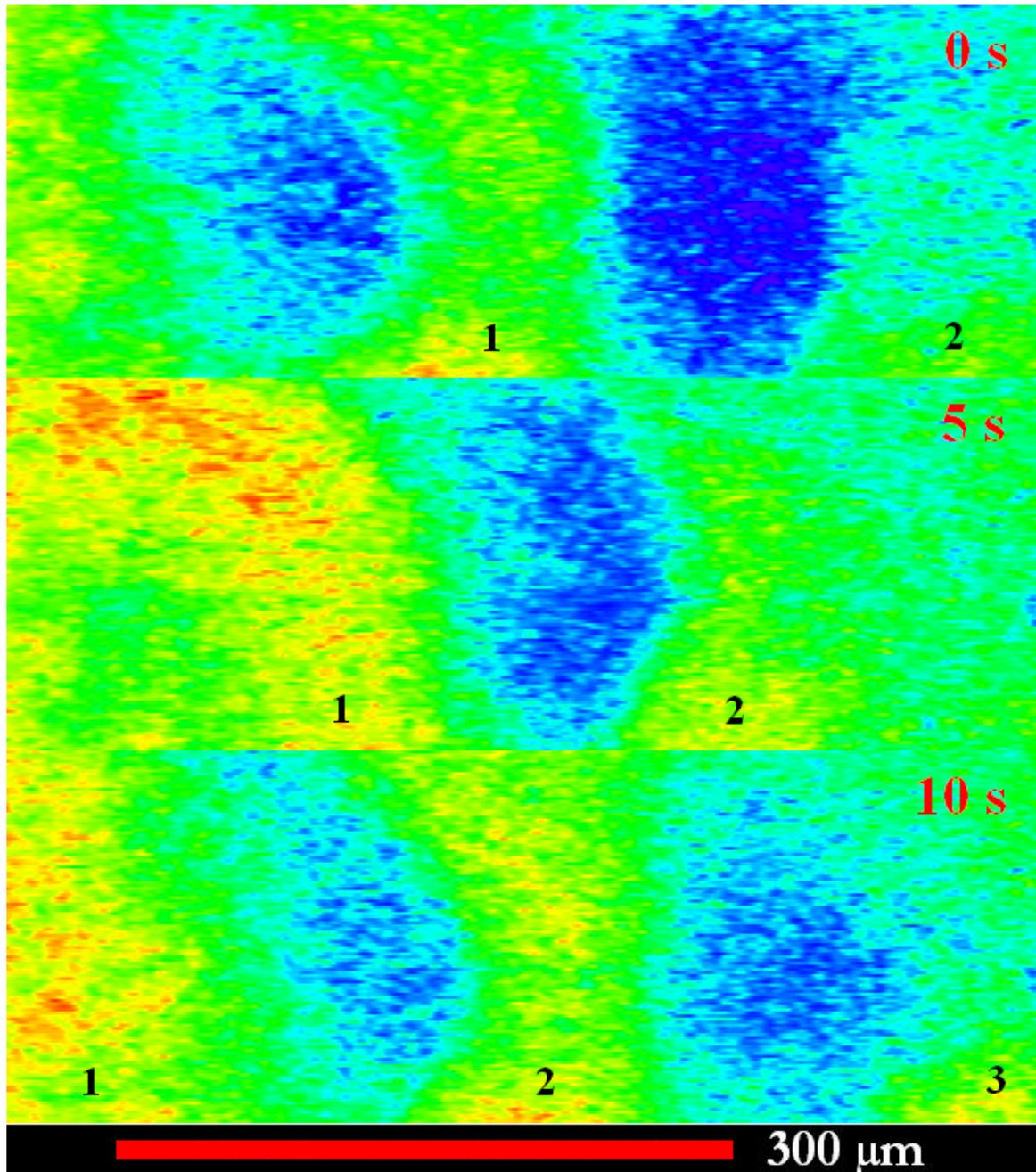


Abbildung 13 Repetitive Kalziumwellen im Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln. (40-fache Objektivvergrößerung. Bewegungsrichtung von rechts nach links.)

Sie beinhaltet eine Sequenz in der die Abfolge von drei aufeinander folgenden Kalziumwellen festgehalten ist. Das Bild wurde mit dem CLSM aufgenommen, als im Gel über einen längeren Zeitraum, der einige Minuten umfasste, repetitiv Kalziumwellen generiert wurden. Das aus drei Fotos zusammengesetzte Bild verfolgt den Weg, den zwei, respektive drei Kalziumwellen im Gel zurücklegen. Die Wellen wurden auf Video aufgezeichnet. Sie wurden also mit 25 Bildern pro Sekunde verfolgt, so dass sicher ist,

dass die Bezeichnung der Wellen „1-3“ korrekt ist. Es wurden somit tatsächlich dieselben Wellen in den drei Teilbildern aufgezeigt. Dies sei so deutlich gesagt, da die Teilbilder der Abbildung 13 in einem zeitlichen Abstand von 5 Sekunden aneinander gefügt wurden. Es ist anhand der Kennzeichnung der Wellen ersichtlich, dass sich die Kalziumwellen von rechts nach links ausbreiten. Wird nun der Ausschnitt des Eichgitters am unteren Bildrand zu Hilfe genommen und die Wellenfront der Welle „2“ verfolgt, die sich innerhalb 10 Sekunden vom rechten Teil des Bildes in die Mitte des Bildausschnitts bewegt, so kann man grob orientierend eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von etwa 25 $\mu\text{m/s}$ abschätzen. Das mag auf den ersten Blick verwundern, breitet sich doch diese Welle im Gel mit nur einem Viertel der Geschwindigkeit einer Kalziumwelle in Myokardzellen der Ratte aus. Wird allerdings mit einbezogen, dass die Geschwindigkeit repetitiver Kalziumwellen betrachtet wird, so kommt dem Öffnungsverhalten der Ionenkanäle eine elementare Bedeutung zu. Nach stattgefundener Öffnung sind die Kanäle für eine gewisse Zeit überhaupt nicht erregbar. Es kann kein Ionenstrom stattfinden. Nach dieser Zeit der kompletten Unerregbarkeit, der absoluten Refraktärzeit, befinden sich die Ionenkonzentrationen und damit aufgebaute Gradienten und Potenziale in der Nähe der Normalwerte. In diesem Moment können die Ionenkanäle bereits wieder öffnen und Ionenströme generieren. Dies kann aber nicht in vollem Umfang geschehen, da die nötige elektrochemische Triebkraft noch nicht maximal aufgebaut werden konnte. Diese Zeit, in der Ionenkanäle Ströme produzieren können, die aber bei Amplitude und Dauer nicht das Maximum erreichen, wird relative Refraktärzeit genannt. Die absolute und relative Refraktärzeit sind somit die limitierenden Faktoren für die Amplitude und vor allen Dingen für die Geschwindigkeit, mit der sich eine Kalziumwelle ausbreiten kann. Entstehen repetitiv Kalziumwellen, wie in der Beispielabbildung 13, so laufen diese stets auf ein Gebiet zu, welches als Folge der vorangegangenen Welle refraktär ist und die ungehinderte Ausbreitung unmöglich macht. Es ist der zeitliche Abstand, in dem die Wellen aufeinander folgen, der darüber entscheidet, in welcher Phase sich die Ionenkanäle in dem Areal (des Gels oder der Zelle) befinden, auf das die Welle zuläuft. Ist der zeitliche Wiederholungsabstand groß genug, so dass die Ionenkanäle wieder vollständig erregbar sind, kann sich die Welle mit maximaler Geschwindigkeit ausbreiten. Verringert sich der Zeitabstand zwischen aufeinander folgenden Wellen derart, dass die nachfolgende Welle auf ein Gebiet absoluter oder relativer Refraktärität aufläuft, wird dieser Umstand die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle deutlich verringern. Dieses beschriebene Phänomen wird als Geschwindigkeitsdispersion bezeichnet.

Eine weitere Besonderheit, die bereits bei der Betrachtung der Myokardzellen in Abschnitt 3.1. Beachtung fand, ist die Eigenschaft von Reaktions-Diffusions-Wellen, sich bei Kollision gegenseitig auszulöschen. Ebenso wie in lebenden Zellen konnten Kollisionen von Kalziumwellen mit der Folge des Auslöschens auch in Gelpräparaten beobachtet werden. In der Abbildung 14 ist diese Besonderheit in bildlicher Abfolge festgehalten.

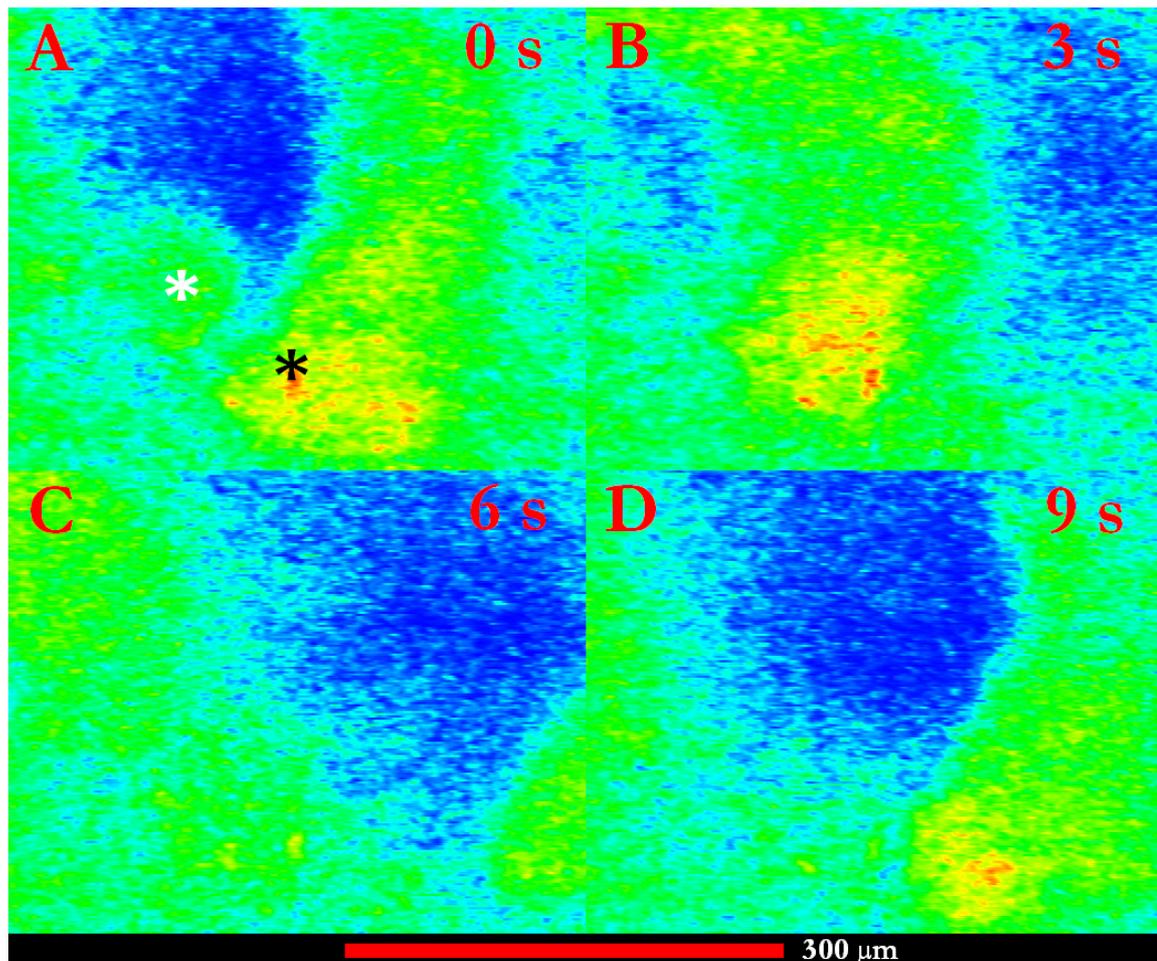


Abbildung 14 Kalziumwellen im Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln. (40-fache Objektivvergrößerung. Die beiden Sternchen „*“ kennzeichnen die Fronten zweier Wellen, die aufeinander zulaufen, kollidieren und sich im weiteren Verlauf gegenseitig auslöschen.)

Im Bild A der Abbildung 14 sind die Fronten zweier Kalziumwellen zu erkennen, die sich aufeinander zu bewegen. Jede Wellenfront ist zur Verdeutlichung mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Bild B zeigt den Moment der Kollision beider Wellen. Die Wellen sind aufeinander getroffen, alle Ionenkanäle in diesem Bereich wurden erregt, öffneten und ließen Kalziumionen ausströmen. Die hohe Kalziumionenkonzentration im Gebiet der Kollision kann anhand der intensiven Fluoreszenz wahrgenommen werden.

3 Sekunden später zeigt sich in Bild C eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, das Kalzium wird von SERCAs, den ATP-getriebenen Ionen-Pumpen zurück in das SR befördert. Es ist zu sehen, dass keine der beiden Wellenfronten über die Kollisionszone hinaus weitergelaufen ist, aufgrund von Refraktärität kam es zur gegenseitigen Auslöschung. Nur der obere Anteil der von rechts nach links laufenden Welle kann sich ungehindert ausbreiten. In Bild D, weitere 3 Sekunden später, läuft eine weitere Welle auf das Gebiet der Kollision zu. Hat diese nachfolgende Welle den Kollisionsbereich erreicht, wird sie sich in jenem Areal weiter ausbreiten können, denn 9 Sekunden nach Kollision zweier Wellen ist zumindest die absolute Refraktärzeit der Ionenkanäle vorüber, und die Rezeptoren sind wieder erregbar.

3.3. Kalziumoszillationen und Kalziumwellen in Abhängigkeit von der Vesikelproteinkonzentration

3.3.1. Theorie der Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration

Die Ansichten bezüglich der Entstehung und Ausbreitung von Kalziumwellen beruhen auf der Annahme, dass sich diese in dreidimensionalen, isotropen Medien als sphärische Wellen, beziehungsweise in der Konfokalebene als zirkuläre Wellen ausbreiten. Wie eingangs erwähnt, wird die Ausbreitung einer Kalziumwelle als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung benachbarter Ryanodinrezeptoren (RyR) verstanden. Für die theoretischen Betrachtungen erscheint es sinnvoll, hierbei von Kalziumfreisetzungseinheiten zu sprechen, da nicht sicher bekannt ist, ob die Kalziumfreisetzung aus einem einzelnen Ryanodinrezeptor erfolgt, aus mehreren RyRs in der Membran eines Vesikels, oder ob sogar mehrere SR-Vesikel notwendig sind, die in geclusterten Verbänden vorliegen. Eine Welle kann nur generiert und aufrechterhalten werden, wenn Kalziumfreisetzungseinheiten in einem Medium vorhanden sind. Nun ergibt sich die Frage, wie weit können diese „Sender“ und „Empfänger“ des Kalziumsignals voneinander entfernt sein, um eine Welle erfolgreich weiterzuleiten.

