

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