

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. Isenberg)



**Konfokale Kalziumsignale in Kardiomyozyten,
differenziert aus embryonalen Stammzellen.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Anke Haberland**

geboren am 30.01.1977 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. M. Wußling

Gutachter: Prof. Dr. Wußling

PD Dr. Gellerich

Prof. Dr. Hescheler (Köln)

17.02.2004

27.09.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007260

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007260>]

Referat

In Kardiomyozyten, die sich *in vitro* aus embryonalen Stammzellen der Maus differenziert haben, treten räumlich-zeitliche Kalziumsignale wie Ca^{2+} -Oszillationen, -Wellen und -Sparks auf. Nachdem die Herzzellen mechanisch und enzymatisch isoliert und mit Fluoreszenzindikatoren beladen wurden, konnten die Kalziumsignale mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes sichtbar gemacht werden. Um zu überprüfen, welchen Einfluss das Alter der Zellen auf die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen hat, erfolgte eine Aufteilung des zu untersuchenden Materials in verschiedene Altersgruppen. Es konnte gezeigt werden, dass die Oszillationsfrequenz mit zunehmendem Alter wächst, wobei eine gewisse Modulation durch den jeweiligen Morphotyp festzustellen war. Berücksichtigt man ausschließlich das Alter der Kardiomyozyten, so erwies sich die Zunahme der Oszillationsfrequenz von Altersgruppe zu Altersgruppe als statistisch signifikant. Parallel dazu wurde eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität gemessen, die vermutlich auf eine mit zunehmendem Alter schnellere Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum zurückzuführen ist. Durch Applikation von Antimycin A (60 $\mu\text{mol/l}$), einem Hemmstoff der Atmungskette, konnte der Einfluss von Mitochondrien auf die Entstehung von Ca^{2+} -Oszillationen näher beleuchtet werden. Messungen des Komplex III der Atmungskette und des Leitenzyms der Glycolyse Phosphohexoseisomerase bestätigten unsere Vermutung, wonach Mitochondrien und nicht das SR bei der Ausbildung von Ca^{2+} -Oszillationen in der ersten Altersgruppe (5+2...4 d) eine dominante Rolle spielen. Mithilfe von Carbachol, das in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ auf die Zellen einwirkte, wurde überprüft, ob die beobachteten Ca^{2+} -Oszillationen durch extrazelluläre Faktoren modifiziert werden können. Carbachol bewirkte generell eine Abnahme der Oszillationsfrequenz, die sich aber nur in der zweiten Altersgruppe (5+5...8 d) als statistisch signifikant erwies. Eine Blockade des Stromes I_f , der die Frequenz von Schrittmacherzellen bestimmt, durch CsCl (2 mmol/l) ergab ebenfalls eine Abnahme der Frequenz von Ca^{2+} -Oszillationen, die sich von Altersgruppe zu Altersgruppe als statistisch signifikant erwies. Es wurde weiter beobachtet, dass mit fortschreitendem Alter der Zellen immer häufiger Ca^{2+} -Sparks auftraten, aus denen sich aber relativ selten Ca^{2+} -Wellen entwickelten, die sich mit einer Geschwindigkeit von 60 bis 100 $\mu\text{m/s}$ durch das Zellinnere bewegten. Als weitere Phänomene seien lange andauernde Ca^{2+} -Oszillationen und räumlich-zeitliche Ca^{2+} -Strukturen in den Zellkernen genannt.

Haberland, Anke: Konfokale Kalziumsignale in Kardiomyozyten, differenziert aus embryonalen Stammzellen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Zielstellung	1
2. Material und Methodik	7
2.1 Entwicklung von Herzzellen aus ES-Zellen	7
2.2 Einzelzellisolierung von Herzzellen aus schlagenden Arealen der EBs	8
2.3 Methode der Fluoreszenzmessungen und Substanzzugabe	9
2.4 Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop	10
2.5 Auswertung der Daten	12
2.5.1 Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten	12
2.5.2 Messung der Wellengeschwindigkeit	13
2.6 Enzymmessungen	13
2.6.1 Komplex III der mitochondrialen Atmungskette wurde nach der Methode von Krähenbühl et al., 1994, bestimmt.	14
2.6.2 Phosphohexoseisomerase als Leitenzym der Glycolyse, wurde wie bei Bergmeyer, 1983 beschrieben, bestimmt.	15
3. Ergebnisse	16
3.1 Morphologie der Kardiomyozyten	16
3.2 Alters- und Morphologieabhängigkeit der Oszillationsfrequenz	17
3.3 Oszillationsfrequenz in Abhängigkeit vom Alter	18
3.4 Relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter	19
3.5 Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter und von der mitochondrialen Funktion	20
3.6 Antimycineffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter	24
3.7 Carbacholeffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter	26
3.8 Carbacholeffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter	30
3.9 Cäsiumchlorideffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter	31
3.10 Cäsiumchlorideffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter	33

3.11	Beobachtung von verschiedenen Kalziumsignalen in Kardiomyozyten	35
3.12	Kernkalzium	35
3.12.1	Zellen, deren Kern bei Oszillationen stärker fluoresziert als das umgebende Zytosol	35
3.12.2	Zellen, deren Kern während einer Oszillation deutlich weniger fluoresziert als das umgebende Zytosol	37
3.13	Phänomene des zytosolischen und nukleären Kalziums	38
3.13.1	Kalziumsparks	38
3.13.2	Lange andauernde Oszillationen	40
3.13.3	Kalziumwellen	42
3.13.4	Abortive Wellen	44
4.	Diskussion	46
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Thesen	67

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

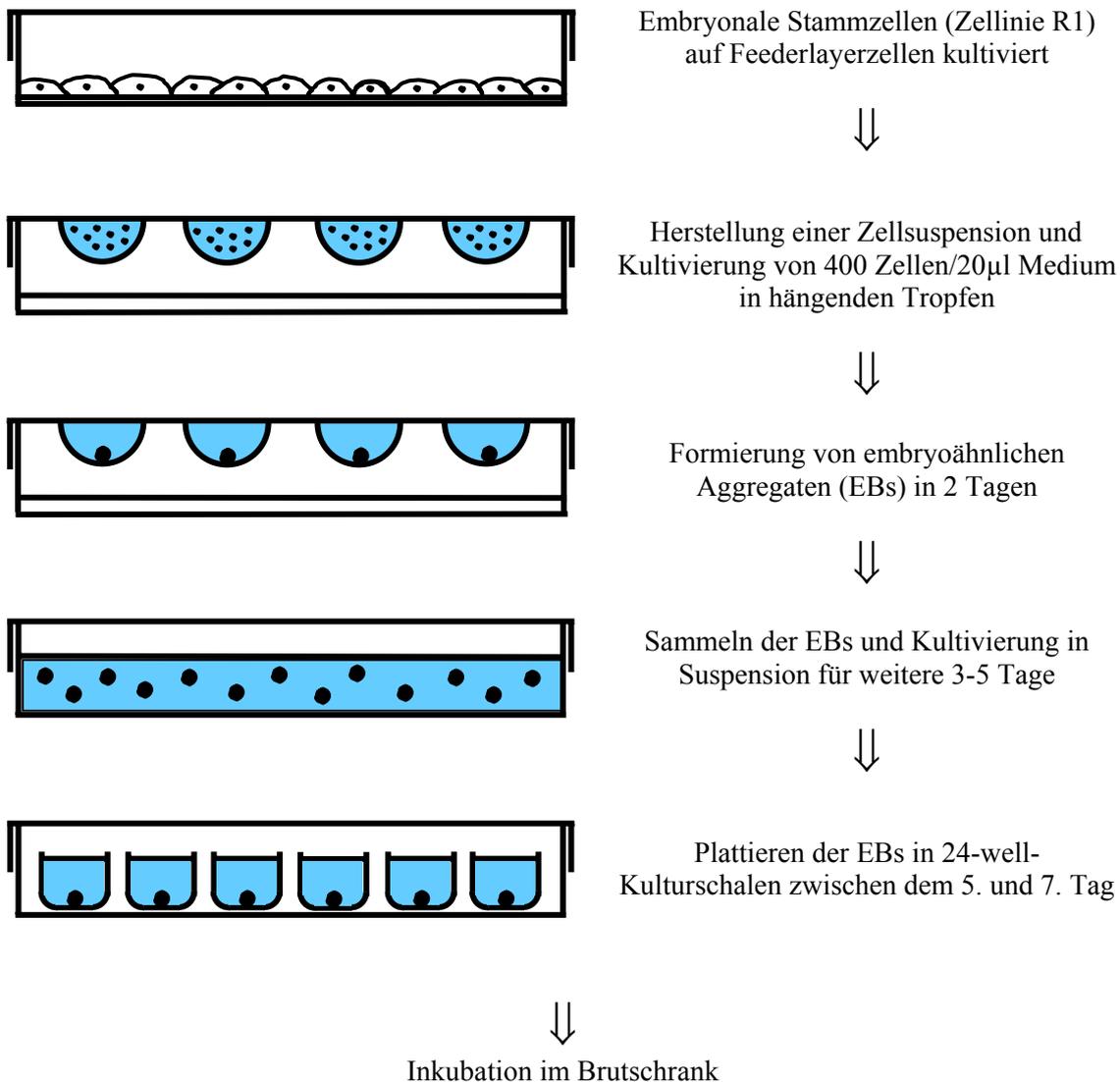
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
[Ca] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP	3',5'-cyclo-Guanosinmonophosphat
CICR	Calcium Induced Calcium Release (kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung)
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle`s Medium
EB	„Embryoid Body“ (embryoähnliches Aggregat)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	fetales Kälberserum
Fluo-3 AM	Fluo-3 Acetoxymethylester
Fluo-4 AM	Fluo-4 Acetoxymethylester
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
HCN	hyperpolarisationsaktivierte zyklische nukleotiddurchlässige Kanäle
I ₀	minimale Fluoreszenzintensität
I _{MAX}	maximale Fluoreszenzintensität
ΔI	Änderung der Fluoreszenzintensität
IMDM	Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s Medium
IP ₃	1,4,5-Inositoltriphosphat
M ₂ - Rezeptor	Muskarinischer (M-) Acetylcholin- Rezeptor
PHI	Phosphohexoseisomerase
PKA	Protein-Kinase A
PTP	Permeability Transition Pore
RA	Retinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-sensitiver Rezeptor
SERCA	SR-Kalzium-ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum

1. Einleitung und Zielstellung

Das Herz ist das erste funktionierende Organ im sich entwickelnden Wirbeltierorganismus. Über die Entwicklung der Herzmuskelzellen ist aber nur wenig bekannt. Adulte Herzzellen, welche terminal differenziert sind, vermehren sich in Kultur nicht und sind somit für permanente Linien funktioneller Herzzellen nicht verfügbar (Pich et al., 1997). Eine Alternative bieten pluripotente embryonale Zellen der Maus, die als permanente Linien embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) über viele Jahre erhalten werden können. *In vivo* sind ES-Zellen pluripotent, d.h., dass sie nach Retransfer in frühe Embryonen alle Gewebe des Embryos bilden können (Maltsev et al., 1993). ES-Zellen zeigen auch *in vitro* pluripotente Eigenschaften (Prelle et al., 1999), wenn sie in embryoähnlichen Aggregaten, sogenannten „Embryoid Bodies“, kultiviert werden (Wobus et al., 1991). Dies bedeutet, dass sich aus ihnen fast alle Gewebearten neu formieren können. Die ES-Zellen sind ein wichtiges Zellmodell der Entwicklungsbiologie zur Untersuchung von Embryogenese und Differenzierung.