Das Herzstück der Überlegungen lässt sich folgendermaßen formulieren: Nimmt man eine hexagonale Anordnung von Kugeln derselben Größe an, so ist der Abstand, d , zwischen den Zentren der Kugeln konstant. Die Abbildung 15 A zeigt schematisch eine

zweidimensionale Anordnung von hexagonal dicht gepackten Kugeln mit einem Abstand $d = d_A$ (siehe Balken). Eine geringere Konzentration von Kugeln lässt einen größeren Abstand zwischen diesen erwarten. Jenen Sachverhalt zeigt die Abbildung 15 B mit einem Abstand $d = d_B = 2 d_A$. Der Abstand zwischen den Kugeln beträgt das Doppelte des Abstandes aus der Abbildung 15 A, die Konzentration c_B und somit die Anzahl der Kugeln allerdings reduzierte sich auf ein Achtel derer in der Abbildung 1.

Wenn $d \sim (1 / c)^{1/3}$ dann ist $d_B = d_A (c_A / c_B)^{1/3}$ (1).

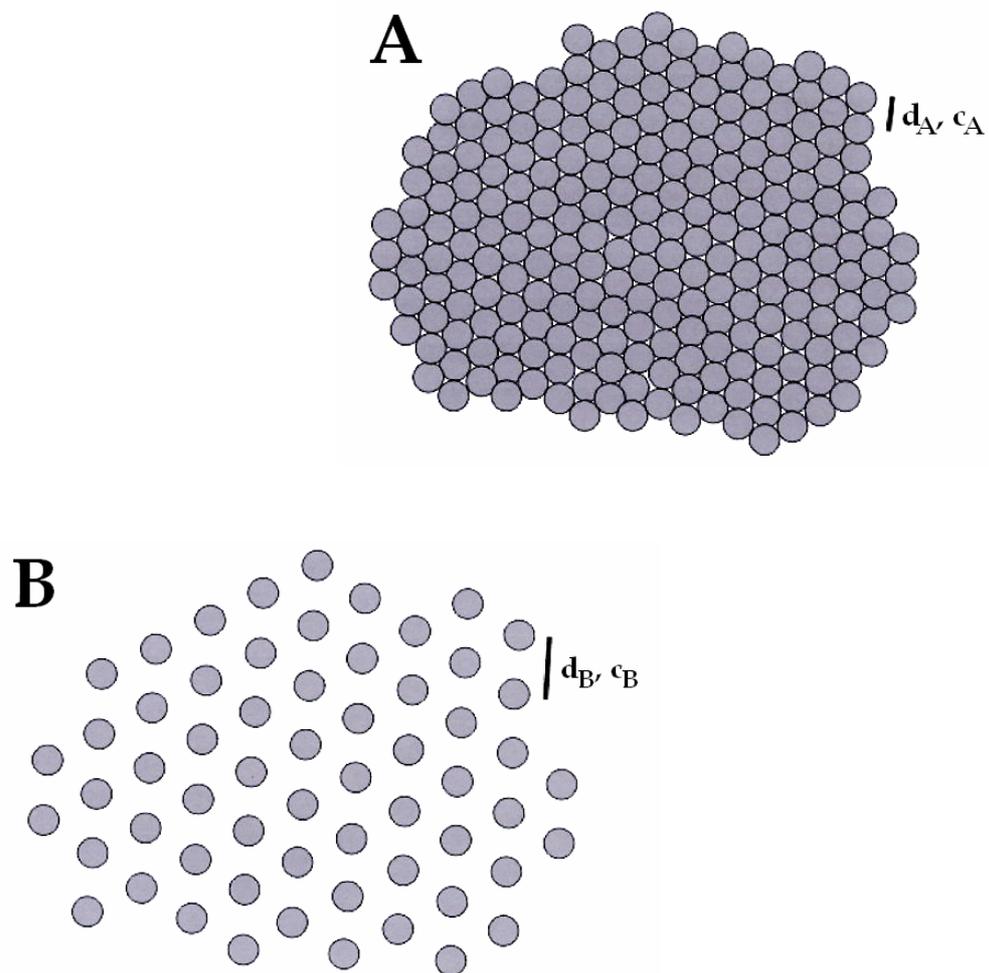


Abbildung 15 A Zweidimensionale Darstellung hexagonal dicht gepackter Kugeln, die in diesem Modell Kalziumfreisetzungseinheiten repräsentieren.
(Der Balken bildet den Abstand zwischen den Zentren benachbarter Kugeln ab und entspricht bei der maximalen Konzentration, c_A , dem Durchmesser der Kugeln.)

Abbildung 15 B Zweidimensionale Darstellung hexagonal angeordneter Kugeln nach Reduktion der Konzentration, c_B , auf ein Achtel der Konzentration aus Abb. 15 A.
(Der Abstand zwischen den Zentren benachbarter Kugeln hat sich dabei verdoppelt, $d = d_B = 2 d_A$.)

Die Formel (1) gibt die Beziehung zwischen der Proteinkonzentration und dem mittlerem Vesikelabstand wieder. Es galt zu überprüfen, ob diese Beziehung tatsächlich der Realität entspricht.

Die Kurve in der Abbildung 16 resultiert aus der Formel (1) und zeigt die Abhängigkeit des mittleren Vesikelabstandes von der Proteinkonzentration über den gesamten zu untersuchenden Bereich. Sie stellt die theoretischen Daten dar, und es müssten im Falle global homogen verteilter SR-Vesikel alle experimentell ermittelten Punkte auf dieser Kurve liegen.

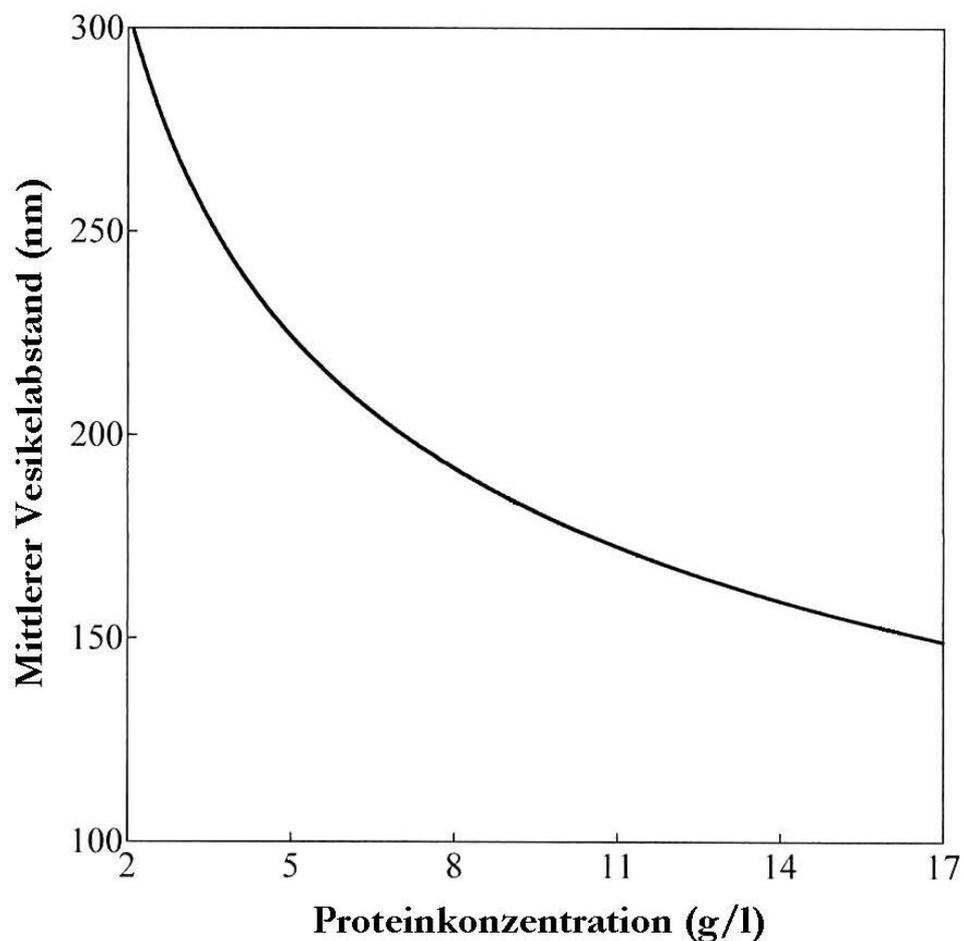


Abbildung 16 Theoretische Beziehung zwischen Proteinkonzentration und mittlerem Vesikelabstand, errechnet mittels der Formel (1).

Mit Blick auf die Kurve in der Abbildung 16 könnte vorhergesagt werden, wie sich mit zunehmender Vesikelproteinkonzentration im Gel der mittlere Abstand zwischen benachbarten Vesikeln verringert. Die Abnahme des mittleren Vesikelabstandes könnte gleichzusetzen sein mit einer Verkürzung der Diffusionsstrecke für Kalzium. Infolge

dessen sollte man bessere Bedingungen für die Ausbreitung von Kalziumwellen erwarten können, denn kürzere Diffusionswege sollten die Generation und Fortleitung von Kalziumwellen positiv beeinflussen.

3.3.2. Überprüfung der Theorie zur Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration

Die Vermutung, dass sich mit Abnahme des mittleren Vesikelabstandes bei zunehmender Proteinkonzentration die Bedingungen für die Ausbreitung von Kalziumwellen verbessern, galt es experimentell zu überprüfen. Als messbarer Parameter, in dem sich günstige Bedingungen widerspiegeln, eignet sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen.

Es wurde bereits gezeigt, dass sich in Clustern von kalziumbeladenen SR-Vesikeln, die bei einer freien Kalziumkonzentration von ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M (Krannich, 2001) in Agarose Gel eingebettet sind, Kalziumwellen mit einer Geschwindigkeit von etwa $40 \mu\text{m/s}$ in Abwesenheit von Mitochondrien ausbreiten und in Anwesenheit von Mitochondrien sogar $60 \mu\text{m/s}$ erreichen (Wussling et al., 1999).

Die Abbildung 17 zeigt eine Sequenz in vier Phasen (A bis D) einer stimulierten Kalziumwelle, die sich durch ein Areal von SR-Vesikelclustern in Agarose-Gel bewegt, das etwa $300 \mu\text{m} \times 450 \mu\text{m}$ misst (siehe Maßstab).

Die vesikuläre Proteinkonzentration beträgt in diesem Fall $16,32 \text{ mg/ml}$. Zusätzlich wurden diesem Präparat noch Mitochondrien beigegeben. Folgt man den theoretischen Überlegungen, waren die Bedingungen für die Entstehung und Ausbreitung einer Kalziumwelle nahezu ideal. Die Zeit zwischen den Bildern der Sequenz beträgt 1 s und die mittlere Wellengeschwindigkeit $64 \mu\text{m/s}$. Der Pfeil in der linken unteren Ecke eines jeden Bildes deutet auf den Rand des Gels.

Die Wellengeschwindigkeit wird in Richtung der sich ausbreitenden Welle, also orthogonal zur Wellenfront ermittelt und über Intensitätsprofile bestimmt. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Fluoreszenzintensität der Welle relativ hoch ist, damit die Wellenfront klar sichtbar erscheint. Beim Betrachten der Abbildung 17 könnte man vermuten, dass es sich hierbei nicht um die Front einer zirkulären Welle handelt. Doch ist eine Abweichungen vermutlich einer inhomogenen Verteilung der SR-Vesikel, des Kalziumindikators Fluo oder beider Bestandteile zuzuschreiben.

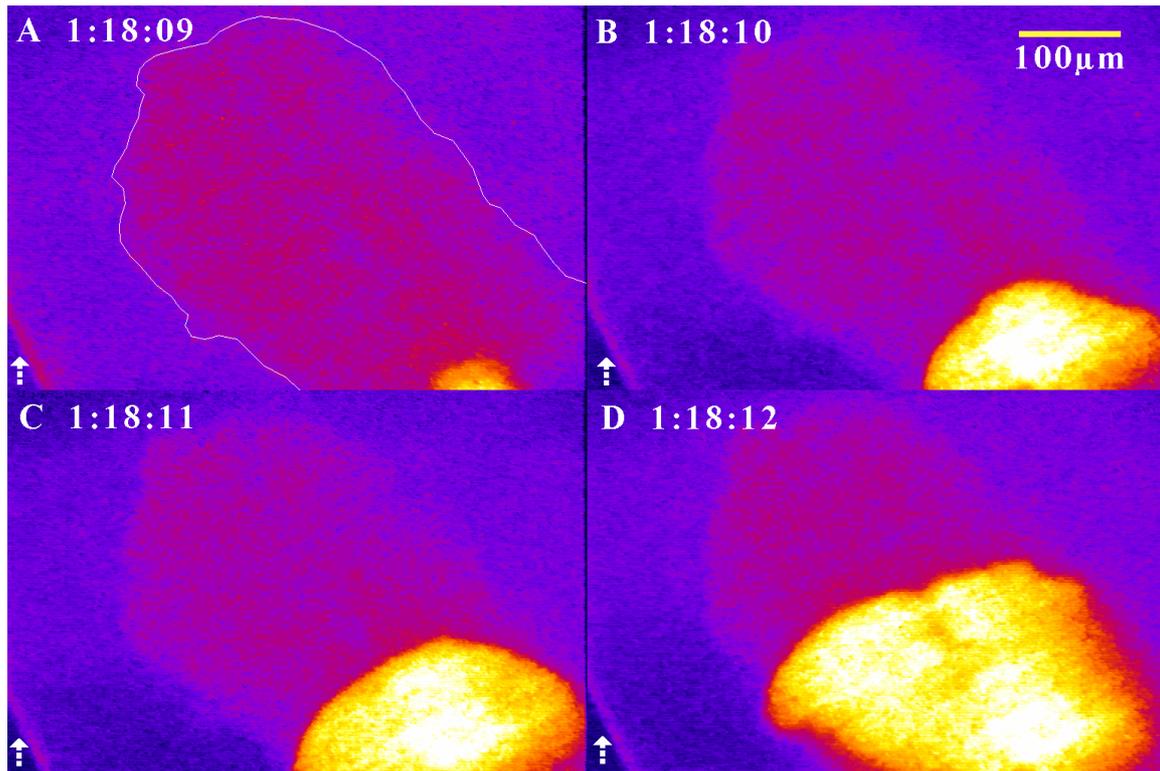


Abbildung 17 Kalziumwelle im Agarose-Gel mit eingebetteten Clustern von SR-Vesikeln und Mitochondrien.
(Proteinkonzentration 16,32 mg/ml; Objektivvergrößerung: 40x (siehe Krannich, 2001 sowie Wussling et al., 1999))

Analog der Abbildung 17 konnten auch in weiteren Präparaten mit der relativ hohen Proteinkonzentration von 16,32 mg/ml im Gel Kalziumwellen registriert werden, die sehr stabil waren und innerhalb von wenigen Minuten mehrfach und mit konstanter mittlerer Geschwindigkeit zu beobachten waren.

