

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



Konfokale Kalziumsignale in einem *in vitro*-System mit Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums

Dissertation

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

vorgelegt

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

von **Kirsten Krannich**

geboren am 26.06.1967 in Greifswald

Gutachter: 1. Prof. M. Wußling
2. Prof. R. Nobiling
3. PD F. N. Gellerich

verteidigt am 05.12.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000003246

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003246>]

Für die elektromechanische Kopplung in Herz- und Skelettmuskel spielt die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) eine wichtige Rolle. Das SR ist nicht nur an der Entstehung synchronisierter Kalziumtransienten, sondern auch elementarer Ereignisse, wie Kalziumoszillationen, Kalziumsparks und Kalziumwellen beteiligt.

In einem von uns entwickelten artifiziellen System von immobilisierten SR-Vesikeln in Agarose-Gel wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, daß die Kalziumsignalausbreitung in Form von Wellen unmittelbar an das Vorhandensein des SR gebunden ist. Spontane oder stimulierte räumlich-zeitliche Kalziumstrukturen konnten in Präparaten mit inhomogener als auch homogener Verteilung von Zellorganellen beobachtet werden. In beiden Fällen unterliegen die elementaren Ereignisse der Kalziumfreisetzung den Prinzipien der Selbstorganisation in erregbaren Medien.

Kalziumoszillationen und Kalziumwellen traten nur innerhalb eines Bereiches von 7,23 bis 16,52 mg Protein/ml Agarose-Gel auf. Die Wellengeschwindigkeit zeigte eine biphasische Abhängigkeit vom totalen Kalziumgehalt im Gel in einem Bereich von 0,20 bis 0,35 mM mit einem Maximum bei 0,27 mM ($[Ca^{2+}]_{\text{frei}} \sim 30 \text{ nM}$). Die Kalziumsignalausbreitung innerhalb des optimierten Reaktions-Diffusions-Systems kann durch Messung der Wellengeschwindigkeiten, der relativen Fluoreszenzintensitätswerte und Bestimmung der scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung (Eikonalgleichung) charakterisiert werden.

Kalziumsignale breiten sich im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit einer Geschwindigkeit von etwa 40 $\mu\text{m/s}$ aus (ebene Wellen). Nach Applikation von Thapsigargin (10 nM), einem Hemmstoff der SR-Kalzium-ATPase, trat eine Senkung der Wellengeschwindigkeit ein. Durch Hinzufügen von Mitochondrien wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit in Clustern von Zellorganellen erhöht. Antimycin A (60 μM), ein Hemmstoff der Atmungskette, machte diesen Effekt vollständig rückgängig. Der scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient im homogenen System betrug 215 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ in Abwesenheit und 150 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ in Gegenwart von Mitochondrien.

Das *in vitro*-System eröffnet neue Möglichkeiten der Untersuchung des Einflusses morphometrischer Parameter, von Mitochondrien und pharmakologischer Substanzen auf die Entstehung elementarer Signale der Kalziumfreisetzung aus den Membranen des SR.

**Krannich, Kirsten : Konfokale Kalziumsignale in einem *in vitro*-System mit Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2001**

Inhaltsverzeichnis

Titelseite

Referat der Arbeit und bibliographische Beschreibung

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1.	Einleitung und Zielstellung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Fluoreszenzmessung	5
2.1.1.	Fluoreszenzfarbstoffe	5
2.1.2.	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	5
2.2.	Präparation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums	8
2.3.	Präparation von Mitochondrien	8
2.4.	Herstellung eines Agarose-Gels mit Zellorganellen-Clustern	9
2.4.1.	Vorbereitung des Agarose-Gels	9
2.4.2.	Kalziumbeladung der SR-Vesikel	9
2.4.3.	Transfer kalziumbeladener SR-Vesikel in das Agarose-Gel	10
2.4.4.	Transfer kalziumbeladener SR-Vesikeln und Mitochondrien in das Agarose-Gel	10
2.5.	Herstellung eines Agarose-Gels mit homogen eingebetteten Zellorganellen	11
2.5.1.	Vorbereitung des Agarose-Gels	11
2.5.2.	Transfer von SR-Vesikeln in das Agarose-Gel	11
2.5.3.	Transfer von SR-Vesikeln und Mitochondrien in das Agarose-Gel	13
2.6.	Computergestützte Bildverarbeitung	13
2.6.1.	Messung der Wellengeschwindigkeit	13
2.6.2.	Messung der relativen Fluoreszenzintensität	15
2.6.3.	Ratiometrische Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der freien Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel	15
2.6.4.	Messung der Wellenfrontkrümmung	17
2.7.	Messung der SR-Vesikelgröße	17

3.	Ergebnisse	19
3.1.	Charakterisierung des Agarose-Gels mit eingebetteten Zellorganellen als Reaktions-Diffusions-System	19
3.2.	Kalziumwellen in Zellorganellen-Clustern	24
3.2.1.	Kalziumwellen in SR-Vesikel-Clustern	24
3.2.2.	Einfluß von Thapsigargin auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen	25
3.2.3.	Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen	27
3.3.	Kalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten Zellorganellen	31
3.3.1.	Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration	31
3.3.2.	Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration	34
3.3.3.	Einfluß von Thapsigargin auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen	35
3.3.4.	Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen	36
3.3.5.	Bestimmung und Vergleich der scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit und ohne Mitochondrien	37
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	57
	Thesen	62
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	
	Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit	
	Danksagung	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ΔF	relative Fluoreszenzintensität
ATP	Adenosintriphosphat
$[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$	freie Kalziumionenkonzentration
$[Ca]_{\text{tot.}}$	totale Kalziumkonzentration
c	Geschwindigkeit ebener Wellen
D	scheinbarer Diffusionskoeffizient
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Fluoreszenzintensität
FCCP	p-Trifluoromethoxy-phenylhydrazon
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IP ₃	1,4,5-Inositoltriphosphat
K	Krümmung
K _d	Dissoziationskonstante
N	Geschwindigkeit gekrümmter Wellen
n	Anzahl der Meßwerte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit statistischer Tests
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
pCa	negativer dekadischer Logarithmus der $[Ca^{2+}]$
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $[H^+]$
R	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Fluo-4 und Fura-rot
r ²	Bestimmtheitsmaß
ROI	Region of interest (näher betrachteter Bildausschnitt)
RyR	Ryanodin-sensitiver Rezeptor
SD	Standardabweichung
SERCA	SR-Kalzium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung und Zielstellung

Kalziumionen wirken als intrazelluläre Botenstoffe bei vielen Signalübertragungswegen in der Zelle. Sie sind bei der Muskelkontraktion, der Neurotransmitterfreisetzung, der Zellproliferation, der Gentransduktion u.a. unbedingt erforderlich, führen jedoch in anhaltend hoher Konzentration zum Zelltod (Berridge, 1997; Berridge, 1998; Misquitta et al., 1999; Niggli, 1999; Berchtold et al., 2000). Die normale Kalziumkonzentration im Zytoplasma beträgt ca. 100 nM. Das ist 20000fach geringer als die extrazelluläre Kalziumkonzentration (~2 mM). Verschiedene aktive Transportmechanismen halten diesen Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum aufrecht (Kalzium-ATPasen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Zellmembran). In größeren Zellen, sowie in Zellen im größeren Verband kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht mehr schnell genug allein über die Plasmamembran reguliert werden. Sie benötigen das endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. in Muskelzellen das sarkoplasmatische Retikulum (SR), um die Kalziumionen im Zellinneren zu kompartimentieren (Clapham, 1995). Das ER/SR erstreckt sich wie ein dreidimensionales Netzwerk durch die Zelle. In den Retikulummembranen befinden sich Kalziumpumpen (SERCAs), die unter Verbrauch von ATP Kalziumionen in das ER/SR transportieren. Dort kann Kalzium durch die Bindung an Calsequestrin in großer Menge gespeichert werden. Das Calsequestrin ist ein großes Kalziumspeicherprotein mit geringer Affinität aber hoher Kapazität für Kalziumionen. Seine Rolle besteht wahrscheinlich darin, die Kalziumionen vom Ort der Aufnahme durch die SERCAs zum Ort der Freisetzung aus dem ER/SR zu transportieren (Berchtold et al., 2000). Es ist bekannt, daß auch Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen Kalzium speichern (Gunter und Pfeiffer, 1990; Clapham, 1995; Jouaville et al., 1995; Boitier et al., 1999; Rizzuto et al., 2000). Dabei spielen sie nicht nur als fixe Puffer eine Rolle. Die Kalziumaufnahme stimuliert u.a. mitochondriale Dehydrogenasen und führt zu einer Steigerung der ATP-Synthese (Jouaville et al., 1999; Szalai et al., 2000; Rizzuto et al., 2000). Desweiteren gibt es im Zytoplasma eine Reihe von kalziumbindenden Proteinen, die zum einen zur schnellen Senkung der freien Kalziumkonzentration führen (Pufferproteine, z.B. Parvalbumin) und zum anderen nach ihrer Kalziumbindung Teil einer Signalkaskade sind (Triggerproteine, z.B. Calmodulin) (Clapham, 1995; Berchtold et al., 2000). Die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration kann durch Kalziumeintritt aus dem Extrazellulärraum, wie auch durch Entleerung der intrazellulären

Kalziumspeicher (ER/SR) erfolgen. Die Kalziumfreisetzung aus dem ER/SR erfolgt durch die Öffnung von 1,4,5-Inositoltrisphosphat-sensitiven (IP_3) Rezeptoren und Ryanodinsensitiven Rezeptoren (RyRs) (Coronado et al., 1994; Berridge, 1996). In der Herzzelle wird die Kalziumfreisetzung durch die RyRs als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung beschrieben (Fabiato, 1993; Berridge, 1996). Über die rezeptorgesteuerten Dihydropyridinrezeptoren (DHPRs) in der Plasmamembran erfolgt ein Kalziumeinstrom. Die Kalziumionen diffundieren zu gegenüberliegenden RyRs und induzieren dort die Kalziumfreisetzung aus dem SR.

In der Skelettmuskelzelle stehen DHPRs und RyRs direkt miteinander in Verbindung. Die Aktivierung dieser RyRs erfolgt unmittelbar über eine Konformationsänderung der DHPRs. Aus der Skelettmuskelzelle wurden jedoch auch RyRs isoliert, deren Offenwahrscheinlichkeit von der Kalziumkonzentration auf zytoplasmatischer Seite abhängt (Copello et al., 1997; Conklin et al., 2000). Dies spricht dafür, daß auch im Skelettmuskel die Kalziumfreisetzung aus dem SR durch Kalziumionen induziert wird.

Mitochondriales Kalzium wird über H^+/Ca^{2+} - bzw. Na^+/Ca^{2+} -Austauscher im Vergleich zur Aufnahme relativ langsam freigesetzt. Über die „permeability transition pore“, einen nicht kalziumselektiven Kanal, können Kalziumionen auch aus der mitochondrialen Matrix in das Zytoplasma gelangen (Rizzuto, 2000).

Zur Erfassung räumlich-zeitlicher Kalziumsignale (Quarks, Sparks, Oszillationen, Wellen) in lebenden Zellen eignet sich am besten die konfokale Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung spezieller, fluoreszierender Kalziumindikatoren (Cheng et al., 1993; Clapham und Sneyd, 1995; Berridge, 1997; Blatter et al., 1997; Lukyanenko et al., 1998). Kalziumwellen und -oszillationen in Zellen wie Kardiomyozyten, Astrozyten, Oozyten u.a. sind Gegenstand intensiver Untersuchungen (Wussling und Salz, 1996; Lechleiter et al., 1998; Boitier et al., 1999).

Kalziumwellen zeigen Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen, wie sie für ein erregbares Medium charakteristisch sind:

1. Ausbreitung mit uneingeschränkter Amplitude (Lechleiter et al., 1991);
2. Beiderseitige Auslöschung nach Kollision infolge Refraktärität (Ishide et al., 1990; Wussling et al., 1997);
3. Asymmetrisches Profil mit steilem Anstieg und flachem Abfall (Wussling und Mair, 1999);

4. Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Krümmung der Wellenfront und der Frequenz des Auftretens (Wussling und Mair, 1999; Lechleiter et al., 1998).

In einem erregbaren Medium finden aktive Prozessen statt, die durch Diffusion eines stimulierenden Signals gekoppelt sind (Winfree, 1990). In der Zelle ist die Kalziumfreisetzung durch die Öffnung von IP_3 -Rezeptoren bzw. RyRs der aktive Prozeß. Der Abstand zwischen den Freisetzungskanälen wird durch die Diffusion des Botenstoffes Kalzium überbrückt (Clapham, 1995). Das Volumen über welches der Botenstoff bis zu seiner Rückspeicherung diffundieren kann wird als kritische Größe für die Entstehung einer Welle gesehen (Clapham und Sneyd, 1995; Amundson und Clapham, 1993).

Nach dieser modellhaften Betrachtung müßte ein artifizielles System, welches nur die Organellen der Zelle enthält, die unmittelbar für die Reaktion, Diffusion und Rückspeicherung verantwortlich gemacht werden, ein erregbares Medium darstellen. Mit der Einbettung von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums des Skelettmuskels, die RyRs und auch SERCAs enthalten, in ein Agarose-Gel ist es uns gelungen, ein solches Medium zu schaffen. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen (bezüglich Vesikeldichte und Kalziumkonzentration) konnten Kalziumwellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, die man als Reaktions-Diffusions-Wellen beschreiben kann. Dieses System bietet Möglichkeiten der Untersuchung der Kalziumsignalausbreitung in Abhängigkeit von pharmakologischen Substanzen, zusätzlichen Zellorganellen sowie morphometrischen Parametern.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

1. Herstellung eines artifiziellen Reaktions-Diffusions-Systems aus Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums;
2. Beschreibung der typischen Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen;
3. Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit und Amplitude von Kalziumwellen im SR-Vesikel-Agarose-Gel;
4. Untersuchung des Einflusses einer partiell gehemmten Rückspeicherung des freigesetzten Kalziums durch Thapsigargin, einen Hemmstoff der SERCA, auf die Kalziumwellenausbreitung;
5. Untersuchung des Einflusses von Mitochondrien auf die Entstehung und Ausbreitung von Kalziumwellen;
6. Variation der SR-Vesikelkonzentration, um eine Abhängigkeit der Kalziumwellen von der Vesikeldichte zu untersuchen bzw. Bestimmung einer kritischen Proteinkonzentration, unterhalb derer das System nicht mehr erregbar ist;
7. Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen in Abhängigkeit von der totalen Kalziumkonzentration im Agarose-Gel-System;
8. Bestimmung der scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne und mit zusätzlich eingebetteten Mitochondrien über die Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung.

2. Material und Methoden

2.1. Fluoreszenzmessung

2.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe

Das Ziel der Fluoreszenzmessung bestand in der Erfassung räumlich-zeitlicher Kalziummuster. Es stehen hochempfindliche Kalziumindikatoren zur Verfügung, deren allgemeine Eigenschaft es ist, nach Bindung von Kalziumionen und Anregung mit relativ kurzwelligem Licht ($\lambda = 488 \text{ nm}$) zu fluoreszieren. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Fluochrome Fluo-3 ($K_d = 390 \text{ nM}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda = 526 \text{ nm}$) und Fluo-4 ($K_d = 345 \text{ nM}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda = 516 \text{ nm}$) verwendet (Haugland, 1996). Zur quantitativen Bestimmung der freien Kalziumkonzentration mittels ratiometrischer Fluoreszenzmessung wurde außerdem Fura-rot ($K_d = 140 \text{ nM}$ und Emissionsmaximum bei $\lambda = 660 \text{ nm}$) eingesetzt. Im Unterschied zu den zuvor genannten Farbstoffen erreicht Fura-rot seine maximale Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Kalziumionen. Alle in dieser Arbeit verwendeten 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 (s.u.).

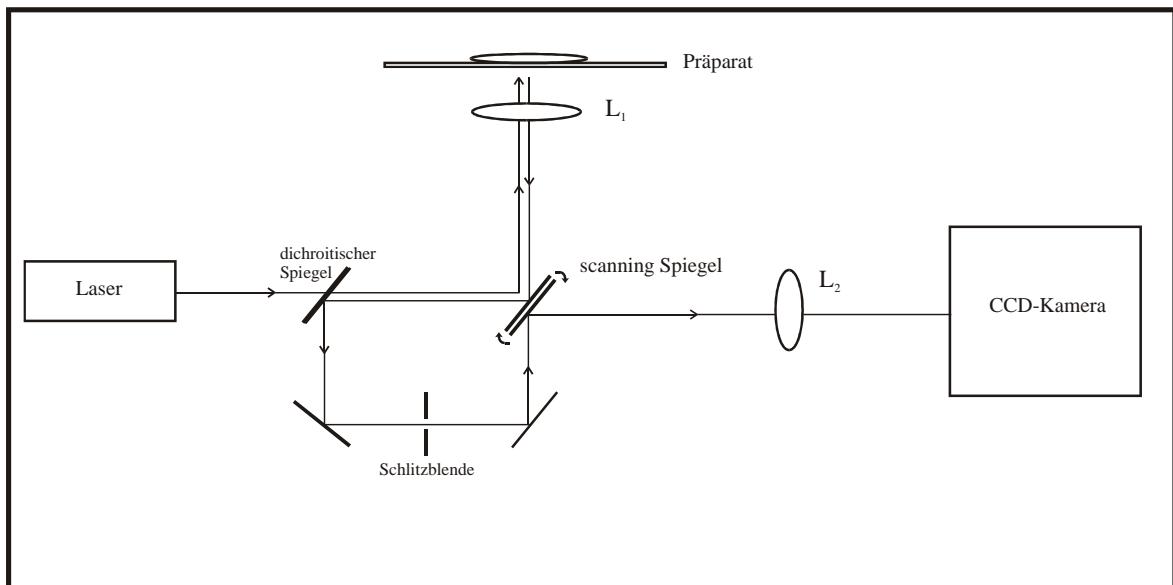


Abbildung 1 Strahlengang im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Abbildung 1 zeigt den Strahlengang im 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 („scanning“ Spiegel) und ein Linsensystem „L₁“ das Meßobjekt. Die dabei entstehenden Fluoreszenzsignale kehren auf inversem Weg über den „scanning“ Spiegel zum dichroitischen Spiegel zurück. Dieser leitet sie über ein weiteres Spiegelsystem zur Schlitzblende, deren Breite die Schichtdicke der Konfokalebene bestimmt. Die Fluoreszenzsignale werden über weitere Spiegel und letztlich über den „scanning“ Spiegel durch Linsensysteme „L₂“ zur CCD-Kamera geleitet. Die Bilder können auf dem Computer über einen Frame Grabber gespeichert werden. Die Meßfrequenz wird hierdurch jedoch auf 6 Bilder pro Sekunde begrenzt. Durch die Möglichkeit, die Meßsignale zuerst auf einem Videoband aufzunehmen und zu einem späteren Zeitpunkt als Einzelbilder in einen Rechner einzulesen, können Signale in Videosequenz (25 Hz) aufgezeichnet werden. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines Fluoreszenzmeßplatzes. Die einzelnen Teile des Meßsystems und deren Herkunft sind in der Legende von Abbildung 2 näher bezeichnet.

Mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops wurden Fluoreszenzbilder

1. in Abhängigkeit von der Zeit in der horizontalen Ebene (x-y) auf einem Videoband (25 Hz) und
2. als Schnittbild in einer senkrechten Ebene (x-z) zur Erzeugung eines Einzelbildes zur seitlichen Betrachtung des Objekts (minimaler Abstand zwischen den Registrierungen in z-Richtung 0,6 μm) aufgenommen.

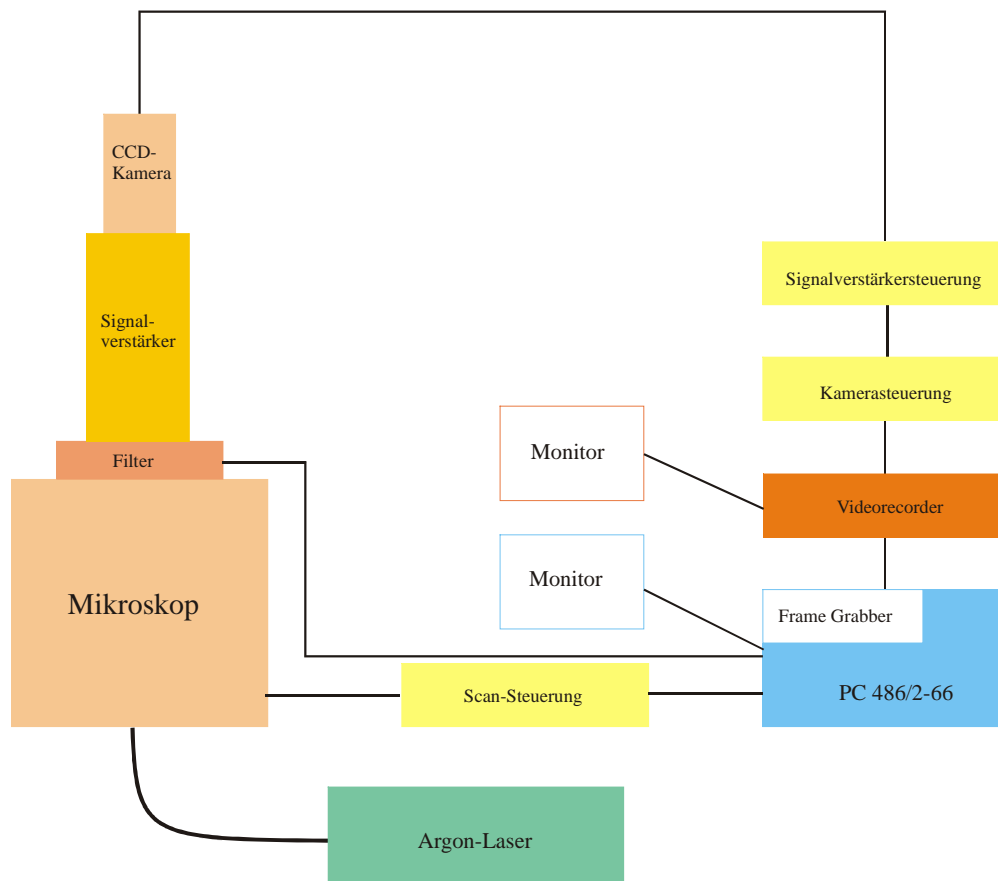


Abbildung 2 Schematischer Meßplatzaufbau

Bestandteile:

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, USA

Signalverstärker und Steuerung: GenIIsys, Dage-MTI, Inc., Michigan City, USA

CCD-Kamera (756 x 581 Pixel): CCD72E, Dage-MIT, Inc., Michigan City, USA

Kamerasteuerung: DSP200, Dage-MIT, Inc., USA

Videorecorder: AG-7330, Panasonic

PC 486/2-66 (32 MB RAM) mit Frame Grabber

Laser: luftgekühlter Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$), Modell 532, Omnicrome, Chino (Kalifornien), USA

2.2. Präparation von Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums

Die Vesikel wurden aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskeln (*Mm. Longissimi dorsi*) adulter Hausschweine im Institut für angewandte Physiologie der Universität Ulm isoliert (Mickelson et al., 1986).