Neben den ES-Zellen stehen noch zwei weitere Zelllinien zur Verfügung: Embryonale Karzinom (EC)- Zellen und embryonale Keim (EG)- Zellen (Wobus et al., 1996). Alle drei Zelltypen können in Kultur in Derivate aller drei Keimblätter, Entoderm, Ektoderm und Mesoderm, differenzieren. Für die Differenzierung von ES-Zellen in Epithel-, Nerven-, Blut-, Skelettmuskel-, glatten Gefäßmuskel- sowie sich spontan kontrahierenden Herzmuskelzellen wurden standardisierte Differenzierungsmethoden etabliert (Wobus et al., 1991, 1994a; Maltsev et al., 1993, 1994). In Abbildung 1 ist das Differenzierungsprotokoll für Herzzellen dargestellt. Die Kardiomyozyten prägen hierbei die pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften atrialer, ventrikulärer und Schrittmacherzellen aus, die denen des lebenden Organismus entsprechen.

Ziel der Forschung an den sich aus ES-Zellen differenzierenden Herzzellen ist es, die Bedeutung von Zell-Zell-Interaktionen, Signaltransduktionsmechanismen und die Einflüsse von Wachstumsfaktoren und Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Differenzierung zu untersuchen. Mit Hilfe molekularbiologischer (RT-PCR), immunologischer (Immunfluoreszenz, CLSM) und pharmakologischer Methoden wird die Expression gewebespezifischer Gene, Proteine und Rezeptoren untersucht. Die Forschungsarbeiten bieten erstmals die Möglichkeit, die Einflüsse exogener chemischer und physikalischer Faktoren in der embryonalen Entwicklung an einem *in vitro*-Modell zu untersuchen.



Differenzierung pulsierender Kardiomyozyten nach 5+2 d, wenn die EBs nach 5 Tagen plattiert wurden oder nach 7+2 Tagen, wenn die EBs nach 7 Tagen plattiert wurden

Abb. 1 Protokoll zur Differenzierung von Kardiomyozyten *in vitro*. (Modifiziertes Schema nach Wobus und Guan, 1998) Eine Anzahl von Parametern beeinflussen speziell die Differenzierungsmöglichkeit der ES-Zellen in Kardiomyozyten: 1. die Ausgangszellzahl im EB, 2. das verwendete Medium, Wachstumsfaktoren und Zusätze, 3. die ES-Zelllinie, und 4. der Zeitpunkt des Plattierens der EBs. Ein 4-5 Tage kultivierter „Embryoid Body“ entspricht einem Embryo im Blastozystenstadium, bei dem die inneren undifferenzierten Stammzellen von entodermalen Zellen umgeben sind, und ein 7-8 Tage alter „Embryoid Body“ entspricht einem Embryo im Eizylinderstadium. Kardiomyozyten sind einfach zu identifizieren, da sie 1-4 Tage nach dem Plattieren spontan kontrahieren. Mit fortschreitender Differenzierung nimmt die Anzahl kontrahierender Fokusse zu und in allen EBs können sich lokalisiert schlagende Zellen befinden.

Das ES-Zell-Differenzierungssystem ist besonders geeignet zur *in vitro*-Analyse von „loss of function“-Mutationen (Verlust bestimmter Gene mit entsprechendem Funktionsverlust) in ES-Zellen (Wobus et Guan, 1998). Hierbei werden homozygote Mutationen eines bestimmten Gens induziert, welche dessen Funktionsverlust zur Folge hat und zur frühen Letalität der Embryonen führen kann. Ein Beispiel ist die Differenzierung von ES-Zellen mit inaktiviertem β -1 Integrin-Gen, einem Defekt, der *in vivo* frühembryonal letal ist (Fässler et al., 1996; Guan et al., 2001). Untersuchungen ergaben, dass es zu einer Hemmung der Kardiogenese und Myogenese und einer gestörten Organisation der Sarkomerproteine kommt. Im terminalen Entwicklungsstadium bilden diese Zellen arrhythmische und pathologische Schrittmacheraktionspotentiale. Atrial- und ventrikelspezifische Gene wurden nicht exprimiert sowie Ionenströme nicht ausgelöst.

Umgekehrt gibt es Modelle, an denen die „gain of function“-Mechanismen (Überexpression von Genen) *in vitro* untersucht werden. Dies ist eine exzellente alternative Strategie der Forschung, die es erlaubt, die Überexpression bestimmter Gene zu erforschen. Ebenso können nach homologer Rekombination in ES-Zellen, spezifischer Selektion rekombinanter ES-Zellklone und anschließendem Retransfer in Blastozysten, Mäuse mit einem bestimmten genetischen Defekt (Knockout-Mäuse) geschaffen werden (Thomas und Capecchi, 1987).

Die Analyse der normalen ES-Zell-Differenzierung in die kardiogene Linie ergab eine entwicklungskontrollierte Expression herzspezifischer Gene, Proteine, Aktionspotentiale und Ionenkanäle. Die Expression von Transkripten des atrialspezifischen ANF- und des ventrikelspezifischen MLC-2V-Gens erfolgte erst in terminal differenzierten Herzzellen. Diese sind durch Aktionspotentiale und Ionenströme charakterisiert, die für atriale Zellen, ventrikelartige Zellen oder Sinusknotenzellen sehr unterschiedlich ausfallen (Maltsev et al., 1993; 1994; Hescheler et al., 1997). Entsprechend der Ausbildung der spezifischen Ionenkanäle wurden die Zellen in verschiedene Altersgruppen aufgeteilt. Im frühen Stadium (7+2...4 d, Schrittmacherzellen) werden der Ca^{2+} -Strom und ein K^{+} -Strom ausgebildet. Das mittlere Stadium (7+5...8 d) ist durch den Na^{+} -, Ca^{2+} - und I_f -strom, sowie den K^{+} -Strom charakterisiert. Beide Gruppen bilden spontan Aktionspotentiale. Bei den Zellen des terminal differenzierten Stadiums (7+9...18 d) wurden atriale, ventrikelartige und sinusknotenartige Zellen unterschieden. Atriale und ventrikelartige Zellen bilden Na^{+} -, Ca^{2+} - und K^{+} -Ströme aus. Sie zeigen getriggerte Aktionspotentiale. In sinusknotenartigen Zellen wurden der Ca^{2+} - und I_f - Strom sowie der Kaliumstrom gefunden. Sie bilden spontane Aktionspotentiale aus.

Der Differenzierungsfaktor Retinsäure (RA) moduliert konzentrations- und stadienabhängig die Entwicklung in die kardiogene, myogene oder neuronale Linie (Wobus et al., 1994a; 1997b; Rohwedel et al., 1999). Lithiumchlorid hemmt in hohen Konzentrationen die Herzentwicklung am Tag 5+5d (Schmidt et al., 2001). Es soll mit diesen zwei Beispielen gezeigt werden, dass das ES-Zell- *in vitro*-Modell für embryotoxische und teratogene Analysen während der frühen Entwicklung geeignet ist (Guan et al., 1999).

Kalziumionen spielen im Stoffwechsel praktisch aller Zellen eine sehr wichtige Rolle. Als intrazelluläre Botenstoffe übernehmen sie essentielle Aufgaben bei Befruchtung, Entwicklung (Gentranskription), Wachstum (Mitose), Differenzierung, Rezeptoren von Nervenzellen, Membranerregbarkeit, mitochondrialem- und Lebermetabolismus, Vesikelsekretion, Insulinsekretion, Wundheilung, Ziliarbewegung und der Muskelkontraktion am glatten Muskel, Skelettmuskel und Herzmuskel (Amundson et al., 1993; Berridge, 1996; Berridge et al. 1998; Simpson et al., 1998; Cheng et al., 1993; Clapham und Sneyd, 1995; Clapham, 1995). Selbst in Leukozyten und schließlich bei dem programmierten Zelltod, der Apoptose, spielen sie eine entscheidende Rolle (Berridge et al., 1998).

Zeitlich-räumliche Kalziumsignale treten lokal als Sparks auf, wenn sich nur einer oder wenige Kalziumfreisetzungskanäle (RyRs) öffnen (Cheng et. al, 1993). Kommt es zur Interaktion zwischen den einzelnen Kanälen, dann sind Prozesse auf zellulärer Ebene möglich, die in Form von intrazellulären Wellen auftreten. Wenn die Zellen untereinander verbunden sind, können solche Wellen auf benachbarte Zellen übergreifen und zelluläre Antworten innerhalb eines Gewebes koordinieren. Während die Kalziumkonzentration im Zytosol ca. 100 nM ist, liegt sie extrazellulär bei ca. 2 mM. Dieser Gradient wird durch in der Zellmembran lokalisierte Transportmechanismen wie Kalzium-ATPasen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aufrechterhalten. In Herzzellen werden die Kalziumionen im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeichert, um schnell zur Verfügung zu stehen (Clapham, 1995). In den Retikulummembranen befinden sich Kalziumpumpen (SERCAs), die unter ATP-Verbrauch Kalziumionen in das SR transportieren.

Auch Mitochondrien speichern unter physiologischen Bedingungen Kalzium (Gunter und Pfeiffer, 1990; Boitier et al., 1999; Clapham, 1995; Jouaville et al., 1995; Rizzuto et al., 2000).

Das Kalzium wird gepuffert und führt über die Stimulierung mitochondrialer Dehydrogenasen zu einer Steigerung der ATP-Synthese (Rizzuto et al., 2000; Szalai et al.,

2000; Jouaville et al., 1999). Auch im Zytoplasma führen kalziumbindende Proteine zur schnellen Senkung der freien Kalziumkonzentration (z.B. Parvalbumin). Zum anderen sind diese Pufferproteine nach ihrer Kalziumbindung Teil einer Signalkaskade (Triggerproteine, z.B. Calmodulin).

Für die Kontraktion der Herzmuskelzellen sind Kalziumionen essentiell. Nach der Aktivierung des schnellen Na^+ -Kanals, die den Aufstrich des Aktionspotentials erzeugt, erfolgt zeitlich versetzt die Öffnung der langsamen Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ Ca^{2+} -Kanal). Diese Kanäle sind mitverantwortlich für die Plateauphase des Aktionspotentials und die elektromechanische Kopplung (Antoni, 1995). Die einströmenden Kalziumionen diffundieren zu den in der Retikulummembran befindlichen RyRs und induzieren dort die Kalziumfreisetzung aus dem SR (Coronado et al., 1994; Berridge, 1996). Auch bei den sich aus ES-Zellen differenzierenden Kardiomyozyten, deren Kontraktionsrate mit zunehmenden Alter ansteigt, sind funktionierende RyRs Voraussetzung für die elektromechanische Kopplung. Herzzellen ohne funktionierende RyRs zeigen eine Verlangsamung der spontanen diastolischen Depolarisation und ein Verschwinden der Kalziumsparks (Sauer et al., 2001; Yang et al., 2002).

In Mitochondrien erfolgt die Freisetzung von Kalziumionen über $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ - bzw. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Austauscher im Vergleich zur Aufnahme relativ langsam. Sie können auch über die PTP, einem nicht kalziumselektiven Kanal, von der mitochondrialen Matrix in das Zytosol gelangen (Rizzuto, 2000; Crompton et al., 1999).

In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der räumlich-zeitlichen Kalziumsignale (Oszillationen, Sparks und Wellen) in Kardiomyozyten, welche sich aus ES-Zellen differenziert haben. Die Veränderung dieser Signale nach Zugabe verschiedener pharmakologischer Substanzen wurde beobachtet. Die Messungen wurden unter Zuhilfenahme der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und Verwendung fluoreszierender Kalziumindikatoren durchgeführt (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al., 1997; Cheng et al., 1993; Clapham und Sneyd, 1995).

Hieraus ergaben sich für die Arbeit folgende Zielstellungen:

1. Einzelzellisolierung der sich in Clustern differenzierenden Kardiomyozyten (Maus, ES-Zelllinie R1) durch Collagenase B.
2. Erfassung räumlich-zeitlicher Kalziumsignale (Oszillationen, Sparks und Wellen) und relativer Fluoreszenzintensitäten mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.
3. Untersuchung von räumlich-zeitlichen Kalziumsignalen in Abhängigkeit vom Alter der Zellen und ihrer Morphologie.
4. Überprüfung des Einflusses der Mitochondrien auf die Kalziumsignalausbreitung durch Hemmung des Komplex III der Atmungskette.
5. Beobachtung der Zellen hinsichtlich ihrer Kalziumsignale nach Stimulierung der Muskarin-Rezeptoren durch Carbachol.
6. Reaktion der Zellen bezüglich ihrer Kalziumsignale nach Hemmung des Schrittmacherstroms I_f .