Im Folgenden wird der Focus wieder auf Agarose-Gelpräparate mit annähernd homogen verteilten SR-Vesikeln ohne Mitochondrienzugabe gerichtet. Nachstehende Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Beispiel für eine Kalziumwelle im Agarose-Gel mit gleichmäßig eingebetteten Vesikeln. Bei diesen Präparaten wurde versucht, die Vesikel durch sorgfältiges Mischen und vorsichtiges, wiederholtes Pipettieren so homogen wie möglich im Gel zu verteilen und größer fragmentierte SR-Vesikelcluster zu vermeiden. Die Sequenz in der Abbildung 18 zeigt ein typisches Kalziumwellenmuster bei einer Vesikelproteinkonzentration von 10,86 mg/ml. Die Teilbilder A-D zeigen jeweils den gleichen Ausschnitt des Gels, mit dem leicht runden Rand des Präparates (siehe Pfeil in Abb.18). Sie sind in einem zeitlichen Abstand von 1 Sekunde aufgenommen und belegen, wie sich die Wellenfront innerhalb des Präparates fortbewegt. Um die fortlaufende

Kalziumwelle besser sichtbar zu machen, wurde der Bereich der beginnenden Erregung in jedem Bild mit einem schwarzen Sternchen versehen. Weiße Sternchen markieren eine unerregbare Region, die gleichzeitig die Grenze für die sich ausbreitende Welle darstellt. Die Helligkeit der Welle ist relativ gering, so dass die Wellenfront diffus erscheint (im Vergleich zur Abb. 17). Trotzdem konnte die Wellengeschwindigkeit über Intensitätsprofile bestimmt werden und war bei dieser Proteinkonzentration von 10,86 mg/ml bei Abwesenheit von Mitochondrien höher als bei Proteinkonzentrationen von 16,32 g/l mit Mitochondrien, nämlich 70 $\mu\text{m/s}$ in der Abbildung 18, verglichen mit 64 $\mu\text{m/s}$ in Abbildung 17.

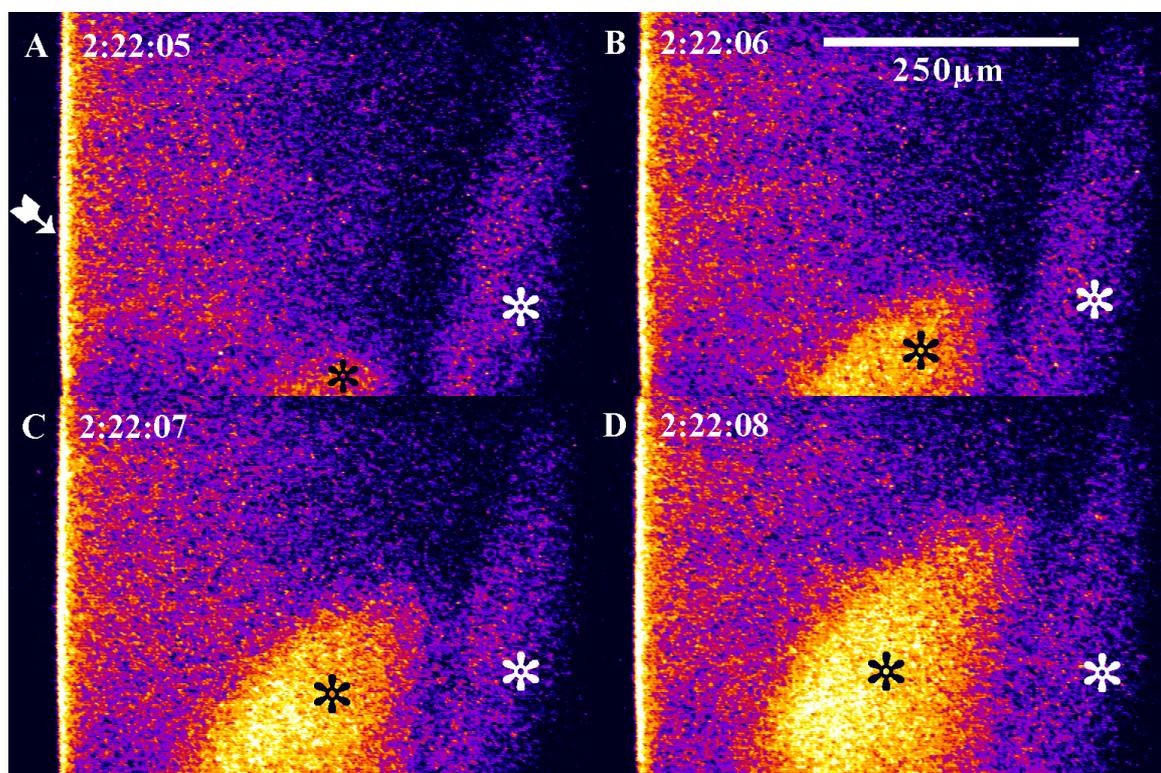


Abbildung 18 Kalziumwelle im Agarose-Gel bei einer Proteinkonzentration von 10,86 mg/ml ohne Mitochondrien.
(Der Pfeil deutet auf den Rand des Gels. Das schwarze Sternchen markiert die fortlaufende Erregung, das weiße Sternchen zeigt eine unerregbare Region an. Objektivvergrößerung: 40x)

Die anfängliche Vermutung, wonach eine höhere Vesikelproteinkonzentration, die geringere Abstände zwischen benachbarten Kalziumfreisetzungseinheiten mit sich bringt und damit die Diffusionswege verkürzt, die Ausbreitung von Kalziumwellen begünstigt, hat sich nicht bestätigt. Vielmehr scheint es eine optimale Proteinkonzentration zu geben, bei der die Ausbreitungsgeschwindigkeit maximal ist.

Auf der anderen Seite können unterhalb einer kritischen Konzentration keine Kalziumwellen mehr entstehen. In diesen Konzentrationsbereichen lassen sich andere vorherrschende Kalziummuster beobachten.

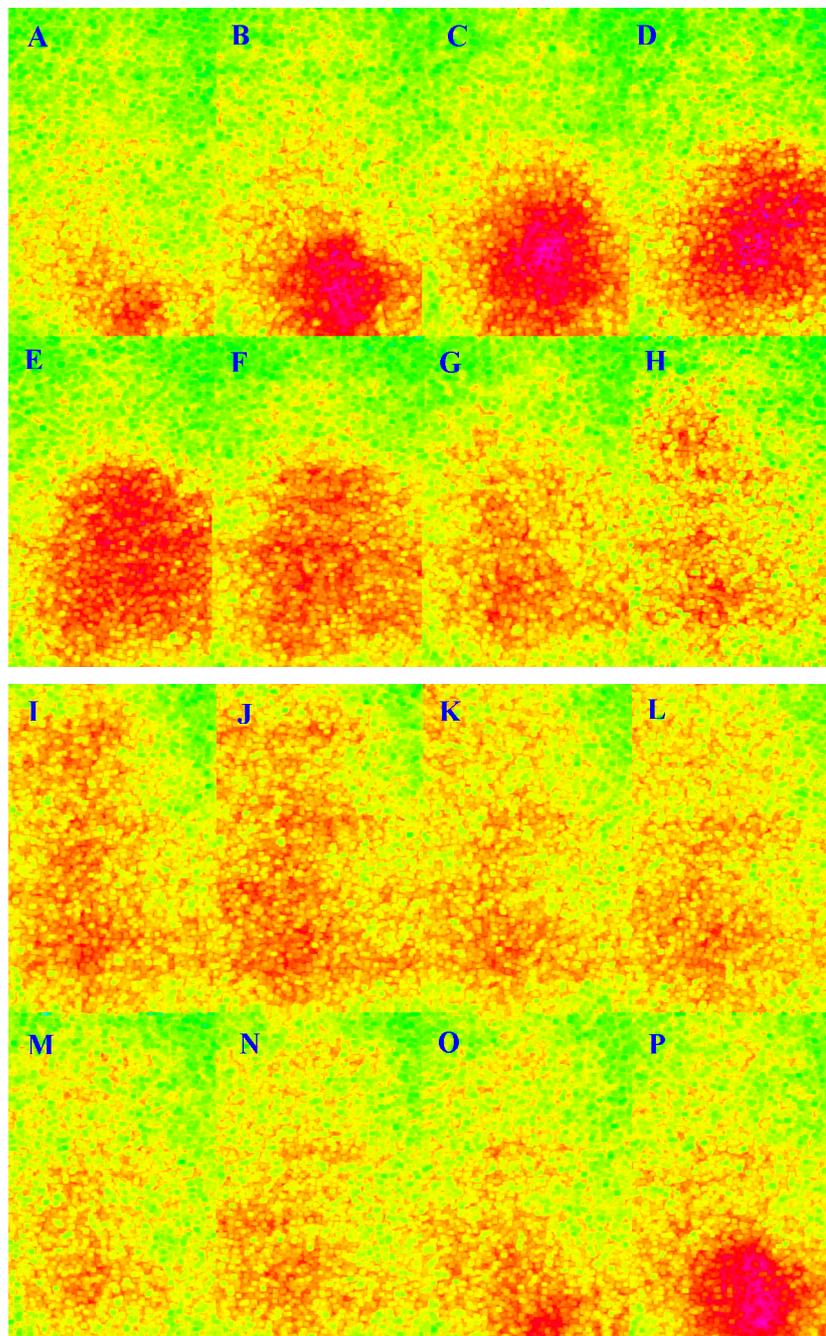


Abbildung 19 Lokale Kalziumoszillation im Agarose-Gel.
(Geringe Bewegung des Erregungszentrums zum oberen Bildrand hin. Die Zeit zwischen den einzelnen Teilbildern beträgt 1 Sekunde. Eine gesamte Oszillation (Bild A-O oder B-P) dauert 14 Sekunden. Insgesamt wurden in diesem Präparat 9 Oszillationen beobachtet mit einer Dauer von $15 \pm 3,1$ Sekunden. Proteinkonzentration von 1 mg/ml und Fluo-4 Konzentration von 10 μ M.)

Die Abbildung 19 (A-P) demonstriert lokale Kalziumoszillationen und geringe Bewegungen der Wellenfront zum oberen Bildrand hin (vergleichbar einer abortiven Welle) bei der sehr niedrigen SR-Vesikelproteinkonzentration von 1 mg/ml. Die Zeit zwischen den aufeinander folgenden Bildern beträgt 1 Sekunde. Die Abbildung 19 zeigt eine vollständige Oszillation von etwa 14 s Dauer (siehe Bilder A bis O oder B bis P). Insgesamt wurden neun Oszillationen mit einer Dauer von $15 \pm 3,1$ s in dem Präparat beobachtet, das in der Abbildung 19 dargestellt ist. Im Zusammenhang mit dieser Abbildung und der sehr niedrigen Proteinkonzentration von nur 1 mg/ml sollte folgendes bedacht werden: Bei geringer SR-Vesikel Dichte wurden sichtbare Kalziumtransienten äußerst selten beobachtet. Daher ist die Frequenz des Auftretens solcher Ereignisse im Hinblick auf die Anzahl der Gel-Präparate und die ausgewählten Bereiche innerhalb eines Präparates schwierig zu quantifizieren. Die Entwicklung schwacher Kalziumoszillationen oder abortiver Wellen ist wahrscheinlich auf unvermeidbare Inhomogenitäten innerhalb des Gels zurückzuführen.

Die Intensität der Fluoreszenz in Präparaten mit niedriger SR-Vesikelproteinkonzentration war um einiges niedriger als in solchen mit relativ hohen Konzentrationen. Um schwache Intensitätsfluktuationen besser darstellen zu können, mussten Berechnungen und Filter-Operationen angewendet werden. Jedes Bild der Abbildung 19 resultierte aus der Bildberechnung $X + X - Y$ (IPLab Spectrum QC), in der X das Originalbild mit einem kaum sichtbaren Kalzium-Signal meint und Y den Hintergrund bezeichnet, z.B. eine Leeraufnahme vor der Entwicklung eines schwachen Kalzium-Signals. Bild M der Abbildung 19 wurde als Hintergrund für die dargestellte Oszillation bestimmt. Das Bild P, beispielsweise, resultierte vom entsprechenden Originalbild X_P , berechnet mit Hilfe der Operation $X_P + X_P - Y_M$, wobei $Y_M = M$. Um den Kontrast noch weiter zu verbessern, wurden Pseudofarben und die Filterfunktion „dilate“ des Programms IPLab Spectrum QC genutzt.

3.4. Lokale und globale Verteilung der SR-Vesikel in Abhängigkeit von der Vesikelproteinkonzentration

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, eine Beziehung zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen und der Verteilung von Kalziumfreisetzungseinheiten bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen aufzuzeigen.

Zu diesem Zweck wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gelen mit Proteinkonzentrationen zwischen $c = 3 \text{ mg/ml}$ und $c = 16 \text{ mg/ml}$ ausgewertet und der mittlere Abstand, d , der Vesikel zueinander bestimmt, wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben. Die höchste Proteinkonzentration im Agarose Gel war $16,32 \text{ g/l}$. Aufgrund der Ausgangskonzentration der isolierten SR-Vesikel ist dies technisch bedingt. Es sei noch einmal die Formel (1) erwähnt, die den Kern der Überlegung zur Verteilung der SR-Vesikel darstellt:

$$d \sim (1 / c)^{1/3}, \text{ so ist } d_B = d_A (c_A / c_B)^{1/3}.$$

Fügt man die experimentell ermittelten Daten über die mittleren Vesikelabstände bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in das Diagramm aus Kapitel 3.3.1. ein, so ist in der Abbildung 20 zu sehen, dass sich die Erwartungen aus der Formel (1) überraschenderweise nicht erfüllt haben.

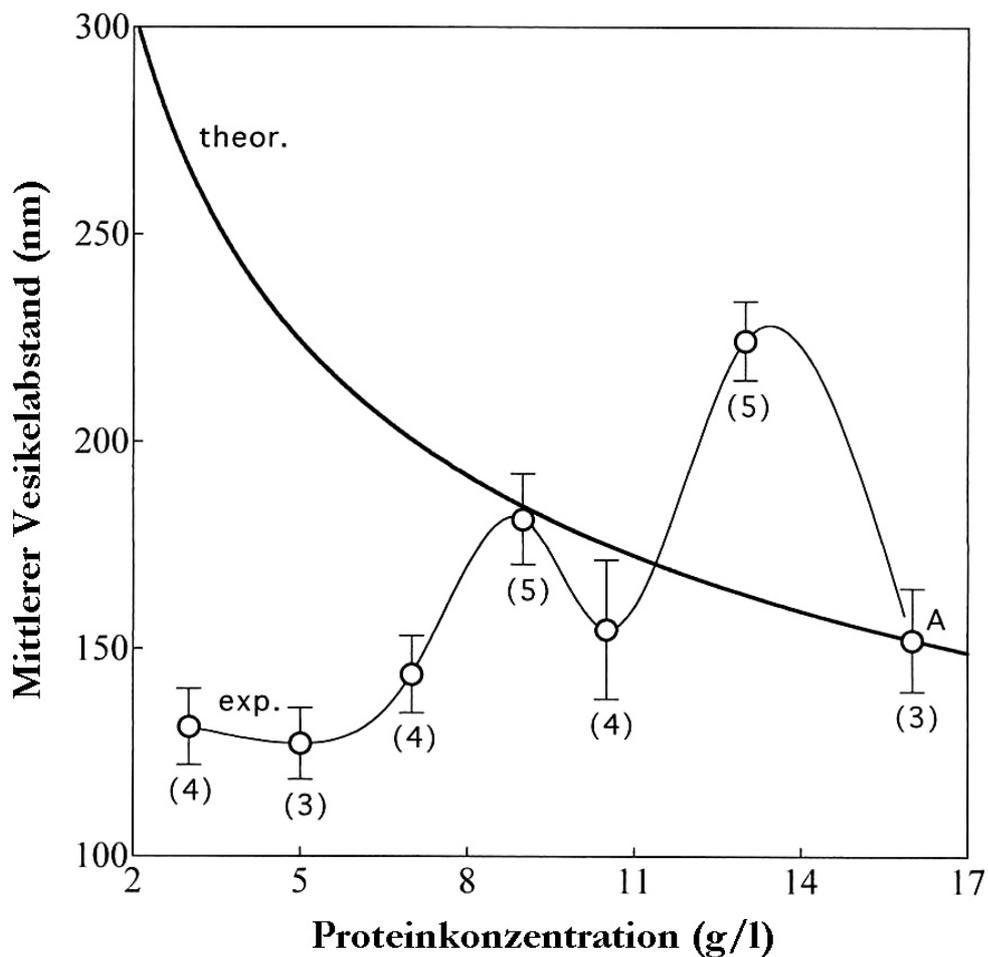


Abbildung 20 Beziehung zwischen Proteinkonzentration und mittlerem Vesikelabstand. (Die dick gezeichnete Kurve stellt die theoretischen Daten dar, die aus Berechnungen mit Hilfe der Formel (1) resultieren, die dünn gezeichnete Kurve repräsentiert die experimentellen Daten.)

