

5. Zusammenfassung

In zahlreichen Zelltypen sind Kalziumoszillationen und/oder Kalziumwellen Teil von Signalkaskaden. Wegen ihrer Bedeutung für die Zellfunktion sind beide Phänomene Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. Räumlich-zeitliche Kalziumsignale beruhen auf einer autoregenerativen Kalziumfreisetzung aus diffusionsgekoppelten Kanälen des endo-/sarkoplasmatischen Retikulums, der für die Kalziumspeicherung wichtigsten Zellorganelle.

Im Mittelpunkt der Arbeit standen im wesentlichen zwei Fragestellungen. Erstens, ist es möglich, daß in einem *in vitro*-System aus immobilisierten Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) räumlich-zeitliche Kalziumsignale auftreten? Oder anders: Ist die Integrität des Zellinneren mit seinen Organellen und dem Zytoskelett notwendig für die Entstehung propagierender Kalziumwellen? Voraussetzung für die Ausbreitung von Kalziumsignalen ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines sogenannten Reaktions-Diffusions-Systems, und das ist offensichtlich gegeben, wenn man das SR in Form von Vesikeln, homogen oder inhomogen verteilt, in ein konvektionsfreies Trägersystem einbringt. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und geeigneter Kalziumindikatoren gelang es in einem Agarose-Gel mit Vesikeln des SR vom Skelettmuskel des Hausschweins, Kalziumwellen zu beobachten. An Beispielen wurden im artifiziellen SR-Vesikel-System allgemeine Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen wie Asymmetrie der Wellenprofile (steiler Anstieg, flacher Abfall), Auslöschung nach Kollision zweier Wellen infolge Refraktärität, Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Wellen von der Frequenz ihres Auftretens (Dispersionsrelation) und von der Krümmung ihrer Fronten (Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung) dargestellt.

Nachdem die Entstehung von Kalziumwellen gezeigt werden konnte, stellte sich zweitens die Frage, inwieweit die Kalziumsignalausbreitung beeinflußt werden kann. In SR-Vesikel-Clustern (inhomogene Verteilung der mit Kalzium beladenen Vesikel) wurden Kalziumsignale sowohl durch Hemmung der SR-Kalzium-ATPasen als auch durch zusätzliche Einbettung von Mitochondrien modifiziert.

Für Untersuchungen des Einflusses der Vesikeldichte (Proteinkonzentration) und der totalen Kalziumkonzentration auf die Wellengeschwindigkeit, war es erforderlich, SR-Vesikel ohne vorherige Kalziumbeladung homogen in ein Agarose-Gel mit definiertem

Kalziumgehalt einzubetten. Um das „Fenster“ der experimentellen Bedingungen bezüglich der beiden genannten Parameter für das homogene System zu finden, waren umfangreiche Voruntersuchungen nötig. Es wurden im Agarose-Gel mit homogen verteilten SR-Vesikeln neben der Protein- und Kalziumkonzentrationsabhängigkeit der Wellengeschwindigkeit auch der Einfluß von Mitochondrien und gehemmter SR-Kalzium-ATPasen auf die Kalziumsignalausbreitung untersucht.

Zur Charakterisierung der Kalziumwellen wurden Ausbreitungsgeschwindigkeiten und relative Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit von ebenen Kalziumwellen in diesem *in vitro*-System betrug 40 $\mu\text{m/s}$.

Durch Einbettung frisch isolierter Mitochondrien in das System mit SR-Vesikel-Clustern nahmen die Kalziumwellengeschwindigkeit und die relative Fluoreszenzintensität der Wellen statistisch signifikant zu. Eine Applikation von 60 μM Antimycin A, einem Hemmstoff der Atmungskette (Komplex III), machte diese Effekte vollständig rückgängig. Diese Daten entsprechen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen aus Experimenten an Oozyten des Krallenfrosches und Kardiomyozyten der Ratte.

Eine partielle Hemmung der SR-Kalzium-ATPase mit 10 nM Thapsigargin reduzierte die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen im Agarose-Gel mit SR-Vesikel-Clustern und auch im homogenen System statistisch signifikant um 50 bzw. 32 %. Die relative Fluoreszenzintensität der Wellen blieb unverändert. Untersuchungen an isolierten Rattenmyokardzellen ergaben eine vergleichbare Reduktion der Wellengeschwindigkeit nach Thapsigarginapplikation.