Dazu wurden 25 g eingefrorenes Muskelgewebe 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 25 s 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 (300 mM) und K-Pipes (10 mM) bei einem pH-Wert von 7,0 aufgenommen, portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden auf Trockeneis verschickt. Bei uns wurden sie bei -80°C gelagert und standen für einige Wochen für unsere 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. Präparation von Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden aus Herzmuskeln adulter Wistarratten im Muskellabor der Klinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg isoliert (Gellerich et al., 1998).

Das Tier wurde durch Dekapitation getötet und das Herz entnommen. Nach Abtrennung des Bindegewebes wurde das Herz in Stücke geschnitten, Hb-frei gewaschen und in folgender Lösung A für 30 min auf Eis gerührt (mM): KCl 180; EDTA 10; Tris 10; pH 7,4 und 0,1 mg Trypsin/ml Lösung. Nach Zugabe eines Trypsininhibitors wurde der Gewebebrei in einem Teflon/Glas-Homogenisator bei 600 RPM homogenisiert. Dann wurden Zellmembranen, Kerne u.a. sedimentiert (2,5 min; 900 x g; Rotor JA-20,

Beckmann) und der Überstand durch ein Gazetuch dekantiert. Dieser wurde dann ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min; 4300 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Lösung B aufgenommen (mM): KCl 180; Tris 10; pH 7,4. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 4300 x g) wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in ca. 50 µl der Lösung B resuspendiert, so daß eine Stammlösung von ungefähr 30 mg Protein/ml resultierte. Der Proteingehalt wurde mittels BCA (Bicinchoninic Acid Kit) bestimmt (Pierce; Netherland). Nach Überprüfung des respiratorischen Kontrollindex (> 8) als Maß für die Funktion wurden die Mitochondrien lichtgeschützt auf Eis gelagert und standen 4-5 Stunden für unsere Versuchszwecke zur Verfügung.

2.4. Herstellung eines Agarose-Gels mit Zellorganellen-Clustern

2.4.1. Vorbereitung des Agarose-Gels

Agarose (Typ VII; low gelling temperature; Sigma Aldrich Co.) wurde in aqua bidest in zwei Konzentrationen (10 mg/ml bzw. 12,5 mg/ml bei zusätzlicher Mitochondrieneinbettung) 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Dann wurde das Agarose-Gel auf 37°C temperiert und stand so im flüssigen Zustand für einen 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 bzw. 19 µl bei zusätzlicher Mitochondrieneinbettung des Agarose-Gels mit 5 µl einer Stammlösung und 0,7 µl Fluo-3 (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.).

2.4.2. Kalziumbeladung der SR-Vesikel

Vor dem Einbringen der SR-Vesikel in das vorbereitete Agarose-Gel erfolgte ihre Beladung mit Kalzium über 10 min bei Raumtemperatur in einer Lösung folgender Zusammensetzung (mM): KCl 100; MgCl₂ 5; Na₂ATP 4; Kreatinphosphat 10; CaCl₂ 1; Pipes 20, pH 7,2 bei einer Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml. Anschließend wurden die Vesikel zentrifugiert (650 x g; 20 min) und der Überstand abpipettiert. Innerhalb der nächsten zwei Minuten wurden die beladenen Vesikel in das Agarose-Gel überführt.

2.4.3. Transfer kalziumbeladener SR-Vesikel in das Agarose-Gel

Zur Herstellung eines Reaktions-Diffusions-Systems für Kalzium wurden 5 μl der kalziumbeladenen SR-Vesikel in 26,7 μl des vorbereiteten Agarose-Gels (10 mg/ml im Ansatz) bei 37°C überführt, das sich dann wie folgt zusammensetzte (mM): KCl 100; MgCl_2 5; Na_2ATP 4; Kreatinphosphat 10; EGTA 0,04; Pipes 20; Fluo-3 11 und Agarose 0,66%. Jeweils 8 μl dieser Suspension wurden auf je einem Deckglas zu einer ca. 200 μm dicken Schicht ausgestrichen. Ein Präparat wurde gleich auf dem Mikroskopisch positioniert und konnte dann für ca. 20 min untersucht werden, während die anderen in einer feuchten Kammer abgedunkelt bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Die im Mikroskop sichtbare Clusterbildung beruhte auf einer unvollständigen Durchmischung der SR-Vesikel mit dem Agarose-Gel. Dieser Effekt wurde zunächst angestrebt, weil räumlich-zeitliche Kalziummuster nur in diesen geclusterten Regionen zu beobachten waren.

2.4.4. Transfer kalziumbeladener SR-Vesikeln und Mitochondrien in das Agarose-Gel

Das Agarose-Gel (12,5 mg/ml im Ansatz) wurde, wie oben beschrieben, vorbereitet. Zusätzlich wurden zur Aufrechterhaltung eines optimalen Energiezustandes der Mitochondrien Glutamat und Malat dazugegeben. 5 μl beladene SR-Vesikel und 2 μl frisch präparierte Mitochondrien (25 - 32 mg/ml) wurden zusammen zu 19 μl Agarose-Gel pipettiert, so daß sich dann folgende Zusammensetzung ergab (mM): KCl 100; MgCl_2 5; Na_2ATP 4; Kreatinphosphat 10; EGTA 0,04; Pipes 20; Glutamat 20; Malat 5; Fluo-3 11 und Agarose 0,66%. Es wurden, wie oben beschrieben, je 8 μl dieser Suspension auf Deckgläser ausgestrichen und untersucht bzw. in einer feuchten Kammer abgedunkelt bei Raumtemperatur bis zur Untersuchung maximal eine Stunde aufbewahrt.

2.5. Herstellung eines Agarose-Gels mit homogen eingebetteten Zellorganellen

2.5.1. Vorbereitung des Agarose-Gels

Agarose wurde, wie in 2.4.1. beschrieben, gelöst und gekocht. Nach dem Temperieren auf 37°C wurden 10 µl Agarose-Gel mit 0,7 µl Fluo-4 sowie 4 µl folgender Stammlösung gemischt (mM): KCl 618; MgCl₂ 30; Na₂ATP 24,7; Kreatinphosphat 61,8; EGTA 0,24; Pipes 123,6; pH 7,2 und CaCl₂ 0,6 bis 3,1.

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

10 µl der SR-Vesikel-Suspension (17 bis max. 40 mg Protein/ml) wurden in 14,7 µl des vorbereiteten Agarose-Gels (10 mg/ml im Ansatz) überführt und, um eine nahezu homogene Verteilung der Vesikel zu erreichen, mehrfach resuspendiert. Es ergab sich eine Zusammensetzung wie folgt (mM): KCl 100; MgCl₂ 5; Na₂ATP 4; Kreatinphosphat 10; EGTA 0,04; Pipes 20; CaCl₂ 0,10 bis 0,35; Fluo-4 14 und Agarose 0,4%. Die Proteinkonzentration variierte je nach Ansatz zwischen 7,23 und 16,52 mg/ml Agarose-Gel. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration im System war nicht möglich, weil die SR-Vesikel in einer Ausgangskonzentration über 40 mg/ml nicht zur Verfügung standen. Jeweils 6 µl des SR-Vesikel-Agarose-Gels wurden auf einem Deckglas zu einer ca. 100-200 µm dicken Schicht ausgestrichen (s. Abb. 3). Ein Präparat wurde sofort auf dem Mikroskopisch positioniert und stand dann 20 min für Untersuchungen bereit. Die beiden anderen Präparate wurden bis zu ihrer Untersuchung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur vor Licht geschützt aufbewahrt.

Abbildung 3 stellt ein Schnittbild (x-z-Schnitt) des Agarose-Gel-Systems mit kalziumbeladenen SR-Vesikeln dar. Die Fluoreszenzintensitätswerte entsprechen der Grundfluoreszenz in Abwesenheit von Kalziumwellen. Die Schichtdicke beträgt im mittleren Teil des Präparates 140 µm.

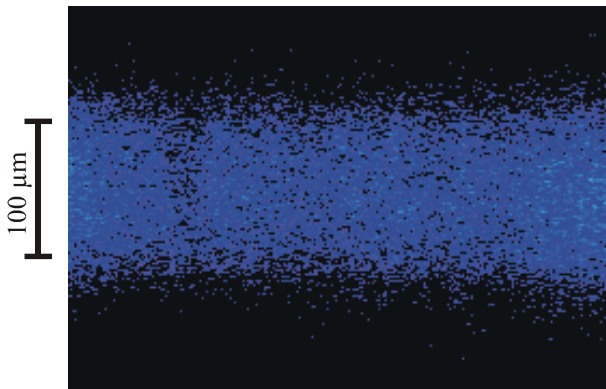


Abbildung 3 Vertikaler Schnitt (x-z-Schnitt) durch das SR-Vesikel-Agarose-Gel

Das Präparat wurde in vertikaler Richtung schichtweise (je $0,6 \mu\text{m}$) gescannt. Die Fluoreszenzsignale entsprechen der Grundfluoreszenz bei gespeichertem Kalzium (in den SR-Vesikeln). Die Schichtdicke beträgt in diesem Präparat $140 \mu\text{m}$.

SR-Vesikel waren als einzelne Partikel im Mikroskop nicht sichtbar. Um zu überprüfen, ob mehrmalige Resuspension des Agarose-Gels zu einer nahezu homogenen Verteilung von Zellorganellen führt, wurden anstatt der SR-Vesikel $1,05 \mu\text{m}$ große Fluoreszenzpartikel (microparticles GmbH Berlin) in das Gel eingebracht. Abbildung 4 zeigt die Verteilung von monodispersen Melaminharz-Partikeln (1%ig) im Agarose-Gel. Diese sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert. Das Einbringen in das Agarose-Gel erfolgte wie bei der Vesikeleinbettung durch mehrfaches Resuspendieren des Agarose-Partikel-Gemisches.

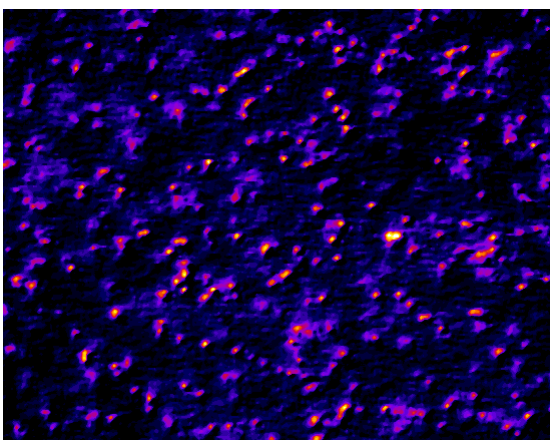


Abbildung 4 Agarose-Gel mit eingebetteten fluoreszierenden Partikeln

Dargestellt ist ein Agarose-Gel (Bildausschnitt $125 \times 100 \mu\text{m}$) mit einer nahezu homogenen Verteilung von $1,05 \mu\text{m}$ großen monodispersen fluoreszierenden Melaminharz-Partikeln (1%ig).

2.5.3. Transfer von SR-Vesikeln und Mitochondrien in das Agarose-Gel

Zur Aufrechterhaltung eines optimalen Energiezustandes der Mitochondrien wurden dem Agarose-Gel (12,5 mg/ml im Ansatz) zusätzlich Glutamat und Malat beigemischt. 10 μ l SR-Vesikel (29 bis 40 mg Protein/ml) wurden zu 12,7 μ l vorbereitetem Agarose-Gel pipettiert und mehrfach resuspendiert. Nach 2 min wurden dann 2 μ l frisch präparierte Mitochondrien (20 bis 28 mg Protein/ml) in das Gel eingebracht und ebenfalls durch mehrmalige Resuspension gleichmäßig verteilt. Für das SR-Vesikel-Agarose-Gel mit eingebetteten Mitochondrien ergab sich folgende Zusammensetzung (mM): KCl 100; MgCl₂ 5; Na₂ATP 4; Kreatinphosphat 10; EGTA 0,04; Pipes 20; Glutamat 20; Malat 5; CaCl₂ 0,3 bis 0,5; Fluo-4 14 und Agarose 0,4%. Es wurden 6 μ l dieser Suspension auf je einem Deckglas zu einer ca. 200 μ m dicken Schicht ausgestrichen. Die Untersuchung eines Präparates erfolgte unmittelbar im Anschluß an die beschriebene Prozedur, während die anderen Präparate bis zu ihrer Untersuchung in einer feuchten Kammer, vor Licht geschützt, maximal 40 min aufbewahrt wurden.

2.6. Computergestützte Bildverarbeitung

2.6.1. Messung der Wellengeschwindigkeit

Abbildung 5 zeigt eine von links nach rechts laufende Kalziumwelle mit annähernd ebener Wellenfront zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. In Abbildung 6 sind die Fluoreszenzintensitätsprofile aus den in Abbildung 5 gekennzeichneten Regionen dargestellt.

Mit Hilfe der Software „Image 1.43“ wurden die auf dem Videoband gespeicherten zeitlichen Vorgänge in Einzelbildern mit definierten zeitlichen Abständen auf dem Macintosh Quadra 800 digitalisiert. Die Auswertung der Einzelbilder erfolgte unter Anwendung des Programms „IPLab-Spectrum QC“. Zur Gewinnung eines Intensitätsprofils wurde ein ROI (region of interest) definiert aus der Kalziumwelle ausgewählt. Die Längsachse des ROI verlief in Richtung der Wellenausbreitung, d.h. orthogonal zur Wellenfront. An der Stelle des halben Intensitätsmaximums der Wellenfront (roter Pfeil in Abb. 6) wurde jeweils der x-Wert bestimmt. Das gleiche ROI

wurde aus dem Folgebild gewählt und ebenfalls ein Intensitätsprofil erstellt. Aus der Differenz beider x-Werte (Pixel) und dem bekannten Zeitabstand beider Einzelbilder konnte man die Ausbreitungsgeschwindigkeit in Pixel/s errechnen. Zur Bestimmung des Pixelabstandes wurde ein Gitter mit bekannter Gitterkonstante mit dem gleichen Objektiv wie die untersuchten Präparate aufgezeichnet, ausgemessen und der Pixelabstand in μm bestimmt. Die Geschwindigkeit konnte so in $\mu\text{m/s}$ umgerechnet werden.

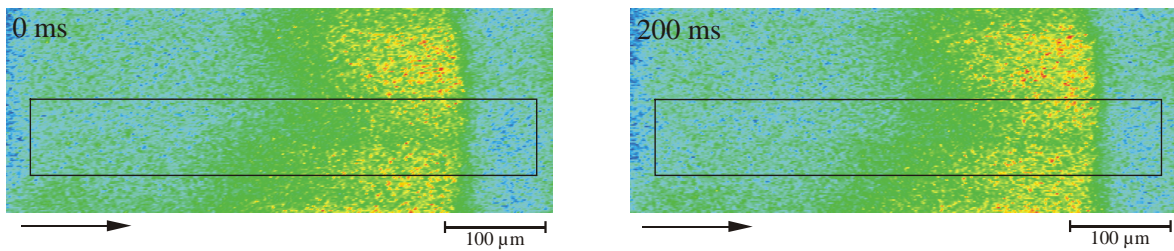


Abbildung 5

Momentaufnahmen einer Kalziumwelle im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln (11,86 mg Protein/ml Gel; 0,30 mM totale Kalziumkonzentration) im zeitlichen Abstand von 200 ms. Es wurden jeweils an gleicher Stelle ROIs (670 x 100 px) gleicher Größe markiert. Die schwarzen Pfeile zeigen die Ausbreitungsrichtung der Kalziumwelle.

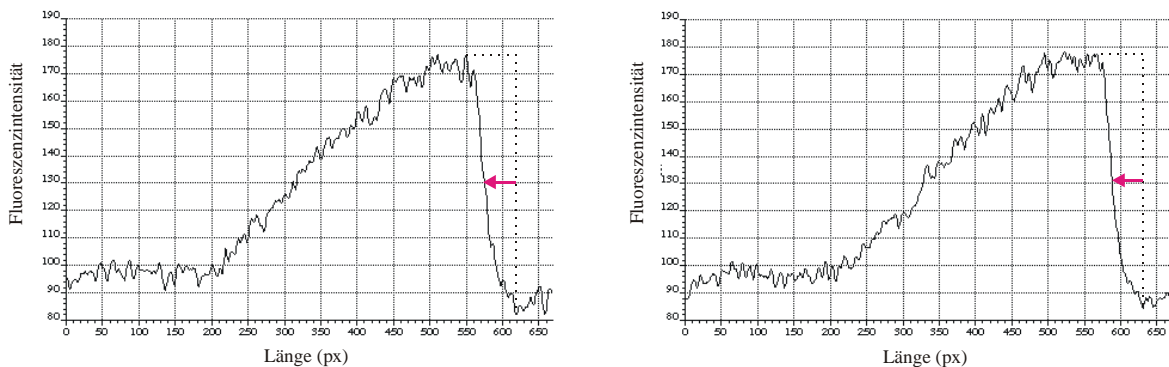


Abbildung 6

Intensitätsprofile der in Abb. 5 gekennzeichneten Regionen (ROIs). Die roten Pfeile zeigen die halben Intensitätsmaxima, wo die x-Werte (px) abgelesen werden. In diesem Beispiel ergibt sich eine Pixeldifferenz von 11 px, denen $8,16 \mu\text{m}$ entsprechen. Aus dieser Differenz und dem zeitlichen Abstand von 200 ms folgt eine Geschwindigkeit der in Abb. 5 dargestellten Kalziumwelle von $40,8 \mu\text{m/s}$.

2.6.2. Messung der relativen Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität (F) der Kalziumwelle wird in Zahlenwerten ohne Einheit angegeben und ist abhängig vom Wert der Grundfluoreszenz, so daß zur vergleichenden Betrachtung nur die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitätserhöhungen in Frage kam. Dazu wurde $(F_{\max} - F_0)/F_0$ errechnet, wobei F_{\max} für die maximalen Fluoreszenzintensitätswerte in der Welle und F_0 für den Wert der Grundfluoreszenzintensität an gleicher Stelle kurz vor der Welle stehen (Jouaville et al., 1995). F_{\max} und F_0 wurden für jede Kalziumwelle in jeweils drei Regionen von 10×10 Pixel gemessen und gemittelt (Macintosh Quadra 800; IPLab-Spectrum QC).

2.6.3. Ratiometrische Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der freien Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel

Die freie Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel im nicht erregten Zustand wurde mittels der ratiometrischen Fluoreszenzmessung mit zwei unterschiedlichen Kalziumindikatoren bestimmt (Lipp und Niggli, 1993). Für diese Messung benutzten wir Fluo-4, welches einen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender Kalziumkonzentration zeigt, und Fura-rot, dessen Fluoreszenzintensität mit steigender Kalziumkonzentration abnimmt (Haughland, 1996). Beide Indikatoren lassen sich bei derselben Wellenlänge von 488 nm anregen. Die Emissionsmaxima der beiden Farbstoffe unterscheiden sich, so daß ihre Fluoreszenzintensitäten durch das Einsetzen von Filtern (530 bzw. 630 nm) getrennt aufgezeichnet werden konnten. Das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($R = F_{\text{Fluo-4}} / F_{\text{Fura-rot}}$) ist von der freien Kalziumkonzentration abhängig. Aufgrund der höheren maximalen Fluoreszenzintensität von Fluo-4, wurde Fura-rot in 5fach höherer Konzentration in das Indikatorgemisch eingebracht. Zur Bestimmung des K_d -Wertes für dieses Indikatorgemisch wurde eine Eichkurve erstellt. Da K_d im wesentlichen vom pH, von der Ionenstärke und der Temperatur abhängt, wurden für die Gewinnung der Eichkurve Lösungen in der Zusammensetzung, CaCl_2 ausgenommen, wie in den SR-Vesikel-Agarose-Gel-Experimenten (Kap. 2.5.2., Seite 11) verwandt. Die freie Kalziumkonzentration wurde mit

einem Kalziumkalibrierungspuffer (Calcium Calibration Buffer Concentrate Kit; Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) definiert eingestellt. Die Fluoreszenzintensitäten von insgesamt 11 Proben mit einer freien Kalziumkonzentration von 0 bis 39,8 μM und jeweils 10 μM Fluo-4 und 50 μM Fura-rot wurden bei unveränderter Laserintensität und Verstärkereinstellung unter Verwendung der zwei genannten Emissionsfilter auf dem Videoband aufgezeichnet. Die quantitative Messung der Intensitäten erfolgte nach Digitalisierung der Aufnahmen auf dem Macintosh Quadra 800 (Software IPLab-Spectrum QC).