Die Kreise (Mittelwert \pm Standardabweichung, Ziffer in Klammern = Anzahl der Präparate) repräsentieren die gemessenen Daten. Es kann vermutet werden, dass die SR-Vesikel nicht in der erwarteten Art und Weise verteilt sind, sondern lokal geclustert vorliegen, unabhängig von der globalen Proteinkonzentration des Gels.

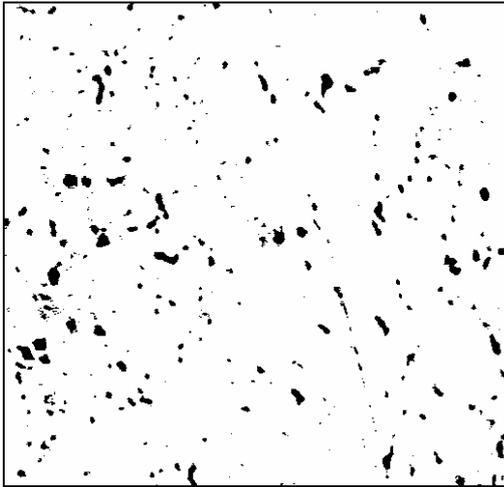
Während der Aufbereitung der in Kunststoff eingebetteten Vesikel-Gel-Präparate wurde erkannt, dass durch Anfärben der Semi-Dünnschnitte bereits ohne Vergrößerung Proteinstrukturen sichtbar wurden. Dieser übergeordnete Verbund der SR-Vesikel sollte näher betrachtet werden. Es genügt bereits eine 20-fache Objektivvergrößerung, um diese Proteinstrukturen als Vesikelcluster zu identifizieren.

Es fiel schon visuell auf, dass die Anzahl der Cluster und deren Abstände zueinander bei verschiedenen Proteinkonzentrationen im Gel variierten, vergleiche Abbildung 21.

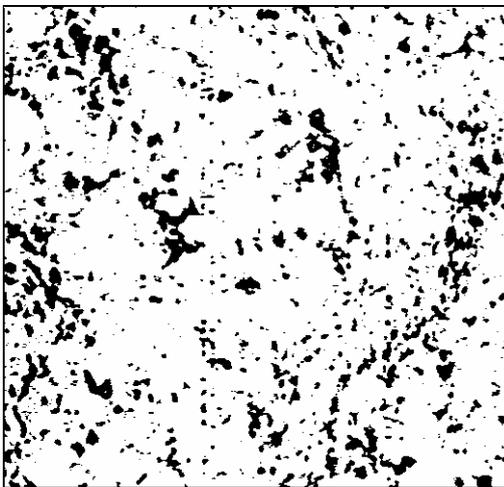
Um dies zu quantifizieren, wurde der gleiche Ansatz verfolgt wie bei der Bestimmung des mittleren Vesikelabstandes anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Wie unter Punkt 2.5.2. im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurden Messpunkte in die Mitte eines jeden Clusters gesetzt und deren Abstände zueinander ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 22 dargestellt.

Die Kreise (mit Fehlerbalken) repräsentieren die gemessenen Daten und wurden über eine lineare Regression angepasst. Aufgrund der hohen Dichte bei Proteinkonzentrationen oberhalb von 9 mg/ml ist es schwierig oder nahezu unmöglich, die SR-Vesikelcluster voneinander zu unterscheiden. Für den Fall der Proteinkonzentration von 16,32 g/l, für den man annimmt, dass praktisch alle Cluster fusioniert sind, wurde der Wert für den Clusterabstand dem mittleren Vesikelabstand gleichgesetzt, wie er über die elektronenmikroskopischen Bilder ermittelt werden konnte (siehe Abb. 22, rechter Punkt A, der dem in Abb. 20 entspricht).

Während die mittlere Distanz zwischen benachbarten Clustern deutlich abnimmt, zeigte sich, dass innerhalb der entsprechenden Breite der Proteinkonzentration die Größe der Cluster leicht zunahm, von 18 μm^2 auf etwa 25 μm^2 (siehe Einsatz in der Abb. 21).



A) 3mg/ml



B) 7mg/ml



C) 10,5mg/ml

Abbildung 21 Cluster von SR-Vesikeln im Agarose-Gel bei 20-facher Objektivvergrößerung. (Zunehmende Proteinkonzentration in den Bildern von oben nach unten (A-C).)

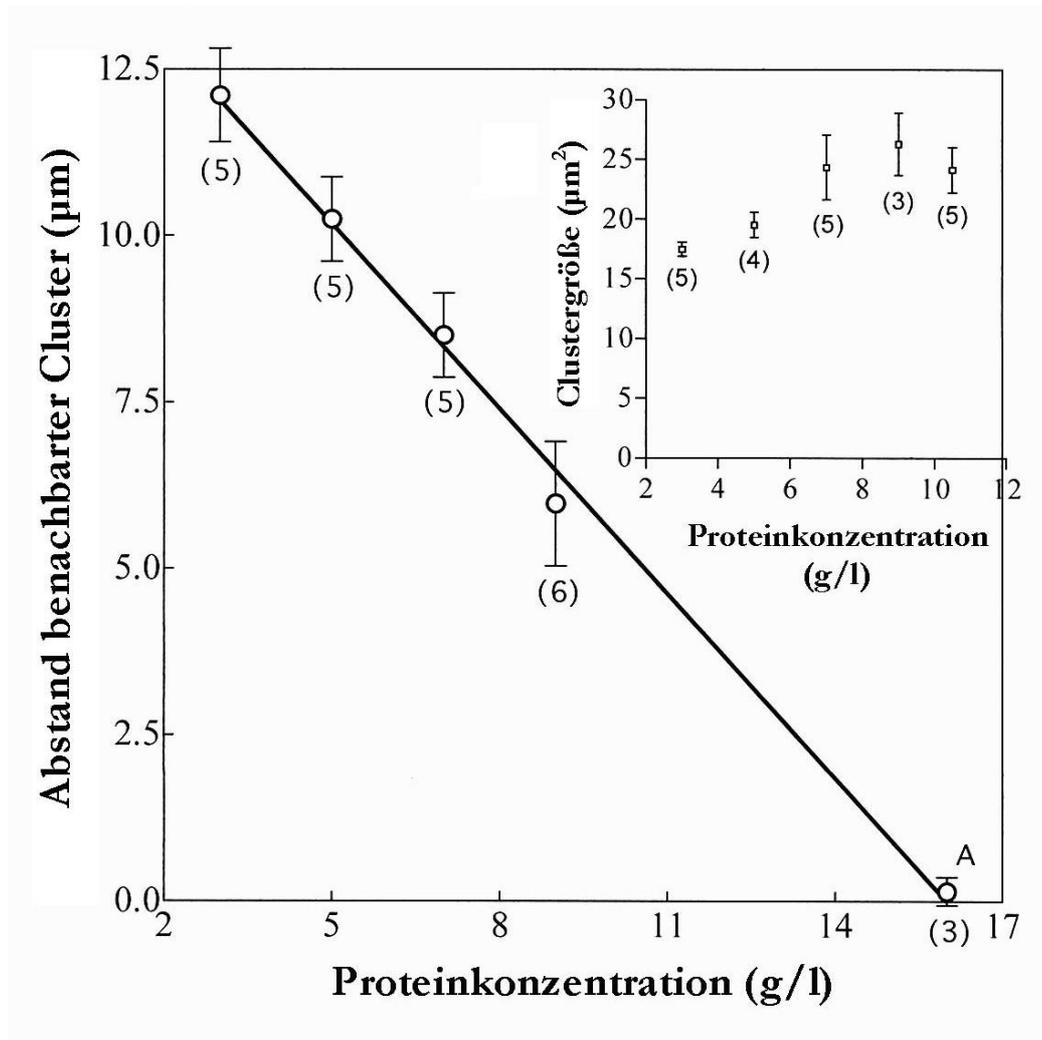


Abbildung 22 Graphische Darstellung des mittleren Abstandes zwischen benachbarten SR-Vesikelclustern in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. (Das Bild im Bild zeigt die Größe der SR-Vesikelcluster in μm^2 bei unterschiedlicher Proteinkonzentration.)

3.5. Einfluss des mittleren Abstandes von Kalziumfreisetzungseinheiten auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit

Bisher wurde gezeigt, dass SR-Vesikel stets die Tendenz haben, sich nach Einbringen in ein Agarose-Gel, zu Clustern zusammenzulagern. Diese Cluster sind in weiten Grenzen gleich groß und innerhalb der Cluster zeigte sich nur ein leichter Trend zu größeren Vesikelabständen bei ansteigender Proteinkonzentration. Zwischen den Clustern herrschen möglicherweise Kräfte vor, die durch Annäherung der Cluster bei steigender Konzentration zur beginnenden Auflösung des Vesikelverbundes führen. Es hat sich eine eindeutige Abhängigkeit des Abstandes benachbarter SR-Vesikelcluster von der Proteinkonzentration herausgestellt (Vergleiche Abb. 22).

Es wurden umfangreiche Messungen der Wellengeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt, um nachzuvollziehen, ob und wie der Abstand benachbarter SR-Vesikel oder -Cluster die Ausbreitungsgeschwindigkeit beeinflusst. Die Abbildung 23 A zeigt die Wellengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die Punkte stellen Mittelwerte mit Standardabweichung dar, die Zahlen in Klammern die Anzahl der jeweils untersuchten Präparate. Bei Konzentrationen unterhalb von 7 mg/ml konnte man erkennen, dass abortive Wellen in relativ eng umschriebenen Regionen (ca. 30 μm im Durchmesser) generiert wurden oder sogar nur lokale Oszillationen auftraten (siehe Abb. 19). Die entsprechenden Daten (innerhalb der Markierung in Abb. 23 A) unterscheiden sich von jenen stabiler Kalziumwellen, die sich innerhalb eines relativ großen Bereiches ausbreiten (Entfernungen von einigen hundert μm , siehe Abb. 17). Deswegen wurden Kalzium-Signale ausgeschlossen, die gelegentlich bei Konzentrationen unterhalb von 7 mg/ml dokumentiert werden konnten. Bei Proteinkonzentrationen zwischen 7 und 16,32 mg/ml wurden stabile Kalziumwellen mit Ausbreitungsgeschwindigkeiten zwischen 28 und 63 $\mu\text{m/s}$ beobachtet. Die Geschwindigkeit erreichte ein Maximum im Bereich um $c=12$ mg/ml (siehe Sternchen). Die Abnahme der Wellengeschwindigkeit über diese Konzentration hinaus war anfangs unerwartet, da vermutet wurde, dass kürzere Diffusionswege die Generation und Ausbreitung von Kalziumwellen verbessern sollten.

Die Abbildung 23 B zeigt die relative Ausbreitungsgeschwindigkeit (relativ zum Maximum) in Abhängigkeit vom mittleren Abstand zwischen benachbarten Vesikelclustern. Die Umrechnung von „Proteinkonzentration“ in „Mittlerer Abstand“ erfolgte unter Verwendung der in der Abbildung 22 dargestellten Regressionsgeraden. Die Daten bezüglich der Geschwindigkeit sind identisch mit denen in der Abbildung 23 A. Nur die markierten Punkte, die Oszillationen repräsentieren, wurden nicht verwendet. Im Bild 23 ist ersichtlich, dass die Kalziumsignalausbreitung in einem relativ engen Bereich optimal zu verlaufen scheint.

Dieses Optimum befindet sich bei einer Proteinkonzentration um 12 mg/ml und, bezogen auf den Abstand zwischen Kalziumfreisetzungseinheiten, bei einer mittleren Distanz von 4 μm zwischen benachbarten SR-Vesikelclustern.

Eine Veränderung des mittleren Abstandes benachbarter SR-Vesikelcluster von nur 2 μm , gleich ob zu höheren oder niedrigeren Werten, hat eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen um 40% zur Folge. Dies kann an Hand der Abbildung 23 (B) nachvollzogen werden.

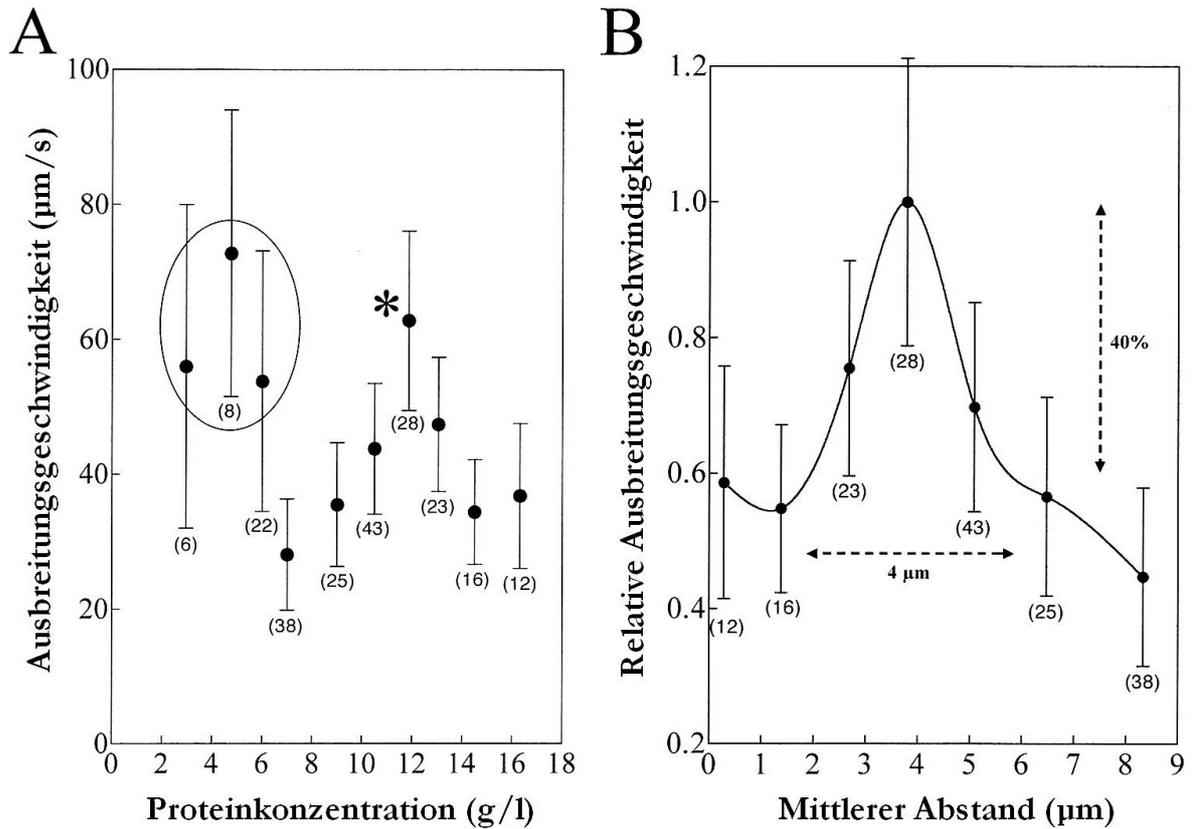


Abbildung 23 A Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen bei unterschiedlichen Vesikelprotein-konzentrationen.

