

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.).

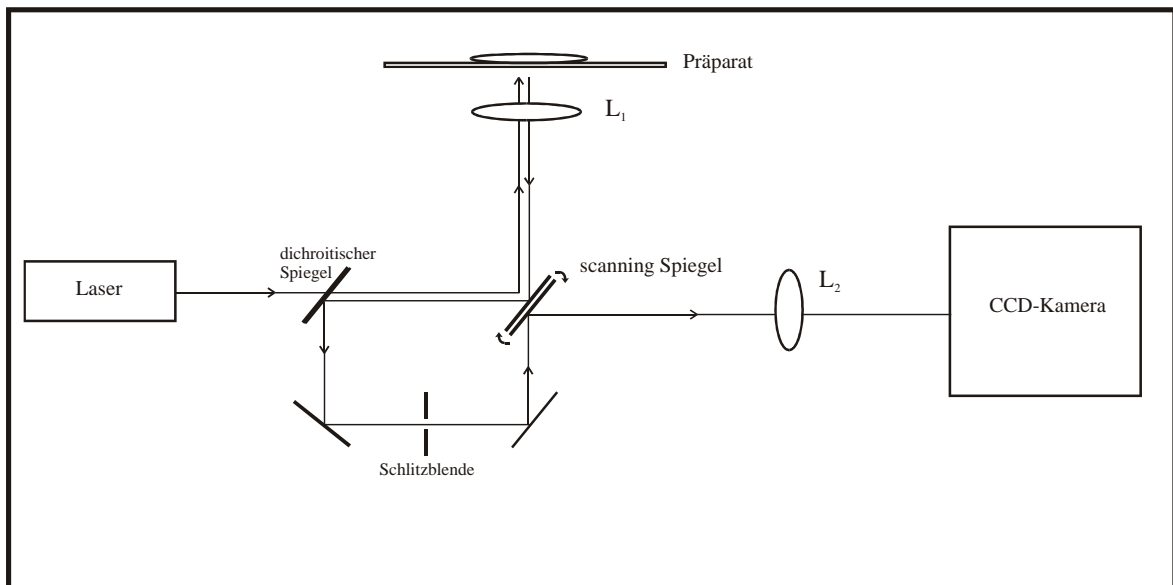


Abbildung 1 Strahlengang im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

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.