Die Approximation des Zusammenhanges zwischen dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten und der freien Kalziumkonzentration erfolgte nach Grynkiewicz et al. (1985) :

$$R = \frac{R_{\max} - R_{\min}}{1 + K_d / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}} + R_{\min} \quad (1)$$

mit R_{\max} = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe in der Lösung mit 39,8 μM freier Kalziumkonzentration und

R_{\min} = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe in der Lösung mit 0 μM freier Kalziumkonzentration.

Aus den in Abbildung 7 graphisch dargestellten Meßwerten (Mittelwert \pm SD) resultierte durch Approximation mit Hilfe der Gleichung (1) ein K_d -Wert für dieses Indikatorgemisch (Fluo-4 / Fura-rot im Verhältnis 1:5) von 318 nM.

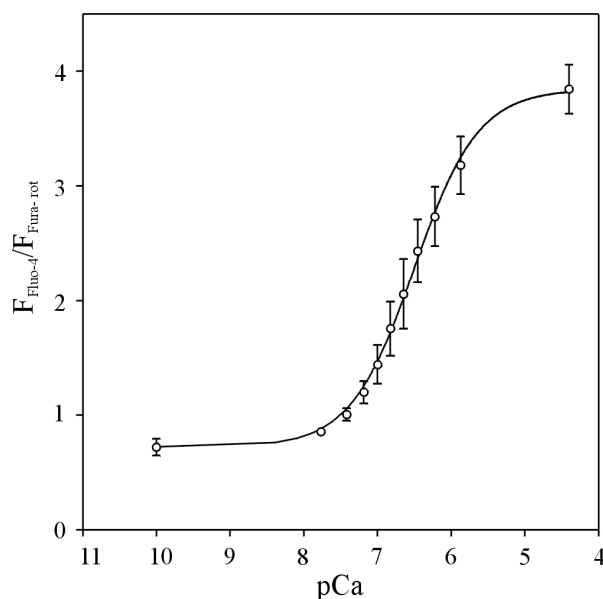


Abbildung 7 Kalibrierungskurve für das Kalziumindikatorgemisch Fluo-4/Fura-rot (im Verhältnis 1:5) am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe wurden unter Verwendung von zwei Emissionsfiltern (530 nm für Fluo-4 und 630 nm für Fura-rot) gemessen und deren Quotient gegen die freie Kalziumkonzentration aufgetragen.

Eine Approximation der Daten (Mittelwert \pm SD; n=3) erfolgte mittels Gleichung (1). Der K_d -Wert für dieses Indikatorgemisch beträgt 318 nM.

Nach Umstellung der Gleichung (1) konnte mit dem ermittelten K_d -Wert die freie Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel folgendermaßen berechnet werden:

$$[Ca^{2+}]_{frei} = K_d * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \quad (2).$$

2.6.4. Messung der Wellenfrontkrümmung

Die auf dem Videoband gespeicherten Kalziumwellen wurden, wie in 2.6.1. beschrieben, auf dem Computer in Einzelbildern digitalisiert, wobei der zeitliche Abstand zwischen zwei Bildern 200 ms betrug. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software „IPLab-Spectrum QC“. Um die Wellenfronten einheitlich zu definieren, wurden die Bilder auf die Hälfte ihres Fluoreszenzmaximums normiert. Die Wellenfronten wurden im Sinne von Isofluoreszenzlinien nachgezeichnet und als x-y-Paare (Pixel) gespeichert. Die Berechnung der Krümmungen und der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der so erfaßten Wellenfronten wurde im Institut für Mathematik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgenommen (Wussling et al., 2001).

2.7. Messung der SR-Vesikelgröße

Die SR-Vesikelgröße wurde zunächst mittels Laserdiffraktion (Low Angle Laser Light Scattering (LALLS)) gemessen (Rawle, Firmenschrift). Das Prinzip dieser Methode sei hier nur kurz erwähnt: Wenn ein Laserstrahl ein Partikel passiert, wird das Licht in einem Winkel gestreut, der der Partikelgröße umgekehrt proportional ist. Die Streustrahlen werden durch einen Detektor gesammelt und die Analyse der Diffraktionsmuster ermöglicht die Kalkulation der Größenverteilung der Partikel in der untersuchten Probe.

Die für unsere Versuche verwandten SR-Vesikel wurden in der Firma „Novosom“ mit dem Zetasizer 3000HS (Malvern Instr.) gemessen. Es wurden drei Messungen an einer isotonen SR-Vesikelsuspension durchgeführt, die eine durchschnittliche Vesikelgröße von $237,4 \pm 15,8$ nm im Durchmesser ergaben.

Weitere Messungen erfolgten an elektronenmikroskopischen Aufnahmen der im Agarose-Gel eingebetteten SR-Vesikel (SR-Vesikel-Proteinkonzentration: 16,3 mg/ml Agarose). Das SR-Vesikel-Agarose-Gel wurde unmittelbar nach der Herstellung im Pathologischen Institut der Universität Halle-Wittenberg mit 3%igem Glutaraldehyd fixiert und in einem Harz (Durcupan) eingebettet. Das Kontrastieren der Vesikelmembranen erfolgte am geschnittenen Präparat mit Uranylacetat und Bleiacetat. Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt aus einem SR-Vesikel-Agarose-Gel mit 30000facher elektronenmikroskopischer Vergrößerung.

Es wurden der Durchmesser (\varnothing) und der mittlere Abstand der Mittelpunkte (d) der SR-Vesikel auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen einzeln ausgemessen (Mittelwert \pm SD, $n = 33$): $\varnothing = 172 \pm 37$ nm; $d = 193 \pm 53$ nm. Wird eine hexagonale Anordnung kugelförmiger SR-Vesikel mit $\varnothing = d$ in einem unendlich großen Volumen angenommen, so ergibt sich ein Anteil der Partikel von $\pi/\sqrt{18}$ oder 74 %. Wenn $\varnothing/d < 1$, dann verringert sich das durch die SR-Vesikel eingenommene Volumen um den Faktor $(\varnothing/d)^3$. Anhand unserer Daten läßt sich sagen, daß das Volumen des Systems bei einer Proteinkonzentration von 16,3 mg/ml Gel zu ungefähr 50 % von SR-Vesikeln eingenommen wird.

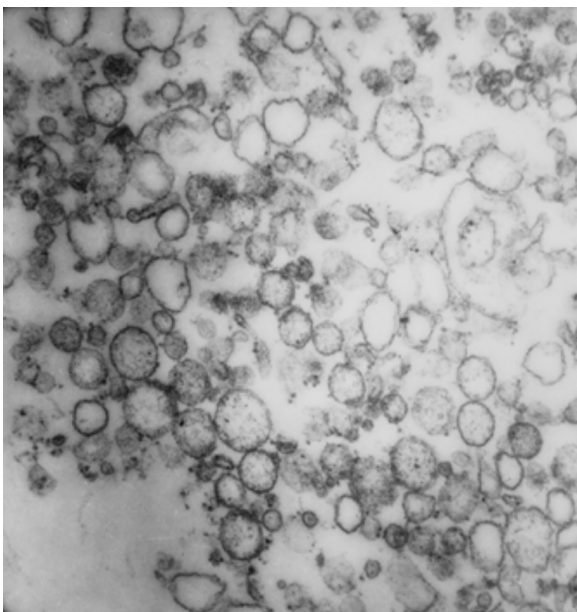


Abbildung 8 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SR-Vesikel-Agarose-Gels (30000fach)

Das SR-Vesikel-Agarose-Gel wurde mit Glutaraldehyd (3%) fixiert, entwässert und in Durcupan eingebettet. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleiacetat kontrastiert. Die Vesikelproteinkonzentration in diesem Gel betrug 16,3 mg/ml Agarose.

Die Aufnahme wurde von Prof. Dr. med. habil. H. J. Holzhausen (Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) freundlichst zur Verfügung gestellt.

1 μ m

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Agarose-Gels mit eingebetteten Zellorganellen als Reaktions-Diffusions-System

Die Kalziumdynamik in lebenden Zellen zeigt allgemeine Eigenschaften von Wellen in Reaktions-Diffusions-Systemen, wie die Asymmetrie des Wellenprofils, die Ausbreitung der Wellenfront mit ungedämpfter Amplitude, die gegenseitige Auslöschung nach Kollision infolge der Refraktärität, die Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Dauer der vorangegangenen Ruhephase (Dispersionsrelation) und der Krümmung der Wellenfront (Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung) (Zykov, 1980 a und b; Lechleiter et al., 1991; Wussling und Mair, 1999).

Abbildung 9 zeigt in 4 Einzelbildern im zeitlichen Abstand von 6 s die Ausbreitung einer spontanen Kalziumwelle im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln. Zur besseren Veranschaulichung des Phänomens „Kalziumwelle“ wurde eine dreidimensionale Darstellung gewählt.

Wie im folgenden gezeigt wird, unterliegen Kalziumwellen im Gel den Prinzipien der Selbstorganisation wie in lebenden Zellen. Die Eigenschaften von Kalziumwellen im Agarose-Gel mit immobilisierten Zellorganellen werden an Einzelbeispielen demonstriert.

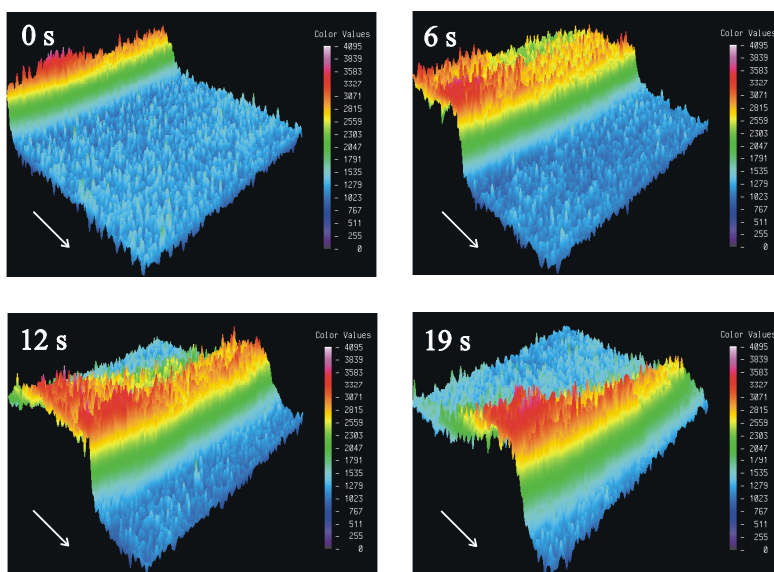


Abbildung 9

Dreidimensionale Darstellung einer spontanen Kalziumwelle im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln (Proteinkonzentration: 14,47 mg/ml Agarose-Gel; $[Ca]_{tot}$: 0,25 mM). Die Pseudofarben stehen für unterschiedliche Fluoreszenzintensitätswerte (siehe rechte Skala). Die Pfeile, deren Länge ca. 100 μ m entsprechen, zeigen die Ausbreitungsrichtung.

In Abbildung 10 sind verschiedene Phasen einer von links nach rechts laufenden Kalziumwelle (Teil A) und die dazugehörigen Fluoreszenzintensitätsprofile (Teil B) dargestellt. Die Wellenausbreitung erfolgte in einem Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln. Abbildung 10B zeigt die Asymmetrie des Fluoreszenzintensitätsprofils mit steilem Anstieg der Intensität in der Wellenfront und flachem Abfall in der Rückfront. Weiterhin ist in dieser Abbildung gut zu erkennen, daß die Amplitude der Welle während der Ausbreitung konstant bleibt. Beides ist für die Wellenausbreitung in homogenen Reaktions-Diffusions-Systemen charakteristisch.

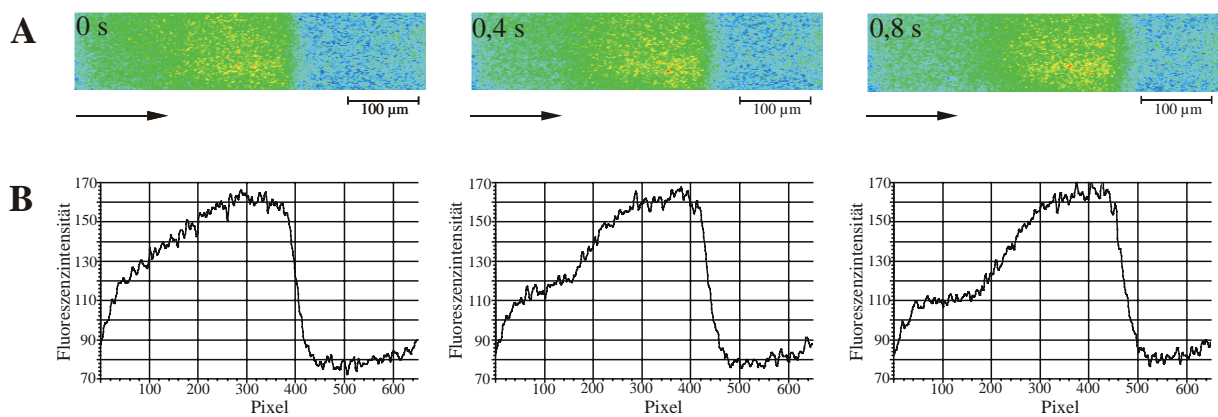


Abbildung 10 Momentaufnahmen einer Kalziumwelle mit jeweiligem Fluoreszenzintensitätsprofil

A Momentaufnahmen im Abstand von 400 ms einer sich in Pfeilrichtung ausbreitenden Kalziumwelle im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln (Proteinkonzentration 11,86 mg/ml Gel; totale Kalziumkonzentration 0,30 mM).

B Fluoreszenzintensitätsprofile der jeweiligen in A dargestellten Region. Die Wellenfront ist durch einen steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität charakterisiert, während diese in der Rückfront deutlich flacher abfällt. Die maximale Intensität der Fluoreszenz ist während der Ausbreitung konstant.

Abbildung 11 zeigt peripher umlaufende Kalziumwellen in einem Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln. In Abbildung 11A sind vier Phasen einer mit einer Geschwindigkeit von 48 µm/s laufenden Welle dargestellt. In diesem Experiment wird die Ausbreitung im Randbereich des Agarose-Gel wahrscheinlich bevorzugt, weil die Bedingungen einer Wellenausbreitung durch Wasserverdunstung vornehmlich im Randbereich besonders günstig sind (Konzentrationseffekt).

In Abbildung 11B ist eine Kollision von zwei aufeinander zulaufenden Wellen in einer Bildfolge (0,5 Hz) dargestellt. Durch eine Normierung der Fluoreszenzwerte auf die Hälfte ihres Maximums sind die Wellenfronten deutlicher zu erkennen. Bei der Kollision beider Wellenfronten kommt es zu keiner Verstärkung der Fluoreszenzintensitäten (obere Reihe der Abb. 11B). Die Wellenfronten treffen auf eine bereits erregte Region. Da sich diese jeweils noch im refraktären Zustand befinden, kommt es nicht zu einer weiteren Wellenausbreitung. Die kollidierenden Kalziumwellen löschen sich gegenseitig aus (untere Reihe der Abb. 11B).

In Abbildung 16 (Seite 27) ist ein weiteres Beispiel für das Auftreten von refraktären Arealen gezeigt, auf das später eingegangen wird.

Auslöschung nach Kollision ist ein generelles Merkmal von Reaktions-Diffusions-Wellen.

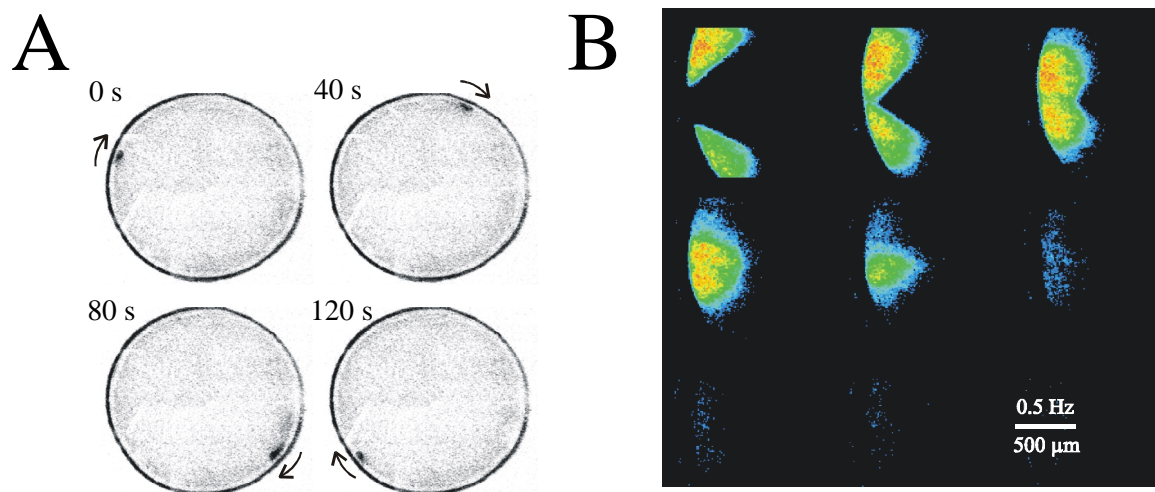


Abbildung 11 Zirkulär umlaufende Kalziumwellen in einem Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln (Proteinkonzentration: 11,86 mg/ml Gel; totale Kalziumkonzentration: 0,25 mM)

A: Zirkulär umlaufende Kalziumwelle in einem Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln in vier Momentaufnahmen im Abstand von 40 s. Die Pfeile geben jeweils die Ausbreitungsrichtung an. Zur besseren Übersichtsdarstellung wurden diese Aufnahmen in 10facher Vergrößerung aufgenommen. Der Umfang des Kreises beträgt 6,72 mm und die Zeit für einen vollständigen Umlauf 140 s. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 48 µm/s.

B: Momentaufnahmen von zwei aufeinander zulaufenden zirkulären Kalziumwellen im gleichen System wie in A im Abstand von jeweils 2 s. Zur besseren Darstellung der Wellenfronten wurden die Fluoreszenzwerte auf die Hälfte ihres Maximums normiert. Nach der Kollision beider Wellen (obere Reihe) kommt es zur gegenseitigen Auslöschung (untere Reihe).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen in Kardiomyozyten der Ratte ist abhängig vom zeitlichen Abstand zwischen zwei Wellen (Wussling und Mair, 1999). Diese Eigenschaft ist allgemein als Dispersionsrelation bekannt. Nach der Dispersionsrelation erhöht sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit mit zunehmender Pausenlänge bis zu einem Wert, der dann auch bei unendlicher Pause nicht größer wird.

Auch im SR-Vesikel-Agarose-Gel konnte eine Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der Dauer zum Vorereignis (Pause) gezeigt werden. In Abbildung 12 wird an einem Einzelbeispiel gezeigt, daß mit kleiner werdender Pause die Ausbreitungsgeschwindigkeit abnimmt. Die Meßwerte stammen von einem Agarose-Gel mit SR-Vesikeln-Clustern.

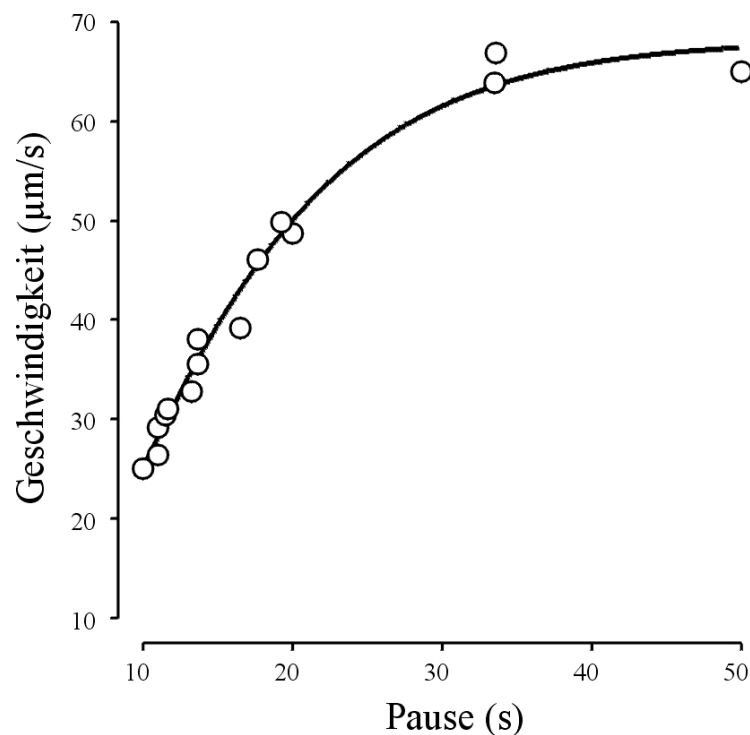


Abbildung 12 Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen von der vorangegangenen Pause (Dispersionsrelation)

Es wurden die Geschwindigkeiten von 15 Kalziumwellen in einem SR-Vesikel-Cluster gemessen und gegen die Zeit der vorangegangenen Ruhephase ohne durchlaufende Welle oder Oszillation (Pause) dargestellt. Mit kleiner werdender Pause nimmt auch die Geschwindigkeit der Kalziumwellen ab.

Schließlich ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Wellen in erregbaren Medien abhängig von der Krümmung der Wellenfront (Foerster et al., 1988; Foerster et al., 1989; Lechleiter et al., 1991; Wussling und Salz, 1996; Wussling et al., 1997; Keener und Sneyd, 1998). Dieser Zusammenhang wurde mit der Eikonalgleichung

$$N = c - D \cdot K \quad (3)$$

beschrieben, wobei N für die Ausbreitungsgeschwindigkeit gekrümmter Wellen, c für die Ausbreitungsgeschwindigkeit ebener Wellen, D für den scheinbaren Diffusionskoeffizienten und K für die Krümmung der Wellenfront stehen. Da sich im SR-Vesikel-Agarose-Gel die Kalziumwellen dreidimensional ausbreiten, verändert sich Gleichung (3) zu (Wussling et al., 2001) :

$$N = c - 2D \cdot K \quad (4).$$

Nach Gleichung (4) wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellen mit abnehmender Krümmung der Wellenfront größer. In Abbildung 13 ist dieser Zusammenhang an einem Beispiel gezeigt. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwelle wird mit zunehmender Krümmung der Wellenfront kleiner. Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich zur Bestimmung der scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten durchgeführt. Im Kapitel 3.3.5. wird ausführlicher auf die Gewinnung dieser Daten eingegangen.

