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 µm 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 μ m/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 μ m/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

$$N = c - D^*K \tag{3}$$

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) :

$$N = c - 2D^*K \tag{4}$$

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 haupsächlich 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 Geschwindigsind die keitsdaten 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 μ 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 Koffeinlösung (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 CaCl₂-benetzten Papierstreifens mit dem Agarose-Gel Kalziumwellen stimuliert werden.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellen in SR-Vesikel-Clustern betrug im Mittel rund 40 μ 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 verzögertern 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: $v = 56 \,\mu$ m/s (Kontrolle)

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

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

Bezüglich der Frequenz, mit der diese Wellen nach Thapsigargineinwirkung 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 µl 60 µM 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 μ m.

Ausbreitungsgeschwindigkeit in A ca. 50 μ m/s und in B ca. 100 μ m/s (mit kleinen Unterschieden gemessen in (a) oder (b).

Die relative Fluoreszenzintensität der Wellen (Δ 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 ± SD in µm/s)	ΔF/F der Wellen (Mittelwert ± 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 ± 12,9* (n = 20)	$2,8 \pm 1,7^{**} (n = 8)$
SR-Vesikel-Agarose-Gel + Mitochondrien und + Antimycin A (60 µM)	40,9 ± 10,1* (n = 20)	$0.9 \pm 0.3^{**} (n = 8)$

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

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

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

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. Abbildung Mittelwerte In 18A sind die der 6 Ausbreitungsgeschwindigkeiten von Kalziumwellen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (7,23 mg/ml – 16,52 mg/ml Gel) in Abhängigkeit von der totalen Kalziumkonzentration dargestellt. Bei fester Kalziumkonzentration zeigte sich kein signifikanter Proteinkonzentration auf statistisch Einfluß der 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 Furarot) 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 Ansteig 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 ($n \ge 6$) 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; r² = 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 µm/s bei 0,27 mM [Ca]_{tot.} erreicht.

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

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 ($n \ge 6$) 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.).





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

Tabelle 2Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten und der relativen Fluoreszenzintensitäten derKalziumwellen im Agarose-Gel mit homogen eingebetetten SR-Vesikeln vor und nach Applikation von10 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. Kalziumwellen auftraten. Vermutlich ist 0.30 keine bei mМ [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 ± SD in µm/s)
Α			
SR-Vesikel	16,30		36,91 ± 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	$33,44 \pm 4,74 (n = 5)$
В			
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 Ca²⁺-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*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: $D = 151 \,\mu m^2/s$; $R_{krit} = 5.8 \,\mu m$ und $c = 28.1 \,\mu m/s$.

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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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*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 μ m ² /s)	Geschwindigkeit ebener Wellen c (Mittelwert \pm SD in μ m/s)	Kritischer Radius \mathbf{R}_{krit} (Mittelwert ± SD in μ m)
SR-Vesikel-Agarose- Gel (n = 18)	215,4 ± 75,4*	45,7 ± 12,4	11,2 ± 7,1
SR-Vesikel-Agarose- Gel + Mitochondrien (n = 12)	149,1 ± 84,2*	43,0 ± 14,4	8,3 ± 4,7

 $\label{eq:kinetic} \begin{array}{l} \textbf{Tabelle 4} & \text{Mittelwerte} \pm \text{SD der Parameter D, c und } R_{krit} \text{, die durch lineare Regression mit} \\ N = c\text{-}2D^*K \text{ ermittelt wurden.} \end{array}$

Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant (p < 0,01; t-Test).