(Die Daten stellen Mittelwert \pm Standardabweichung dar sowie die Anzahl der untersuchten Präparate (Werte in Klammern). Bei Proteinkonzentrationen von weniger als 7 mg/ml wurden überwiegend abortive Wellen und Oszillationen beobachtet. Die eingekreisten Werte differieren von jenen stabiler Wellen, die sich über ein weitaus größeres Gebiet ausbreiten. Eine Proteinkonzentration von 11,86 mg/ml scheint optimal zu sein in Bezug auf die maximale Ausbreitungsgeschwindigkeit (siehe Sternchen).)

Abbildung 23 B Relative Ausbreitungsgeschwindigkeit aufgetragen gegen den mittleren Abstand benachbarter CRUs nach Umrechnung anhand der Regressionsgeraden aus Abb. 22.

(Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, Anzahl der Präparate in Klammern. Das Maximum korrespondiert mit dem markierten Punkt in Bild A. Eine Abweichung des mittleren Abstandes benachbarter SR-Vesikelcluster von seinem optimalen Wert hat eine Abnahme der Wellengeschwindigkeit zu Folge.)

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass in der Tat den SR-Vesikelclustern die Funktion von Kalziumfreisetzungseinheiten zukommt, einzelne Vesikel scheinen dafür nicht auszureichen.

4. Diskussion

4.1. Kalziumeinstrom und kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (CICR)

In lebenden Zellen werden zahlreiche und vielfältige Vorgänge, die die Funktion einer Zelle unmittelbar beeinflussen, durch Kalzium kontrolliert (z.B. Berridge, 1993, 1997). Ihm kommt die Bedeutung eines intrazellulären Botenstoffes zu. Kalzium baut als ubiquitär verbreitetes Ion räumliche und zeitliche Transienten auf, sowohl in periodisch aktivierten Zellen, wie Herzmuskelzellen oder auch in nicht periodisch stimulierten Zellen, wie in den Haarzellen der Cochlea oder in befruchteten Oozyten. Das endoplasmatische / sarkoplasmatische Retikulum (ER/SR) besitzt die strukturellen und funktionellen Eigenschaften, die es einer Zellorganelle ermöglichen, die Integration und Koordination wichtiger zellulärer Prozesse zu unterstützen. Beispielsweise besitzt das im ER/SR gespeicherte Kalzium Schlüsselfunktionen bei Translation und Processing in der Proteinbiosynthese, in dem es ein Reservoir an benötigten Kationen darstellt, um die Stimulus-Antwort-Kopplung im Zytosol zu gewährleisten (Brostrom und Brostrom, 2003). Regulation der Translation bedeutet Eingriff in das Wachstum. Werden Muskelzellen betrachtet, so ist Kalzium an vielen Schritten der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (ECC) beteiligt. Das Sarkolemm und das transversale Tubulussystem (TT) einer Muskelzelle zeigen einen physiologischen Mechanismus, der erregungsgekoppelter Kalziumeinstrom (ECCE) genannt wird (Cherednichenko et al., 2004). Dieser ECCE wird sehr schnell durch eine Membran-Depolarisation während eines Aktionspotentials ausgelöst. Das über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ) nach intrazellulär einströmende Ca^{2+} führt als Triggerkalzium zur Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (RyRs), die in den Membranen des SR lokalisiert sind und Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol freisetzen. Dies ist der Mechanismus der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung (CICR). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration initialisiert die Kontraktion (z.B. Cheung, 2002). In Skelettmuskelzellen dominiert der Ryanodinrezeptor der Isoform 1 (RyR1) (McPherson und Campbell, 1993; Coronado et al., 1994; Ogawa, 1994), der die intrazelluläre Kalziumsignalausbreitung reguliert, indem er die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern kontrolliert. Die Isoform RyR3 wird in Skelettmuskelzellen ebenfalls exprimiert, allerdings in deutlich geringerer Zahl (Sutko et al., 1991; Tarroni et al., 1997; Froemming et al., 2000). Die RyRs fungieren somit als Kalziumquellen. Um den intrazellulären Kalziumtransienten wieder

herzustellen wird das freigesetzte Kalzium von ATP-getriebenen Pumpen, den SR-Ca-ATPasen (SERCAs), die ebenfalls in den Membranen des SR lokalisiert sind, zurück in die Kalziumspeicher befördert. Die SR-Ca-ATPasen können daher als Kalziumsenken bezeichnet werden.

Die Aktivierung von Signalkaskaden führt zu spatio-temporalen Kalziummustern wie Kalziumoszillationen und -wellen. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Zellfunktion sind diese Phänomene Gegenstand intensiver theoretischer und experimenteller Untersuchungen.

Voraussetzung für die Entstehung und Ausbreitung von Kalziumwellen ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines so genannten Reaktions-Diffusions-Systems. Eine Anhäufung von Kalziumfreisetzungseinheiten, die über Diffusion eines Botenstoffes (Ca^{2+}) gekoppelt sind, stellt ein erregbares Medium dar, in dem Kalziumwellen auftreten (Clapham et al., 1995). Ursprung spontaner oder stimulierter Kalziumwellen ist ein Focus lokal erhöhter zytosolischer Kalziumkonzentration. Solche räumlich und zeitlich diskreten Kalziumfreisetzungen wurden zuerst in Herzmuskelzellen von Säugern entdeckt und als Ca^{2+} -Sparks beschrieben (Cheng et al., 1993). Analoge Ereignisse treten auch in Skelettmuskelzellen von Amphibien auf (Tsugorka et al., 1995; Klein et al., 1996; Kirsch et al., 2001). Ebenso wurden in Skelettmuskelzellen von Säugern Spark-ähnliche Phänomene beschrieben (Conklin et al., 1999; Kirsch et al., 2001; Zhou et al., 2003). Die genaue Anzahl von RyRs, die an der Entwicklung eines Sparks beteiligt sind, wird noch immer debattiert (z.B. Rios und Brum, 2002; Schneider und Ward, 2002), nach durchgeführten Einzelkanalmessungen wird aber von Clustern von RyRs gesprochen (Kettlun et al., 2003). Die Ausbreitung einer Kalziumwelle vollzieht sich aufgrund autoregenerativer Kalziumfreisetzung aus dem SR über diffusionsgekoppelte Ionenkanäle, die RyRs. Hierbei bleibt die lokale Kalziumkonzentrationserhöhung nur kurz bestehen, da die SERCAs das Ca^{2+} in das SR zurückpumpen.

Es ist bekannt, dass Mitochondrien erregbare Zellorganellen sind, die fortlaufende Depolarisationen und Kalziumwellen erzeugen können (Ichas et al., 1997). Energiereiche Mitochondrien sind in der Lage, die Ausbreitung von Kalziumwellen zu beschleunigen. So wurde gezeigt, dass sich in Clustern kalziumbeladener SR-Vesikel, die bei einer freien Kalziumkonzentration von ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M (Krannich, 2001) in Agarose-Gel eingebettet sind, Kalziumwellen mit einer Geschwindigkeit von etwa $40 \mu\text{m/s}$ in Abwesenheit von Mitochondrien ausbreiten und in Anwesenheit von Mitochondrien sogar $60 \mu\text{m/s}$ erreichen (Wussling et al., 1999).

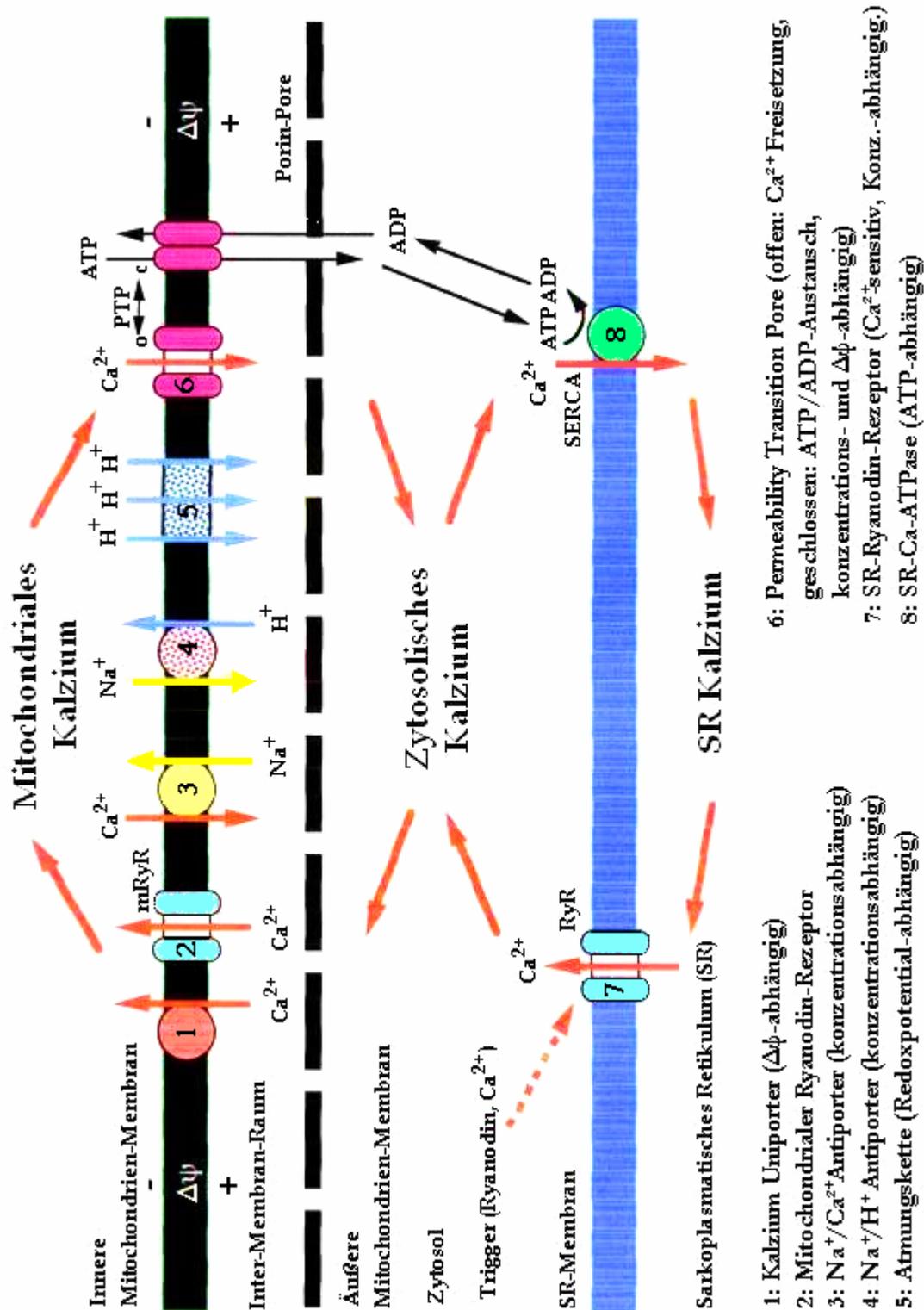


Abbildung 24 Schematisch stark vereinfachte Übersicht der intrazelluläre Kalziumquellen und -senken, deren Lokalisation in den Membranen von Mitochondrien und SR sowie die Wechselwirkungen, die das zytosolische Kalzium betreffen.

In der Abbildung 26 ist auf stark vereinfachte Weise der schematische Membranaufbau von SR-Vesikeln und von Mitochondrien wiedergegeben. In diesem Schema sind wichtige Rezeptoren und Transportproteine aufgezeigt. Mittels Pfeilen wurde deren Arbeitsweise und somit die Effekte auf die Ionenverteilung sowohl zwischen Mitochondrium und Zytosol, als auch zwischen dem SR und dem Zytosol skizziert.

Hierbei ist unter anderem der mitochondriale Ryanodinrezeptor (mRyR) zu nennen, der in der inneren Mitochondrienmembran sitzt. Anders als der RyR1 in der SR-Membran von Skelettmuskel wird der mRyR nicht durch Triggerkalzium aktiviert, sondern öffnet bei erhöhter zytosolischer Kalziumkonzentration und befördert Ca^{2+} in das Innere des Mitochondriums (Beutner et al., 2005). Als Triggerkalzium wird das während eines Aktionspotentials aus dem Extrazellulärraum einströmende Kalzium bezeichnet, das zur Öffnung von RyRs mit konsekutiver Kalziumfreisetzung führt (CICR). Dieser Mechanismus ermöglicht eine erhebliche Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration binnen kürzester Zeit. Kommt es zu einer lokalen Erhöhung der Kalziumkonzentration, wird ein Teil des Ca^{2+} in benachbarte Mitochondrien aufgenommen. Aufgrund der geringen Ca^{2+} -Affinität der mitochondrialen Transportsysteme bedarf es einer relativ hohen zytosolischen Kalziumkonzentration, um Kalzium aufnehmen zu können (nach Selivanov et al., 1998, zwischen 60 und 120 μM). Darüber hinaus besitzen Mitochondrien eine enorme Speicherkapazität für Ca^{2+} . Für die zytosolische Kalziumhomöostase ist die Permeability Transition Pore (PTP) von Bedeutung. Diese ist ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und Bestandteil eines Mechanismus, der nach Ca^{2+} -Stimulation einen Kalziumausstrom aus dem Mitochondrium ermöglicht (Ichas et al., 1997, Selivanov et al., 1998). Diese Autoren sprechen hierbei von mCICR, die von einer vorübergehenden Öffnung der PTP nach mitochondrialer Kalziumaufnahme abhängt. Eine irreversible Öffnung der PTP und damit einhergehende mitochondriale Dysfunktion scheint aufgrund verschiedener pathologischer Mechanismen eine Schlüsselfunktion bei Apoptose und Zelltod einzunehmen und könnte eine Ursache verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen sein, zum Beispiel von Chorea Huntington (Gizatullina et al., 2005).

Die mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation erfüllt zwei wichtige Aufgaben: Zum einen wird der Energiebedarf der Zelle gedeckt, weil mitochondriale Enzyme aktiviert und die Synthese von ATP erhöht wird, welches via PTP ins Zytosol gelangt. Das ausgeschleuste ATP ist notwendiger Energielieferant für den aktiven Transport von Kalzium über die SR-Ca-ATPase aus dem Zytosol in das Innere des SR. Auf diese Weise wird die

Kalziumkonzentration im Zytosol wieder abgesenkt, und die intrazellulären Kalziumspeicher werden aufgefüllt. Eine erneute Freisetzung von Ca^{2+} via RyRs wird möglich.

Die zweite Rolle mitochondrialer Kalziumanreicherung ist spezifisch für den jeweiligen Zelltyp. Durch lokale Pufferung zytosolischer Ca^{2+} erfolgt eine Modulation der spatio-temporalen Dynamik von Kalziumsignalen und somit eine feine Steuerung der jeweiligen Zellfunktion (Brini, 2003).