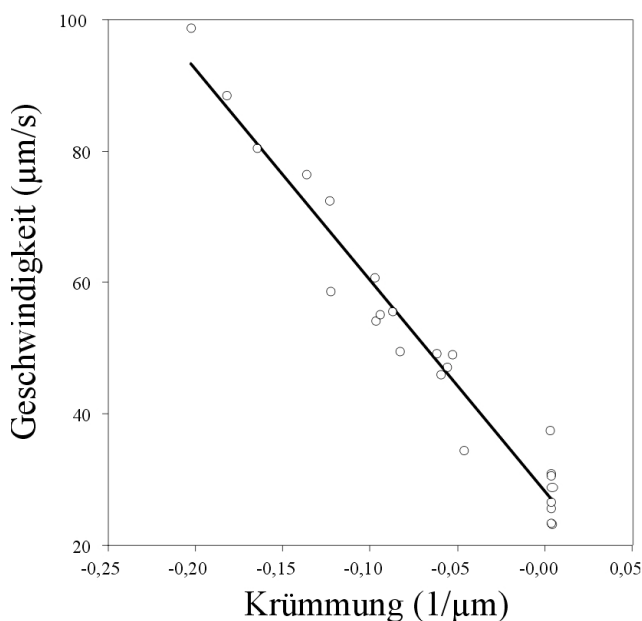


Abbildung 13 Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Kalziumwelle von der Krümmung ihrer Front

Dargestellt sind die Geschwindigkeitsdaten einer Kalziumwelle im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln in Abhängigkeit von der jeweiligen Krümmung der Wellenfront. Die negativen Daten für die Krümmung ergaben sich aus konkav gekrümmtem Wellenfronten.

3.2. Kalziumwellen in Zellorganellen-Clustern

3.2.1. Kalziumwellen in SR-Vesikel-Clustern

Das Auftreten räumlich-zeitlicher Strukturen im SR-Vesikel-Agarose-Gel wurde zunächst ausschließlich in Clustern von SR-Vesikeln beobachtet. Abbildung 14 zeigt einen SR-Vesikel-Cluster (im ersten Teilbild mit gepunkteter Linie umrandet), innerhalb dessen sich Kalziumwellen mit einer Frequenz von 1 s^{-1} und einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $48\text{ }\mu\text{m/s}$ ausbreiten. Die Kalziumwelle beginnt spontan am linken Clusterrand (siehe Fluoreszenzerhöhung zum Zeitpunkt 0 s) und breitet sich über den gesamten SR-Vesikel-Cluster aus (2 s und 4 s). Aus der Abnahme der Fluoreszenzintensität an der Rückfront der Kalziumwelle (2 s und 4 s) wird geschlossen, daß die Kalziumionen nach erfolgter Freisetzung wieder in den SR-Vesikeln gespeichert wurden. Nachdem die Kalziumwelle den Cluster durchlaufen hat, zeigt sich die Fluoreszenzintensität wieder auf ihrem Ausgangsniveau (6 s).

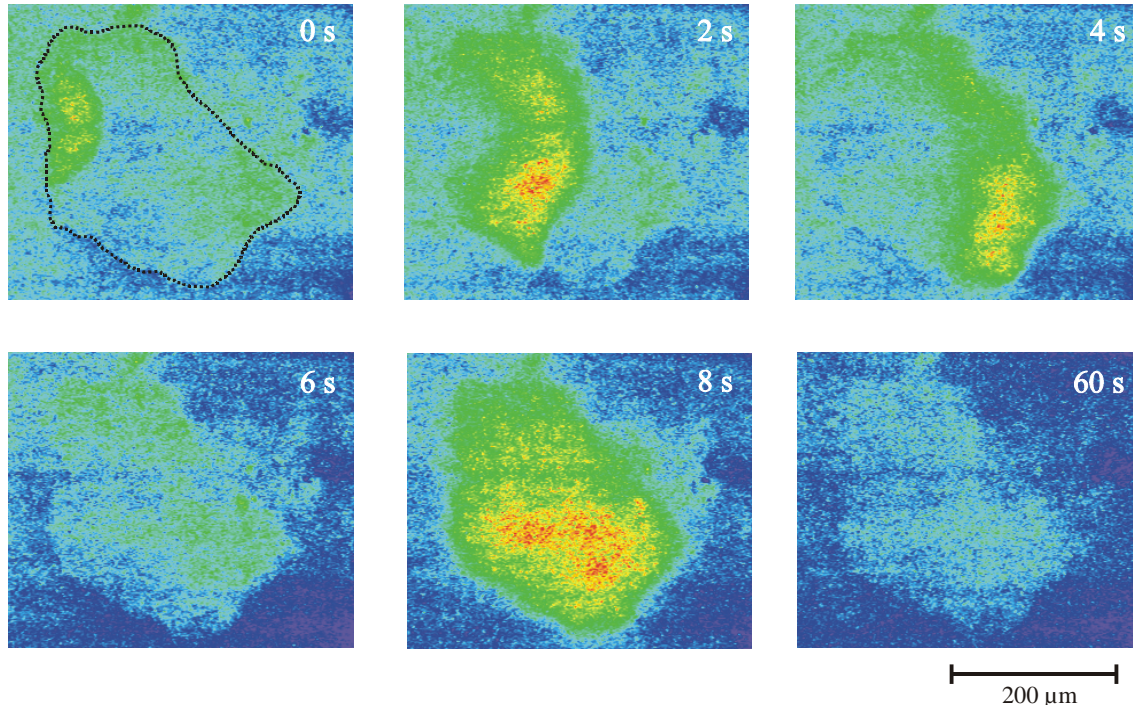


Abbildung 14 Spontane Kalziumwelle in einem SR-Vesikel-Cluster und Entleerung der SR-Vesikel nach Koffeinzugabe (siehe Text)

Nach 7 s wurde 1 μ l Koffeinelösung (20 mM) auf das Agarose-Gel pipettiert und es kam zur Entleerung der Kalziumspeicher (SR-Vesikel), was durch einem rapiden Anstieg der Fluoreszenzintensität im gesamten Cluster (8 s) gezeigt wird. Innerhalb der folgenden 52 s nahm die Fluoreszenzintensität wieder ab (60 s).

Die Abnahme dürfte sowohl auf einen Ausbleichungseffekt des Kalziumindikators als auch auf Diffusion der Kalziumionen in die Clusterumgebung beruhen. Kalziumwellen konnten anschließend nicht mehr beobachtet werden.

Traten spontan keine Kalziumwellen auf, so konnten durch kurzzeitigen Kontakt eines mit CaCl_2 -benetzten Papierstreifens mit dem Agarose-Gel Kalziumwellen stimuliert werden.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellen in SR-Vesikel-Clustern betrug im Mittel rund 40 $\mu\text{m/s}$. Genauere Angaben und Vergleiche nach Modifikationen des Reaktions-Diffusions-Systems findet man in Tabelle 1 (siehe Seite 30).

3.2.2. Einfluß von Thapsigargin auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen

Thapsigargin ist ein aus der Wurzel der Pflanze *Thapsia garganica* gewonnener hochspezifischer Hemmstoff der SR-Kalzium-ATPase (SERCA) (Inesi und Sagara, 1992; Treiman et al., 1998). Die stoichiometrische Interaktion von Thapsigargin mit der SERCA ist irreversibel. Es werden zwei Konformationen der SERCA angenommen, ein E_1 -Zustand mit hoher und ein E_2 -Zustand mit geringer Affinität zum Kalzium. Thapsigargin verändert das Gleichgewicht zugunsten des E_2 -Zustandes, wobei die ATPase dephosphoryliert wird (Carafoli und Brini, 2000). Es wurde gezeigt, daß in der Herzzelle die Kalziumaufnahme in das SR infolge der Hemmung der SERCAs durch Thapsigargin verringert wird (Lukyanenko et al., 1999).

Im folgenden wird der Einfluß einer verringerten Kalziumaufnahme der SR-Vesikel auf die räumlich-zeitlichen Kalziumsignale im SR-Vesikel-Agarose-Gel untersucht. Zunächst wurden Kalziumwellen zur Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit ohne zusätzliche Beeinflussung aufgezeichnet. Nach Applikation von 10 nM Thapsigargin (Sigma) erfolgte die Registrierung von Kalziumwellen im selben SR-Vesikel-Cluster.

In Abbildung 15 ist ein Beispiel der verzögerten Ausbreitung der Wellenfront nach Thapsigarginapplikation gezeigt. Dargestellt sind jeweils dieselben Ausschnitte aus einem SR-Vesikel-Cluster vor und nach Thapsigarginzugabe. Eine Senkung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwelle wird in diesem Beispiel durch das Zurückbleiben der Wellenfront in Abb. 15B nach 90 s gegenüber der Kontrolle in Abb. 15A deutlich.

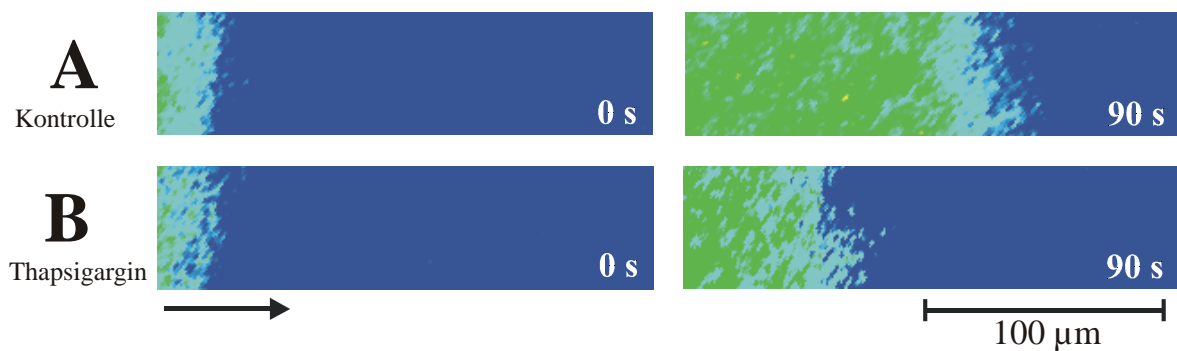


Abbildung 15 Effekt von Thapsigargin auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Kalziumwelle

A und B zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt aus einem SR-Vesikel-Cluster

A: $v = 56 \mu\text{m/s}$ (Kontrolle)

B: $v = 24 \mu\text{m/s}$ (nach Applikation von 10 nM Thapsigargin)

Die durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen in SR-Vesikel-Clustern betrug $39,2 \pm 16,2 \mu\text{m/s}$, (Mittelwert \pm SD, $n = 22$). Nach Thapsigarginapplikation wurde ein statistisch signifikanter Abfall der Ausbreitungsgeschwindigkeit auf $19,6 \pm 4,4 \mu\text{m/s}$ (Mittelwert \pm SD, $n = 8$; $p < 0,01$; t-Test) verzeichnet.

Bezüglich der Frequenz, mit der diese Wellen nach Thapsigarginwirkung auftraten, gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollaufzeichnungen. Die relativen Fluoreszenzintensitätswerte ($\Delta F/F$) in den Wellen unterschieden sich ebenfalls nicht von den Kontrollwerten (siehe Tabelle 1; Seite 30).

3.2.3. Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen

Frisch präparierte Mitochondrien wurden gleichzeitig mit den kalziumbeladenen SR-Vesikeln in das Agarose-Gel eingebettet und ihr Einfluß auf die Kalziumwellen in SR-Vesikel-Clustern untersucht.

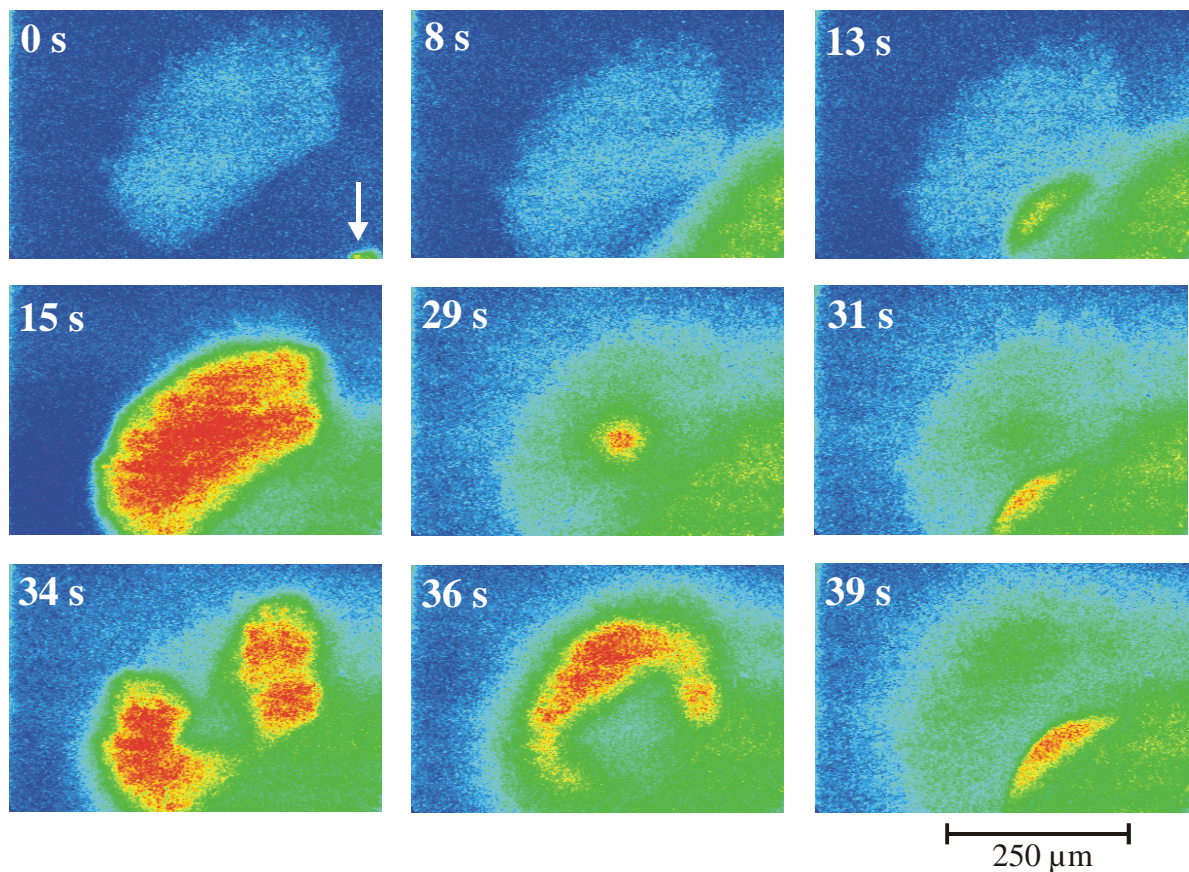


Abbildung 16 Kalziumwellen in einem SR-Vesikel-Mitochondrien-Cluster

Zum Zeitpunkt 0 s befindet sich der Cluster im nicht erregten Zustand. Lokal wurde die Kalziumkonzentration mittels Ca^{2+} -benetztem Zellulosesteifens außerhalb des Clusters erhöht (siehe Pfeil). Nach 8 s sind Kalziumionen fast bis an den Clusterrand diffundiert. Nach 13 s ist am Cluster eine Kalziumkonzentration erreicht, die eine Kalziumfreisetzung (Reaktion) verursacht. Die Welle läuft innerhalb von 2 s durch den Cluster. Nach 29 s ist das Kalzium bis auf eine kleine Region (Bildmitte) wieder in den Organellen gespeichert. Kurz danach (31 s) entsteht eine zweite spontane Welle, die den noch refraktären Bereich (durch verzögerte Rückspeicherung) umläuft (34 s und 39 s). Nach 39 s entwickelt sich eine dritte spontane Welle.

Abbildung 16 zeigt die Entstehung räumlich-zeitlicher Kalziumstrukturen (repetitive Kalziumwellen) innerhalb eines Zellorganellen-Clusters zu verschiedenen Zeitpunkten. Dem System wurden mit Hilfe eines Zellulosestreifens außerhalb des Clusters zusätzlich Kalziumionen zugeführt (siehe Pfeil im ersten Teilbild). Die Kalziumionen erreichen den Cluster nach mehr als 8 s und rufen eine aktive Kalziumfreisetzung hervor (13 s). Die Kalziumwelle durchläuft den gesamten Cluster (15 s). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität ist sehr wahrscheinlich auf eine Kalziumaufnahme in die SR-Vesikel wie auch in die Mitochondrien zurückzuführen, erfolgt jedoch nicht gleichmäßig (29 s). Ein Teil der Kalziumionen könnte auch in Bereiche außerhalb des Clusters diffundiert sein. Nach 31 s entwickelt sich eine zweite Welle, die nun nicht den gesamten Cluster durchläuft, sondern den Bereich der verzögerten Rückbildung ausspart (34 s und 36 s). Dieser Bereich ist offensichtlich noch nicht wieder erregbar, also refraktär. Nach 39 s kommt es zur Entstehung einer dritten Kalziumwelle.

Nachdem 1 μ l 60 μ M Antimycin A (Sigma), ein Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette (Komplex III), auf den Cluster pipettiert wurde, trat kurzzeitig eine Fluoreszenzintensitätserhöhung im beobachteten Cluster auf, welche innerhalb weniger Sekunden verschwand (in Abbildung 16 nicht dargestellt). Es ist von einer Entleerung der mitochondrialen Kalziumspeicher auszugehen. Die anschließende Abnahme der Fluoreszenzintensität läßt sich durch Diffusion der Kalziumionen in das umgebende Agarose-Gel erklären. Die danach aufgetretenen Kalziumwellen entsprachen bezüglich der Ausbreitungsgeschwindigkeit und der relativen Fluoreszenzintensität den Kalziumwellen, die im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne Mitochondrien auftraten (siehe Tabelle 1, Seite 30).

Abbildung 17 zeigt Isofluoreszenzlinien von Wellenfronten zu unterschiedlichen Zeitpunkten im SR-Vesikel-System ohne (17A) und mit Mitochondrien (17B). Die Konturen der Wellenfronten im Agarose-Gel mit SR-Vesikeln und Mitochondrien stellen sich wesentlich gleichförmiger dar, als jene der Kalziumwellen im System bei alleiniger Einbettung von SR-Vesikeln.

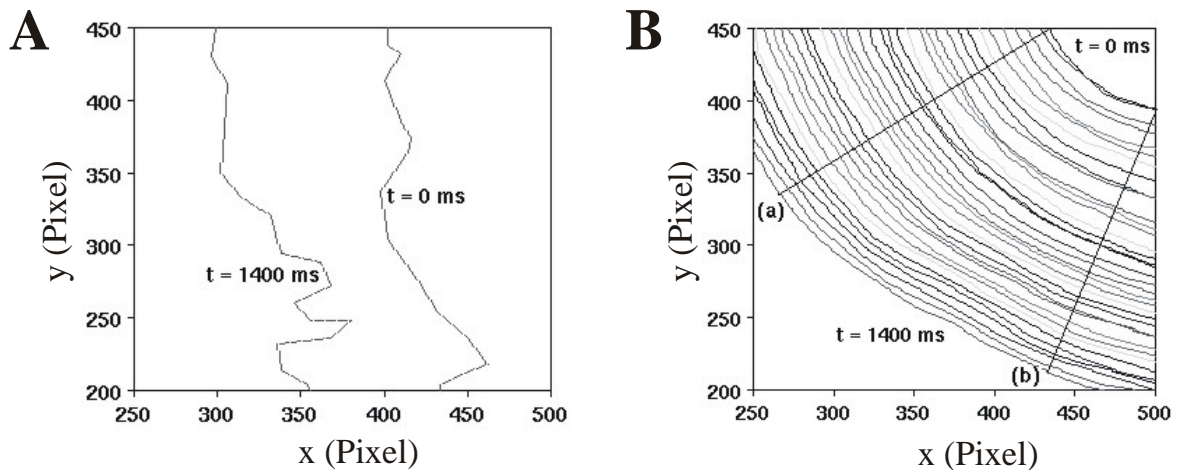


Abbildung 17 Vergleichende Darstellung der Homogenität sich ausbreitender Kalziumwellenfronten im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne (A) und mit Einbettung von Mitochondrien (B)

Fronten einer sich ausbreitenden Kalziumwelle im Agarose-Gel mit SR-Vesikel-Clustern (A) und im Agarose-Gel mit SR-Vesikel-Clustern und Mitochondrien (B) wurden als Isofluoreszenzlinien nachgezeichnet. In B sind die Wellenfronten in einem Abstand von 40 ms dargestellt. 100 Pixel entsprechen 74,15 μm .

Ausbreitungsgeschwindigkeit in A ca. 50 $\mu\text{m/s}$ und in B ca. 100 $\mu\text{m/s}$ (mit kleinen Unterschieden gemessen in (a) oder (b)).

Die relative Fluoreszenzintensität der Wellen ($\Delta F/F$), ein relatives Maß für die Menge der freigesetzten Kalziumionen, wurde im SR-Vesikel-Agarose-Gel vor und nach Thapsigarginapplikation und im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit Mitochondrien vor und nach Antimycinapplikation gemessen. Die Daten sind in Tabelle 1 enthalten. Statistisch signifikante Unterschiede der relativen Fluoreszenzintensitätswerte sind dort gekennzeichnet.