2. Material und Methodik

2.1. Entwicklung von Herzzellen aus ES-Zellen

Die Entwicklung von Herzzellen aus embryonalen Stammzellen erfolgt auf sogenannten Feederzellen, embryonalen Fibroblasten der Maus (Wobus et al., 1984 und 1991). Sie werden 1-2 Tage bevor die ES-Zellkultur angelegt wird zwischen dem 15. und 17. Trächtigkeitstag aus den Embryonen von Mäusen gewonnen. Die ES-Zellen werden im Kulturmedium DMEM, das mit 15%igem hitzeinaktivierten Kälberserum versetzt ist, auf Feederzellen im inaktivierten Zustand gehalten. Sie werden alle 24-48 h geteilt und umgesetzt. Das Medium wird 1-2 h vor dem Umsetzen gewechselt. Die ES-Zellen lösen sich durch Inkubation (30-60 s) mit einem Trypsin-EDTA-Gemisch (Verhältnis 1:1) bei Raumtemperatur ab. Die Zellen werden in frischem Kulturmedium mit einer 2ml Glaspipette in eine einzige Zellsuspension resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 in neue Feederzellenschalen oder auf 0,1%ige gelatinebedeckte 60 mm Kulturschalen gebracht, nachdem das Trypsin-EDTA-Gemisch vorsichtig abgesaugt wurde. Das ES-Zell-Differenzierungsprotokoll für Herzzellen ist in Abbildung 1 (Seite 2, Ergebnisse) dargestellt. 400 ES-Zellen werden in 20 µl Differenzierungsmedium auf die Deckel von mit PBS gefüllten Petrischalen (Ø 100 mm) aufgebracht und so in hängenden Tropfen 2 Tage kultiviert. In dieser Zeit aggregieren die Zellen und bilden in jedem Tropfen einen EB. Sie werden eingesammelt und auf bakteriologische Petrischalen umgesetzt und für weitere 3-5 Tage in einer Suspension kultiviert. Die EBs werden einzeln in 24-well-Kulturschalen plattiert. Die Herzzellen beginnen 2 Tage später sich zu kontrahieren.

400 ES-Zellen der Linie R1 oder D3 sind optimal für die Differenzierung in Herzzellen. Die ersten Cluster von spontan schlagenden Kardiomyozyten werden schon bei 7 Tage alten EBs gefunden, aber die maximale Herzzelldifferenzierung wird erst 5-7 Tage nach Plattieren der EBs auf gelatinebeschichtete Kulturschalen erreicht. Die ersten Cluster spontan kontrahierender Herzzellen erscheinen 1-2 Tage nach dem Plattieren. Die EBs sollten am 5. Tag plattiert werden, wenn physiologische Untersuchungen des frühen Stadiums (Altersgruppe 1) durchgeführt werden sollen.

2.2 Einzelzellisolierung von Herzzellen aus schlagenden Arealen der EBs

Für physiologische Analysen müssen die sich in Clustern differenzierenden Herzzellen in Einzelzellen isoliert werden. Dafür ist das Enzym Collagenase erforderlich (Maltsev et al., 1993 und 1994). Die folgenden Lösungen wurden verwendet.

- (1) PBS: NaCl 10g/l, KCl 0,25g/l, Na₂HPO₄ 1,44g/l und KH₂PO₄ x2H₂O 0,25g/l.
- (2) Low Ca²⁺-medium (in mM): NaCl 120, KCl 5,4, MgSO₄ 5, Natriumpyruvat 5, Glucose 20, Taurin 20, Hepes 10/NaOH, pH 6,9 bei 4°C
- (3) Enzymmedium: Low Ca²⁺-medium versetzt mit 1 mg/ml Collagenase B (Boehringer Mannheim, Germany)
- (4) KB-Medium (in mM): KCl 85, K₂HPO₄ 30, MgSO₄ 5, EDTA 1, Na₂ATP 2, Natriumpyruvat 5, Kreatin 20, Glucose 20, und pH 7,2 bei -20°C.
- (5) Gelatinelösung: 1% Gelatine (Fluka) in Aqua tridest., autoklavieren und 1:10 mit PBS verdünnen.
- (6) „Differenzierungsmedium“: Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s Medium (IMDM, Gibco) unter Zusatz von 20%igem, hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Gibco), L- Glutamin (2mM Gibco), NEAA (Stammlösung 1:100 gelöst, Gibco) α-Monothioglycerol 3-mercapto-1, 2-propandiol (α- MTG, endgültige Konzentration 450 μM, frisch hergestellt, Sigma).

Ablaufplan

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Herzzellen verwendet, die sich aus embryonalen Stammzellen der Zelllinie R1 differenziert haben.

Die schlagenden Areale von ca. 20 EBs werden mit einem Mikroskalpell unter einem Umkehrmikroskop herausgeschnitten. Die Gewebestückchen werden in PBS Dulbecco in einem Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur gesammelt. Bei 1000 Umdrehungen wird das Röhrchen 1 Minute lang zentrifugiert. PBS wird anschließend verworfen. Nach Hinzugabe von 75 μl einer Enzymlösung (1 mg Collagenase B/ml Low Ca²⁺-medium) wird das Zentrifugenröhrchen 40 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Währenddessen wird das Röhrchen mehrmals beklopft, um eine bessere Durchmischung der Zellen mit Collagenase zu erreichen. Danach wird die Enzymlösung vorsichtig abgesaugt und 200 μl KB Medium hinzugegeben. Unter gleichen Bedingungen wird für

weitere 40 Minuten inkubiert. Nun kann die Zellsuspension vorsichtig in gelatinebeschichtete Kammern mit Glasboden, die mit 2ml Differenzierungsmedium bedeckt sind, übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Jetzt können die Zellen an der Gelatine anhaften.

Am nächsten Tag wird das Medium gegen 2 ml Differenzierungsmedium (Iscove) ausgetauscht. Nach einer Erholungsphase von einigen Stunden zeigen die Herzzellen rhythmische Aktivität und stehen somit für die Untersuchungen bereit.

Möchte man ein älteres Stadium der Herzzellen untersuchen, so muss das Differenzierungsmedium bis zum gewünschten Alter alle 2-3 Tage gewechselt werden.

2.3 Methode der Fluoreszenzmessungen und Substanzzugabe

Um die Kalziumsignale der Herzzellen zu erfassen, stehen sehr empfindliche Kalziumindikatoren zur Verfügung. Sie fluoreszieren, nachdem sie Kalziumionen gebunden haben und eine Anregung mit relativ kurzwelligem Licht ($\lambda = 488 \text{ nm}$) erfolgte. Für die Experimente in dieser Arbeit wurden die Fluochrome Fluo-3 AM (Emissionsmaximum bei $\lambda = 526 \text{ nm}$) und Fluo-4 AM (Emissionsmaximum bei $\lambda = 516 \text{ nm}$) verwendet (Haugland, 1996). Beide wurden von Molecular Probes (Eugene, USA) bezogen.

Zur Vorbereitung werden 20 μl Fluo-3 AM mit 2 ml Differenzierungsmedium gemischt, um eine Konzentration von 10 μM (bzw. 10 μl Fluo-4 AM um eine Konzentration von 5 μM) zu erhalten (Sauer et al., 1998; Cheng et al., 1993). Das so vorbereitete Medium wird auf ein Deckglas gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 20 min an einem dunklen Ort wird das Medium abpipettiert und 2 ml kalziumhaltiges Medium hinzugegeben (Ca^{2+} -Konzentration = 3,6 mM). Nun können die Zellen unter dem konfokalen Laser- Scanning-Mikroskop betrachtet werden. Bei dem vorherigen Betrachten im Durchlichtmikroskop wird eine Skizze der Zellen und ihrer Lagebeziehung zu den benachbarten Zellen angefertigt, sowie eine Markierung mit einem wasserfesten Stift auf dem Kammerdeckel angebracht. Unter gleichzeitiger Fixierung der Kammer auf dem Objektträgertisch mit Hilfe eines positionierbaren Metallwinkels ist dies eine wesentliche Erleichterung beim Auffinden der einzelnen Zellen nach Substanzzugabe. Folgende Substanzen wurden appliziert: 18,3 μl einer 6,56 mM Antimycin-A-Lösung, Endkonzentration im Kulturmedium 60 $\mu\text{mol/l}$; 2 μl einer 1 mM Carbachollösung, Endkonzentration 1 $\mu\text{mol/l}$; 200 μl einer 20 mM Cäsiumchloridlösung, Endkonzentration 2 mmol/l.

2.4 Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop

Abbildung 2 zeigt schematisch das konfokale Messprinzip.

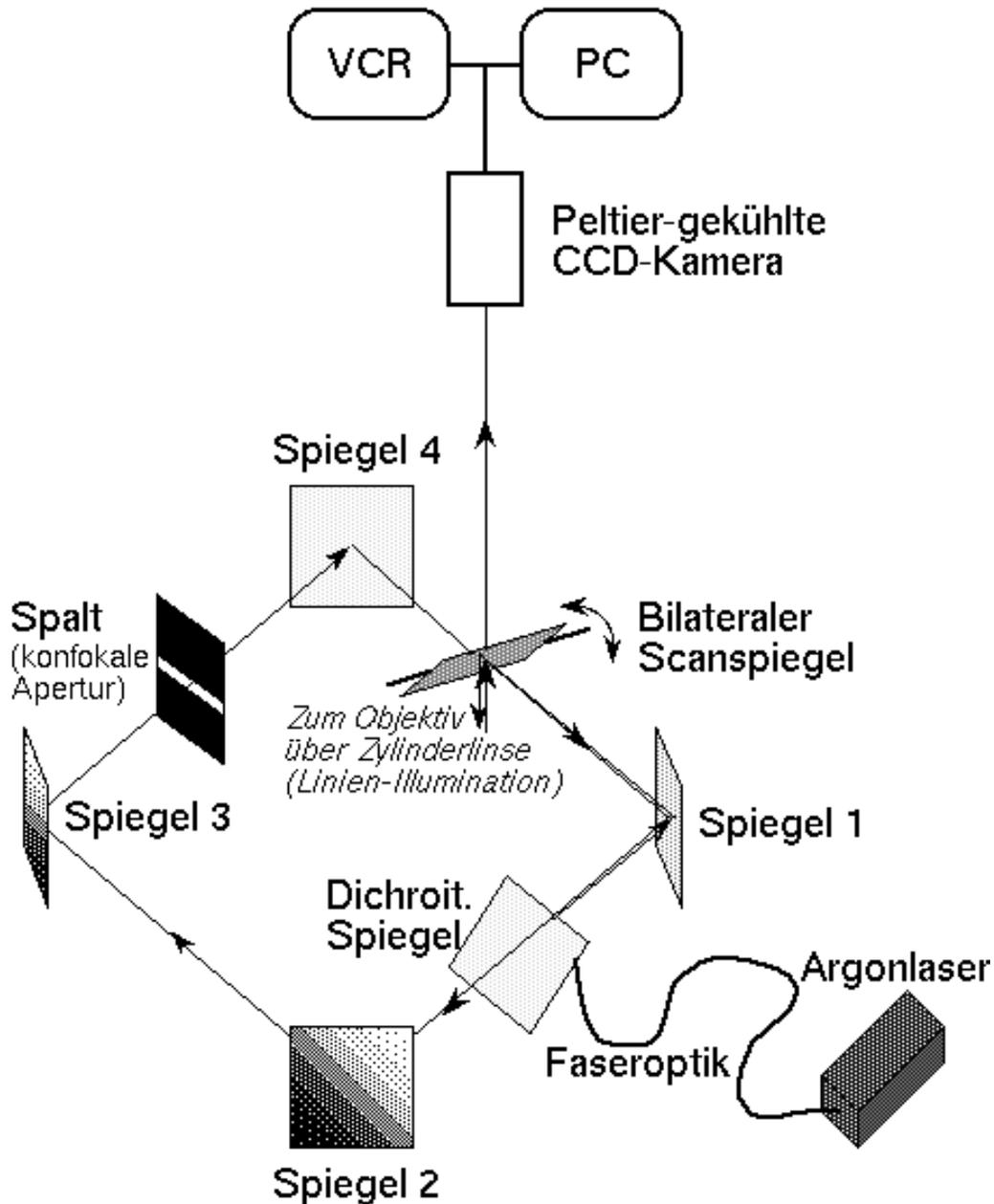


Abb. 2 Schema des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, das die Linienillumination eines Präparates nach Brakenhoff zeigt. Die Scanning-Frequenz dieses Systems beträgt 100 Hz. Das Zeitintervall zwischen den Bildern (480x512 Pixel), die auf einem Videorecorder (VCR) aufgenommen werden, wird durch die Bildwechselfrequenz der CCD-Kamera (25 Hz) bestimmt. Modifiziertes Schema nach dem Anhang 2 des „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, 1995, Hrsg. J.B.Pawley.

Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (InSight-Plus, Meridian) ist ein Umkehrmikroskop (Olympus IMT-2). Es lassen sich Lichtintensitäten aus einer definierten Schichtdicke des zu untersuchenden Objektes gewinnen (Brakenhoff et al., 1989). Zur Anregung der Fluoreszenz dient das monochromatische Licht eines Argonlasers ($\lambda = 488$ nm). Das Laserlicht erreicht nach dem Passieren eines dichroitischen Spiegels (transparent für das Anregungslicht, reflektierend für das emittierte Licht) über den sogenannten „Scanning“ Spiegel und einem Objektiv die Probe. Über den „Scanning“ Spiegel gelangen die Fluoreszenzsignale zum dichroitischen Spiegel zurück. Die Signale gelangen nun über weitere Spiegel zur Aperturblende. Diese ist zusammen mit dem verwendeten Objektiv für die Schichtdicke verantwortlich. Emissionslicht, das oberhalb oder unterhalb der Fokusebene entstanden ist, wird durch die konfokale Blende wirksam unterdrückt. Weitere Spiegel und zuletzt der „Scanning“ Spiegel leiten die Fluoreszenzsignale über ein zweites Linsensystem zur CCD-Kamera.

Die Messsignale aus einer minimalen Schichtdicke von $0,6 \mu\text{m}$ werden mit einer Frequenz von 25 Hz auf einem Videoband (SVHS) aufgenommen und stehen somit zu einem späteren Zeitpunkt der Auswertung zur Verfügung.

Der Messplatz umfasste die im folgenden aufgeführten Teilsysteme:

- 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-MIT, Inc., Michigan City, USA
- CCD-Kamera (756x581 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 ($\lambda=488$ nm), Modell 532, Omnicrome, Chino (Kalifornien, USA)

2.5 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Fourieranalyse (Software „Imagoquant“, Mediquant, Halle/Saale). Mit der Option „Dichtemessung“ können die Kalziumoszillationen in den verschiedensten Zellarten gemessen werden. Es sind sowohl Echtzeitmessungen, als auch Auswertungen über Videobänder möglich. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Auswertung der Videobänder vorgenommen. Durch die gleichzeitige Messung von zwei wählbaren Arealen, die in ihrer Größe variiert werden können, ist die Feststellung von Signalsynchronitäten hinsichtlich Frequenz und Amplitude in einer oder zwei Zellen möglich. Die Koordinaten erscheinen auf dem Bildschirm, wodurch die Messung jederzeit exakt reproduzierbar ist.

Die gewünschte Messzeit kann zwischen 1- 60 s variiert werden. Pro Sekunde werden 10 Messpunkte aufgenommen. Unter den Oszillogrammen werden automatisch die Fourieranalysen erstellt.

Die Messwerte der Oszillationsfrequenz und der Fourieranalyse können anschließend in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel) gespeichert und weiterverarbeitet werden (Abbildung 3).

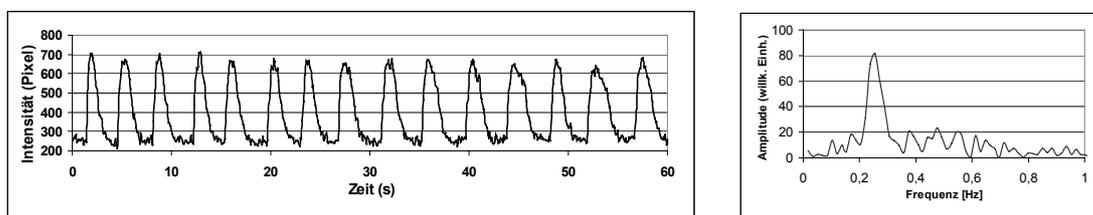


Abb. 3 Oszillogramm (links) und dazugehörige Fourieranalyse (rechts), die nach Speicherung der Messwerte in „Excel“ angefertigt wurden.

2.5.1 Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten

Die Fluoreszenzintensität einer Kalziumoszillation wird in Zahlenwerten ohne Einheit angegeben (Krannich, 2001). Sie ist abhängig vom Wert der Grundfluoreszenz, das heißt, es können nur Fluoreszenzintensitätserhöhungen bestimmt werden. Dazu wurde $(I_{\text{MAX}} - I_0)/I_0$ berechnet. I_{MAX} steht für die maximale Fluoreszenzintensität im Oszillogramm, während I_0 für die Grundfluoreszenz am gleichen Messpunkt der Zelle steht. Im Diagramm steht ΔI für $I_{\text{MAX}} - I_0$.

2.5.2 Messung der Wellengeschwindigkeit

Abbildung 4 zeigt eine von rechts nach links laufende Kalziumwelle zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Mit Hilfe der Software „Quick Capture“, IPLab Spectrum QC, und „Image 1.43“ für Apple Computer wurden die auf dem SVHS-Videoband gespeicherten zeitlichen Vorgänge in Einzelbildern mit definierten zeitlichen Abständen auf dem Macintosh Quadra 800 digitalisiert. Die Bearbeitung und Präsentation der Einzelbilder erfolgte dann auf dem PC mit Hilfe des Programms „Jasc Paint Shop Pro“. Es wurde in beiden Bildern ein Balken längs durch die Zelle gelegt, der orthogonal zur Wellenfront läuft. Die Wellengeschwindigkeit wurde dann aus dem bekannten Zeitabstand beider Bilder und dem Pixelabstand errechnet.

Mit dem gleichen Objektiv, das zur Untersuchung der Zellen diente (100x), wurde ein Gitter mit bekannter Gitterkonstante aufgezeichnet, ausgemessen und der Pixelabstand in μm bestimmt. Nun konnte die Wellengeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ umgerechnet werden (Wussling und Salz, 1996).

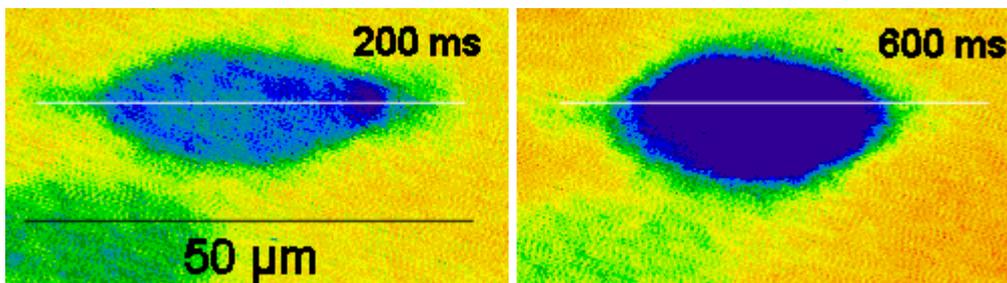


Abb. 4 Momentaufnahmen einer Kalziumwelle zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Die weißen Balken wurden jeweils an der gleichen Stelle durch die Zelle gelegt. Anhand des bestimmten Pixelabstandes in μm und der Zeitdifferenz ist es möglich, die Wellengeschwindigkeit zu ermitteln. Sie beträgt ca. $66,3 \mu\text{m/s}$.

2.6 Enzymmessungen

Die EBs (mindestens 60 Stück) wurden wie unter 2.2 beschrieben in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation und Absaugung des PBS-Puffers wurden die EBs in ein Chappel Perry A-Puffer enthaltendes Cryoröhrchen überführt (Chappel Perry A enthält: 100 mM KCl, 50 mM Tris (pH 7,5), 5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM EGTA; 1 N HCl für pH-Wert-Einstellung auf 7,5). Die Cryoröhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung der Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Am Tag der Messung wurden die Zellen aufgetaut und in einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert.

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte spektralphotometrisch im optischen Test. Alle Messungen wurden bei 30°C und stets als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Testansätze wurden vor dem Starten der Reaktion 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die verwendeten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 1 cm. Das Messvolumen der Ansätze betrug 300 µl.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend folgender Formel:

$$U/ ml = \frac{\Delta E/min \times V_{me\ddot{a}} \times F_v}{\epsilon \times V_{prob}}$$

$\Delta E/min$ = Extinktionsänderung/ Minute

$V_{me\ddot{a}}$ = Messvolumen [µl]

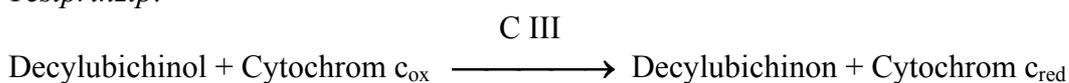
F_v = Verdünnungsfaktor

ϵ = Extinktionskoeffizient

V_{prob} = Probenvolumen [µl]

2.6.1 Komplex III der mitochondrialen Atmungskette wurde nach der Methode von Krähenbühl et al., 1994, bestimmt.

Testprinzip:



Gemessen wurde die Reduktion von Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm, katalysiert vom Komplex III in Gegenwart von Decylubichinol ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Der Testansatz enthielt folgende Lösungen:

K-Phosphat-Puffer, pH 8,0	50 mM
EDTA-Na	0,1 mM
Rinderserumalbumin	0,2 %
NaN ₃	3 mM
Cytochrom c _{ox}	60 µM
Homogenat	20, 40 µl (1:300)

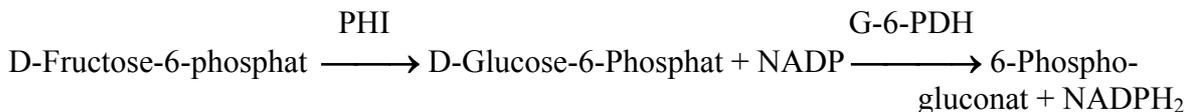
Die Reaktion wurde durch Zusatz von Decylubichinol (150 μM) gestartet.

Herstellung der Decylubichinol- Stammlösung (Ragan et al., 1987)

1 ml einer 0,01 M Decylubichinon-Lösung in Ethanol (pH 2,0) wurde mit einer kleinen Spatelspitze KBH_4 und 1 ml bidestilliertem Wasser gemischt und ständig gerührt, bis die Lösung farblos war. Danach wurden 2 ml Ether und 1 ml Cyclohexan hinzugefügt und gut gemischt. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und nochmals mit 1 ml 2 M NaCl Lösung extrahiert. Schließlich wurde die obere Phase abgetrennt und mit Stickstoff durchblasen, bis das Gemisch verdunstet war. Die verbliebene Substanz wurde in 1 ml Ethanol mit HCl auf pH 2 gebracht und bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

2.6.2 Phosphohexoseisomerase, als Leitenzym der Glycolyse, wurde wie bei Bergmeyer, 1983 beschrieben, bestimmt.

Testprinzip:



Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 360 nm über die zunehmende Bildung von NADPH_2 gemessen ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Der Testansatz enthielt folgende Lösungen:

Tris-HCL-Puffer, pH 8,0	50 mM
EDTA- Na_2	5 mM
NADP	0,5 mM
G-6-PDH	1U/ ml
Homogenat	

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie der Kardiomyozyten

Die Betrachtung der Herzzellen im Mikroskop ließ die verschiedensten morphologischen Typen erkennen, die in unseren Untersuchungen in 6 Morphotypen unterteilt wurden. In Abbildung 5 sind sie zeichnerisch dargestellt. Die näheren Erläuterungen sind nur Vermutungen über den Typ von Kardiomyozyt, weil eine exakte Identifikation des Zelltyps jeweils elektrophysiologische Analysen („Patch-Clamp“) voraussetzt.