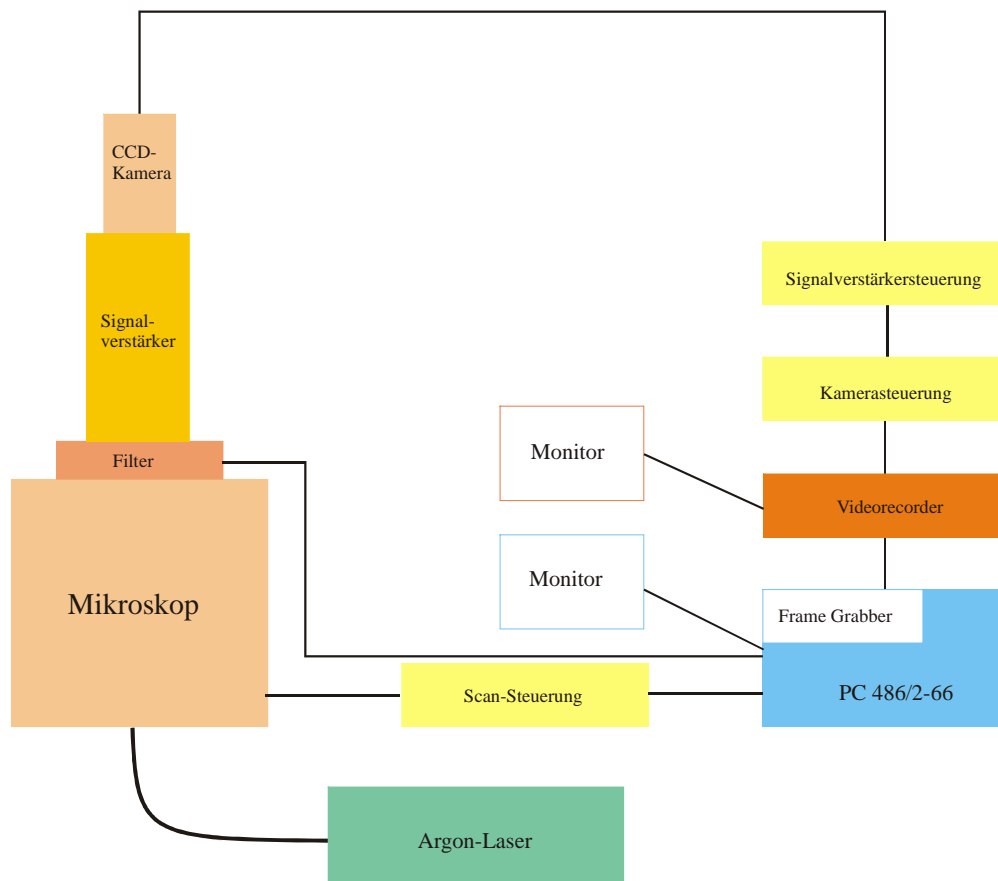


Abbildung 2 Schematischer Meßplatzaufbau

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 Mitochondrien-einbettung) 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.

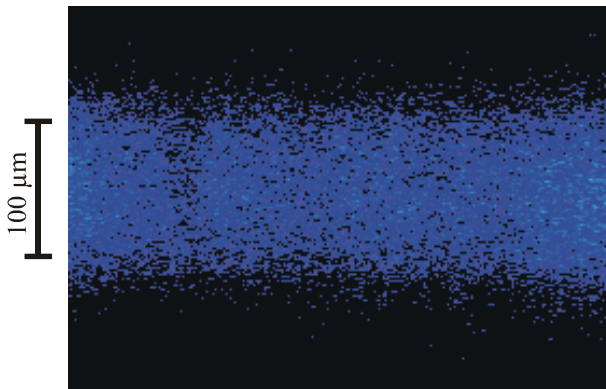


Abbildung 3 Vertikaler Schnitt (x-z-Schnitt) durch das SR-Vesikel-Agarose-Gel

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.

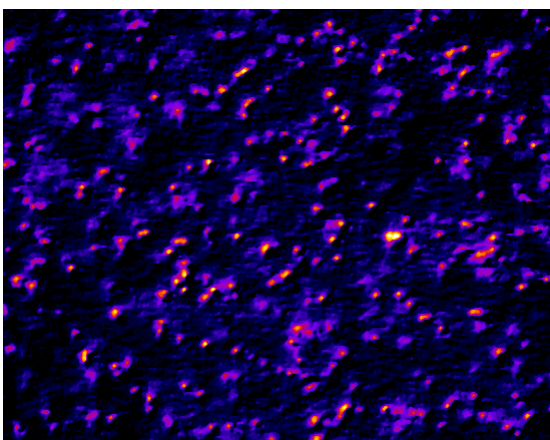


Abbildung 4 Agarose-Gel mit eingebetteten fluoreszierenden Partikeln

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.

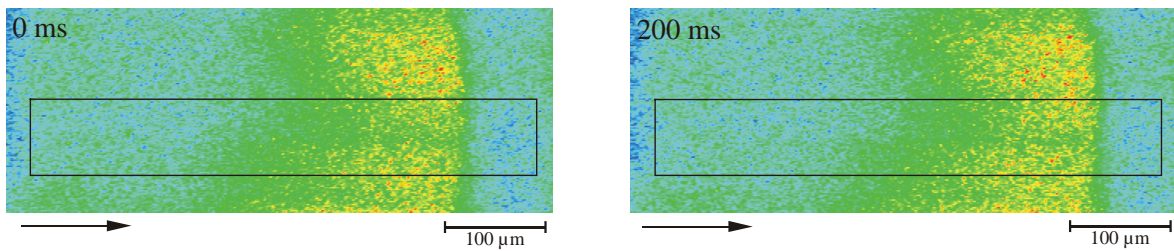


Abbildung 5

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.