Erregbares Medium	Wellengeschwindigkeit (Mittelwert \pm SD in $\mu\text{m/s}$)	$\Delta F/F$ der Wellen (Mittelwert \pm SD)
SR-Vesikel-Agarose-Gel	$39,2 \pm 16,2^{\#}$ (n = 22)	$1,0 \pm 0,2$ (n = 8)
SR-Vesikel-Agarose-Gel + Thapsigargin (10 nM)	$19,6 \pm 4,4^{\#}$ (n = 8)	$1,0 \pm 0,2$ (n = 8)
SR-Vesikel-Agarose-Gel + Mitochondrien	$57,9 \pm 12,9^*$ (n = 20)	$2,8 \pm 1,7^{**}$ (n = 8)
SR-Vesikel-Agarose-Gel + Mitochondrien und + Antimycin A (60 μM)	$40,9 \pm 10,1^*$ (n = 20)	$0,9 \pm 0,3^{**}$ (n = 8)

Tabelle 1 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse nach unterschiedlicher Beeinflussung der Kalziumwellenausbreitung in SR-Vesikel-Clustern im Agarose-Gel

$\Delta F/F$ = relative Fluoreszenzintensität = $(F_{\text{max}} - F_0)/F_0$ gemessen in ROIs von 10 x 10 Pixel.

Die mit *, ** und # gekennzeichneten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (t-Test ; $p \leq 0.01$).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die zusätzliche Einbettung von Mitochondrien in das Agarose-Gel mit SR-Vesikel-Clustern zu folgenden Veränderungen in der Kalziumsignalausbreitung führte:

1. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit stieg um 50% statistisch signifikant an (Tabelle 1).
2. Die Wellenfronten wurden homogener (Abb. 17).
3. Die relative Fluoreszenzintensität der Kalziumwellen nahm statistisch signifikant zu (Tabelle 1).

3.3. Kalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten Zellorganellen

Um eine Abhängigkeit der Wellenausbreitungsgeschwindigkeit von der Dichte der SR-Vesikel (Proteinkonzentration) und der totalen Kalziumkonzentration untersuchen zu können, wurde das SR-Vesikel-Agarose-System so modifiziert, daß beide Parameter definiert verändert werden konnten. Die SR-Vesikel wurden durch wiederholtes Resuspendieren homogen in das Agarose-Gel eingebettet, was eine Aussage zur Proteinkonzentration am Ort der Kalziumwelle zuließ. Die zweite Veränderung bestand darin, daß dem System zusammen mit der Einbettung von unbeladenen SR-Vesikeln Kalziumionen zugeführt wurden. Auf diese Weise konnte die totale Kalziumkonzentration im Agarose-Gel angegeben und definiert variiert werden. Das System mit homogen eingebetteten Zellorganellen bedurfte keiner Stimulation, d.h. Kalziumwellen traten spontan auf.

3.3.1. Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration

SR-Vesikel wurden unbeladen in das vorbereitete Agarose-Gel mit definierter Kalziumkonzentration überführt (0,10 – 0,40 mM). Innerhalb kurzer Zeit (max. 2 min) kam es zur Speicherung der Kalziumionen in den SR-Vesikeln, was zu einem starken Abfall der Fluoreszenzintensität führte. Daß dieser Abfall tatsächlich auf einem Transport der Kalziumionen in die SR-Vesikel beruhte, wurde durch Kalziumfreisetzung der SR-Vesikel mit 10 mM Koffein an einem Testpräparat geprüft. Die Koffeinapplikation hatte eine prompte Fluoreszenzintensitätserhöhung zur Folge.

Nachdem SR-Vesikel Kalzium gespeichert hatten, konnten spontane Kalziumwellen beobachtet werden, deren Ausbreitungsgeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration abhing. In Abbildung 18A sind die Mittelwerte der Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Kalziumwellen bei 6 unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (7,23 mg/ml – 16,52 mg/ml Gel) in Abhängigkeit von der totalen Kalziumkonzentration dargestellt. Bei fester Kalziumkonzentration zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluß der Proteinkonzentration auf die

Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen. In Abbildung 18B wurde deshalb die Proteinkonzentration unberücksichtigt gelassen. Mittelwerte und Standardabweichungen aller gemessenen Geschwindigkeiten unabhängig der Proteinkonzentration wurden gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen. Eine Approximation der Daten erfolgte aus praktischen Gründen jeweils mit einer Gauß-Funktion.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen nimmt mit ansteigender totaler Kalziumkonzentration zu, erreicht bei 0,27 mM ihren Maximalwert und nimmt dann mit weiterer Steigerung der Kalziumkonzentration wieder ab. Die Geschwindigkeitswerte bei 0,25 und 0,30 mM $[Ca]_{tot.}$ sind statistisch signifikant größer als die bei 0,20 und 0,35 mM $[Ca]_{tot.}$ (p jeweils $< 0,01$). Unterhalb von 0,20 mM Kalzium traten Kalziumwellen nur noch sporadisch auf. Oberhalb von 0,35 mM Kalzium waren keine Kalziumwellen zu beobachten. Die Intensität der Grundfluoreszenz des SR-Vesikel-Agarose-Gels war im letzteren Fall deutlich höher als bei Versuchen mit Kalziumkonzentrationen bis maximal 0,35 mM $[Ca]_{tot.}$. Es ist zu vermuten, daß die Speicherkapazität der SR-Vesikel bei $[Ca]_{tot.} > 0,35$ mM erschöpft war und die RyRs durch zu hohe extravesikuläre Kalziumkonzentrationen inaktiviert waren.

Zur Bestimmung der freien Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel nach erfolgter Kalziumaufnahme durch die Vesikel, wurde eine ratiometrische Messung der Fluoreszenzintensitäten von zwei unterschiedlichen Kalziumindikatoren (Fluo-4 und Fura-rot) durchgeführt.

Im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit einer Proteinkonzentration von 16,52 mg/ml Agarose-Gel und 0,20 mM $[Ca]_{tot.}$ betrug die freie Kalziumkonzentration 10 nM. Bei 0,35 mM $[Ca]_{tot.}$ wurde unter den gleichen Konditionen ein Anstieg der freien Kalziumkonzentration auf 60 nM gemessen. Da eine Erhöhung der totalen Kalziumkonzentration um 0,15 mM nur zu einem Anstieg der freien Kalziumkonzentration um 50 nM führt, ist davon auszugehen, daß auch die Kalziumkonzentration in den Vesikeln zunimmt.

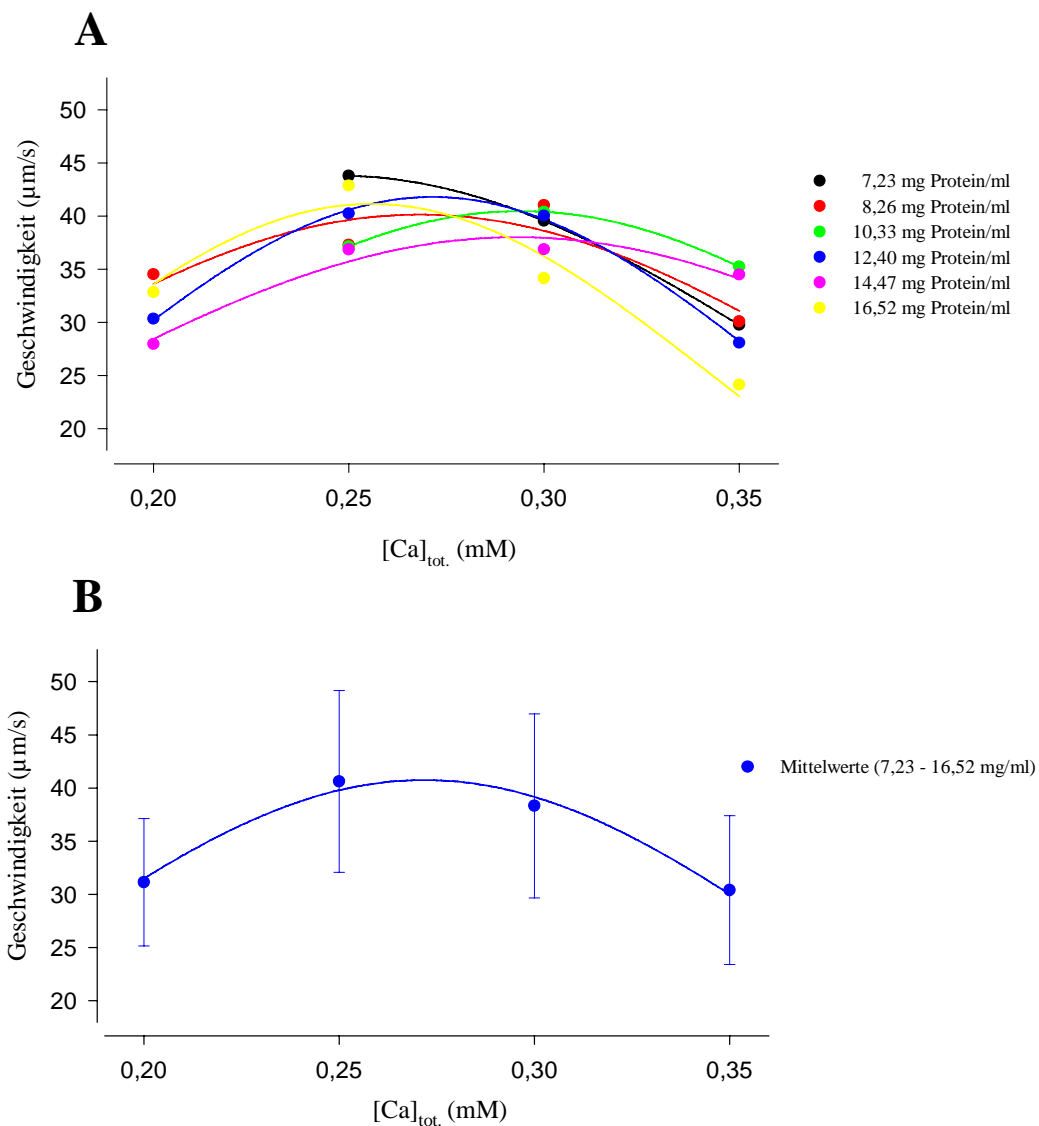


Abbildung 18 Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen in Abhängigkeit von der totalen Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel

A: Dargestellt sind Mittelwerte von Kalziumwellengeschwindigkeiten ($n \geq 6$) gegenüber totalen Kalziumkonzentrationen. Parameter sind 6 unterschiedliche Proteinkonzentrationen in einem Bereich von 7,23 mg/ml bis 16,52 mg/ml Gel. Eine Approximation der Daten erfolgte mit einer Gauß-Funktion (n = Anzahl aller eingegangenen Geschwindigkeitsdaten).

7,23 mg/ml: $n = 19$; $r^2 = 1,00$; 8,26 mg/ml: $n = 27$; $r^2 = 0,79$; 10,33 mg/ml: $n = 26$; $r^2 = 1,00$;
12,40 mg/ml: $n = 24$; $r^2 = 1,00$; 14,47 mg/ml: $n = 24$; $r^2 = 0,95$; 16,52 mg/ml: $n = 48$; $r^2 = 0,95$

B: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der Geschwindigkeitsdaten unabhängig von der Proteinkonzentration bei jeweils fester Kalziumkonzentration. Die Approximation der Daten erfolgte wie in A durch eine Gauß-Funktion ($n = 168$; $r^2 = 0,98$). Die Geschwindigkeitswerte bei totalen Kalziumkonzentrationen von 0,25 mM und 0,30 mM sind jeweils statistisch signifikant größer als diejenigen bei 0,20 mM und 0,35 mM Kalzium gemessenen ($p < 0,01$; t-Test). Nach dieser Approximation wird eine maximale Ausbreitungsgeschwindigkeit von 40,8 $\mu\text{m/s}$ bei 0,27 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ erreicht.

0,20 bis 0,35 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ entsprechen bei einer Proteinkonzentration von 16,52 mg/ml Gel 10 bis 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$.

3.3.2. Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Vesikelproteinkonzentration

Es wurde die Proteinkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel in einem Bereich von 7,23 bis 16,52 mg Protein/ml Agarose-Gel variiert. In Abbildung 19 sind die Mittelwerte der Ausbreitungsgeschwindigkeiten ($n \geq 6$) gegenüber der Proteinkonzentration dargestellt. Parameter war jeweils die totale Kalziumkonzentration (0,20; 0,25; 0,30 und 0,35 mM). Wie oben im Text zur Abbildung 18A bereits erwähnt, konnten zwischen den Wellengeschwindigkeiten bei fester Kalziumkonzentration keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden. Es stellte sich jedoch die Proteinkonzentration von 7,23 mg/ml Agarose-Gel als kritischer Wert heraus, bei dessen Unterschreitung keine Wellen mehr zu beobachten waren. Messungen bei einer Proteinkonzentration oberhalb 16,52 mg/ml Gel konnten nicht durchgeführt werden, weil die SR-Vesikel-Konzentration im Ausgangsmaterial begrenzt war (siehe Seite 11, Kapitel 2.5.2.).

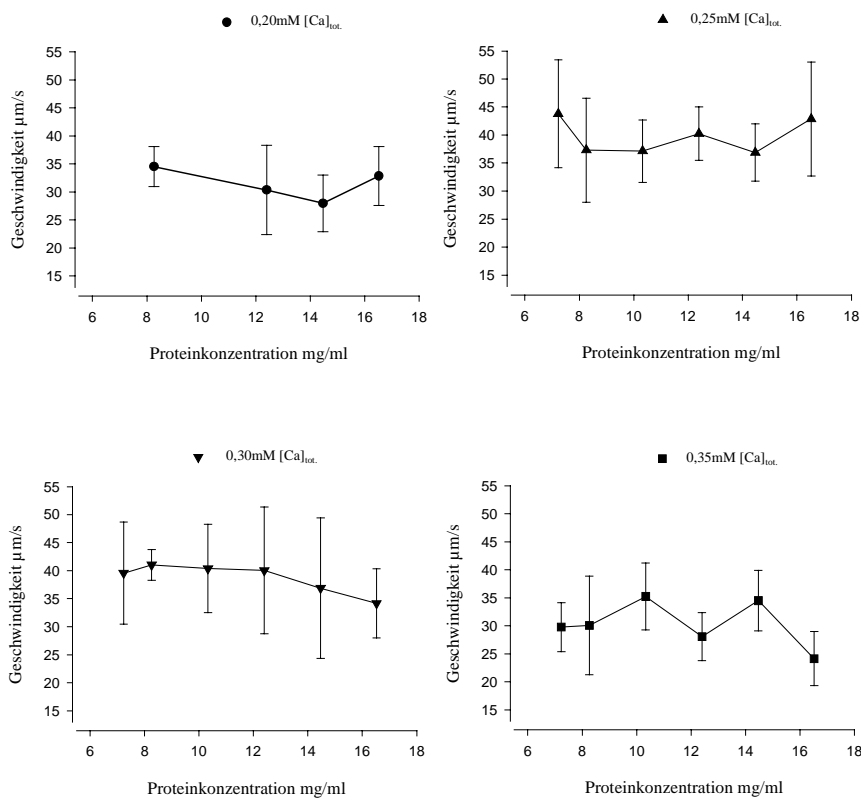


Abbildung 19 Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Kalziumwellen in Abhängigkeit von der Vesikelproteinkonzentration bei 4 unterschiedlichen totalen Kalziumkonzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen ($n \geq 6$ Wellen). Statistisch signifikante Unterschiede konnten innerhalb einer Kalziumkonzentration nicht gefunden werden.

3.3.3. Einfluß von Thapsigargin auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen

Nachdem gezeigt wurde, daß Thapsigargin die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen in SR-Vesikel-Clustern verzögert, sollte die Wirkung des SERCA-Hemmstoffes auch im homogenen System untersucht werden.

Es wurden die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Kalziumwellen am jeweiligen Präparat vor und nach Thapsigarginapplikation gemessen. Auch bei homogener Verteilung der SR-Vesikel konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Wellengeschwindigkeit durch die Wirkung von 10 nM Thapsigargin nachgewiesen werden. Die relativen Fluoreszenzintensitätswerte der Wellen ($\Delta F/F$) wurden, wie auch im System mit SR-Vesikel-Clustern, nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

	Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen (Mittelwert \pm SD in $\mu\text{m/s}$)	
	vor Thapsigarginapplikation (Kontrollwerte)	nach Thapsigarginapplikation (10 nM)
Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln	46,38 \pm 5,13 (n = 10)*	31,57 \pm 7,13 (n = 14)*
	Relative Fluoreszenzintensität der Wellen (Mittelwert \pm SD)	
	vor Thapsigarginapplikation (Kontrollwerte)	nach Thapsigarginapplikation (10 nM)
Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln	0,71 \pm 0,11 (n = 7)	0,73 \pm 0,13 (n = 7)

Tabelle 2 Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten und der relativen Fluoreszenzintensitäten der Kalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln vor und nach Applikation von 10 nM Thapsigargin

Proteinkonzentration 11,86 mg/ml Gel; totale Kalziumkonzentration 0,30 mM

Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0.01$; t-Test).

3.3.4. Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen

SR-Vesikel und Mitochondrien wurden nacheinander homogen in das Agarose-Gel eingebettet. Die totale Kalziumkonzentration mußte bei den Versuchsansätzen mit Mitochondrien von 0,30 mM auf 0,50 mM erhöht werden, da unterhalb 0,50 mM $[Ca]_{tot}$ keine Kalziumwellen auftraten. Vermutlich ist bei 0,30 mM $[Ca]_{tot}$ die Kalziumkonzentration außerhalb der SR-Vesikel durch eine zusätzliche Speicherung von Kalzium in den Mitochondrien zu gering, als daß es zu einer spontanen Kalziumwellenausbreitung kommen kann. Bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,50 mM traten repetitiv spontane Kalziumwellen auf.

Nach Zugabe von 60 μ M Antimycin A auf des SR-Vesikel-Agarose-Gel mit Mitochondrien kam es zu einer bleibenden Fluoreszenzerhöhung, was auf ein Freisetzen des mitochondrialen Kalziums zurückzuführen war. Offensichtlich waren die SR-Vesikel nicht in der Lage, das freigewordene Kalzium zu speichern. Im Unterschied zum Agarose-Gel mit Organellenclustern können die Kalziumionen aus dem erregbaren Bereich nicht in umliegendes Gel diffundieren, so daß die extravesikuläre Kalziumkonzentration Werte erreicht, bei denen keine Kalziumwellen mehr auftreten.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der spontanen Kalziumwellen wurden im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit und ohne Mitochondrien bei voneinander abweichenden totalen Kalziumkonzentrationen (0,30 bzw. 0,50 mM) gesondert gemessen und verglichen.

Die Daten sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Versuche wurden mit SR-Vesikeln aus zwei Präparationschargen durchgeführt und wurden deshalb getrennt betrachtet. Bei den Mitochondrien handelt es sich ebenfalls um zwei Präparationschargen, die den SR-Vesikeln in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurden. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen wird durch die Mitochondrien in keiner der untersuchten Konzentrationen statistisch signifikant verändert. Eine Messung der relativen Fluoreszenzintensität der Wellen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht dargestellt).

Agarose-Gel-System	Proteinkonzentration (mg/ml Agarose-Gel) der SR-Vesikel Mitochondrien		Geschwindigkeit (Mittelwert \pm SD in $\mu\text{m/s}$)
A			
SR-Vesikel	16,30		36,91 \pm 10,67 (n = 20)
SR-Vesikel + Mitochondrien	16,30	3,05	34,01 \pm 4,93 (n = 9)
SR-Vesikel + Mitochondrien	16,30	2,03	34,03 \pm 4,49 (n = 21)
SR-Vesikel + Mitochondrien	16,30	1,02	33,44 \pm 4,74 (n = 5)
B			
SR-Vesikel	11,86		36,02 \pm 9,71 (n = 21)
SR-Vesikel + Mitochondrien	11,86	2,83	36,46 \pm 7,82 (n = 24)
SR-Vesikel + Mitochondrien	11,86	1,42	38,33 \pm 7,91 (n = 24)

Tabelle 3 Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Kalziumwellen im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne und mit Mitochondrien bei homogener Verteilung der Zellorganellen
Mit A und B sind unterschiedliche Präparationschargen der SR-Vesikel und der Mitochondrien bezeichnet.
[Ca]_{tot.} im Agarose-Gel mit SR-Vesikeln: 0,30 mM
[Ca]_{tot.} im Agarose-Gel mit SR-Vesikeln und Mitochondrien: 0,50 mM

3.3.5. Bestimmung und Vergleich der scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit und ohne Mitochondrien

Die Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung für dreidimensionale Wellen lässt sich mit der Gleichung (4) $N = c - 2D \cdot K$ beschreiben, wobei **N** für die Ausbreitungsgeschwindigkeit gekrümmter Wellen, **c** für die Geschwindigkeit ebener Wellen, **K** für die Krümmung der Wellenfront und **D** für den scheinbaren Diffusionskoeffizienten stehen (Foerster et al., 1988; Foerster et al., 1989; Wussling et al., 2001). Über die Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen und der Krümmung der Wellenfront lassen sich mit Hilfe der genannten Gleichung der scheinbare Diffusionskoeffizient für Kalziumionen und der kritische Radius (R_{krit}) eines Focus, bei dessen Überschreitung es

zur Ausbreitung einer Welle kommt, bestimmen (Wussling et al., 1997; Lechleiter et al., 1991). Durch die Einbeziehung negativ (konkav) gekrümmter Wellenfronten, die durch die Kollision zweier positiv (konvex) gekrümmter Wellenfronten entstehen, standen deutlich mehr Daten, besonders im Bereich der kleinen Krümmungen zur Verfügung. In Abbildung 20 sind die Kollision von zwei aufeinander zulaufenden Kalziumwellen (A), die Konturen der positiv und negativ gekrümmten Wellenfronten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (B) und die Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Krümmung der Wellenfront (C) an einem Beispiel dargestellt.