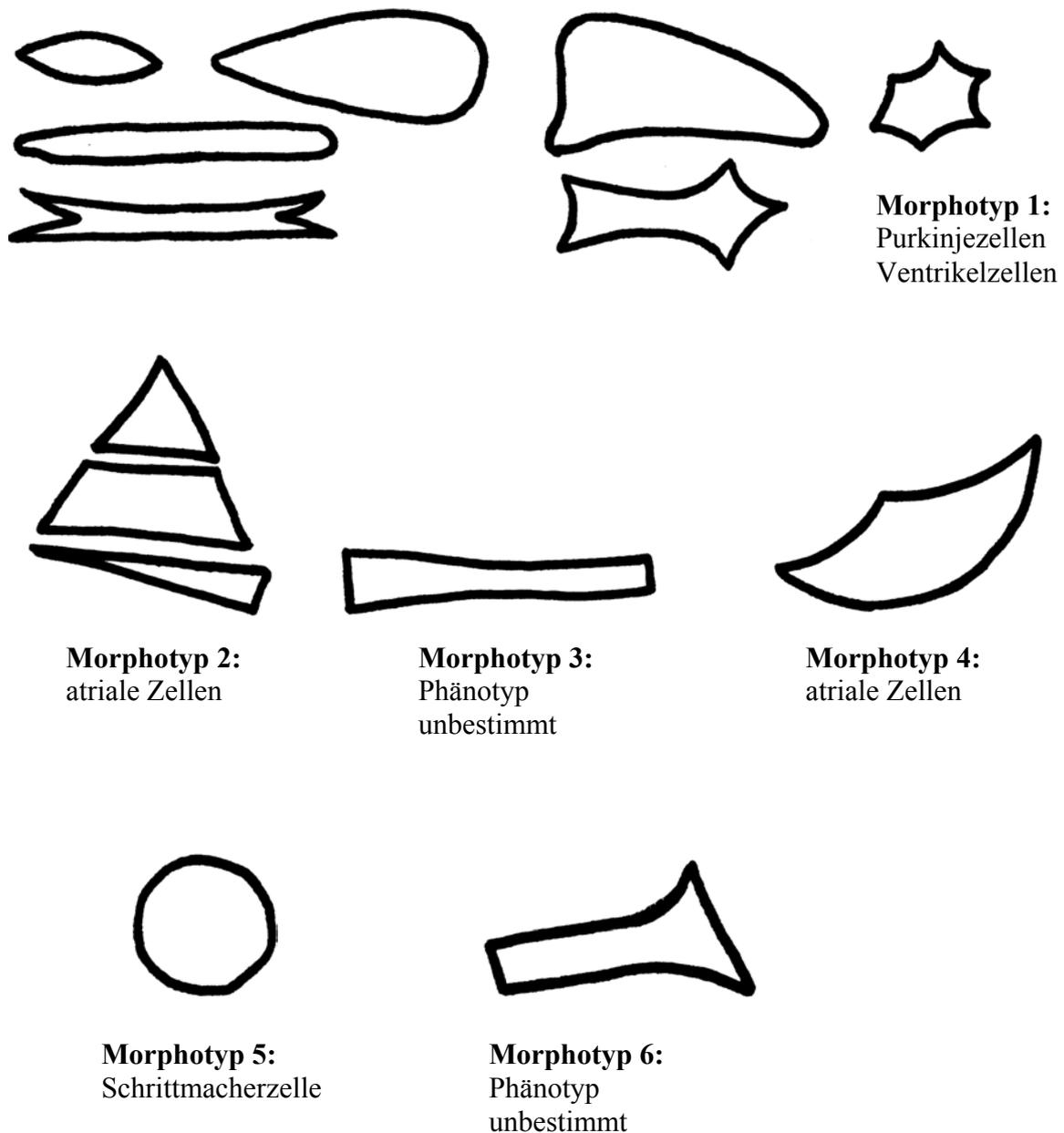


Abb. 5 Die Morphotypen

3.2 Alters- und Morphologieabhängigkeit der Oszillationsfrequenz

Bei der Untersuchung der Kardiomyozyten, die sich aus embryonalen Stammzellen differenziert haben, lag das Hauptaugenmerk auf der Beobachtung der von ihnen ausgehenden zeitlichen und räumlichen Kalziumsignale. Die Zellen wurden neben ihrer Untergliederung in die 6 Morphotypen auch in 3 Altersgruppen aufgeteilt: Altersgruppe 1 5+(2...4) d, Altersgruppe 2 5+(5...8) d, Altersgruppe 3 5+(9...15) d (Maltsev et al. 1993 und 1994; Hescheler et al. 1997). Nach Beladung der Herzzellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluo-3 AM (10 μM) oder Fluo-4 AM (5 μM) und anschließender Hinzugabe von 3,6 mM Ca^{2+} konnte untersucht werden, ob die Frequenz der Kalziumoszillationen mit dem Alter und der Morphologie der Zellen in Zusammenhang steht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

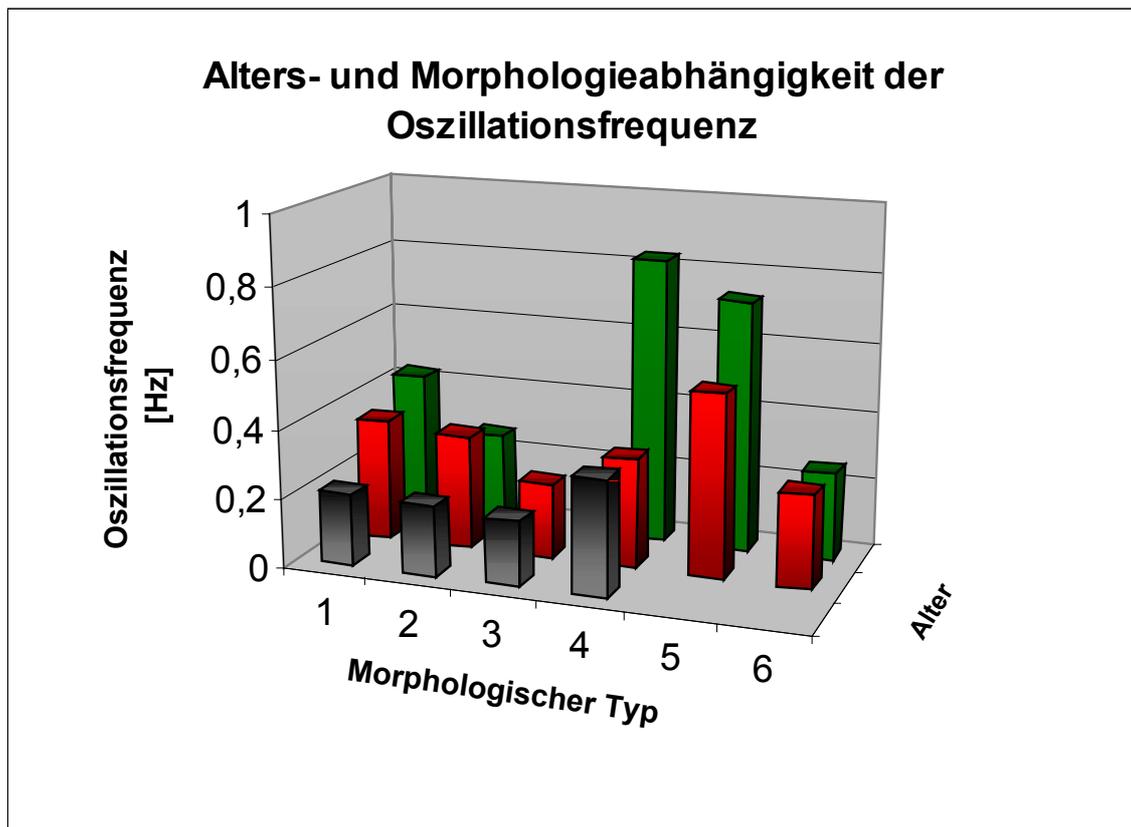


Abb. 6 Alters- und Morphologieabhängigkeit der Oszillationsfrequenz.

Altersgruppe 1	5+(2...4) d	schwarze Säulen
Altersgruppe 2	5+(5...8) d	rote Säulen
Altersgruppe 3	5+(9...15) d	grüne Säulen

Aus der Abbildung geht hervor, dass es bei den meisten Morphotypen zu einer kontinuierlichen Oszillationsfrequenzsteigerung mit zunehmendem Alter kommt. Dieser Anstieg ist bei dem 4. und 5. Morphotyp sprunghaft.

3.3 Oszillationsfrequenz in Abhängigkeit vom Alter

Bei der Untersuchung der Oszillationsfrequenzen in Abhängigkeit vom Alter ließen erste Versuche schon vermuten, dass es von der 2. zur 3. Altersgruppe zu einer starken Zunahme der Oszillationsfrequenz kommt. Deshalb wurde die 3. Altersgruppe in 2 Gruppen [Altersgruppe 3: 5+(9...11) d und 4: 5+(12...15) d] aufgeteilt. Aus Abbildung 7 geht ein genereller Anstieg der Oszillationsfrequenzen mit zunehmendem Alter hervor. Es besteht eine statistisch signifikante Zunahme der Frequenzen außer zwischen der 2. und 3. Gruppe, wie sich nach Durchführung des ungepaarten t-Tests zeigte.

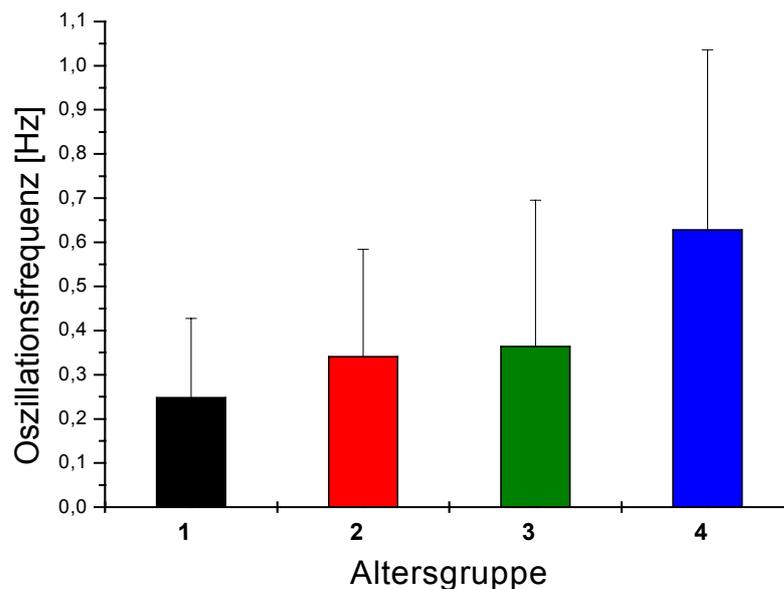


Abb. 7 Oszillationsfrequenz in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1	5+(2...4) d
Altersgruppe 2	5+(5...8) d
Altersgruppe 3	5+(9...11) d
Altersgruppe 4	5+(12...15) d

Tabelle 1 zeigt die Zahlenwerte der Abbildung 7. Es sind Mittelwerte, Standardabweichungen, die Anzahl der untersuchten Zellen und die p-Werte aufgeführt.

Tab. 1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Oszillationsfrequenzen in Hz in den einzelnen Altersgruppen in Abhängigkeit vom Alter sowie die Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte ungepaart.

