

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.