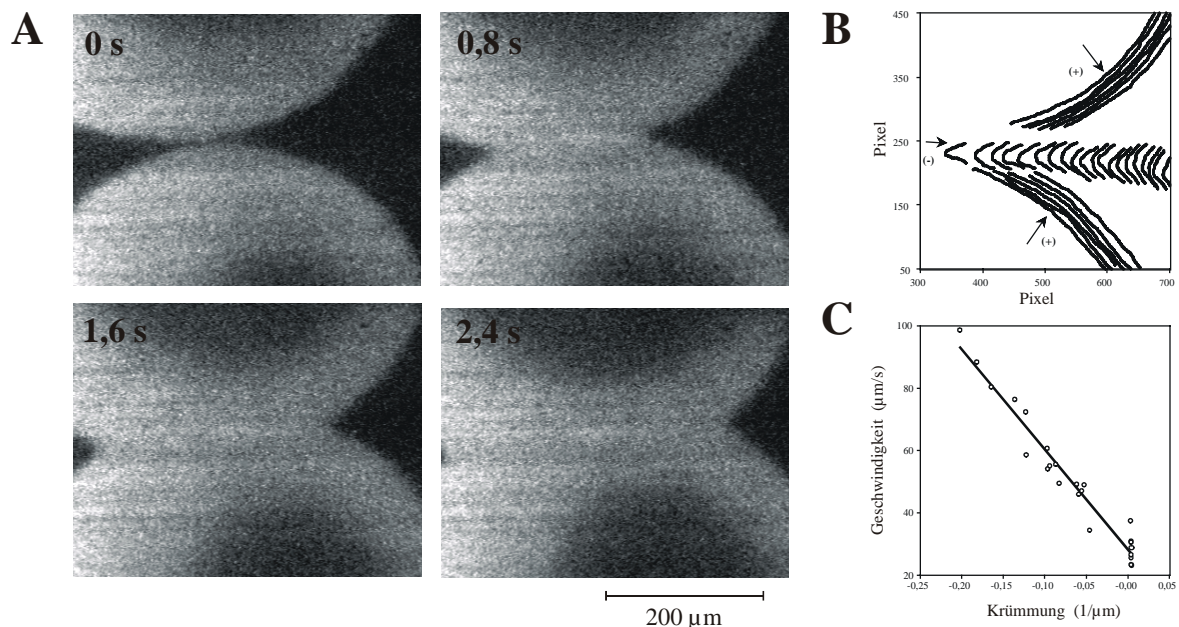


Abbildung 20 Darstellung der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung an einem Beispiel

A: 4 Momentaufnahmen von zwei kollidierenden Kalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln (Proteinkonzentration: 16,52 mg/ml Gel; $[Ca]_{tot}$: 0,15 mM).

B: Korrespondierende Wellenfronten aus der Kollision in A, dargestellt in einem zeitlichen Abstand von 200 ms. Sie sind aus den Isofluoreszenzlinien der Wellenfronten gewonnen worden (mindestens 100 x-y Paare). Die Pfeile zeigen die Ausbreitungsrichtung und (+) und (-) die Krümmung der Wellenfront.

C: Darstellung der Ausbreitungsgeschwindigkeit gegen die entsprechende Krümmung der Wellenfront (aus B errechnet) und deren Approximation durch lineare Regression mit Gleichung (4). Für dieses Beispiel ergaben sich folgende Werte: $D = 151 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $R_{krit} = 5,8 \mu\text{m}$ und $c = 28,1 \mu\text{m}/\text{s}$.

Die positiv gekrümmten Wellenfronten breiteten sich nahezu kreisförmig aus. Die Bestimmung der Wellenfrontkrümmung erfolgte in diesen Fällen über die Krümmung eines Kreises. Den negativ gekrümmten Wellenfronten ließ sich am besten die Form einer Parabel anpassen, deren Krümmung im Scheitelpunkt berechnet wurde. Auf diese Berechnungen, die im Institut für Mathematik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt wurden, wird hier nicht weiter eingegangen (Wussling et al., 2001).

Ziel der Messungen war es zum einen, die Gültigkeit der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung im SR-Vesikel-Agarose-Gel zu zeigen. Zum anderen ergab sich über diesen Zusammenhang die Möglichkeit, die scheinbaren Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten für die SR-Vesikel-Systeme mit und ohne Mitochondrien zu bestimmen und zu vergleichen.

Es wurden im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln ohne Mitochondrien 18 Kollisionen von Kalziumwellen ausgewertet. Alle 200 ms wurden die jeweilige Krümmung der Wellenfront und die Ausbreitungsgeschwindigkeit bestimmt. Aus diesen Daten wurden der scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient, der kritische Radius und die Geschwindigkeit einer ebenen Welle ermittelt. Im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln und Mitochondrien wurden 12 Kollisionen von Kalziumwellen analog ausgewertet.

In der Abbildung 21 sind alle einzeln ermittelten Geschwindigkeitsdaten gegen die jeweilige Krümmung der Wellenfront für die SR-Vesikel-Agarose-Gele ohne (A; $n = 267$) und mit Mitochondrien (B; $n = 131$) dargestellt. Die Approximation erfolgte durch lineare Regression mit $N = c - 2D \cdot K$. Die geringere negative Steigung der Geraden in B macht eine Verschlechterung der Diffusion der Kalziumionen deutlich.

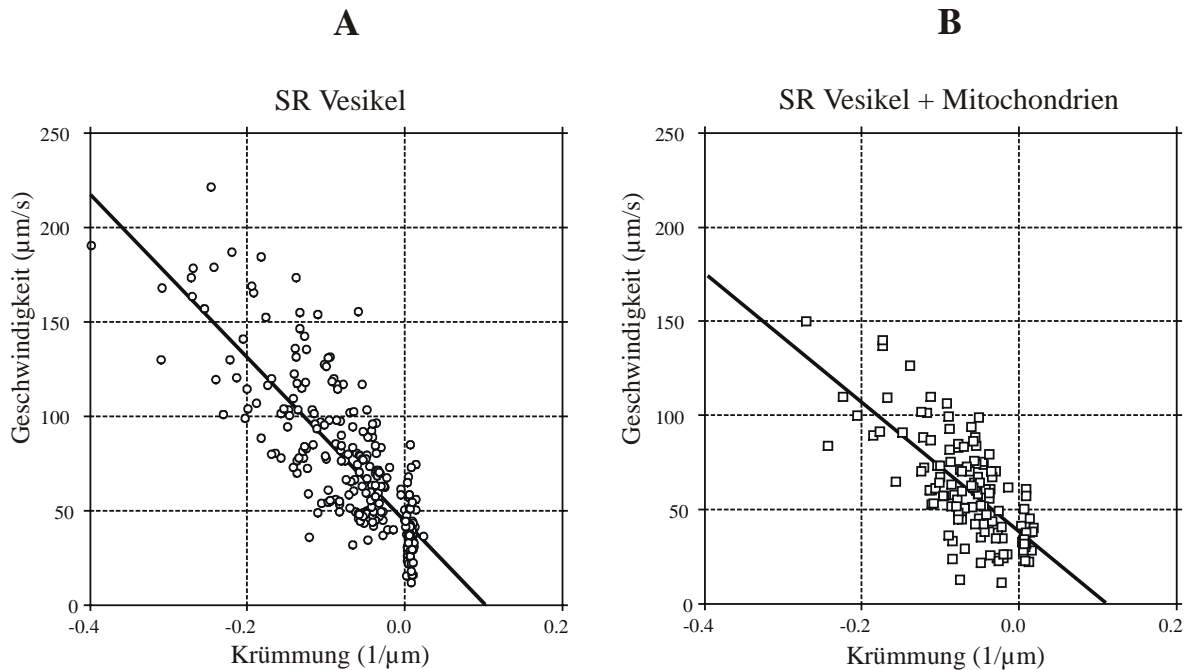


Abbildung 21 Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne (A) und mit (B) Mitochondrien

A: Daten ($n = 267$) von Kalziumwellen mit positiver und negativer Krümmung aus 18 Kollisionen im SR-Vesikel-Agarose-Gel.

B: Daten ($n = 131$) von Kalziumwellen mit positiver und negativer Krümmung aus 12 Kollisionen im SR-Vesikel-Agarose-Gel mit zusätzlich eingebetteten Mitochondrien.

Die Approximation erfolgte durch lineare Regression mit Gleichung (4). r^2 für A = 0,68 und B = 0,63

Zu beachten ist der steilere Abfall der Geraden in A, was einem größeren scheinbaren Diffusionskoeffizienten im System ohne Mitochondrien entspricht.

Es wurden der scheinbare Diffusionskoeffizient, die Geschwindigkeit und der kritische Radius für jede der 18 bzw. 12 Kollisionen jeweils einzeln bestimmt. In Tabelle 4 sind die resultierenden Mittelwerte \pm SD enthalten.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß durch zusätzliche Einbettung von Mitochondrien in das SR-Vesikel-Agarose-Gel die Diffusion der Kalziumionen statistisch signifikant verschlechtert wird ($p < 0,01$; t-Test). Ausbreitungsgeschwindigkeiten und kritische Radien zeigen keine signifikanten Unterschiede.

	Scheinbarer Diffusionskoeffizient D (Mittelwert \pm SD in $\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Geschwindigkeit ebener Wellen c (Mittelwert \pm SD in $\mu\text{m}/\text{s}$)	Kritischer Radius R_{krit} (Mittelwert \pm SD in μm)
SR-Vesikel-Agarose- Gel (n = 18)	215,4 \pm 75,4*	45,7 \pm 12,4	11,2 \pm 7,1
SR-Vesikel-Agarose- Gel + Mitochondrien (n = 12)	149,1 \pm 84,2*	43,0 \pm 14,4	8,3 \pm 4,7

Tabelle 4 Mittelwerte \pm SD der Parameter D, c und R_{krit}, die durch lineare Regression mit $N = c \cdot 2D \cdot K$ ermittelt wurden.
Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,01$; t-Test).

4. Diskussion

In zahlreichen Typen erregbarer und nicht erregbarer Zellen führt die Aktivierung von Signaltransduktionsschritten zu Kalziumoszillationen und/oder Kalziumwellen. Wegen ihrer Bedeutung für die Zellfunktion sind beide Phänomene Gegenstand intensiver experimenteller und theoretischer Untersuchungen (Lechleiter et al., 1991; Wussling et al., 1997; Boitier et al., 1999). Spontane oder stimulierte Kalziumwellen entwickeln sich aus sogenannten „hot spots“ mit lokal erhöhter zytosolischer Kalziumkonzentration (Cheng et al., 1993). Die Wellenausbreitung beruht auf der regenerativen Kalziumfreisetzung aus diffusionsgekoppelten Kanälen des endoplasmatischen Retikulums, der für die intrazelluläre Kalziumspeicherung wichtigsten Organelle. Die zytosolische Kalziumkonzentration an einem bestimmten Ort ist nur vorübergehend erhöht, weil die in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisierten Kalzium-ATPasen Kalziumionen wieder in die Speicher transportieren. Die Freisetzungskanäle und Kalzium-ATPasen der verschiedenen Zelltypen zeigen zum Teil voneinander abweichende Eigenschaften (Copello et al., 1997; Misquitta et al., 1999; Ramos-Franco et al., 1998). Die von uns verwendeten Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums setzen Kalzium vorwiegend aus Ryanodin-sensitiven Rezeptoren Typ-1 (RyRs1) frei und nehmen es über SR-Kalzium-ATPasen (SERCAs) wieder auf.

Untersuchungen mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ergaben, daß räumlich-zeitliche Kalziumstrukturen in lebenden Zellen allgemeine Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen zeigen, nämlich Asymmetrie der Wellenprofile (steiler Anstieg, flacher Abfall), Auslöschung nach Kollision (und kein wechselseitiges Durchdringen, was auf Refraktärität hinweist), Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der Frequenz ihrer Entstehung (Dispersionsrelation) und von der Krümmung der Wellenfronten (Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung) (Zykov, 1980 a und b; Lechleiter et al., 1991; Wussling und Mair, 1999; Keener und Sneyd, 1998).

Kalziumoszillationen und Kalziumwellen entstehen nicht nur in lebenden Zellen sondern auch in weniger komplexen Systemen isolierter Zellorganellen, was in dieser Arbeit gezeigt wurde. Inhomogen oder homogen verteilte SR-Vesikel innerhalb eines Agarosegels stellen offensichtlich ein gut erregbares Medium dar, in dem alle oben genannten Eigenschaften von Erregungswellen nachweisbar sind. Die Immobilisation der

Zellorganellen in einem Gel ist wichtig, weil auf diese Weise störende Bewegungen (Konvektion z.B. durch thermische Einflüsse) praktisch ausgeschlossen werden.

Dieses *in vitro*-System erlaubt Untersuchungen der Kalziumsignalausbreitung unabhängig von der Zellmembran, vom Zytoskelett oder anderen Zellorganellen, kann jedoch auch erweitert werden, etwa durch Hinzufügen von Mitochondrien.

Der Nachweis räumlich-zeitlicher Kalziumstrukturen im SR-Vesikel-Agarose-Gel-System gelang erst, nachdem in umfangreichen Voruntersuchungen das „Fenster“ für die Entstehung von Kalziumoszillationen und –wellen gefunden wurde. Die Wahl geeigneter experimenteller Bedingungen betrifft vor allem die Konzentration der SR-Vesikel und des totalen Kalziums.

Die ersten Kalziumwellen im Agarose-Gel konnten wir in sogenannten Clustern von kalziumbeladenen SR-Vesikeln beobachten (Wussling et al., 1999). Eines unserer besten Beispiele für die Kalziumsignalausbreitung im inhomogenen System findet man als Video im Internet unter <http://nummulit.mathematik.uni-halle.de/helmut/calcium>.

Für die Fragestellung nach der Abhängigkeit der Kalziumsignalausbreitung von der Kalziumkonzentration und von der SR-Vesikeldichte (Vesikelproteinkonzentration) mußte das System so modifiziert werden, daß diese Parameter definiert verändert werden konnten. Hierzu war eine homogene Verteilung der Zellorganellen erforderlich, wobei SR-Vesikel in kalziumhaltiges Agarose-Gel ohne vorherige Kalziumbeladung eingebracht wurden. Eine Aussage zur Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration war nun durch die Auswertung ausschließlich spontan auftretender Wellen möglich (siehe Abbildung 18, Seite 33).

Ebene Kalziumwellen breiten sich in dem von uns entwickelten *in vitro*-System mit etwa 40 $\mu\text{m/s}$, in Oozyten vom Krallenfrosch mit $\sim 22 \mu\text{m/s}$ (Jouaville et al., 1995) und in Rattenmyokardzellen mit 85 bis 110 $\mu\text{m/s}$ aus (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al., 1997).

Für die Ausbreitung von Kalziumsignalen in diesem erregbaren System ist die Diffusion der Kalziumionen zwischen den RyRs erforderlich. Je weniger die Diffusion behindert wird, desto günstiger müßte es sich auf die Ausbreitung der Kalziumwelle auswirken.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten kann die Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung (Gleichung 4) herangezogen werden. Mit Hilfe dieser Beziehung wurden

scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten in Myokardzellen der Ratte von $120 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Wussling et al., 1997) und in Oozyten vom Krallenfrosch von $78 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Lechleiter et al., 1991) ermittelt.

Die Diffusion kann in der Zelle durch Proteine (Puffer) und Zellorganellen (Zellkern, Mitochondrien, kontraktile Filamente) beeinträchtigt werden (Al-Baldawin und Abercrombie, 1995). Im SR-Vesikel-Agarose-Gel fehlen diese Zellbestandteile, so daß die Diffusion der Kalziumionen weniger behindert wird. Ein scheinbarer Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient von $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde für dieses SR-Vesikel-Agarose-Gel mit den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen bestimmt. Da die scheinbaren Diffusionskoeffizienten in Herzzellen, Oozyten und im SR-Vesikel-Agarose-System mit derselben Methode ermittelt wurden, lassen sie sich gut miteinander vergleichen.

Al-Baldawi und Abercrombie (1995) bestimmten Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten für 1%ige Agarose von 320 bis $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mittels Isotopentechnik und unter Verwendung von Minielektroden.

Der von uns bestimmte scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient ist kleiner als in reiner Agarose, jedoch deutlich größer als die in Herzzellen und Oozyten. Da die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen in unserem System langsamer als in den Myokardzellen ist, läßt das darauf schließen, daß die aktive Kalziumfreisetzung für die Wellengeschwindigkeit von größerer Bedeutung als die Diffusion der Kalziumionen zu sein scheint. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse aus dem SR-Vesikel-Agarose-Gel mit eingebetteten Mitochondrien noch gestützt. Die Kalziumfreisetzung aus dem SR ist unmittelbar gefolgt von einer Kalziumaufnahme in benachbarte Mitochondrien (Duchen et al., 1998; Rizzuto et al., 2000). Die Diffusion der Kalziumionen ist dadurch erschwert. Der scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient im SR-Vesikel-Agarose-Gel in Abwesenheit von Mitochondrien beträgt $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und in deren Gegenwart $115 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese Werte unterscheiden sich statistisch signifikant. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit ebener Kalziumwellen ist jedoch in beiden Systemen nahezu gleich. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß die Kinetik der Kalziumfreisetzung von größerer Bedeutung für die Ausbreitung des Kalziumsignals ist, als die Diffusion der Kalziumionen selbst.

Es kann weiterhin vermutet werden, daß eine Veränderung der Dichte der Freisetzungskanäle einen Einfluß auf die Kalziumwellengeschwindigkeit haben müßte. Wir gingen davon aus, daß bei homogener Verteilung der SR-Vesikel im Agarose-Gel die

Zugabe einer kleineren Menge der gleichen SR-Vesikel-Suspension zu größeren mittleren Abständen zwischen den RyRs führen muß. Die Untersuchungen an SR-Vesikel-Agarose-Gelen unterschiedlicher Vesikelproteinkonzentrationen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Kalziumwellen.

Möglicherweise wurde die Proteinkonzentration in einem zu kleinen Bereich variiert, so daß der Einfluß auf die Geschwindigkeit der Wellenausbreitung nicht meßbar war. Eine weitere Erhöhung der Konzentration war aus methodischen Gründen nicht möglich.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß es einen Mindestabstand zu geben scheint, der, wenn man ihn weiter vergrößert, eine Ausbreitung der Kalziumsignale nicht mehr möglich macht. Grundsätzlich ist der mittlere Abstand zwischen den Zentren der Vesikel morphometrisch erfaßbar. Dies wurde für ein SR-Vesikel-Agarose-Gel mit einer Proteinkonzentration von 16,3 mg/ml Gel auch abgeschätzt (siehe Seite 18), nicht aber für die übrigen in dieser Arbeit verwendeten Proteinkonzentrationen. Als quantitatives Maß konnte eine Vesikelproteinkonzentration von 7,23 mg/ml Agarose-Gel angegeben werden, bei deren Unterschreitung keine räumlich-zeitlichen Kalziumsignale auftraten.

Die Kinetik der Ryanodin-sensitiven Rezeptoren wurde durch Einzelkanalmessungen vielfach untersucht (Györke et al., 1994; Schiefer et al., 1995; Herrmann-Frank und Lehmann-Horn, 1996; Copello et al., 1997; Chen et al., 1998; Xu und Meissner, 1998; Laver und Lamb, 1998). Es wird diskutiert, daß sowohl die Kalziumkonzentration auf zytoplasmatischer wie auch auf luminaler Seite die Offenwahrscheinlichkeit der RyRs beeinflusst (Coronado et al., 1994; Herrmann-Frank und Lehmann-Horn, 1996; Copello et al., 1997; Györke und Györke, 1998; Lukyanenko et al., 1999). Über den Mechanismus der Beeinflussung der RyRs durch die luminalen Kalziumkonzentration gibt es zur Zeit zwei unterschiedliche Auffassungen. Zum einen wird eine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit der RyRs durch Änderungen der luminalen Kalziumkonzentration über Interaktionen mit luminalen Bindungsstellen der RyRs angenommen (Györke und Györke, 1998; Ching et al., 2000). Andererseits wird diskutiert, daß Kalziumionen aus dem SR die RyRs passieren und die Offenwahrscheinlichkeit der RyRs über Bindungsstellen modulieren, die auf der zytoplasmatischen Seite bzw. innerhalb des Rezeptors lokalisiert sind (Herrmann-Frank und Lehmann-Horn, 1996; Xu und Meissner, 1998). Chen et al. (1998) wiesen einen sogenannten Ca^{2+} -Sensor im transmembranären Bereich des RyR Typ-3 (RyR3) nach, der als gemeinsame Bindungsstelle für die Kalziumionen aus dem

Zytoplasma wie auch aus dem SR agieren soll. Es konnte weiter gezeigt werden, daß durch eine Mutation der transmembranären Sequenz des RyR3 die Sensitivität der Ca^{2+} -Aktivierung um das 10000fache gesenkt wird (Chen et al., 1998).

Wir untersuchten den Einfluß unterschiedlicher totaler Kalziumkonzentrationen im Agarose-Gel auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln.

Die freie Kalziumkonzentration im SR-Vesikel-Agarose-Gel wurde mit ratiometrischer Fluoreszenzmessung bestimmt und beträgt 60 nM bei einer Proteinkonzentration von 16,52 mg/ml Gel und 0,35 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$. Eine grobe Schätzung ergibt, daß das Volumen aller SR-Vesikel im Gel maximal 50% des Gesamtvolumens einnimmt (siehe Seite 18). Daraus folgt, daß die Kalziumkonzentration innerhalb der SR-Vesikel etwa 10000 mal so groß wie außerhalb ist. Dies entspricht in etwa dem Konzentrationsgefälle zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum.

Unterhalb von 0,10 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ konnten keine spontanen oder stimulierten Kalziumwellen beobachtet werden. Bei 0,10 – 0,20 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ traten Kalziumwellen nur selten und in eng begrenzten Regionen des jeweiligen Präparates auf. Wir führen das sporadische Auftreten innerhalb dieses Übergangsbereiches auf mögliche inhomogene Verteilungen beim Resuspendieren des noch flüssigen SR-Vesikel-Agarose-Gels zurück. Die Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration ist im Bereich von 0,20 – 0,35 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ biphasisch mit einem Gipfel bei 0,27 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$.