Altersgruppe	Mittelwert (Hz)	Standardabweichung	N	p
1	0,25	0,18	98	$4,93 \times 10^{-4}$
2	0,34	0,24	321	
2	0,34	0,24	321	0,42
3	0,36	0,33	134	
3	0,36	0,33	134	$2,63 \times 10^{-5}$
4	0,63	0,41	44	

3.4 Relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter

Um eine möglichst allgemeine Charakterisierung der Kalziummuster vorzunehmen, wurden neben räumlich-zeitlichen Veränderungen auch deren Intensitäten in Abhängigkeit vom Alter der Zellen bestimmt, wobei auch hier eine Einteilung in 4 Altersgruppen erfolgte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten mit zunehmendem Alter wurde festgestellt. Statistische Signifikanz war zwischen allen Werten der Vergleichsgruppen zu verzeichnen, außer zwischen denen der 1. und 2. Gruppe, wie sich nach Durchführung des ungepaarten t-Tests zeigte.

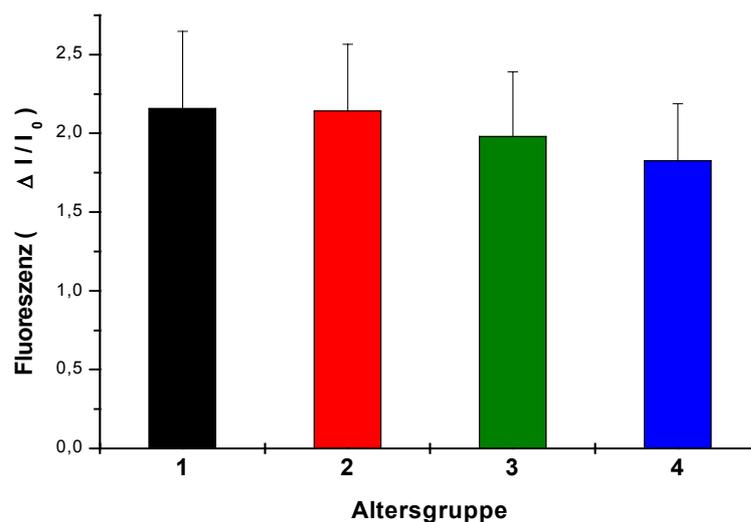


Abb. 8 Relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(9...11) d
 Altersgruppe 4 5+(12...15) d

Tabelle 2 sind die Zahlenwerte aus Abbildung 8 zu entnehmen. Es sind Mittelwerte, Standardabweichungen, die Anzahl der untersuchten Zellen und die p-Werte aufgeführt.

Tab. 2 Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter sowie die Anzahl N der untersuchten Zellen. Die p-Werte wurden bei einer Signifikanzebene von $\alpha \leq 0,05$ durch einen ungepaarten t-Test ermittelt.

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	N	p
1	2,16	0,49	96	0,78
2	2,14	0,42	303	
2	2,14	0,42	303	$1,85 \times 10^{-4}$
3	1,98	0,41	134	
3	1,98	0,41	134	0,04
4	1,83	0,36	36	

3.5 Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter und von der mitochondrialen Funktion

Im Folgenden wurde die Reaktion der Zellen auf die Hemmung der Atmungskette untersucht. Die Atmungskette, die der ATP-Bereitstellung dient, ist in den Mitochondrien lokalisiert. Es erfolgte spezifisch die Hemmung des Komplex III der Atmungskette durch Applikation von Antimycin A ($60 \mu\text{mol/l}$).

In Abbildung 9 wird die Originalregistrierung zur Oszillation der globalen Fluoreszenzintensität in einer Herzzelle der 2. Altersgruppe gezeigt. Zur Ermittlung der am häufigsten auftretenden Frequenz wurde eine Fourieranalyse durchgeführt. Sie ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Oszillationsfrequenz liegt bei 0,25 Hz.

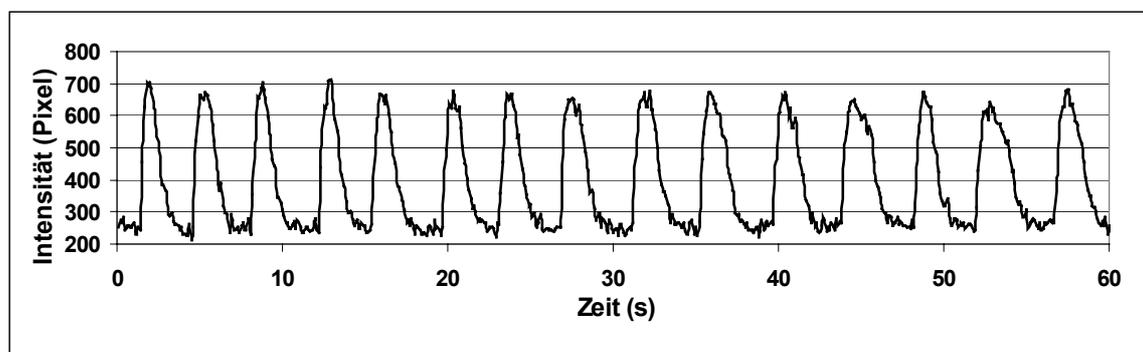


Abb. 9 Oszillogramm der Kalziumfluoreszenz einer 5+8 d alten Herzzelle.

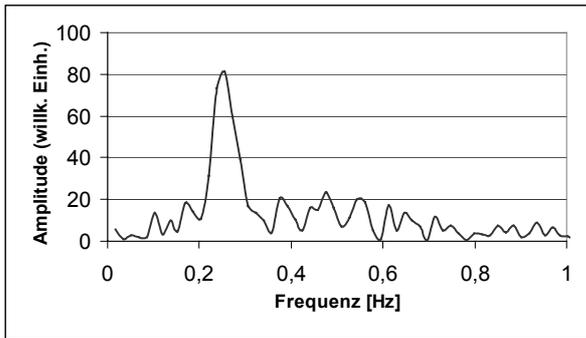


Abb. 10 Im Fourier-Spektrogramm der Spur von Abb.9 tritt die Oszillationsfrequenz von 0,25 Hz als Peak deutlich hervor.

Zu dieser Zelle wurde der Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette Antimycin A ($60 \mu\text{mol/l}$) hinzugegeben. Aus der in Abbildung 11 dargestellten Originalregistrierung zur Oszillation der globalen Fluoreszenzintensität nach Substanzzugabe lässt sich bereits eine Verringerung der Frequenz ablesen. Die Fourieranalyse in Abbildung 12 zeigt, dass die Oszillationsfrequenz tatsächlich auf 0,17 Hz abgefallen ist.

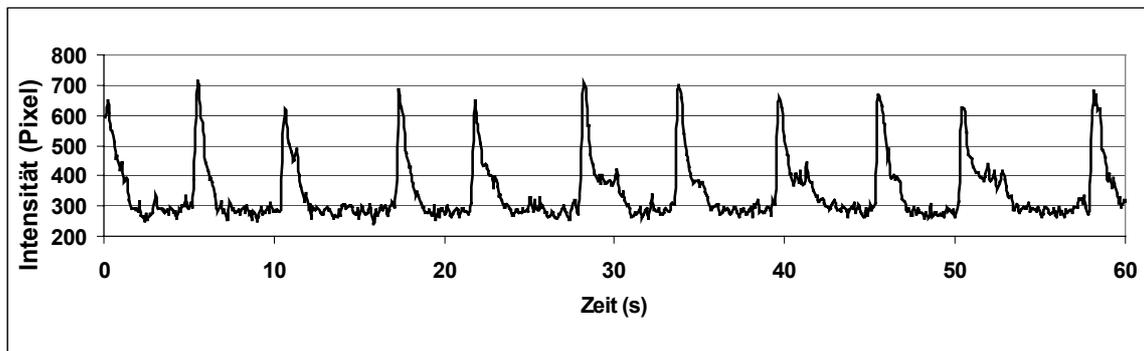


Abb. 11 Oszillogramm derselben Zelle wie aus Abbildung 9 nach Zugabe von Antimycin A ($60 \mu\text{mol/l}$).

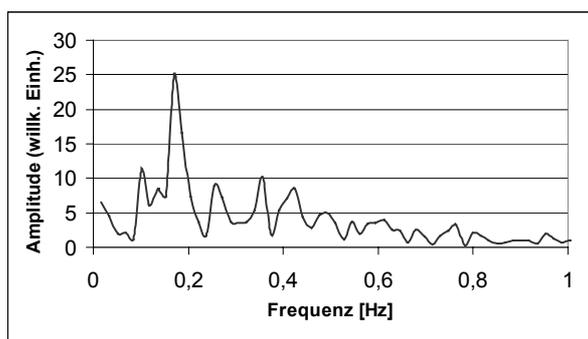


Abb. 12 Fourieranalyse der Spur von Abbildung 11. Der Peak der Oszillationsfrequenz liegt nun mit 0,17 Hz deutlich niedriger im Vergleich zur Ausgangsfrequenz von 0,25 Hz.

Es soll dem Einzelbeispiel nun die Darstellung des Effektes aller mit Antimycin A behandelten Zellen folgen. Wir beschränken uns auf eine Einteilung des zu untersuchenden Zellmaterials in nur 3 Altersgruppen, weil erste Untersuchungen vermuten ließen, dass in der 3. Altersgruppe kaum wesentliche Veränderungen auftreten würden: 1. Altersgruppe 5+(2...4) d, 2. Altersgruppe 5+(5...8) d und 3. Altersgruppe 5+(9...15) d. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter nach Antimycinapplikation statistisch signifikant (außer in der 3. Gruppe) abnimmt. Dies wurde nach Durchführung eines gepaarten t-Tests festgestellt.

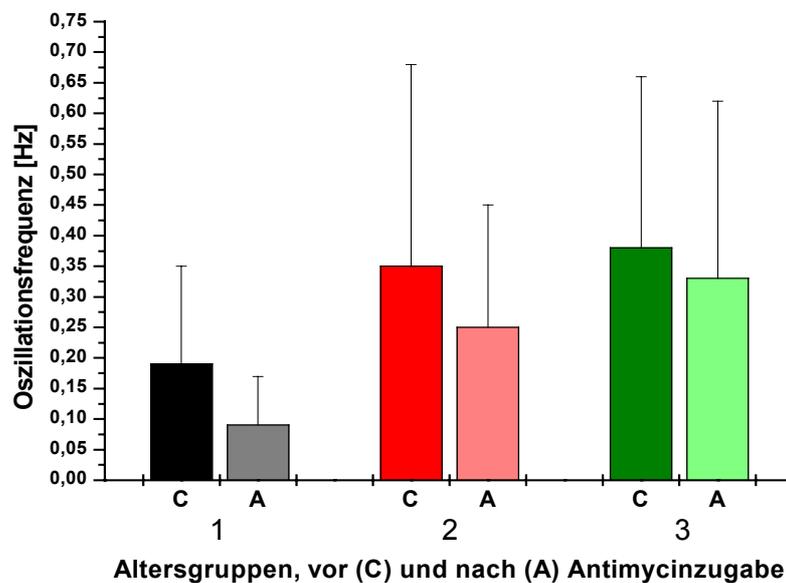


Abb. 13 Antimycineffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(9...15) d

C : Kontrollgruppe
 A : nach Zugabe von Antimycin A (60 $\mu\text{mol/l}$)

Tabelle 3 sind die der Abbildung 13 entsprechenden Zahlenwerte wie Mittelwert, Standardabweichung, Anzahl der untersuchten Zellen und der p-Wert zu entnehmen.

Tab. 3 Mittelwerte und Standardabweichungen der Oszillationsfrequenzen in Hz in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter. Die Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte sind aufgeführt. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t- Test erfolgte paarweise.