Um die Abstände zwischen den SR-Vesikeln zu verändern, wurde die Vesikelproteinkonzentration im Agarose-Gel mit homogen eingebetteten SR-Vesikeln variiert. Im untersuchten Bereich von 7,23 bis 16,52 mg Protein/ml Gel war die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen von der Proteinkonzentration unabhängig. Wurde die Proteinkonzentration von 7,23 mg/ml Gel jedoch unterschritten, traten keine räumlich-zeitlichen Kalziumsignale auf. Eine Charakterisierung von Kalziumwellen bei einer Proteinkonzentration über 16,52 mg/ml Gel war aus methodischen Gründen nicht möglich.

Der mittlere Abstand zwischen den Zentren der Vesikel ist morphometrisch erfaßbar und wurde für ein SR-Vesikel-Agarose-Gel mit einer Proteinkonzentration von 16,3 mg/ml Gel anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gemessen. Bei einer Vesikelgröße von 172 ± 37 nm (Mittelwert \pm SD) betrug der mittlere Abstand zwischen ihnen 193 ± 53 nm.

Im homogenen System konnten reproduzierbare Kalziumwellen bei totalen Kalziumkonzentrationen von 0,20 bis 0,35 mM beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine glockenförmige Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Kalziumkonzentration mit einem Gipfel bei 0,27 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$.

Die freie Kalziumkonzentration im Agarose-Gel mit kalziumbeladenen SR-Vesikeln wurde mittels ratiometrischer Fluoreszenzmessung im nicht erregten System (außerhalb einer Welle) durchgeführt. Bei einer Vesikelproteinkonzentration von 16,52 mg/ml Gel entsprachen 0,20 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$ einer freien Kalziumkonzentration von 10 nM und 0,35 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$ einer freien Kalziumkonzentration von 60 nM.

Mitochondrien hatten auf das System mit homogen verteilten SR-Vesikeln unterschiedliche Einflüsse. Die Einbettung von Mitochondrien ins SR-Vesikel-Agarose-Gel bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,30 mM führte dazu, daß keine Kalziumwellen mehr auftraten. Andererseits wurden bei einer totalen Kalziumkonzentration von 0,50 mM im System durch das Einbringen von Mitochondrien räumlich-zeitliche Kalziumsignale überhaupt erst möglich.

Geschwindigkeiten und relative Fluoreszenzintensitäten der Wellen zeigten im SR-Vesikel-Agarose-Gel bei 0,30 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$ ohne Mitochondrien und bei 0,50 mM $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$ mit Mitochondrien keine signifikanten Unterschiede.

Mit Hilfe der Geschwindigkeits-Krümmungs-Beziehung wurden scheinbare Ca^{2+} -Diffusionskoeffizienten im homogenen System bestimmt. Für das SR-Vesikel-Agarose-Gel ohne Mitochondrien betrug er $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und mit Mitochondrien $150 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Während sich diese Werte statistisch signifikant unterschieden, hatten Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeiten keinen Einfluß. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwellen eher von der Kinetik der Kalziumfreisetzung als von den Diffusionsbedingungen abhängig ist.

Das beschriebene *in vitro*-System eröffnet neue Möglichkeiten, die an das SR gekoppelte Kalziumsignalausbreitung unter Berücksichtigung pathologisch veränderter Ryanodinrezeptoren und auch Mitochondrien zu untersuchen. Veränderungen der mitochondrialen Funktionen, wie sie unter anderem bei neurologischen Erkrankungen gefunden wurden, und Abweichungen vom „normalen“ Ryanodinrezeptor, wie bei der malignen Hyperthermie beschrieben, könnten die Kalziumsignalausbreitung beeinflussen.

In der Literatur wurde gezeigt, daß im Herzmuskel eine Zunahme der Diffusionsstrecke (Abstand zwischen DHPRs und angrenzenden RyRs) zu Störungen der elektromechanischen Kopplung führen kann. Das Agarose-Gel-System bietet sich für Untersuchungen der Kalziumsignalausbreitung zwischen SR-Vesikeln vom Herzmuskel an. Es könnte so versucht werden, einen kritischen Abstand zwischen SR-Vesikeln zu ermitteln, bei dessen weiterer Vergrößerung es zu keiner kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung mehr kommt.

Das artifizielle System zeichnet sich weiter durch leichte Zugänglichkeit für pharmakologische Substanzen aus und bietet wegen seiner relativ großen räumlichen Ausdehnung im Vergleich zu intakten Zellen sehr günstige Meßbedingungen.