

## Thesen

1.) Das endoplasmatische Retikulum (ER) vieler Zellen ganz unterschiedlicher Spezies ist mit „Quellen“ und „Senken“ für Kalziumionen ausgestattet. Sind Kalziumionen freigesetzt, diffundieren sie zu benachbarten Freisetzungskanälen und induzieren eine weitere Kalziumfreisetzung. Als Begleiterscheinung autoregenerativer, zeitlich-räumlicher Prozesse können Kalziumwellen entstehen. Im Rücken einer Wellenfront geht die Konzentration des freien, extraretikulären Kalziums wieder zurück, weil es durch Kalzium-ATPasen in das ER, in dem eine etwa 10000fach höhere Kalziumkonzentration als im Zytosol erreicht werden kann, zurückgepumpt wird.

2.) In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß für „kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung“ die Integrität einer Zelle mit ihren Organellen und dem Zytoskelett nicht unbedingt erforderlich ist. Notwendige Voraussetzung für das Entstehen propagierender Kalziumsignale ist das Vorhandensein eines erregbaren Mediums, eines sogenannten Reaktions-Diffusions-Systems. Das ist offensichtlich gegeben, wenn man sarkoplasmatisches Retikulum (SR) isoliert und in Form von Vesikeln, inhomogen oder homogen verteilt, in ein konvektionsfreies Trägersystem (Agarose-Gel) einbettet.

3.) Das von uns entwickelte und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersuchte Agarose-Gel-System mit eingebetteten Vesikeln des SR vom Skelettmuskel zeigt typische Eigenschaften erregbarer Medien, die auch an isolierten Zellen (z.B. Oozyten, Kardiomyozyten) nachweisbar sind:

- a.) Asymmetrie der Kalziumwellenprofile (steiler Anstieg, flacher Abfall);
- b.) Auslöschung kollidierender Kalziumwellen infolge Refraktärität;
- c.) Abhängigkeit der Wellengeschwindigkeit von der Frequenz der Signalentstehung (Dispersionsrelation);
- d.) Abhängigkeit der Ausbreitungsgeschwindigkeit von der Krümmung der Wellenfront (Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation).

4.) In Clustern von kalziumbeladenen SR-Vesikeln (inhomogenes System) war die Kalziumsignalausbreitung mit einer Geschwindigkeit von etwa 40  $\mu\text{m/s}$  wesentlich schneller als bei reiner Diffusion (nur wenige  $\mu\text{m/s}$  außerhalb des erregbaren Mediums). Durch zusätzliche Einbettung intakter Mitochondrien kam es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität der Welle und der Ausbreitungsgeschwindigkeit (letztere auf etwa 60  $\mu\text{m/s}$ ). Nach Applikation von Antimycin A, einem Hemmstoff der Atmungskette, konnte dieser Effekt wieder rückgängig gemacht werden.

5.) Zur Untersuchung des Einflusses von Vesikelprotein- und Kalziumkonzentration auf die Kalziumsignalausbreitung war es erforderlich, unbeladene SR-Vesikel möglichst homogen im Agarose-Gel einzubetten. Im homogenen System traten Kalziumwellen nur dann auf, wenn die Proteinkonzentration größer als 7,23 mg/ml Gel war und die totale Kalziumkonzentration zwischen 0,20 und 0,35 mM (entsprechend  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$  von 10 nM bis 60 nM) gewählt wurde. Die Kalziumabhängigkeit der Geschwindigkeit ebener Kalziumwellen erwies sich als glockenförmig mit einem Gipfel bei 0,27 mM  $[\text{Ca}]_{\text{tot}}$ .

6.) 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. Diese Beobachtungen zeigten deutlich, daß Mitochondrien als Kalziumpuffer die Kalziumsignalausbreitung beeinflussen, und in Abhängigkeit von der aktuellen extravesikulären Kalziumkonzentration sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung des „ $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling“ bewirken können.

7.) Eine Applikation von Thapsigargin (10 nM), einem Hemmstoff der SR-Kalzium-ATPase, führte zu einer Senkung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen im homogenen wie auch im inhomogenen SR-Vesikel-Agarose-Gel. Die Effekte waren statistisch signifikant und entsprachen den Ergebnissen aus vergleichbaren Untersuchungen an Rattenmyokardzellen, die unabhängig von dieser Arbeit erfolgten.

8.) Mit Hilfe der Geschwindigkeits-Krümmungs-Relation ( $N = c - 2D \cdot K$ , wobei mit  $N$  die Geschwindigkeit der gekrümmten, mit  $c$  die der ebenen Welle, mit  $D$  der scheinbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Diffusionskoeffizient und mit  $K$  die Krümmung der Wellenfront bezeichnet wird) wurden die Diffusionsverhältnisse näher charakterisiert.  $D$  betrug im homogenen System ohne Mitochondrien  $215 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und in deren Anwesenheit  $150 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Während sich diese Werte statistisch signifikant unterschieden, war ein Einfluß von Mitochondrien auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kalziumwellen im homogenen System nicht nachweisbar. Es liegt nahe anzunehmen, daß die Geschwindigkeit des „ $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling“ eher von der Kinetik der Kalziumfreisetzung als von den Diffusionsbedingungen bestimmt wird.

9.) Das vorgestellte *in vitro*-System eröffnet neue Möglichkeiten, die Entstehung elementarer Kalziumsignale, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Sparks und  $\text{Ca}^{2+}$ -Quarks, und ihre Ausbreitung unabhängig vom Einfluß der Zellmembran zu untersuchen. Es zeichnet sich durch leichte Zugänglichkeit für pharmakologische Substanzen aus, kann z.B. durch Hinzufügen von Mitochondrien (intakt oder pathologisch verändert) erweitert werden, bietet eine Möglichkeit der Veränderung von Diffusionsstrecken durch Variation der SR-Vesikeldichte (wichtig wahrscheinlich für die Simulation des „ $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling“ bei Myokardhypertrophie) und bietet wegen seiner relativ großen räumlichen Ausdehnung im Vergleich zu intakten Zellen sehr günstige Meßbedingungen.