Ohne eine genaue Betrachtung der Synchronisation der Vorgänge an den Membranen beider Zellorganellen anstellen zu wollen, impliziert doch das Öffnungsverhalten der beschriebenen Rezeptoren einen synergistischen Effekt im Hinblick auf die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration und ist möglicherweise die Erklärung für die höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen in Anwesenheit von Mitochondrien.

4.2. Spatio-temporale Kalziummuster und deren Eigenschaften in Reaktions-Diffusions-Systemen

4.2.1. Intensitätsprofile propagierender Kalziumwellen

Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zeigten auf, dass räumlich-zeitliche Kalziumstrukturen allgemeine Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen besitzen. An Intensitätsprofilen von Kalziumwellen ist zu erkennen, dass sich ein asymmetrisches Wellenprofil ausbildet, welches durch einen steilen Anstieg der Wellenfront und einen flachen Abfall auf der Rückseite der Welle charakterisiert ist. Der steile Anstieg ist bedingt durch den schnellen Kalziumausstrom bei Aktivierung der RyRs. Da der aktive Rücktransport der Kalziumionen in das SR nicht so schnell vollzogen wird, flacht die Welle nur langsam ab, die lokale Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung wird langsam abgebaut. Dies ist ein grundlegender Unterschied zu mechanischen Wellen, die am ehesten sinusförmig verlaufen. Hier ist das Schwingungsverhalten durch die Eigenschaften des Materials bestimmt. Der steile Anstieg einer Reaktions-Diffusions-Welle kann sehr gut zur genauen Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit herangezogen werden, indem eine Markierung bei halbmaximaler Intensität gesetzt wird und zu verschiedenen Zeiten der Ort genau dieser Markierung, und damit der zurückgelegte Weg der Welle bestimmt wird.

4.2.2. Refraktärverhalten

Ein essentielles Merkmal erregbarer Medien ist die Refraktärität. Diese ist die Ursache für weitere Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen.

Gründe für das Refraktärverhalten sind in den Eigenschaften des Ryanodinrezeptors zu suchen. Der Rezeptor ermöglicht durch Konformationsänderung einen Ausstrom von Kalziumionen aus dem SR in das Zytosol. Nach erfolgter Aktivierung muss der ursprüngliche Zustand des Rezeptors wieder hergestellt werden, damit eine erneute Aktivierung stattfinden kann. Des Weiteren muss die luminale Kalziumkonzentration im SR wieder aufgebaut werden, nachdem dieser Speicher durch Erregung der RyRs teilweise entleert wurde. Die Wiederaufnahme der Kalziumionen in das SR erfolgt durch aktiven Transport über die SR-Ca-ATPase. Das Schema der Abbildung 24 lässt erkennen, dass freigesetztes Kalzium innerhalb des SR eine gewisse Wegstrecke zurücklegen muss, damit es zur nächsten Freisetzung via RyR zur Verfügung steht.

4.2.3. Auslöschung aufeinander zulaufender Kalziumwellen durch Kollision

Anders als physikalische Wellen, die bei Kollision interferieren und mit veränderten Merkmalen wie Amplitude und Frequenz weiterlaufen können, löschen sich Reaktions-Diffusions-Wellen bei Kollision gegenseitig immer aus. Dies geschieht aufgrund von Refraktärität des gerade durchlaufenen Gebietes. Das gegenseitige Auslöschen aufeinander zulaufender und kollidierender Kalziumwellen wird in Form von „schwarzen Löchern“ sichtbar (vergleiche Seite 19, Abbildung 7, bei 200 und 400ms). Die Bereiche, die zuvor hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen, befinden sich wenig später in der Phase der absoluten Refraktärität und stehen für die Ausbreitung der Kalziumwellen momentan nicht zur Verfügung. An solchen Stellen brechen die Fronten der Kalziumwellen zusammen und formen neue, negative Wellenfronten, die sich senkrecht zur Richtung der ursprünglichen Wellen ausbreiten (Förster et al., 1989; Wussling et al., 1997; Krannich, 2001).

4.2.4. Frequenzabhängigkeit der Wellengeschwindigkeit (Dispersionsrelation)

Refraktärität ist auch der Grund für die Frequenzabhängigkeit der Wellengeschwindigkeit bei Ausbildung repetitiver Wellen. Die absolute und relative Refraktärzeit sind die limitierenden Faktoren für die Amplitude und vor allen Dingen für die Geschwindigkeit, mit der sich eine Kalziumwelle ausbreiten kann. Folgt eine Welle einer vorangegangenen, während das Areal, in das sie hineinläuft, noch absolut oder relativ refraktär ist, so ist die Ausbreitung der nachfolgenden Welle gehemmt, und die Ausbreitungsgeschwindigkeit nimmt ab. Dieses Phänomen ist als Geschwindigkeitsdispersion bekannt. In der Abbildung 25 ist diese Dispersionsrelation dargestellt. Mit Zunahme des Intervalls zwischen der Entstehung aufeinander folgender Kalziumwellen, erhöht sich deren Ausbreitungsgeschwindigkeit. Es ist also die Wellengeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Frequenz.

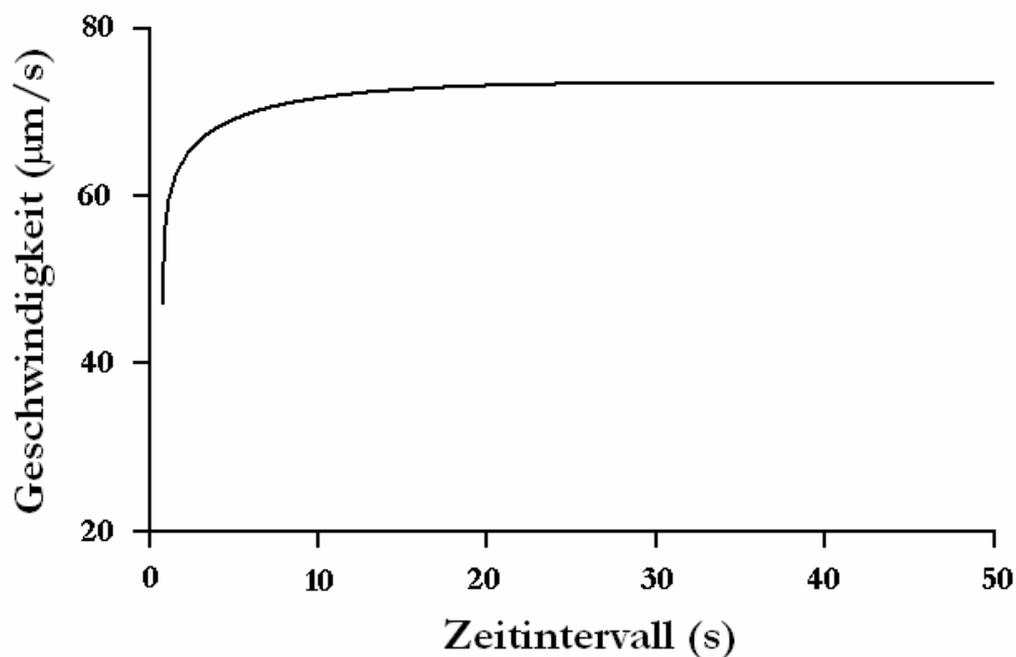


Abbildung 25 Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit repetitiver Wellen von der Zeitspanne zwischen deren Entstehung (Dispersionsrelation). (Adaptiert nach Wussling und Mair, 1999)

4.2.5. Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung

Wie eingangs erwähnt, wird eine Kalziumwelle als sphärische bzw. zirkuläre Welle aufgefasst. Wenn nun der Radius einer spontan entstandenen und sich ausbreitenden Welle r ist, so ist die Krümmung K der Wellenfront gegeben durch $K=1/r$. Im Falle einer dreidimensionalen, kugelförmigen Welle ergibt sich die Krümmung durch $K=2/r$. Die Front einer solchen Welle bleibt im Gegensatz zur Front einer Welle, die aus einer Kollision hervorgegangen ist, während der Ausbreitung immer positiv gekrümmt, da das zurückliegende Areal refraktär ist und sich die Wellenfront nicht nach hinten, also negativ, krümmen kann.

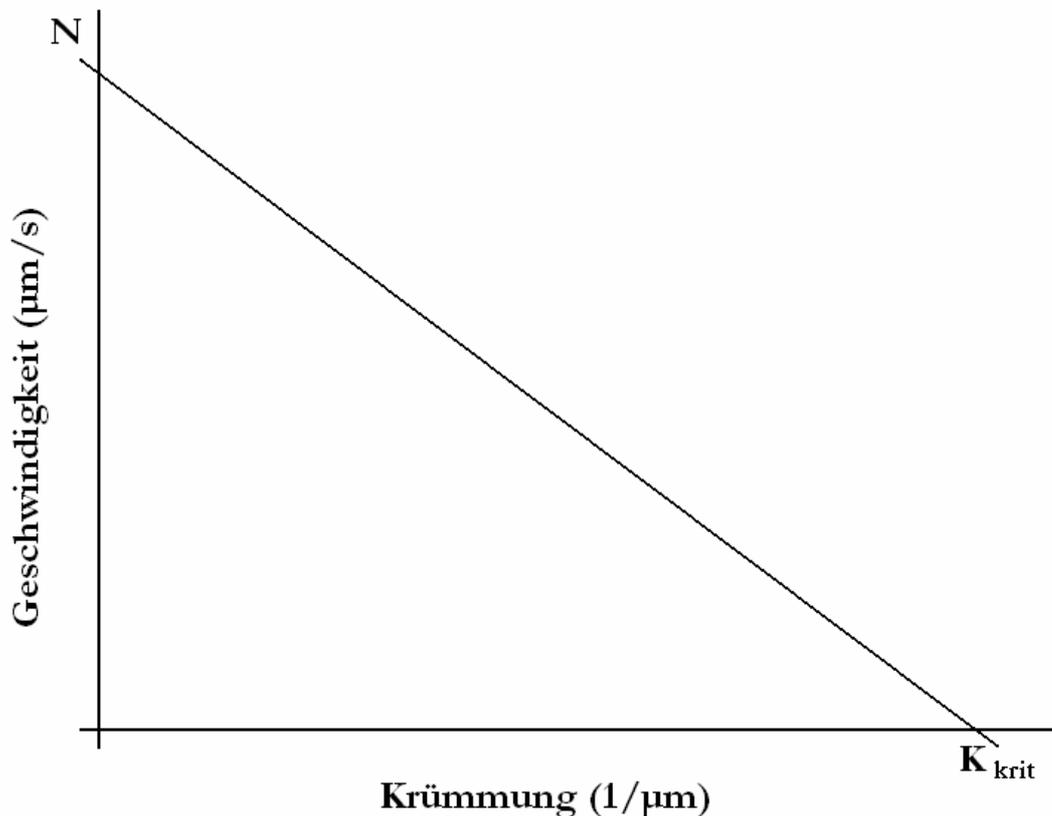


Abbildung 26 Beziehung zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit und der Krümmung der Wellenfront. (Die Beziehung ist linear. Bei einer Krümmung von $K=0$ ist die Normalgeschwindigkeit N gleich der maximalen Geschwindigkeit einer planen Welle. Bei einem kritischen Wert der Krümmung K_{krit} ist die Normalgeschwindigkeit gleich 0.)

Das Diagramm in der Abbildung 26 zeigt die lineare Beziehung zwischen der Normalgeschwindigkeit N und der Krümmung der Wellenfront K . Der Zusammenhang wird ausgedrückt durch die Gleichung

$$N = c - DK,$$

wobei c die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer planen bzw. ebenen Welle ist (z.B. $N=86 \mu\text{m/s}$ in der Ratten-Myokardzelle (Wussling und Mair, 1999)), D gibt mit $6 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ den effektiven Diffusionskoeffizienten wieder. Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass bei einer Krümmung $K=0$, also einer planen Welle, die Normalgeschwindigkeit maximal ist. Erreicht die Krümmung einen kritischen Wert K_{krit} , so ist die Normalgeschwindigkeit 0. Es findet keine Ausbreitung statt.

Wenn also $N = 0$, dann ist $1/K_{\text{krit}} = 2D/c = r_{\text{krit}}$.

Für Ratten-Myokardzellen wurde ein Wert von $r_{\text{krit}} = 1,4 \mu\text{m}$ berechnet (Wussling und Mair, 1999). Es bedarf somit eines Volumens von mehr als $12 \mu\text{m}^3$ an erhöhter zytosolischer Kalziumkonzentration, damit eine Kalziumwelle generiert werden kann.

Nach Cheng et al. (1993) nimmt ein solches Minimalereignis an Kalziumfreisetzung, als Kalziumspark bezeichnet, ein Volumen von etwa $10 \mu\text{m}^3$ ein. Dies bedeutet, dass die autoregenerative Ausbreitung eines Kalziumsignals nur dann möglich wird, wenn das kritische Volumen das Sparkvolumen überschreitet.

4.3. Verteilung der Kalziumfreisetzungseinheiten innerhalb des Agarose-Gels

Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums können am ehesten als Kugeln aufgefasst werden. Zur Bestimmung ihres mittleren Durchmessers wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen. Nach Vermessung von 225 Vesikeln unterschiedlicher Größe ergab sich ein Wert von $172 \pm 37 \text{ nm}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Da die regenerative Ausbreitung von Kalziumsignalen von der Proteinkonzentration bzw. der Dichte von SR-Vesikeln abhängt, erschien es zweckmäßig, eine Abschätzung der Anzahl von Ryanodinrezeptoren pro SR-Vesikel vorzunehmen. Aus dem oben angegebenen mittleren Durchmesser eines SR-Vesikels kann man für die

Vesikeloberfläche einen Wert errechnen, der zwischen 85000 nm^2 und 205000 nm^2 variiert. Um eine Vorstellung zu bekommen, wieviele Ryanodinrezeptoren auf einen Vesikel entfallen könnten, wurde mit in der Literatur angegebenen morphometrischen Daten von Kalziumfreisetzungseinheiten im SR von Skelettmuskelzellen von Säugetieren (Franzini-Armstrong et al., 1999) gerechnet. Dort ist die Anzahl von Ryanodinrezeptoren pro Kalziumfreisetzungseinheit (CRU), die eine hexagonale Struktur aufweist, mit 30 ± 11 (Mittelwert \pm Standardabweichung) angegeben, wobei deren Abstand untereinander etwa 29 nm beträgt (siehe Tabelle 1 in Franzini-Armstrong et al., 1999)

Daraus resultierte eine von den Ryanodinrezeptoren eingenommene Fläche, die zwischen 17000 nm^2 bis 36000 nm^2 je CRU liegt. Unter Verwendung der Daten für die Vesikeloberfläche ergibt eine einfache Rechnung, dass sich die Anzahl von Kalziumfreisetzungseinheiten pro SR-Vesikel auf 2 bis 12 belaufen sollte ($85000 \text{ nm}^2 : 36000 \text{ nm}^2$ ist etwa 2 und $205000 \text{ nm}^2 : 17000 \text{ nm}^2$ ist etwa 12). Aus methodischen Gründen können diese Schätzungen nicht mit eigenen Immunfluoreszenzdaten untermauert werden. Es erscheint aber nicht unbegründet anzunehmen, dass die in dieser Arbeit verwendeten SR-Vesikel wenigstens zwei, eher aber mehr Kalziumfreisetzungseinheiten enthalten, wobei sich nach Franzini-Armstrong et al. (1999) in jeder CRU ein Vielfaches von Ryanodinrezeptoren befindet.