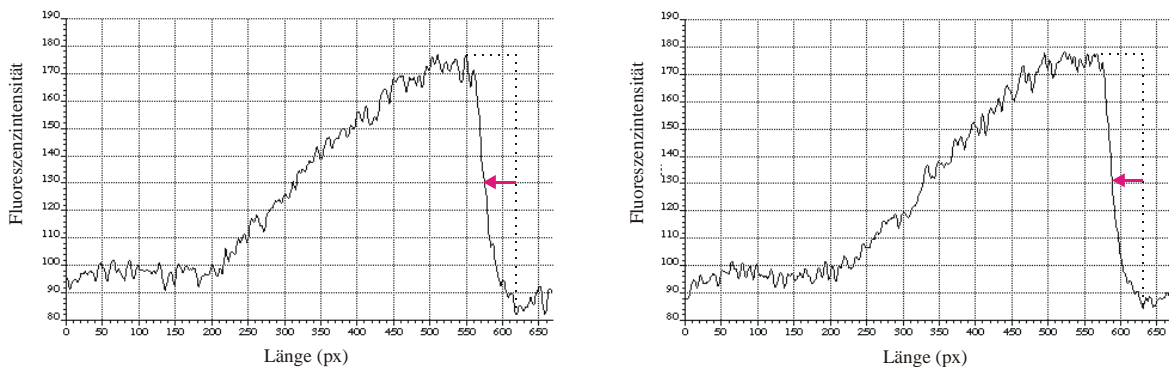


Abbildung 6

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 x 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.

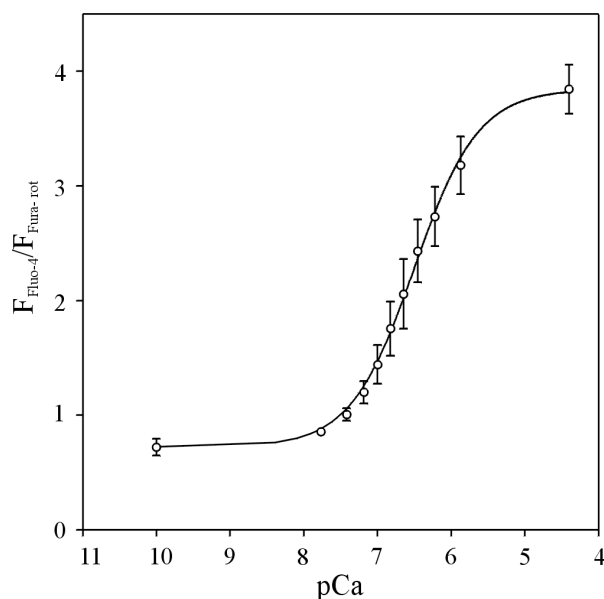


Abbildung 7 Kalibrierungskurve für das Kalziumindikatorgemisch Fluo-4/Fura-rot (im Verhältnis 1:5) am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

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.

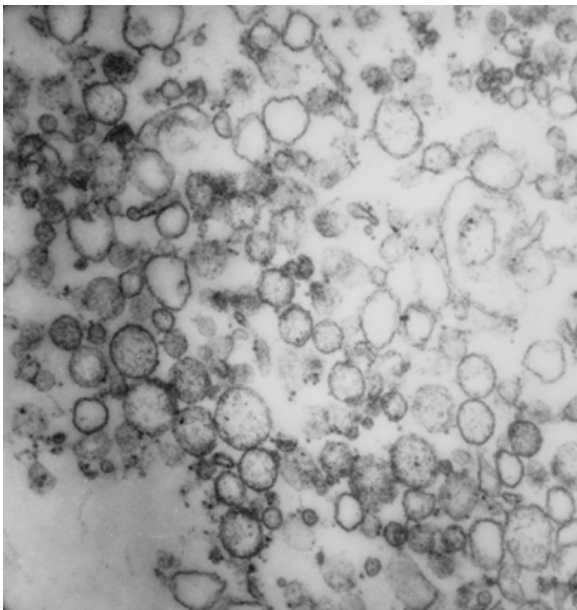


Abbildung 8 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SR-Vesikel-Agarose-Gels (30000fach)

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