Altersgruppe	Mittelwert (Hz)	Standardabweichung	N	p
1 C	0,19	0,16	8	0,01
1 A	0,09	0,08	8	
2 C	0,35	0,33	106	$5,7 \times 10^{-4}$
2 A	0,25	0,2	106	
3 C	0,38	0,28	42	0,08
3 A	0,33	0,29	42	

Folgende Tabelle (Tab.4) zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, deren Frequenz nach Antimycin-A-Zugabe (60 $\mu\text{mol/l}$) abgenommen hat, gleich geblieben ist bzw. zugenommen hat. Es fällt auf, dass in der 1. Altersgruppe eine Frequenzabnahme der Oszillationen aller Zellen erfolgte und Antimycin A somit eine starke Hemmung bewirkt hat. In der 2. und 3. Gruppe nimmt die Frequenz nur bei 68,9 bzw. 64,3% der Zellen ab, bei 4,7 % bzw. 2,4% bleibt sie gleich und bei gut einem Viertel bzw. einem Drittel der Zellen steigt sie nach Antimycin-A-Zugabe an.

Tab. 4 Prozentualer Anteil der Zellen aller 3 Altersgruppen, deren Frequenz nach Antimycin-A-Zugabe abgenommen hat, gleich geblieben ist oder zugenommen hat. Während in der 1. Altersgruppe alle Zellen ihre Frequenz verringerten (100%) lässt der Hemmeffekt in der 2. und 3. Altersgruppe nach (68,9% bzw. 64,3%). Bei den beiden letztgenannten Gruppen zeigten 4,7% bzw. 2,4% der Zellen eine gleichbleibende Frequenz, wobei eine Zunahme derselben ein gutes Viertel bzw. ein Drittel erkennen ließen.

Altersgruppe	prozentualer Anteil der Zellen mit		
	Abnahme der Oszillationsfrequenz	Konstanz der Oszillationsfrequenz	Zunahme der Oszillationsfrequenz
1	100 %	0 %	0 %
2	68,9 %	4,7 %	26,4 %
3	64,3 %	2,4 %	33,3 %

Um das Ergebnis des Hemmeffektes von 100% in der 1. Altersgruppe zu erhärten, erfolgten ergänzende Untersuchungen, bei denen das Leitenzym der Glycolyse, Phosphohexoseisomerase (PHI), und der Komplex III (C III) der Atmungskette in den Zellproben gemessen wurden. Wenn der Komplex III zur PHI ins Verhältnis gesetzt wird,

ergibt sich eine Tendenz, nach der in den Zellen 5+3 d relativ mehr Komplex III–Aktivität vorliegt (Tab. 5). Dies bedeutet, dass das Verhältnis „Menge der Mitochondrien“-„Vorhandensein von Glycolyseleitenzymen“ zugunsten der Mitochondrien verschoben ist.

Tab. 5 Messung des Komplex III der Atmungskette und der Phosphohexoseisomerase in Zellproben aller 3 Altersgruppen (Einheiten/ml). Der Quotient aus beiden Werten wurde in Prozent dargestellt und ist in den Zellen 5+3 d erhöht. In dieser Gruppe liegt eine erhöhte Komplex III-Aktivität vor.

Altersgruppe	C III in Einheiten pro ml / PHI in Einheiten pro ml in Prozent dargestellt
1 (nur 5+3 d)	4,1 ± 4,5
2 (5+6/7 d)	1,33 ± 0,23
3 (nur 5+9 d)	1,12 ± 0,53

3.6 Antimycineffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter

Der Antimycineffekt wurde nicht nur hinsichtlich der Änderungen der Oszillationsfrequenzen untersucht, sondern es wurden auch die Veränderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 und Tabelle 6 dargestellt. Ein gepaarter t-Test wurde durchgeführt. Es ist in allen 3 Altersgruppen nach Antimycinzugabe eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten zu verzeichnen.

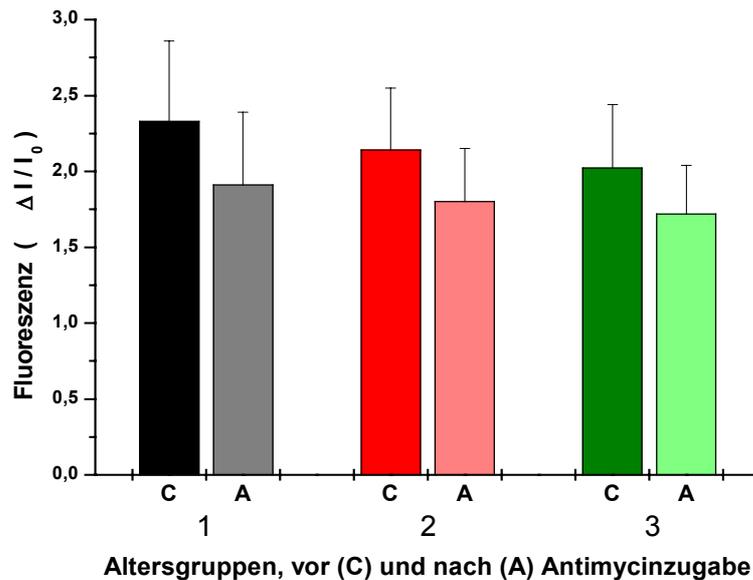


Abb. 14 Antimycineffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(9...15) d

C: Kontrollgruppe
 A: nach Zugabe von Antimycin A (60 $\mu\text{mol/l}$)

Tabelle 6 zeigt die zur Abbildung 14 gehörigen Zahlenwerte. Mittelwerte, Standardabweichungen, Anzahl der untersuchten Zellen und p-Werte sind ihr zu entnehmen.

Tab. 6 Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter. Die Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte sind aufgeführt. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte paarweise.

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	N	p
1 C	2,33	0,53	8	0,002
1 A	1,91	0,48	8	
2 C	2,14	0,41	106	$2,5 \times 10^{-13}$
2 A	1,8	0,35	106	
3 C	2,02	0,42	42	$1,6 \times 10^{-6}$
3 A	1,72	0,32	42	

3.7 Carbacholeffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter

Von großem Interesse war die Frage, ob die beobachteten Kalziumoszillationen völlig autonom in der Zelle entstehen oder, ob sie auch einer extrazellulären Beeinflussung unterliegen. Für diese Untersuchungen wurde Carbachol ($1 \mu\text{mol/l}$), ein direktes Parasympathomimetikum, verwendet. Es bewirkt am muskarinischen Acetylcholinrezeptor der Herzschrittmacherzelle eine Kaliumkanalaktivierung, was wiederum zu einer Verlangsamung der diastolischen Depolarisation und somit zu einer Schlagfrequenzabnahme führt.

Die Abbildung 15 zeigt eine 5+8 d alte Herzzelle vor Carbacholzugabe, welche in einem Zellausläufer nach jeder 3. oder 4. Oszillation spontan eine Welle bildet, die sich zum Zellinnern ausbreitet und dort in die Gesamtoszillation der Zelle übergeht.

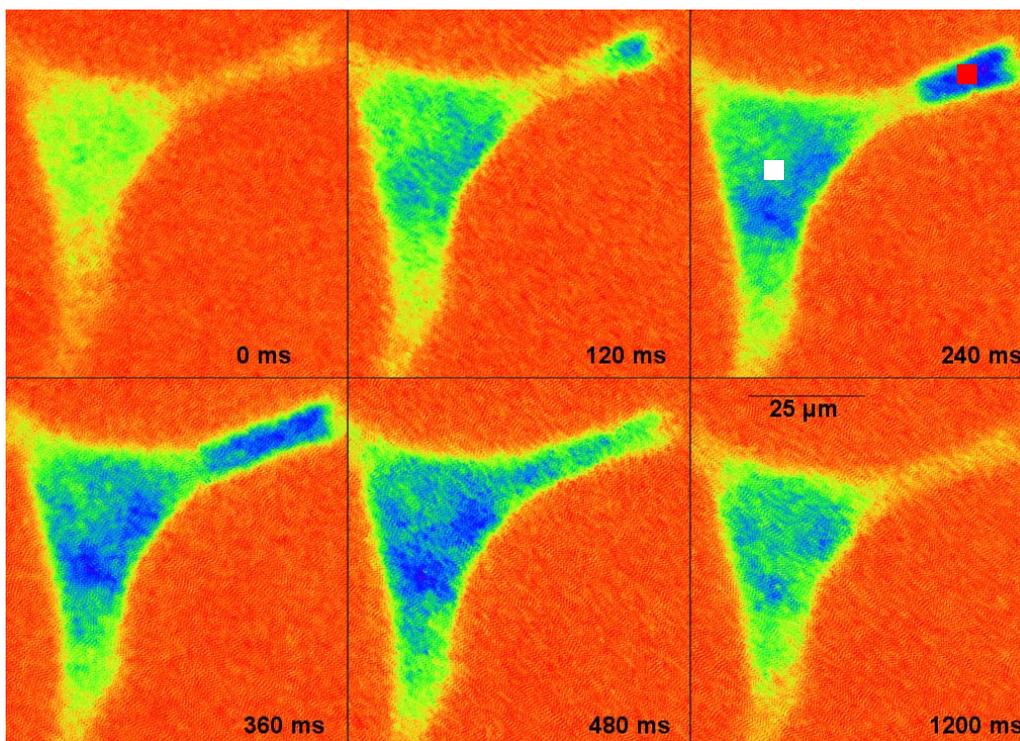


Abb. 15 Beispiel für eine 5+8 d alte Herzzelle vor Carbacholzugabe, die nach jeder dritten bis vierten Oszillation in einem Zellausläufer eine Welle generiert, welche von peripher nach zentral läuft. Nach 480 ms ist die Welle in die Gesamtoszillation der Zelle, welche zeitgleich abläuft, übergegangen.

Im Folgenden (Abbildung 16) wird die Originalregistrierung zur Oszillation der globalen Fluoreszenzintensität des Kardiomyozyten aus Abbildung 15 gezeigt. Aus der danach angefertigten Fourieranalyse (Abbildung 17) ist zu entnehmen, dass die Oszillationsfrequenz 0,4 Hz beträgt.

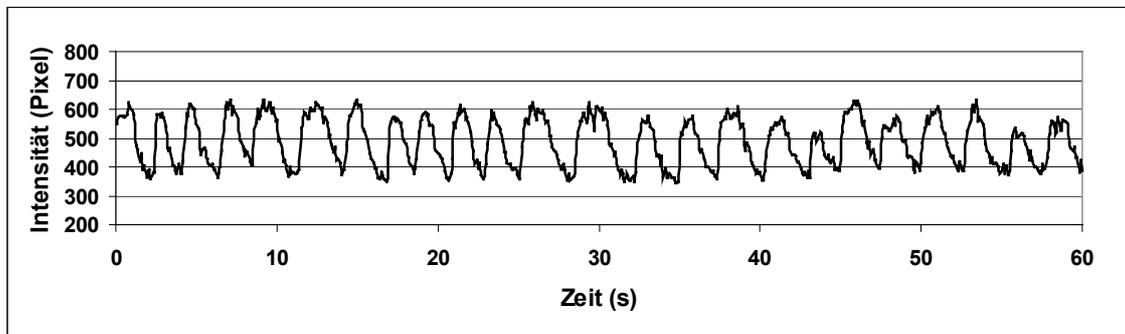


Abb. 16 Zu Abbildung 15 gehörendes Oszillogramm der Fluoreszenz aus dem Zentrum der Zelle (siehe weißes Kästchen).

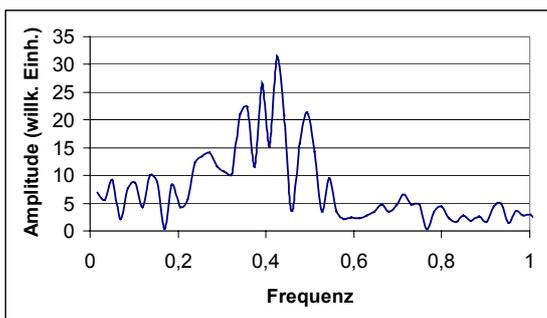


Abb. 17 Im Fourier-Spektrum der Spur von Abbildung 16 vor Carbacholzugabe tritt die Oszillationsfrequenz von 0,4 Hz als Peak deutlich hervor.