Die Steigerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen bei Erhöhung der $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ von 0,20 auf 0,30 mM könnte auf eine stärkere Kalziumbeladung der SR-Vesikel zurückzuführen sein. Höhere Kalziumkonzentrationen im SR führen zu einer gesteigerten Sensibilität der RyRs gegenüber zytosolischem Kalzium (Herrmann-Frank und Lehmann-Horn, 1996; Györke und Györke, 1998; Lukyanenko et al., 1999). Bei weiterer Erhöhung der Kalziumkonzentration bis auf 0,35 mM scheint die maximale Speicherkapazität der SR-Vesikel für Kalzium erreicht zu sein. Es kommt zu einer Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit. Diese ist vermutlich durch eine Zunahme der extravesikulären Kalziumkonzentration bedingt, die die Offenwahrscheinlichkeit der RyRs herabsetzt. Bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,40 mM traten keine Kalziumwellen mehr auf.

Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten der Ratte ergaben eine dem SR-Vesikel-Agarose-Gel sehr ähnliche Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit der

Kalziumwellen von der Kalziumkonzentration im Zellmedium (Landgraf et al., 2001). Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz des in dieser Arbeit untersuchten Zellorganellensystems für eine weitere Analyse der Kalziumsignalausbreitung.

Die Kalziumkonzentration in den SR-Vesikeln hängt auch von der Aktivität der SERCA ab. Untersuchungen an SR-Vesikeln des Kaninchens mit induziertem Herzversagen zeigten eine reduzierte SERCA-Expression mit verringerter Kalziumaufnahme in die Vesikel (Currie und Smith, 1999). An isolierten Kardiomyozyten wurde dieser Zustand simuliert, indem die SERCAs und damit die Kalziumaufnahme in das SR mit Thapsigargin partiell gehemmt wurden. Die Folge war eine Reduzierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen (Landgraf et al., 2001). Mit unseren Untersuchungen im SR-Vesikel-Agarose-Gel konnten wir nach partieller Hemmung der SERCAs mit 10 nM Thapsigargin eine statistisch signifikante Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen um 32 % im homogenen und 50 % im inhomogenen System zeigen. Eine verminderte Kalziumaufnahme der SR-Vesikel führt zur Senkung der intravesikulären und Steigerung der extravesikulären Kalziumkonzentration. Es sind vermutlich beide Konzentrationsänderungen ursächlich für die Reduktion der Wellengeschwindigkeiten anzusehen.

In der Literatur wurden auch gegensätzliche Befunde mitgeteilt, wobei die experimentellen Bedingungen sehr von denen in unserer Arbeit abwichen. Lukyanenko et al. (1999) fanden bei Untersuchungen an Rattenmyokardzellen nach Thapsigargininkubation (10 μ M) und Koffeinstimulation eine Steigerung der Kalziumwellengeschwindigkeit. Im Unterschied zu unseren Experimenten wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit der ersten stimulierten Kalziumwelle nach Thapsigarginzugabe bestimmt, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Kalziumkonzentration im sarkoplasmatischen Retikulum noch nicht reduziert war.

In Oozyten des Krallenfrosches und in kortikalen Astrozyten der Ratte, in denen die Entstehung und Ausbreitung von Kalziumwellen über IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum vermittelt werden, konnte gezeigt werden, daß Mitochondrien den Charakter der Kalziumwellen in unterschiedlicher Weise modulieren können (Jouaville et al., 1995; Boitier et al., 1999). Es wurde untersucht, ob die Mitochondrien über die Bereitstellung von ATP und/oder ihre Kalziumspeicherfunktion die Ausbreitung der Kalziumwellen beeinflussen. Gegen eine Beeinflussung der

Wellenausbreitung über gesteigerte ATP-Bereitstellung spricht, daß in Oozyten die Kalziumwellen und deren Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthase mit Oligomycin unverändert blieben (Jouaville et al., 1995). Wurde jedoch der Ca^{2+} -Uniporter, ein potentialgetriebenes Elektronentransportsystem, über das Kalziumionen ins Mitochondrium transportiert werden, direkt mit Rutheniumrot oder indirekt über Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe (Rotenon und Antimycin A) in seiner Funktion gehemmt, verlangsamte sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen in den Oozyten des Krallenfrosches. Boitier et al. (1999) dagegen fanden in Astrozyten der Ratte einen „negativen feedback“ der Mitochondrien auf die Geschwindigkeit der Kalziumwellen. Es wurde eine signifikante Steigerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Hemmung der mitochondrialen Kalziumaufnahme, die man über eine Beeinflussung des Membranpotentials mit Rotenon bzw. Antimycin A1 oder über einen Entkoppler (FCCP) erreichte, beobachtet. Weshalb die Hemmung der mitochondrialen Kalziumspeicherung zum einen zu einer Senkung und zum anderen zu einer Steigerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen führt, wird mit unterschiedlichen IP_3 -Rezeptorisoformen erklärt (Boitier et al., 1999). So zeigt der in den Oozyten vorkommende IP_3 -Rezeptor Typ-1 eine biphasische Abhängigkeit gegenüber der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration (Ramos-Franco et al., 1998). Nachdem die mitochondriale Kalziumspeicherung gehemmt ist, wirkt die Kalziumkonzentrationssteigerung im Zytosol am IP_3 -Rezeptor inhibitorisch auf die Offenwahrscheinlichkeit und führt damit zu einer Senkung der Wellengeschwindigkeit. Anders verhält es sich bei dem in Astrozyten vorkommenden IP_3 -Rezeptor Typ-2, bei dem eine kalziumabhängige Inaktivierung durch hohe zytoplasmatische Kalziumkonzentrationen nicht gefunden wurde (Ramos-Franco et al., 1998). Eine Abnahme der mitochondrialen Kalziumpufferkapazität führt zur Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration und zu einer Verbesserung der Kalziumwellenausbreitung.

Durch eine Schädigung der Mitochondrien im ZNS, wie sie bei Ischämie, Reperfusionsschäden (Sims, 1995) und der Parkinsonerkrankung (Bowling und Beal, 1995) gefunden wurde, ist auch die mitochondriale Kalziumaufnahme gestört. Die Mitochondrien sind nicht mehr in der Lage, regulierend auf die Kalziumwellengeschwindigkeit einzuwirken. Es ist möglich, daß eine verlangsamte bzw. beschleunigte Kalziumsignalausbreitung zu Dysregulationen im umgebenden

Nervengewebe führt. Erkenntnisse über mitochondriale Funktionsstörungen, die zu Veränderungen in der Kalziumsignalausbreitung führen, könnten zum Verständnis der Pathogenese von Erkrankungen des ZNS beitragen (Boitier et al., 1999).

In unserem SR-Vesikel-Agarose-Gel wird die Ausbreitung von Kalziumwellen über die Öffnung von RyRs1 vermittelt. Diese zeigen wie die IP₃-Rezeptoren Typ-1 eine biphasische Abhängigkeit gegenüber der zytosolischen Kalziumkonzentration. Im Gel mit SR-Vesikel-Clustern führte die Einbettung von Mitochondrien zu einer fast 50%ig gesteigerten Wellengeschwindigkeit und einem statistisch signifikanten Anstieg der Wellenamplitude. Nach Hemmung der Atmungskette mit Antimycin A und damit der mitochondrialen Kalziumspeicherung entsprachen Wellengeschwindigkeit und Wellenamplitude wieder denen im SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne Mitochondrien. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Einbettung von Mitochondrien die Bedingungen für die Kalziumsignalausbreitung im System mit Zellorganellen-Clustern optimiert hat.

Jouaville et al. (1995) fanden an Oozyten des Krallenfrosches nach Aktivierung der Mitochondrien auch einen Anstieg der Wellenamplitude. Sie erklärten dieses Phänomen mit einer Senkung der Kalziumkonzentration im Zytosol, wodurch der Schwellenwert, bei dem die RyRs öffnen, nicht so schnell erreicht wird. Die RyRs sind in der überwiegenden Zahl geschlossen. Kommt es jedoch zur Überschreitung einer kritischen Kalziumkonzentration (Schwellenwert), dann geht eine größere Anzahl RyRs in den Offenzustand über, so daß mehr Kalziumionen gleichzeitig freigesetzt werden können. Die Ausbreitung des Kalziumsignals erfolgt schneller und mit größerer Amplitude.

Ein höherer Grad der Gleichzeitigkeit wäre eine Erklärung für die homogenen Wellenfronten in Anwesenheit von Mitochondrien (siehe Abbildung 17, Seite 29).

Die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien erfolgt schneller als dessen Freisetzung (Rizzuto et al., 2000). Ichas et al. (1997) zeigten, daß auch Mitochondrien Kalziumwellen generieren können. Sie betteten Mitochondrien in ein Agarose-Gel ein. Nach einem lokalen Stimulus mit 10 nM [Ca²⁺] konnten sie die Ausbreitung einer Kalziumwelle und parallel dazu auch eine Depolarisationswelle ($\Delta\Psi$ -Welle) beobachten. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit war mit 1 $\mu\text{m/s}$ jedoch deutlich langsamer als die der Kalziumwellen, die durch Kalziumfreisetzung aus dem SR/ER entstehen. Eine Beschleunigung dieser Kalziumwellen über aktive Kalziumfreisetzung aus den Mitochondrien wird nicht angenommen.

Eine biphasische Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der zytosolischen Kalziumkonzentration zeigen auch die RyRs Typ-2 in den Myokardzellen der Ratte (Copello et al., 1997; Xu und Meissner, 1998; Györke und Györke, 1998). Untersuchungen an diesen Zellen ergaben ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen nach Hemmung der mitochondrialen Kalziumaufnahme mit dem Rutheniumrot-Derivat RU 360 (Landgraf et al., 2001).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Kalziumwellen im System mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln in An- bzw. Abwesenheit von Mitochondrien wurden bei voneinander abweichenden $[Ca]_{tot}$ verglichen. Dabei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Dennoch konnte auch an diesem System ein Einfluß der Mitochondrien auf die Kalziumsignalausbreitung verzeichnet werden. In Kapitel 3.3.1. wurde die Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der totalen Kalziumkonzentration im System mit SR-Vesikeln gezeigt. Die maximale Geschwindigkeit von Kalziumwellen wird bei 0,27 mM $[Ca]_{tot}$ erreicht. Mitochondrien verringern die extravesikuläre Kalziumkonzentration, so daß eine Absenkung der Geschwindigkeit bei unveränderter totaler Kalziumkonzentration zu erwarten wäre. Unsere Versuche zeigten, daß bei 0,30 mM $[Ca]_{tot}$ und zusätzlicher Einbettung von Mitochondrien keine Kalziumwellen mehr auftraten. Nach Erhöhung auf 0,50 mM $[Ca]_{tot}$ konnten Kalziumwellen wieder beobachtet werden. Da im SR-Vesikel-System ohne Mitochondrien bei dieser Kalziumkonzentration keine Wellen mehr auftraten, bedeutet das Einbringen von Mitochondrien eine Optimierung der extravesikulären Kalziumkonzentration, bei der die Ausbreitung von Kalziumwellen wieder möglich wird. Nach Hemmung der mitochondrialen Kalziumaufnahme durch Antimycin A stieg die Grundfluoreszenzintensität (d.h. die extravesikuläre Kalziumkonzentration) stark an und Kalziumwellen konnten nicht mehr beobachtet werden..

Ausblick

Das System aus immobilisierten SR-Vesikeln des Skelettmuskels bietet die Möglichkeit, über die Kalziumsignalausbreitung zwischen den RyRs1 Schlußfolgerungen auf deren Funktionszustand zu ziehen. Die gute Zugänglichkeit des Systems bietet Vorteile bei der Untersuchung der Wirkung von Pharmaka (Hemmstoffe oder Aktivatoren), die direkt und in definierter Konzentration auf die Ryanodinrezeptoren bzw. die ATPasen einwirken können. Man könnte auch pathologisch veränderte Mitochondrien und Vesikel mit defekten RyRs in das System einbetten und die Kalziumsignalausbreitung und deren Beeinflussung untersuchen. So sind bei vielen neurologischen Erkrankungen (z.B. Alzheimer-Krankheit, Chorea Huntington, Parkinson-Krankheit, amyotrophe Lateralsklerose) mitochondriale Dysfunktionen aufgezeigt worden, die Einfluß auf die Kalziumsignalausbreitung haben könnten. Auch am RyR1 sind Abweichungen bekannt, die für das Krankheitsbild der malignen Hyperthermie (MH) ursächlich sind. Diese autosomal vererbte Erkrankung ist durch eine gesteigerte Sensitivität des Skelettmuskels gegenüber Inhalationsnarkotika und depolarisierenden Muskelrelaxantien mit einer abnorm hohen Kalziumfreisetzung aus dem SR charakterisiert. Prädisponierte Patienten tragen ein hohes Risiko, während einer Narkose mit diesen Medikamenten, eine fulminante hyperthermale Krise, die nicht selten tödlich endet, zu durchlaufen. Untersuchungen an MH-RyRs haben gezeigt, daß eine Aktivierung bei geringeren und eine Inhibierung bei höheren Kalziumkonzentrationen im Vergleich zu normalen RyRs erfolgt (Richter et al., 1997). Ein reduzierter inhibitorischer Effekt von physiologischen Magnesiumkonzentrationen auf die Öffnung dieser veränderten RyRs wird außerdem als Ursache für die exzessive nicht regulierte Kalziumfreisetzung diskutiert (Laver et al., 1997; Lamb, 1993).

Die Kalziumsignalausbreitung am Herzmuskel ist Gegenstand intensiver Forschungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprachen denen aus Versuchen an isolierten Herzzellen (Landgraf et al., 2001; Wussling et al. 1997), jedoch wurden Kalziumwellen in einem Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln aus Herzzellen bislang nicht untersucht.

Das Agarose-Gel-System bietet sich für Untersuchungen der Kalziumsignalausbreitung zwischen myokardialen SR-Vesikeln an. Es kann erwartet werden, daß auch in diesem System unterhalb einer kritischen Proteinkonzentration keine Kalziumwellen mehr

auftreten. Entsprechende Experimente wären sehr interessant, weil theoretisch gezeigt wurde, daß eine Zunahme des Abstandes zwischen DHPRs und den angrenzenden RyRs zur Störung der elektromechanischen Kopplung führen kann (Yue, 1997). Untersuchungen von Gómez et al. (1997) am hypertrophen Rattenherzen weisen auf eine Reduktion des Kalziumeinstromes durch DHPRs als Ursache für eine verringerte Kontraktilität hin. Da im Falle des Herzversagens β -Adrenergika keinen Effekt auf die DHPRs mehr haben, könnte nach Meinung des Autors über eine Steigerung der Sensitivität der RyRs gegenüber Kalzium eine ungestörte Signalübertragung von DHPRs auf die RyRs erreicht werden. In einem Agarose-Gel mit eingebetteten SR-Vesikeln des Herzen ließen sich solche Substanzen primär gut untersuchen.

5. Zusammenfassung

In zahlreichen Zelltypen sind Kalziumoszillationen und/oder Kalziumwellen Teil von Signalkaskaden. Wegen ihrer Bedeutung für die Zellfunktion sind beide Phänomene Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. Räumlich-zeitliche Kalziumsignale beruhen auf einer autoregenerativen Kalziumfreisetzung aus diffusionsgekoppelten Kanälen des endo-/sarkoplasmatischen Retikulums, der für die Kalziumspeicherung wichtigsten Zellorganelle.

Im Mittelpunkt der Arbeit standen im wesentlichen zwei Fragestellungen. Erstens, ist es möglich, daß in einem *in vitro*-System aus immobilisierten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) räumlich-zeitliche Kalziumsignale auftreten? Oder anders: Ist die Integrität des Zellinneren mit seinen Organellen und dem Zytoskelett notwendig für die Entstehung propagierender Kalziumwellen? Voraussetzung für die Ausbreitung von Kalziumsignalen ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines sogenannten Reaktions-Diffusions-Systems, und das ist offensichtlich gegeben, wenn man das SR in Form von Vesikeln, homogen oder inhomogen verteilt, in ein konvektionsfreies Trägersystem einbringt. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und geeigneter Kalziumindikatoren gelang es in einem Agarose-Gel mit Vesikeln des SR vom Skelettmuskel des Hausschweins, Kalziumwellen zu beobachten. An Beispielen wurden im artifiziellen SR-Vesikel-System allgemeine Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen wie Asymmetrie der Wellenprofile (steiler Anstieg, flacher Abfall), Auslöschung nach Kollision zweier Wellen infolge Refraktärität, Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Wellen von der Frequenz ihres Auftretens (Dispersionsrelation) und von der Krümmung ihrer Fronten (Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung) dargestellt.

Nachdem die Entstehung von Kalziumwellen gezeigt werden konnte, stellte sich zweitens die Frage, inwieweit die Kalziumsignalausbreitung beeinflußt werden kann. In SR-Vesikel-Clustern (inhomogene Verteilung der mit Kalzium beladenen Vesikel) wurden Kalziumsignale sowohl durch Hemmung der SR-Kalzium-ATPasen als auch durch zusätzliche Einbettung von Mitochondrien modifiziert.

Für Untersuchungen des Einflusses der Vesikeldichte (Proteinkonzentration) und der totalen Kalziumkonzentration auf die Wellengeschwindigkeit, war es erforderlich, SR-Vesikel ohne vorherige Kalziumbeladung homogen in ein Agarose-Gel mit definiertem

Kalziumgehalt einzubetten. Um das „Fenster“ der experimentellen Bedingungen bezüglich der beiden genannten Parameter für das homogene System zu finden, waren umfangreiche Voruntersuchungen nötig. Es wurden im Agarose-Gel mit homogen verteilten SR-Vesikeln neben der Protein- und Kalziumkonzentrationsabhängigkeit der Wellengeschwindigkeit auch der Einfluß von Mitochondrien und gehemmter SR-Kalzium-ATPasen auf die Kalziumsignalausbreitung untersucht.

Zur Charakterisierung der Kalziumwellen wurden Ausbreitungsgeschwindigkeiten und relative Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit von ebenen Kalziumwellen in diesem *in vitro*-System betrug 40 $\mu\text{m/s}$.

Durch Einbettung frisch isolierter Mitochondrien in das System mit SR-Vesikel-Clustern nahmen die Kalziumwellengeschwindigkeit und die relative Fluoreszenzintensität der Wellen statistisch signifikant zu. Eine Applikation von 60 μM Antimycin A, einem Hemmstoff der Atmungskette (Komplex III), machte diese Effekte vollständig rückgängig. Diese Daten entsprechen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen aus Experimenten an Oozyten des Krallenfrosches und Kardiomyozyten der Ratte.

Eine partielle Hemmung der SR-Kalzium-ATPase mit 10 nM Thapsigargin reduzierte die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen im Agarose-Gel mit SR-Vesikel-Clustern und auch im homogenen System statistisch signifikant um 50 bzw. 32 %. Die relative Fluoreszenzintensität der Wellen blieb unverändert. Untersuchungen an isolierten Rattenmyokardzellen ergaben eine vergleichbare Reduktion der Wellengeschwindigkeit nach Thapsigarginapplikation.

Um die Abstände zwischen den SR-Vesikeln zu verändern, wurde die Vesikelproteinkonzentration im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln variiert. Im untersuchten Bereich von 7,23 bis 16,52 mg Protein/ml Gel war die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen von der Proteinkonzentration unabhängig. Wurde die Proteinkonzentration von 7,23 mg/ml Gel jedoch unterschritten, traten keine räumlich-zeitlichen Kalziumsignale auf. Eine Charakterisierung von Kalziumwellen bei einer Proteinkonzentration über 16,52 mg/ml Gel war aus methodischen Gründen nicht möglich.

Der mittlere Abstand zwischen den Zentren der Vesikel ist morphometrisch erfaßbar und wurde für ein SR-Vesikel-Agarose-Gel mit einer Proteinkonzentration von 16,3 mg/ml Gel anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gemessen. Bei einer Vesikelgröße von 172 ± 37 nm (Mittelwert \pm SD) betrug der mittlere Abstand zwischen ihnen 193 ± 53 nm.

Im homogenen System konnten reproduzierbare Kalziumwellen bei totalen Kalziumkonzentrationen von 0,20 bis 0,35 mM beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine glockenförmige Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Kalziumkonzentration mit einem Gipfel bei 0,27 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$.

Die freie Kalziumkonzentration im Agarose-Gel mit kalziumbeladenen SR-Vesikeln wurde mittels ratiometrischer Fluoreszenzmessung im nicht erregten System (außerhalb einer Welle) durchgeführt. Bei einer Vesikelproteinkonzentration von 16,52 mg/ml Gel entsprachen 0,20 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ einer freien Kalziumkonzentration von 10 nM und 0,35 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ einer freien Kalziumkonzentration von 60 nM.

Mitochondrien hatten auf das System mit homogen verteilten SR-Vesikeln unterschiedliche Einflüsse. Die Einbettung von Mitochondrien ins SR-Vesikel-Agarose-Gel bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,30 mM führte dazu, daß keine Kalziumwellen mehr auftraten. Andererseits wurden bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,50 mM im System durch das Einbringen von Mitochondrien räumlich-zeitliche Kalziumsignale überhaupt erst möglich.

Geschwindigkeiten und relative Fluoreszenzintensitäten der Wellen zeigten im SR-Vesikel-Agarose-Gel bei 0,30 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ ohne Mitochondrien und bei 0,50 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot.}}$ mit Mitochondrien keine signifikanten Unterschiede.

Mit Hilfe der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung wurden scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten im homogenen System bestimmt. Für das SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne Mitochondrien betrug er $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und mit Mitochondrien $150 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Während sich diese Werte statistisch signifikant unterschieden, hatten Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeiten keinen Einfluß. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen eher von der Kinetik der Kalziumfreisetzung als von den Diffusionsbedingungen abhängig ist.