Diese Überlegungen sind insofern von Bedeutung, dass die in Agarose-Gel eingebetteten SR-Vesikel nur dann zur autoregenerativen Kalziumfreisetzung beitragen können, wenn sich in ihren Membranen auch Ryanodinrezeptoren oder Cluster von Ryanodinrezeptoren befinden. Diese Voraussetzung scheint nach den vorliegenden morphometrischen Daten und Berechnungen einerseits und nach den grundsätzlich beobachtbaren Kalziumoszillationen und -wellen andererseits tatsächlich erfüllt zu sein.

4.4. Kalziumsignalausbreitung im Agarose-Gel mit eingebetteten Clustern von SR-Vesikeln

Analog zu lebenden Zellen können auch in Agarose-Gelen mit homogen eingebetteten Clustern von SR-Vesikeln stimulierte oder spontan sich entwickelnde Kalziummuster beobachtet werden. Dabei stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Verteilung der Kalziumfreisetzungseinheiten auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumsignalen hat. Großes Interesse galt dabei besonders dem Abstand zwischen benachbarten SR-

Vesikeln, respektive zwischen CRUs. Um den Zusammenhang zwischen mittlerem Vesikelabstand und der Wellenausbreitung systematisch zu untersuchen, wurde als funktioneller Parameter die Ausbreitungsgeschwindigkeit gewählt und die Vesikelproteinkonzentration im Agarose-Gel variiert.

Aus den vorangegangenen Modellsimulationen wurde eine nichtlineare Beziehung zwischen dem mittleren Vesikelabstand und der Vesikelproteinkonzentration (siehe Abbildung 16) erwartet. Es wurde angenommen, dass eine homogene, hexagonal strukturierte Verteilung der Vesikel im Gel vorliegen würde und sich der Abstand benachbarter Vesikel bei verschiedenen Proteinkonzentrationen so verhält, wie er in der Abbildung 15 dargestellt und nach der Formel (1) berechnet wurde. Allerdings konnten die Ergebnisse der durchgeführten Experimente die zuerst geäußerten Vermutungen nicht bestätigen. Vielmehr war es so, dass SR-Vesikel nicht homogen, sondern als geclusterte Verbände im Gel vorlagen. Innerhalb eines einzelnen Clusters wiederum waren die einzelnen SR-Vesikel homogen verteilt. Es wirken vermutlich Kräfte zwischen benachbarten Vesikeln, zum Beispiel elektrostatische, die die einzelnen Vesikel in dem Verband des Clusters zusammen- und auf Abstand halten. Im Lichtmikroskop betrachtet fiel auf, dass die Cluster ihrerseits im Gelpräparat annähernd homogen verteilt waren. Mit zunehmender Vesikelproteindichte nahm der mittlere Abstand zwischen lichtmikroskopisch erkennbaren SR-Vesikelclustern kontinuierlich ab, bei gleichzeitig leicht zunehmender Größe der Cluster. Diese beiden Beobachtungen sind in der Abbildung 22 in einem Diagramm vereint. Es kann vermutet werden, dass vorherrschende Kohäsionskräfte zwischen den Vesikeln die Cluster formen und diese in einem gewissen Umfang zusammenhalten. Denkbar sind ebensolche Kräfte auch zwischen benachbarten Vesikelclustern. Mit zunehmender Proteinkonzentration verringern sich die mittleren Abstände zwischen den Clustern und die Wechselwirkungen zwischen diesen könnten an Bedeutung gewinnen und dazu führen, dass sich die bei niedrigeren Proteinkonzentrationen recht stabilen Clusterverbände mit zunehmender Vesikeldichte auflösen beginnen. Diese Beobachtungen wurden bei Proteinkonzentrationen oberhalb von 10 mg/ml gemacht. Ab diesem Wert wurde es zunehmend schwierig, einzelne Cluster abzugrenzen. Wie im Lichtmikroskop erkennbar war, nahmen die Präparate ein zunehmend homogenes Verteilungsmuster an (siehe hierzu auch die Beispiele in Abb. 21). Unterhalb einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml war die Größe der Vesikelcluster annähernd konstant.

Bei relativ geringen Vesikelproteinkonzentrationen, z. B. 1 mg/ml konnten Kalziumoszillationen beobachtet werden. Möglicherweise sind diese auch als abortive Wellen anzusehen, denn es breiteten sich keine weiträumig propagierenden Wellen aus. Ein Beispiel für eine Oszillation mit einer geringen Vorwärtsbewegung im Sinne einer abortiven Welle bietet die Abbildung 19.

Kalziummuster wie lokal begrenzte Oszillationen und abortive Wellen können als Beweis für die Existenz eines Reaktions-Diffusions-Systems aufgefasst werden, da sie die Erregbarkeit des Systems widerspiegeln. So konnten bei Proteinkonzentrationen von weniger als 7 mg/ml keine stabilen Kalziumwellen beobachtet werden. Bezogen auf den mittleren Abstand benachbarter Kalziumfreisetzungseinheiten entspricht dies einer Distanz von mehr als 8,3 μm . Der Grund für das Fehlen regenerativer Ca^{2+} -Freisetzung ist in der Diffusionsstrecke zu suchen, die vermutlich zu groß ist für die Entstehung und Fortleitung von Kalziumwellen im Gel.

Es hat sich herausgestellt, dass die Kalziumwellengeschwindigkeit bei einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml ein Maximum erreicht und sowohl bei niedrigeren, als auch bei höheren Vesikelproteinkonzentrationen deutlich reduziert ist. In der Abbildung 23 ist diese Beobachtung ersichtlich. Eine Proteinkonzentration von 12 mg/ml hat sich als optimal erwiesen in Bezug auf die Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Kalziumwellen. Dies entspricht einer Distanz von 4 μm zwischen benachbarten CRUs. Aus der Abbildung 23 B geht hervor, dass eine Abweichung von nur 2 μm von diesem optimalen Wert, sowohl zu größeren Abständen als auch zu geringeren Abständen hin, mit einer Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 40% einhergeht. Es existiert demnach nur eine geringe Breite besonders guter Bedingungen für propagierende Kalziumwellen. Dieses Ergebnis ist überraschend, ging man doch davon aus, dass eine weitere Abnahme des mittleren Vesikel- bzw. Vesikelclusterabstandes und damit eine Verkürzung der Diffusionsstrecke für Ca^{2+} , gleichbedeutend ist mit einer weiteren Verbesserung der Ausbreitungsbedingungen.

Anhand der vorbeschriebenen Ergebnisse kann durchaus die Vermutung formuliert werden, dass Zellen ihre spezifischen Funktionen nur dann ohne Beeinträchtigungen ausführen können, wenn Signaltransduktionsprozesse störungsfrei ablaufen.

Räumlich-zeitliche Kalziummuster sind solche grundlegenden Übertragungswege, deren optimaler Verlauf an eine günstige Verteilung von Kalziumfreisetzungseinheiten gebunden ist. Da die Abnahme der spatialen Frequenz von CRUs die Übertragung von

Kalziumsignalen negativ beeinflusst, ist auch eine konsekutive Beeinträchtigung von Zellfunktionen vorstellbar.

Möglicherweise sind die beschriebenen Zusammenhänge als Teil des Alterungsprozesses mitursächlich für die senile oder präsenile Funktionseinschränkung von Zellen, Geweben und Organen und als eine Grundlage der Entstehung von degenerativen Erkrankungen anzusehen.

5. Zusammenfassung

Kalzium spielt eine zentrale Rolle in zellulären Signalübertragungsprozessen. Seine Verteilung innerhalb der Zelle verändert sich als Antwort auf vielfältige Signale, die sich sowohl in ihrem Ursprung (extra- oder intrazellulär) unterscheiden, als auch chemischer, mechanischer oder elektrischer Natur sein können. Spatio-temporale Kalziumsignale können in Form von Kalziumsparks, -oszillationen und -wellen beobachtet werden und beruhen auf einer autoregenerativen Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (ER/SR) über diffusionsgekoppelte Kanäle (RyR).

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen an einem *in vitro*-System aus immobilisierten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums. Voraussetzung für die Ausbildung von räumlich-zeitlichen Kalziummustern ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines so genannten Reaktions-Diffusions-Systems. Um ein solches System zu realisieren, wurden Vesikel des SR aus Skelettmuskelzellen vom Hausschwein isoliert und in Agarose-Gel resuspendiert, wobei eine möglichst homogene Verteilung angestrebt wurde. Mittels eingesetzter Fluoreszenzindikatoren konnten Kalziumionen sichtbar gemacht werden. In anschließenden Untersuchungen frischer Vesikel-Gel-Präparate konnten mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops propagierende und oszillierende Kalziumsignale beobachtet werden. Diese wurden auf Videoband aufgezeichnet und standen später für genauere räumliche und zeitliche Analysen zu Verfügung.

Der zweite Teil der Experimente hatte morphologische Untersuchungen zum Gegenstand. Hierzu wurden SR-Vesikel-Gel-Präparate verschiedener Konzentrationen sorgfältig fixiert und in Kunststoff eingebettet. Von diesen Präparaten wurden Semi-Dünn-Schnitte mit einer Schichtdicke von $0,35\mu\text{m}$ angefertigt, deren Beurteilung unter dem Lichtmikroskop durch Anfärben der Proteinstrukturen mit Toluidinblau ermöglicht wurde. Ultra-Dünn-Schnitte von nur 55nm Schichtdicke, die aus eben diesen Präparaten gewonnen wurden, konnten nach Doppelkontrastierung mit dem Elektronenmikroskop untersucht werden. Die Auswertung aller mikroskopisch gewonnenen Aufnahmen der untersuchten Präparate erfolgte mittels einer nicht-kommerziellen Software, wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben.

Die wesentliche Fragestellung dieser Arbeit zielte auf den Zusammenhang zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen und der mittleren Distanz zwischen Kalziumfreisetzungseinheiten (CRUs). Da CRUs (einzelne oder geclusterte SR-Vesikel)

nur durch Elektronenmikroskopie oder einfache Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden können, Fluoreszenzsignale hingegen ausschließlich durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zugänglich sind, musste zumindest die Beziehung zwischen der Konzentration von Vesikelprotein im Gel und der mittleren Distanz zwischen CRUs näher untersucht werden.

Zuerst sollte geklärt werden, wie groß der Konzentrationsbereich von SR-Vesikelprotein im Gel ist, in dem Kalziumwellen überhaupt beobachtet werden können.

Das artifizielle Agarose-Gelsystem ermöglichte es, die SR-Vesikelproteinkonzentration bis zu einer Obergrenze von 16,32 mg/ml zu variieren. Höhere Werte konnten nicht erreicht werden, da dies durch die Ausgangskonzentration der präparierten Vesikel limitiert war. Stabile, reproduzierbare Kalziumwellen traten in einem Bereich von 7 mg/ml bis 16,32 mg/ml auf. Bei Konzentrationen unterhalb von 7 mg/ml konnten überwiegend Ereignisse beobachtet werden, die sich als abortive Wellen charakterisieren lassen, und es traten Oszillationen auf.

Die beobachteten Kalziumwellen im Agarose-Gelsystem weisen gleichermaßen wie Kalziumwellen in intakten Zellen die typischen Merkmale von Reaktions-Diffusions-Wellen auf. Das Intensitätsprofil solcher Wellen zeigt einen steilen Anstieg der Front und einen flachen Abfall an der Rückseite der Welle. Intensitätsprofile eignen sich hervorragend zur Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen. Eine essentielle Eigenschaft erregbarer Medien ist das Refraktärverhalten, in dem weitere Merkmale propagierender Kalziumwellen begründet sind. So löschen sich aufeinander zu laufende und kollidierende Wellen gegenseitig aus. Die Dauer der Refraktärzeit limitiert die Ausbreitungsgeschwindigkeit fortlaufender Kalziumwellen in Abhängigkeit von ihrer Entstehungsfrequenz und ist damit der Grund für die Geschwindigkeitsdispersion. Die Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung besagt, dass die Geschwindigkeit einer propagierenden Welle vom Krümmungsradius der Wellenfront abhängig ist.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der fixierten Präparate ergaben einen mittleren SR-Vesikeldurchmesser von 172 ± 37 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung). Für die Anzahl von Ryanodinrezeptoren pro CRU sind in der Literatur Werte von 30 ± 11 (Mittelwert \pm Standardabweichung) angegeben, so dass sich die Anzahl von Kalzium-freisetzungseinheiten pro SR-Vesikel nach Schätzungen auf 2 bis 12 belaufen sollte.

Es wurde eine nichtlineare Beziehung zwischen dem mittleren Vesikelabstand und der Vesikelproteinkonzentration erwartet. Diese Vermutung ließ sich nicht bestätigen. Die SR-Vesikel schienen nicht homogen, sondern geclustert vorzuliegen. Im Lichtmikroskop

betrachtet, ließen die Cluster ihrerseits allerdings eine homogene Verteilung erkennen, deren mittlerer Abstand mit zunehmender Vesikelproteindichte kontinuierlich abnahm. Bei Proteinkonzentrationen oberhalb von 10 mg/ml war es zunehmend schwieriger, einzelne Cluster abzugrenzen. Die mittleren Abstände zwischen den Clustern näherten sich denen zwischen einzelnen Vesikeln an.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit propagierender Kalziumwellen erreichte bei einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml ein Maximum und war sowohl bei niedrigeren, als auch bei höheren Vesikelproteinkonzentrationen deutlich reduziert. Diese optimale Proteinkonzentration von 12 mg/ml entspricht einer mittleren Distanz von 4 µm zwischen benachbarten CRUs. Eine Abweichung von nur 2 µm von diesem Wert, sowohl zu größeren Abständen als auch zu geringeren Abständen hin, ging mit einer Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 40% einher.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es einen optimalen Abstand zwischen benachbarten CRUs gibt, bei dem die spezifische Zellfunktion ungestört ablaufen kann und dass eine Abweichung von jenem optimalen Wert mit einer Dysfunktion der Zelle einhergehen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Berridge MJ: Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361 (1993) 315-325
2. Berridge MJ: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499 (1997) 291-306
3. Berridge MJ, Lipp P, Bootman M: Calcium signalling. *Curr Biol* 9 (1999) R157-R159
4. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS: Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 276 (2001) 21482-21488
5. Blatter LA, Kockskämper J, Sheehan KA, Zima AV, Hüser J, Lipsius SL: Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *J Physiol* 546 (2003) 19-31
6. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P: Calcium signalling-an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12 (2001) 3-10
7. Brakenhoff GJ, von der Voort HTM, van Spronsen EA, Linnemans WAM, Nanninga N: Threedimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal laser scanning microscopy. *Nature* 317 (1985) 748-749
8. Brakenhoff GJ, von der Voort HTM, van Spronsen EA, Nanninga N: Threedimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy. *J Microsc* 153/2 (1989) 151-159
9. Brini M: Ca^{2+} signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 34 (2003) 399-405
10. Brostrom MA, Brostrom CO: Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* 34 (2003) 345-363
11. Camacho P, Lechleiter JD: Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium ATPase. *Science* 260 (1993) 226-229
12. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB: Calcium sparks - elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262 (1993) 740-744
13. Cherednichenko G, Hurne AM, Fessenden JD, Lee EH, Allen PD, Beam KG, Pessah IN: Conformational activation of Ca^{2+} entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 15793-15798
14. Clapham DE: Calcium signaling. *Cell* 80 (1995) 259-268

