

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.