Das beschriebene *in vitro*-System eröffnet neue Möglichkeiten, die an das SR gekoppelte Kalziumsignalausbreitung unter Berücksichtigung pathologisch veränderter Ryanodinrezeptoren und auch Mitochondrien zu untersuchen. Veränderungen der mitochondrialen Funktionen, wie sie unter anderem bei neurologischen Erkrankungen gefunden wurden, und Abweichungen vom „normalen“ Ryanodinrezeptor, wie bei der malignen Hyperthermie beschrieben, könnten die Kalziumsignalausbreitung beeinflussen.

In der Literatur wurde gezeigt, daß im Herzmuskel eine Zunahme der Diffusionsstrecke (Abstand zwischen DHPRs und angrenzenden RyRs) zu Störungen der elektromechanischen Kopplung führen kann. Das Agarose-Gel-System bietet sich für Untersuchungen der Kalziumsignalausbreitung zwischen SR-Vesikeln vom Herzmuskel an. Es könnte so versucht werden, einen kritischen Abstand zwischen SR-Vesikeln zu ermitteln, bei dessen weiterer Vergrößerung es zu keiner kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung mehr kommt.

Das artifizielle System zeichnet sich weiter durch leichte Zugänglichkeit für pharmakologische Substanzen aus und bietet wegen seiner relativ großen räumlichen Ausdehnung im Vergleich zu intakten Zellen sehr günstige Meßbedingungen.

Literaturverzeichnis

- Al-Baldawi N.F., Abercrombie R.F. : Calcium diffusion coefficient in Myxicola axoplasm. *Cell Calcium* 17 (1995) 422-430
- Amundson J., Clapham D. : Calcium waves. *Curr Opin Neurobiol* 3 (1993) 375-382
- Berchtold M.W., Brinkmeier H., Müntener M. : Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80/3 (2000) 1215-1265
- Berridge M.J. : Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499/2 (1996) 291-306
- Berridge M. : The AM and FM of calcium signalling. *Nature* 386 (1997) 759-760
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. : Calcium – a life and death signal. *Nature* 395 (1998) 645-648
- Blatter L.A., Hüser J., Rios E. : Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release flux underlying Ca^{2+} sparks in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 4176-4181
- Boitier E., Rea R., Duchen M.R. : Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca^{2+} waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol* 145/4 (1999) 795-808
- Bowling A.C., Beal M.F. : Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 56/14 (1995) 1151-1171
- Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A., Linnemans W.A.M., Nanninga N. : Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* 317 (1985) 748-749
- Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A., Nanninga N. : Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy. *J Microsc* 153/2 (1989) 151-159
- Carafoli E., Brini M. : Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 4/2 (2000) 152-161
- Chen S.R.W., Ebisawa K., Li X., Zhang L. : Molecular identification of the ryanodine receptor Ca^{2+} sensor. *J Biol Chem* 273/24 (1998) 14675-14678
- Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. : Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262 (1993) 740-744

- Ching L.L., Williams A.J., Sitsapesan R. : Evidence for Ca^{2+} activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ Res* 87/3 (2000) 201-206
- Clapham D.E. : Calcium signaling. *Cell* 80/2 (1995) 259-268
- Clapham D.E., Sneyd J. : Intracellular calcium waves. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30 (1995) 1-24
- Conklin M.W., Ahern Ch.A., Vallejo P., Sorrentino V., Takeshima H., Coronado R. : Comparison of Ca^{2+} sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (typ 1 or typ 3). *Biophys J* 78/4 (2000) 1777-1785
- Copello J.A., Barg S., Onoue H., Fleischer S. : Heterogeneity of Ca^{2+} gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J* 73/1 (1997) 141-156
- Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M., Vaughan D.M. : Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266/6 (1994) C1485-C1504
- Currie S., Smith G.L. : Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase typ 2 (SERCA 2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure. *Cardiovasc Res* 41/1 (1999) 135-146
- Duchen M.R., Leyssens A., Crompton M. : Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* 142/4 (1998) 975-988
- Fabiato, A. : Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245/1 (1983) C1-14
- Foerster P., Müller S.C., Hess B. : Curvature and propagation velocity of chemical waves. *Science* 241 (1988) 685-687
- Foerster P., Müller S.C., Hess B. : Critical size and curvature of wave formation in an excitable chemical medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 6831-6834
- Gellerich F.N., Laterveer F.D., Korzeniewski B., Zierz S., Nicolay K. : Dextran strongly increases the Michaelis constants of oxidative phosphorylation and of mitochondrial creatine kinase in heart mitochondria. *Eur J Biochem* 254/1 (1998) 172-180
- Gómez A.M., Valdivia H.H., Cheng H., Lederer M.R., Santana L.F., Cannell M.B., McCune S.A., Altschuld R.A., Lederer W.J. : Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 276 (1997) 800-806
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260/6 (1985) 3440-3450
- Gunter T.E., Pfeiffer D.R. : Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258 (1990) C755-C786

- Györke S., Vélez P, Suárez-Isla B., Fill M. : Activation of single cardiac and skeletal ryanodine receptor channels by flash photolysis of caged Ca^{2+} . *Biophys J* 66/6 (1994) 1876-1886
- Györke I., Györke S. : Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites. *Biophys J* 75/6 (1998) 2801-2810
- Haugland R.P. : Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6. Aufl. Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA., 1996
- Herrmann-Frank A., Lehmann-Horn F. : Regulation of the purified Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor complex of skeletal sarcoplasmic reticulum by luminal calcium. *Pflügers Arch* 432/1 (1996): 155-7
- Ichas F., Jouaville L.S., Mazat J.P. : Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89/7 (1997) 1145-1153
- Inesi G., Sagara Y. : Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. *Arch Biochem Biophys* 298/2 (1992) 313-317
- Ishide N., Urayama K.I., Inoue K.I., Komaru T., Takishima T. : Propagation and collision characteristics of calcium waves in rat myocytes. *Am J Physiol* 259 (1990) H940-H950
- Jouaville L.S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.D. : Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377 (1995) 438-441
- Jouaville L.S., Pinton P., Bastianutto C., Rutter G.A., Rizzuto R. : Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 96/24 (1999) 13807-13812
- Keener J., Sneyd J. : Interdisciplinary applied mathematics, Vol.8, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1998
- Lamb G.D. : Ca^{2+} inactivation, Mg^{2+} inhibition and malignant hyperthermia. *J Muscle Res Cell Motil* 14/6 (1993): 554-556
- Landgraf G., Krannich K., Wussling M.H.P. : Thapsigargin and RU 360 decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes. (eingereicht 2001)
- Laver D.R., Owen V.J., Junankar P.R., Taske N.L., Dulhunty A.F., Lamb G.D. : Reduced inhibitory effect of Mg^{2+} on ryanodine receptor- Ca^{2+} release channels in malignant hyperthermia. *Biophys J* 73/4 (1997) : 1913-1924
- Laver D.R., Lamb G.D. : Inactivation of Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors RyR1 and RyR2) with rapid steps in $[\text{Ca}^{2+}]$ and voltage. *Biophys J* 74/5 (1998) 2352-2364
- Lechleiter J.D., Girard S., Peralta E., Clapham D. : Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* 252 (1991) 123- 126

- Lechleiter J.D., John L.M., Camacho P. : Ca^{2+} wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overpressing Ca^{2+} ATPases. *Biophys Chem* 72 (1998) 123-129
- Lipp P., Niggli E. : Ratiometric confocal Ca^{2+} -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calcium* 14 (1993) 359-372
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1951) 265 – 275
- Lukyanenko V., Wiesner T.F., Györke S. : Termination of Ca^{2+} -release during Ca^{2+} sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 507/3 (1998) 667-677
- Lukyanenko V., Subramanian S., Györke I., Wiesner T.F., Györke S. : The role of luminal Ca^{2+} in the generation of Ca^{2+} waves in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 518/1 (1999) 173-186
- Mickelson J.R., Ross J.A., Reed B.K., Louis C.F. : Enhanced Ca^{2+} -induced calcium release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle. *Biochim Biophys Acta* 862/2 (1986) 318-328
- Misquitta C.M., Mack D.P., Grover A.K. : Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25/4 (1999) 277-290
- Niggli E. : Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annu Rev Physiol* 61 (1999) 311-35
- Ramos-Franco J., Fill M., Mignery G.A. : Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-triphosphate receptor channels. *Biophys J* 75/2 (1998) 834-839
- Rawle A. : The basic principles of particle size analysis. Firmenschrift von Malvern Instruments Ltd., Spring Lane South, Malvern, Worcs.
- Richter M., Schleithoff L., Deufel T., Lehmann-Horn F., Herrmann-Frank A. : Functional characterization of a distinct ryanodine receptor mutation in human malignant hyperthermia-susceptible muscle. *J Biol Chem* 272/8 (1997) 5256-5260
- Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. : Mitochondria as all-round players of calcium game. *J Physiol* 529/1 (2000) 37-47
- Szalai G., Csordas G., Hantash B.M., Thomas A.P., Hajnoczky G. : Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem* 275/20 (2000) 15305-15313
- Schiefer A., Meissner G., Isenberg G. : Ca^{2+} activation and Ca^{2+} inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels. *J Physiol* 489/2 (1995) 337-348

- Sims N.R. : Calcium, energy metabolism and the development of selective neuronal loss following short-term cerebral ischemia. *Metab Brain Dis* 10/3 (1995) 191-217
- Treiman M., Caspersen C., Christensen S.B. : A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 19/4 (1998) 131-135
- Winfree A.T. : The geometry of biological time. Springer, Berlin, Heidelberg, 1990
- Wussling M.H.P., Salz H. : Nonlinear propagation of spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 70 (1996) 1144-1153
- Wussling M.H.P., Scheufler K., Schmerling S., Drygalla V. : Velocity-curvature relationship of colliding spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 73 (1997) 1232-1242
- Wussling M.H.P., Mair T. : Calcium waves in rat cardiac myocytes underlie the principles of self-organization in excitable media. In: S.C. Müller, Parisi J., Zimmermann W. (eds.) : Transport and structure: their competitive roles in biophysics and chemistry; Lecture notes in physics; Vol. 532; Springer, Berlin, Heidelberg, New York usw.; 1999, S. 151-163
- Wussling M.H.P., Krannich K., Landgraf G., Herrmann-Frank A., Wiedenmann D., Gellerich F.N., Podhaisky H. : Sarcoplasmic reticulum vesicles embedded in agarose gel exhibit propagating calcium waves. *FEBS Letters* 463 (1999) 103-109
- Wussling M.H.P., Krannich K., Drygalla V., Podhaisky H. : Calcium waves in agarose gel with cell organelles – implications of the velocity curvature relationship. (eingereicht 2001)
- Xu L., Meissner G. : Regulation of cardiac muscle Ca^{2+} release channel by sarcoplasmic reticulum luminal Ca^{2+} . *Biophys J* 75/5 (1998) 2302-2312
- Yue D.T. : Quenching the spark in the heart. *Science* 276 (1997) 755-756
- Zykov V.S., Morozova O.L. : Speed of spread of excitation in a two-dimensional excitable medium. *Biophysics* 24 (1980 a) 739-744
- Zykov V.S. : Analytical evaluation of the dependence of the speed of an excitation wave in a two-dimensional excitable medium on the curvature of its front. *Biophysics* 25 (1980 b) 906-911

Thesen

1.) Das endoplasmatische Retikulum (ER) vieler Zellen ganz unterschiedlicher Spezies ist mit „Quellen“ und „Senken“ für Kalziumionen ausgestattet. Sind Kalziumionen freigesetzt, diffundieren sie zu benachbarten Freisetzungskanälen und induzieren eine weitere Kalziumfreisetzung. Als Begleiterscheinung autoregenerativer, zeitlich-räumlicher Prozesse können Kalziumwellen entstehen. Im Rücken einer Wellenfront geht die Konzentration des freien, extraretikulären Kalziums wieder zurück, weil es durch Kalzium-ATPasen in das ER, in dem eine etwa 10000fach höhere Kalziumkonzentration als im Zytosol erreicht werden kann, zurückgepumpt wird.

2.) In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß für „kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung“ die Integrität einer Zelle mit ihren Organellen und dem Zytoskelett nicht unbedingt erforderlich ist. Notwendige Voraussetzung für das Entstehen propagierender Kalziumsignale ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines sogenannten Reaktions-Diffusions-Systems. Das ist offensichtlich gegeben, wenn man sarkoplasmatisches Retikulum (SR) isoliert und in Form von Vesikeln, inhomogen oder homogen verteilt, in ein konvektionsfreies Trägersystem (Agarose-Gel) einbettet.

3.) Das von uns entwickelte und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersuchte Agarose-Gel-System mit eingebetteten Vesikeln des SR vom Skelettmuskel zeigt typische Eigenschaften erregbarer Medien, die auch an isolierten Zellen (z.B. Oozyten, Kardiomyozyten) nachweisbar sind:

- a.) Asymmetrie der Kalziumwellenprofile (steiler Anstieg, flacher Abfall);
- b.) Auslöschung kollidierender Kalziumwellen infolge Refraktärität;
- c.) Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der Frequenz der Signalentstehung (Dispersionsrelation);
- d.) Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Krümmung der Wellenfront (Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation).

4.) In Clustern von kalziumbeladenen SR-Vesikeln (inhomogenes System) war die Kalziumsignalausbreitung mit einer Geschwindigkeit von etwa 40 $\mu\text{m/s}$ wesentlich schneller als bei reiner Diffusion (nur wenige $\mu\text{m/s}$ außerhalb des erregbaren Mediums). Durch zusätzliche Einbettung intakter Mitochondrien kam es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität der Welle und der Ausbreitungsgeschwindigkeit (letztere auf etwa 60 $\mu\text{m/s}$). Nach Applikation von Antimycin A, einem Hemmstoff der Atmungskette, konnte dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden.

5.) Zur Untersuchung des Einflusses von Vesikelprotein- und Kalziumkonzentration auf die Kalziumsignalausbreitung war es erforderlich, unbeladene SR-Vesikel möglichst homogen im Agarose-Gel einzubetten. Im homogenen System traten Kalziumwellen nur dann auf, wenn die Proteinkonzentration größer als 7,23 mg/ml Gel war und die totale Kalziumkonzentration zwischen 0,20 und 0,35 mM (entsprechend $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ von 10 nM bis 60 nM) gewählt wurde. Die Kalziumabhängigkeit der Geschwindigkeit ebener Kalziumwellen erwies sich als glockenförmig mit einem Gipfel bei 0,27 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$.

6.) Mitochondrien hatten auf das System mit homogen verteilten SR-Vesikeln unterschiedliche Einflüsse. Die Einbettung von Mitochondrien ins SR-Vesikel-Agarose-Gel bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,30 mM führte dazu, daß keine Kalziumwellen mehr auftraten. Andererseits wurden bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,50 mM im System durch das Einbringen von Mitochondrien räumlich-zeitliche Kalziumsignale überhaupt erst möglich. Diese Beobachtungen zeigten deutlich, daß Mitochondrien als Kalziumpuffer die Kalziumsignalausbreitung beeinflussen, und in Abhängigkeit von der aktuellen extravesikulären Kalziumkonzentration sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung des „ Ca^{2+} -Signaling“ bewirken können.

7.) Eine Applikation von Thapsigargin (10 nM), einem Hemmstoff der SR-Kalzium-ATPase, führte zu einer Senkung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen im homogenen wie auch im inhomogenen SR-Vesikel-Agarose-Gel. Die Effekte waren statistisch signifikant und entsprachen den Ergebnissen aus vergleichbaren Untersuchungen an Rattenmyokardzellen, die unabhängig von dieser Arbeit erfolgten.

8.) Mit Hilfe der Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation ($N = c - 2D \cdot K$, wobei mit N die Geschwindigkeit der gekrümmten, mit c die der ebenen Welle, mit D der scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizient und mit K die Krümmung der Wellenfront bezeichnet wird) wurden die Diffusionsverhältnisse näher charakterisiert. D betrug im homogenen System ohne Mitochondrien $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und in deren Anwesenheit $150 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Während sich diese Werte statistisch signifikant unterschieden, war ein Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen im homogenen System nicht nachweisbar. Es liegt nahe anzunehmen, daß die Geschwindigkeit des „ Ca^{2+} -Signaling“ eher von der Kinetik der Kalziumfreisetzung als von den Diffusionsbedingungen bestimmt wird.

9.) Das vorgestellte *in vitro*-System eröffnet neue Möglichkeiten, die Entstehung elementarer Kalziumsignale, wie Ca^{2+} -Sparks und Ca^{2+} -Quarks, und ihre Ausbreitung unabhängig vom Einfluß der Zellmembran zu untersuchen. Es zeichnet sich durch leichte Zugänglichkeit für pharmakologische Substanzen aus, kann z.B. durch Hinzufügen von Mitochondrien (intakt oder pathologisch verändert) erweitert werden, bietet eine Möglichkeit der Veränderung von Diffusionsstrecken durch Variation der SR-Vesikeldichte (wichtig wahrscheinlich für die Simulation des „ Ca^{2+} -Signaling“ bei Myokardhypertrophie) und bietet wegen seiner relativ großen räumlichen Ausdehnung im Vergleich zu intakten Zellen sehr günstige Meßbedingungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name	Krannich
Vorname	Kirsten
Geburtsdatum	26.06.1967
Geburtsort	Greifswald
Familienstand	ledig
Kind	Anne, geb. 6.09.1994
Nationalität	deutsch
Wohnung	Parkstr.20 06108 Halle

Schulbildung :

1974 – 1984	11. Polytechnische Oberschule Greifswald
1984 – 1986	Erweiterte Oberschule „F.-L.-Jahn“ Greifswald
Mai 1986	Abitur

Studium :

Sep. 1986 - Aug. 1987	Vorpraktikum in der Chirurgischen Universitätsklinik Greifswald
Sep. 1987 - Aug. 1992	Medizinstudium an der Medizinischen Akademie Magdeburg
Jan. - Mai 1992	Staatsexamen

Okt. 1992 - Sep. 1993 Praktisches Jahr an der Medizinischen
Akademie Magdeburg in den Fachrichtungen:
- Chirurgie (Prof. P. Heinrich)
- Innere Medizin (Prof. H. Klein)
- Gynäkologie (Prof. W. Weise)

Berufliche Tätigkeiten:

Okt. 1993 - Okt. 1994 Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der
Universitätsfrauenklinik Magdeburg
(Prof. W. Weise)

Nov. 1994 - Juni 1995 Erziehungsurlaub

Juli 1995 - Jan. 1996 Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der
Universitätsfrauenklinik Magdeburg
(Prof. W. Weise)

Feb. 1996 - März 1996 ohne Tätigkeit

April 1996 - Mai 1996 Urlaubsvertretung
Plasmazentrum Halle, Baxter GmbH

Juni 1996 - Jan. 1997 ohne Tätigkeit

seit Febr. 1997 Tätigkeit als wissenschaftl. Mitarbeiter am Julius-
Bernstein-Institut der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Halle, 30. März 2001

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle, 30. März 2001

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Wussling M.H.P., Krannich K., Landgraf G., Hermann-Frank A., Wiedenmann D., Gellerich F.N., Podhaisky H. : Sarcoplasmic reticulum vesicles embedded in agarose gel exhibit propagating calcium waves. FEBS Letters 463 (1999) 103-109

Wussling M.H.P., Krannich K., Drygalla V., Podhaisky H. : Calcium waves in agarose gel with cell organelles – implication of the velocity curvature relationship. Biophys J (2001 eingereicht)

Krannich K., Wiedenmann D., Herrman-Frank A., Wussling M.H.P. : Spatiotemporal Ca^{2+} -signals in a SR vesicles agarose gel. Pflügers Arch 437/5[Suppl] (1999) R 194

Krannich K., Gellerich F.N., Podhaisky H., Wussling M.H.P. : Spatiotemporal calcium patterns in reconstituted cell organelles. Biophys J 78/1 (2000) 15 A

Krannich K., Podhaisky H., Wussling M.H.P. : Modulation of calcium wave patterns in a sarcoplasmic vesicles agarose gel system. Pflügers Arch 439/6[Suppl] (2000) R 417

Wussling M.H.P., Krannich K., Landgraf G., Opalka J.R., Podhaisky H., Gellerich F.N. : Mitochondria influence spatiotemporal calcium patterns in a sarcoplasmic reticulum vesicle agarose gel. Eur J Med Res 5[Suppl I] (2000) L 37

Krannich K., Wussling M.H.P. : Calcium wavespeed and diffusion coefficient in agarose gel with suspended SR vesicles. Influence of mitochondria. Biophys J 80/1 (2001) 609 a

Krannich K., Wussling M.H.P. : Influence of diffusion on calcium signalling between gel-immobilized cell organelles. Pflügers Arch 441/6[Suppl] (2001) R 188

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, daß ich keine früheren Promotionsversuche weder mit dieser noch mit einer anderen Arbeit unternommen habe.

Halle, 30. März 2001

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle **Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. M. Wußling** für seine engagierte und hilfreiche Betreuung meiner Arbeit danken. Durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen, sowie durch das konstruktive Arbeitsklima förderte er wesentlich das Zustandekommen dieser Arbeit.

Bei **Fr. K Hendrich** bedanke ich mich für die zuverlässigen Versuchsvorbereitungen und für hilfreiche Zuarbeiten besonders bei der Literaturrecherche.

Fr. Dr. A. Herrmann-Frank und **Herrn D. Wiedenmann** danke ich vor allem für die Präparationen der Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums.

Herrn PD F. Gellerich und **Herrn Dr. J. Opalka** danke ich besonders für die Präparation der Mitochondrien.

Weiterhin möchte ich **Fr. Dr. Grit Landgraf** für eine gute Zusammenarbeit, ihren fachlichen Rat und hilfreiche Diskussionen der Versuchsergebnisse danken.

Abschließend möchte ich mich bei allen **Mitarbeiterinnen** und **Mitarbeitern** des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie für die Hilfe und gute Zusammenarbeit sehr herzlich bedanken.