15. Clapham DE, Sneyd J: Intracellular calcium waves. In: Means AR (Ed): *Advances in Second Messengers and Phosphoprotein Research*. Raven Press, New York, 1995, S. 1-24
16. Conklin MW, Powers P, Gregg RG, Coronado R: Ca^{2+} sparks in embryonic mouse skeletal muscle selectively deficient in dihydropyridine receptor $\alpha 1\beta$ or $\beta 1\alpha$ subunits. *Biophys J* 76 (1999) 657-669
17. Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M, Vaughan DM: Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266 (1994) C1485-C1504
18. D'Andrea P, Vittur F: Spatial and temporal Ca^{2+} signalling in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215 (1995) 129-135
19. Ehrlich BE: Functional properties of intracellular calcium-release channels. *Curr Opin Neurobiol* 5 (1995) 304-309
20. Felder E, Franzini-Armstrong C: Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 1695-1700
21. Fontanilla RA, Nuccitelli R: Characterization of the spermin-induced calcium wave in *Xenopus* eggs using confocal microscopy. *Biophys J* 75 (1998) 2079-2087
22. Förster P, Müller SC, Hess B: Critical size and curvature of wave formation in an excitable chemical medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 6831-6834
23. Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V: Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units in couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J* 77 (1999) 1528-1539
24. Froemming GR, Murray BE, Harmon S, Pette D, Ohlendieck K: Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca^{2+} -regulatory membrane proteins in fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochem Biophys Acta* 1466 (2000) 151-168
25. Gizatullina ZZ, Lindenberg KS, Harjes P, Chen Y, Kosinski CM, Landwehrmeyer BG, Ludolph AC, Striggow F, Zierz S, Gellerich FN: Low Stability of Huntington Muscle Mitochondria Against Ca^{2+} in R6/2 Mice. (2005 eingereicht)
26. Haberland A, Wilhelm M, Wobus AM, Wussling MHP: Confocal calcium signals in cardiac myocytes derived from embryonic stem (ES) cells. *Pflügers Archiv, Eur J Physiol* 439 (2000) R360
27. Haberland A, Gellerich FN, Wobus AM, Wussling MHP: Calcium signal in cardiac myocytes derived from embryonic stem cells. (2005 eingereicht, Medical News, Polen)
28. Haugland RP: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals* 1996. Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA

29. Hongo K, White E, Orchard CH: Effect of stretch on contraction and the Ca²⁺ transient in ferret ventricular muscles during hypoxia and acidosis. *Am J Physiol* 269 (1995) C690-C697
30. Hüser J, Lipsius SL, Blatter LA: Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol* 494 (1996) 641-651
31. Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP: Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89 (1997) 1145-1153
32. Ishida H, Genka C, Hirota Y, Nakazawa H, Barry WH: Formation of planar and spiral Ca²⁺ waves in isolated cardiac myocytes. *Biophys J* 77 (1999) 2114-2122
33. Ishide N, Urayama T, Inoue K, Komaru T, Takishima T: Propagation and collision characteristics of calcium waves in rat myocytes. *Am J Physiol* 259 (1990) H940-H950
34. Jaffe LF: Classes and mechanisms of calcium waves. *Cell Calcium* 14 (1993) 738-745
35. Jaffe LF: On the conservation of fast calcium wave speeds. *Cell Calcium* 32 (2002) 217-229
36. Kettlun C, González A, Rios E, Fill M: Unitary Ca²⁺ current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor channels under near-physiological ionic conditions. *J Gen Physiol* 122 (2003) 407-417
37. Kirsch WG, Uttenweiler D, Fink RH: Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibers of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 537 (2001) 379-389
38. Klein MG, Cheng H, Santana LF, Jiang YH, Lederer WJ, Schneider MF: Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379 (1996) 455-458
39. Kockskämper J, Blatter LA: Subcellular Ca²⁺ alternans represents a novel mechanism for the generation of arrhythmogenic Ca²⁺ waves in cat atrial myocytes. *J Physiol* 545 (2002) 65-79
40. Kockskämper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA: Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J* 81 (2001) 2590-2605
41. Krannich K: Confocal calcium signals in an in vitro system with vesicles of the sarcoplasmic reticulum. (2001) PhD thesis. Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Germany
42. Landgraf G, Krannich K, Wussling MHP: Thapsigargin and RU 360 decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes. (2001 eingereicht)
43. Lipp P, Niggli E: Microscopic spiral waves reveal positive feedback in subcellular calcium signaling. *Biophys J* 65 (1993) 2272-2276

44. Lechleiter J, Girard S, Peralta E, Clapham D: Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* 252 (1991) 123-126
45. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265-275
46. Marks AR: Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 41 (1997) H597-H605
47. Mickelson JR, Ross JA, Reed BK, Louis CF: Enhanced Ca^{2+} -induced calcium release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle. *Biochim Biophys Acta* 862 (1986) 318-328
48. Mikoshiba K: The InsP_3 receptor and intracellular Ca^{2+} signaling. *Curr Opin Neurobiol* 7 (1997) 339-345
49. McPherson PS, Campbell KP: The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J Biol Chem* 268 (1993) 13765-13768
50. Nathanson MH, Burgstahler AD, Fallon MB: Multistep mechanism of polarized Ca^{2+} wave patterns in hepatocytes. *Am J Physiol* 267 (1994) G338-G349
51. Ogawa Y: Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29 (1994) 229-274
52. Podhaisky H, Wussling MHP: The velocity of calcium waves is expected to depend non-monotonously on the density of the calcium release units. *Mol Cell Biochem* 256-257 (2004) 387-390
53. Ridgeway EB, Gilkey JC, Jaffe LF: Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 623-627
54. Rios E, Brum G: Ca^{2+} release flux underlying Ca^{2+} transients and Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Front Biosci* 7 (2002) d1195-d1211
55. Sheehan KA, Blatter LA: Regulation of junctional and nonjunctional sarcoplasmic reticulum calcium release in excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol* 546 (2003) 119-135
56. Schneider MF, Ward CW: Initiation and termination of calcium sparks in skeletal muscle. *Front Biosci* 7 (2002) d1212-d1222
57. Selivanov VA, Ichas F, Holmuhamedov EL, Jouaville LS, Evtodienko YV, Mazat JP: A Model of mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release simulating the Ca^{2+} oscillations and spikes generated by mitochondria. *Biophys Chem* 72 (1998) 111-121
58. Sell M, Boldt W, Markwardt F: Desynchronising effect of the endothelium on intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. *Cell Calcium* 32 (2002) 105-120

59. Stellwagen D, Shatz CJ, Feller MB: Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP. *Neuron* 24 (1999) 673-685
60. Subramanian S, Viatchenko-Karpinski S, Lukyanenko V, Györke S, Wiesner T: Underlying mechanisms of symmetric calcium wave propagation in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 80 (2001) 1-11
61. Sutko JL, Airey JA, Murakami K, Takeda M, Beck CF, Deerinck TJ, Ellisman MH: Foot protein isoforms are expressed at different times during embryonic chicken skeletal muscle development. *J Cell Biol* 113 (1991) 793-803
62. Tarroni P, Rossi D, Conti A, Sorrentino V: Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 19808-19813
63. Trafford AW, Lipp P, O'Neill SC, Niggli E, Eisner DA: Propagating calcium waves initiated by local caffeine application in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 489 (1995) 319-326
64. Wier WG, Blatter LA: Ca^{2+} -oscillations and Ca^{2+} -waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 12 (1991) 241-254
65. Wier WG, Cannell MB, Berlin JR, Marban E, Lederer WJ: Cellular and subcellular heterogeneity of $[Ca^{2+}]_i$ in single heart cells revealed by fura-2. *Science* 235 (1987) 325-328
66. Worth RG, Kim MK, Kindzelskii AL, Petty HR, Schreiber AD: Signal sequence within FcgRIIA controls calcium wave propagation patterns: Apparent role in phagolysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 4533-4538
67. Wussling MHP, Aurich I, Knauf O, Podhaisky H, Holzhausen HJ: Disposition of calcium release units in agarose gel for an optimal propagation of Ca^{2+} -signals. *Biophys J* 87 (2004) 4333-4342
68. Wussling MHP, Krannich K, Drygalla V, Podhaisky H: Calcium waves in agarose gel with cell organelles: implications of the velocity curvature relationship. *Biophys J* 80 (2001) 2658-2666
69. Wussling MHP, Krannich K, Landgraf G, Herrmann-Frank A, Wiedenmann D, Gellerich FN, Podhaisky H: Sarcoplasmic reticulum vesicles embedded in agarose gel exhibit propagating calcium waves. *FEBS Lett* 463 (1999) 103-109
70. Wussling MHP, Mair T: Calcium waves in rat cardiac myocytes underlie the principles of self-organization in excitable media. In: Müller SC, Parisi J, Zimmermann W (Eds.): *Lecture notes in physics. Transport and structure: their competitive roles in biophysics and chemistry.* 532, Springer, Berlin, Heidelberg, New York usw., 1999, S. 151-163
71. Wussling MHP, Salz H: Nonlinear propagation of spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 70 (1996) 1144-1153

72. Wussling MHP, Scheufler K, Schmerling S, Drygalla V: Velocity-curvature relationship of colliding spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 73 (1997) 1232-1242
73. Zhou J, Brum G, Gonzalez A, Launikonis BS, Stern MD, Rios E: Ca^{2+} sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J Gen Physiol* 122 (2003) 95-114

7. Thesen

1. Kalzium nimmt eine zentrale Stellung in der zellulären Signaltransduktion ein. Ca^{2+} -Signale treten in Form von Sparks, Oszillationen und Wellen auf.
2. Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf Untersuchungen an einem *in vitro*-System aus immobilisierten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR).
3. Ein Reaktions-Diffusions-System ist ein erregbares Medium und damit die Voraussetzung für die Ausbildung von Ca^{2+} -Signalen. Dies ist bereits gegeben, wenn SR-Vesikel isoliert und in Agarose-Gel resuspendiert werden.
4. Ca^{2+} -Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops unter Verwendung von fluoreszierenden Kalziumindikatoren beobachtet. Die Aufzeichnung auf Videoband erlaubte eine spätere Auswertung.
5. Um die Verteilung von Kalziumfreisetzungseinheiten zu kontrollieren, wurden fixierte und eingebettete SR-Vesikel-Gel-Präparate unter dem Lichtmikroskop (Schichtdicke $0,35\mu\text{m}$) und unter dem Elektronenmikroskop (Schichtdicke 55nm) untersucht.
6. Der Fokus der Fragestellungen war auf den Zusammenhang zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Ca^{2+} -Wellen und der SR-Vesikelproteinkonzentration im Gel gerichtet. Im Speziellen interessierte die Beziehung zwischen mittlerem Abstand benachbarter Kalziumfreisetzungseinheiten (CRU) und SR-Vesikelproteinkonzentration und somit die Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der mittleren Distanz zwischen CRUs.
7. Die SR-Vesikelproteinkonzentration wurde zwischen 1mg/ml und $16,32\text{mg/ml}$ variiert. Höhere Werte waren technisch nicht zu realisieren.
8. Propagierende Ca^{2+} -Wellen traten reproduzierbar bei Konzentrationen zwischen 7mg/ml und $16,32\text{mg/ml}$ auf. Unterhalb von 7mg/ml dominierten Ca^{2+} -Oszillationen und abortive Wellen.

9. Analog zu intakten Zellen weisen Ca^{2+} -Wellen in Agarose-Gelen die typischen Merkmale von Reaktions-Diffusions-Wellen auf:
- steiler Anstieg der Wellenfront und flacher Abfall auf der Rückseite der Welle im Intensitätsprofil
 - temporäre Refraktärität nach stattgehabter Erregung
 - gegenseitiges Auslöschen kollidierender Wellen
 - Geschwindigkeitsdispersion, d.h. Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Frequenz aufeinander folgender Wellen
 - Erfüllen der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung, wonach sich ebene Wellen ($K=0$) mit maximaler Geschwindigkeit ausbreiten.
10. Anhand elektronenmikroskopischer Messungen des mittleren Vesikeldurchmessers ($172 \pm 23\text{nm}$) und unter Verwendung von Literaturangaben über die Anzahl von Ryanodinrezeptoren (RyR) pro CRU (30 ± 11) wurde eine Dichte von 2-12 CRUs pro SR-Vesikel geschätzt.
11. SR-Vesikel waren nicht homogen im Gel verteilt, sondern lagen in Clustern vor. Die Cluster selbst waren sehr regelmäßig angeordnet und ihr mittlerer Abstand nahm mit ansteigender Vesikelproteinkonzentration kontinuierlich ab.
12. Im untersuchten Agarose-Gelsystem mit eingebetteten SR-Vesikeln war die Geschwindigkeit propagierender Kalziumwellen bei einer Vesikelproteinkonzentration von 12mg/ml im Gel maximal, was einer mittleren Distanz von $4\mu\text{m}$ zwischen benachbarten CRUs entspricht.
13. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen die Vermutungen nahe, dass
- a) ein optimaler Abstand zwischen CRUs für eine normale Zellfunktion relevant ist, und
 - b) eine Abweichung von diesem optimalen Wert zu einer Dysfunktion der Zelle führen kann.

Lebenslauf

31.07.1978 geboren in Halle / Saale

Schulausbildung

1985 – 1991 Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt
1991 – 1997 Gymnasium „LATINA August Hermann Francke“ Halle
09.07.1997 Abitur
1997 – 1998 13 Mon. Zivildienst im stationären Pflegedienst

Studium

ab 01.10.1998 Studium der Humanmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03.1999 – 03.2003 Tätigkeit als stud. Aushilfe im stationären Pflegedienst (ITS,
Allgemein- u. Visceralchirurgie)
27.03.2001 Physikum
21.03.2002 1. Staatsexamen
01.2004 – 06.2005 Tätigkeit als stud. Aushilfe im stationären Pflegedienst
(Univ.-Klinik für Strahlentherapie)
29.03.2004 2. Staatsexamen
04.2004 – 04.2005 Praktisches Jahr am Städt. KH Martha-Maria Halle-Dölau
(Chirurgie, Innere Medizin, Neurologie)
08.06.2005 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 01.01.2006 Assistenzarzt Innere Medizin und Rheumatologie
in der Klinik Adelheid, Unterägeri, ZG, Schweiz

Oliver Knauf

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Oliver Knauf

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Oliver Knauf

Publikation von Ergebnissen dieser Dissertation

Wussling MHP, Aurich I, Knauf O, Podhaisky H, Holzhausen HJ: Disposition of calcium release units in agarose gel for an optimal propagation of Ca²⁺-signals. Biophys J 87 (2004) 4333-4342

Danksagung

Für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Gerrit Isenberg, Direktor des Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Manfred H. P. Wussling für die Überlassung des Themas und die engagierte Anleitung und Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen.

Für die geleistete technische Assistenz bei den Versuchsdurchführungen bedanke ich mich bei Frau Kerstin Hendrich.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen möchte ich mich für die hilfreiche Beratung und die Ermöglichung der Arbeit mit dem Transmissionselektronenmikroskop bedanken.

Den Mitarbeiterinnen des elektronenmikroskopischen Labors des Pathologischen Institutes, Frau Claudia Fischer und Frau Gudrun Senze danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.

Herrn Dr. rer. nat. Helmut Podhaisky danke ich für die Möglichkeit der computergestützten Bildverarbeitung.

Meinen Eltern bin ich dankbar, dass sie mich ständig motivierten und so die Fertigstellung dieser Schrift unterstützt haben.

Abschließend möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie für das angenehme Arbeitsklima danken.