Zusätzlich wurde ein Oszillogramm der Kalziumfluoreszenz aus dem Fortsatz der Zelle registriert, in welchem die Welle entsteht (siehe rotes Kästchen in Abbildung 15). Die Gesamtoszillation erreicht hier (Abbildung 18) nur geringere Intensitätswerte als die Wellen. Letzere stellen die hohen Intensitätsspitzen im Oszillogramm dar.

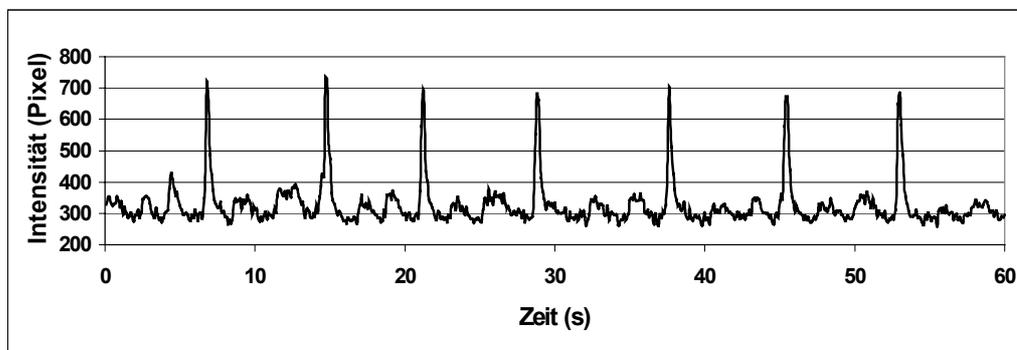


Abb. 18 Oszillogramm aus dem Fortsatz der Zelle (Abbildung 15, rotes Kästchen), in dem die Welle entsteht. Die hohen Intensitätsspitzen stellen die Welle dar, die flachen Intensitätsspitzen hingegen die Oszillation der gesamten Zelle.

Nach Zugabe von Carbachol ($1 \mu\text{mol/l}$) zu der Zelle aus Abbildung 15 wurde eine erneute Messung im Zentrum der Zelle (weißes Kästchen) durchgeführt. Aus der Abbildung 19 geht hervor, dass nur noch zwei Oszillationen pro Minute auftraten. Die Berechnung der Frequenz (Fourieranalyse war nicht durchführbar) ergab eine Verringerung der Frequenz von $0,4 \text{ Hz}$ vor auf $0,03 \text{ Hz}$ nach Carbacholzugabe.

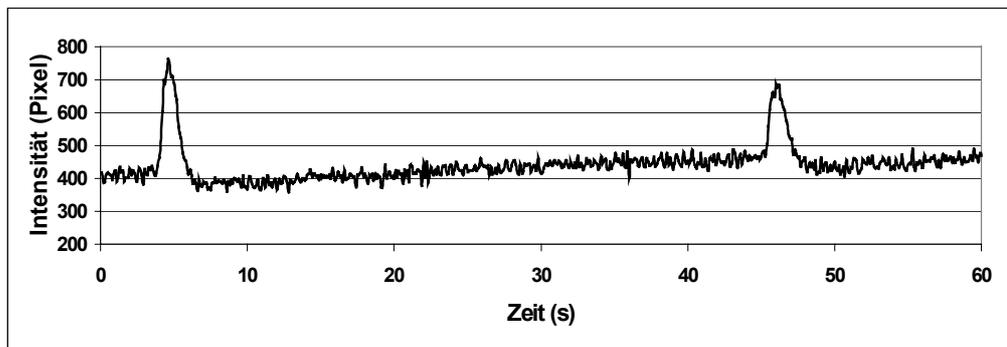


Abb. 19 Oszillogramm der selben Zelle (weißes Kästchen) nach Carbacholzugabe ($1 \mu\text{mol/l}$). Die Frequenz war mittels Fourieranalyse nicht bestimmbar, nach Berechnung verringerte sie sich jedoch deutlich auf $0,03 \text{ Hz}$. Wellen traten nicht mehr auf.

Der Carbacholeffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen aller Zellen in Abhängigkeit vom Alter ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Zellen wurden in 3 Altersgruppen aufgeteilt: 1. Gruppe $5+(2...4) \text{ d}$, 2. Gruppe $5+(5...8) \text{ d}$, 3. Gruppe $5+(12...13) \text{ d}$. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Nach Carbacholzugabe kam es zu einer statistisch signifikanten Frequenzabnahme in der 2. Gruppe, in der 1. und 3. Gruppe jedoch nicht.

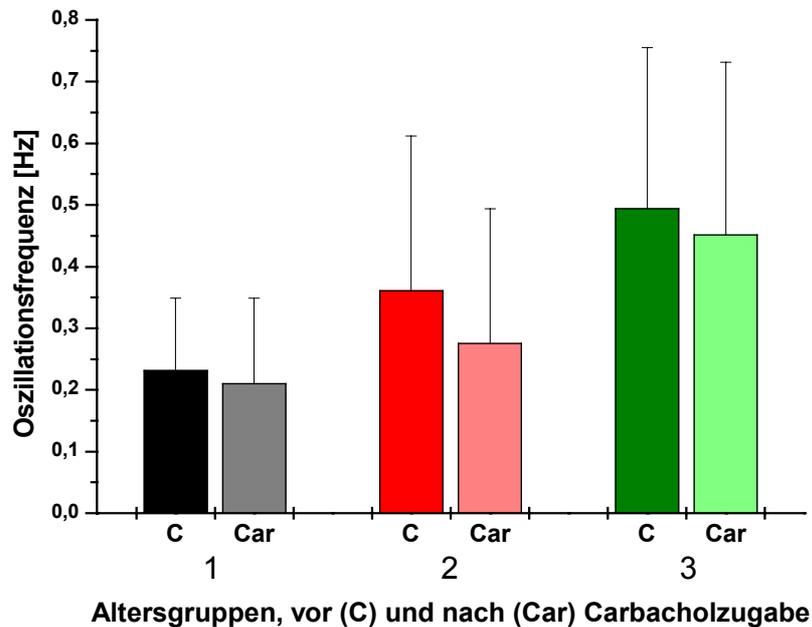


Abb. 20 Carbacholeffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(12...13) d

C : Kontrollgruppe
 Car : nach Carbacholzugabe (1 $\mu\text{mol/l}$)

Der folgenden Tabelle (Tab.7) sind die der Abbildung 20 zugehörigen Zahlenwerte zu entnehmen. Mittelwerte, Standardabweichungen, Anzahl der Zellen und der p-Wert sind aufgeführt.

Tab. 7 Mittelwerte und Standardabweichungen der Oszillationsfrequenzen in Hz in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter, Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte sind aufgeführt. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte paarweise.

Altersgruppe	Mittelwert (Hz)	Standardabweichung	N	p
1 C	0,23	0,12	31	0,22
1 Car	0,21	0,14	31	
2 C	0,36	0,25	75	$1,32 \times 10^{-4}$
2 Car	0,28	0,22	75	
3 C	0,49	0,26	10	0,69
3 Car	0,45	0,28	10	

In Tabelle 8 ist abhängig vom Alter der Prozentsatz an Zellen aufgeführt, deren Frequenz nach Carbacholzugabe abgenommen hat, gleichgeblieben ist oder zugenommen hat. In der 1. Gruppe nahm die Frequenz bei 48,4% ab, blieb bei 9,6% gleich und nahm bei 42% zu. In der 2. Gruppe war der Effekt der Frequenzabnahme mit 68% am größten, 6,7% blieben gleich und bei 25,3% nahm die Frequenz zu. In der 3. Gruppe nahm sie mit jeweils 20% ab und blieb gleich, 60% der Zellen steigerten sogar ihre Frequenz.

Tab. 8 Prozentualer Anteil der Zellen, deren Oszillationsfrequenz nach Carbacholzugabe abgenommen hat, gleich geblieben ist oder zugenommen hat. In der 1. Gruppe nimmt die Frequenz bei knapp der Hälfte aller Zellen ab, bei der 2. Gruppe liegt dieser Anteil mit 68% am höchsten und bei der 3. Gruppe mit nur 20% am niedrigsten. Die Frequenzen ändern sich in den Gruppen 1 bis 3 bei 9,6%, 6,7% bzw. 20% nicht. Eine Zunahme hingegen erfährt Alter 1 in 42%, Alter 2 in 25,3% und Alter 3 in 60% der Fälle.

Alters- gruppe	prozentualer Anteil der Zellen mit		
	Abnahme der Oszillations- frequenz	Konstanz der Oszillations- frequenz	Zunahme der Oszillations- frequenz
1	48,4 %	9,6 %	42 %
2	68 %	6,7 %	25,3 %
3	20 %	20 %	60 %

3.8 Carbacholeffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter

Neben der Beeinflussung der Oszillationsfrequenzen durch Carbachol wurden auch die Veränderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter gemessen. Die Zellen wurden in 2 Altersgruppen, 5+(2...4) d und 5+(5...8) d, aufgeteilt. Für die Auswertung der 3. Altersgruppe (5+[12...13] d) standen nicht genügend Daten zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 und Tabelle 9 dargestellt. Es wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten ist in beiden Altersgruppen zu verzeichnen.

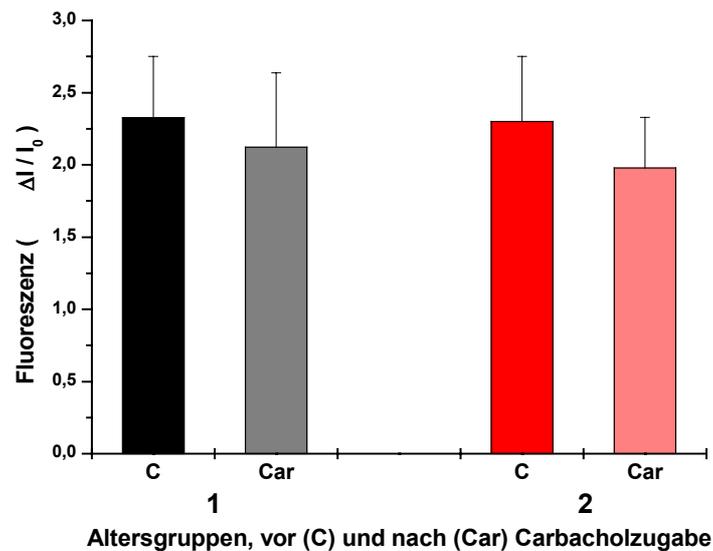


Abb. 21 Carbacholeffekt auf relative Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d

C: Kontrollgruppe
 Car: nach Carbacholzugabe (1 $\mu\text{mol/l}$)

Tabelle 9 sind die Zahlenwerte wie Mittelwerte, Standardabweichungen, Anzahl der untersuchten Zellen und p-Werte zu entnehmen.

Tab. 9 Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter. Die Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte sind auch zu entnehmen. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte paarweise.

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	N	p
1 C	2,33	0,43	30	0,005
1 Car	2,12	0,52	30	
2 C	2,3	0,45	73	$1,84 \times 10^{-10}$
2 Car	1,98	0,35	73	

3.9 Cäsiumchlorideffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter

Eine weitere Fragestellung war, ob die beobachteten Kalziumoszillationen primär von den Eigenschaften des SR bestimmt werden, oder aber, ob sie von der Zellmembran beeinflusst werden. In Schrittmacherzellen wird der Schrittmacherstrom I_f durch CsCl gehemmt. Deshalb wird I_f auch als Cäsium-gehemmter Membranstrom (I_{Cs}) bezeichnet (Glitsch et

al., 1986). Der Cäsiumchlorideffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Zellen wurden in 3 Altersgruppen aufgeteilt: 1. Gruppe 5+(2...4) d, 2. Gruppe 5+(5...8) d, 3. Gruppe 5+(9...15) d. Zu einer statistisch signifikanten Frequenzabnahme kam es in allen 3 Gruppen nach Cäsiumchloridzugabe.

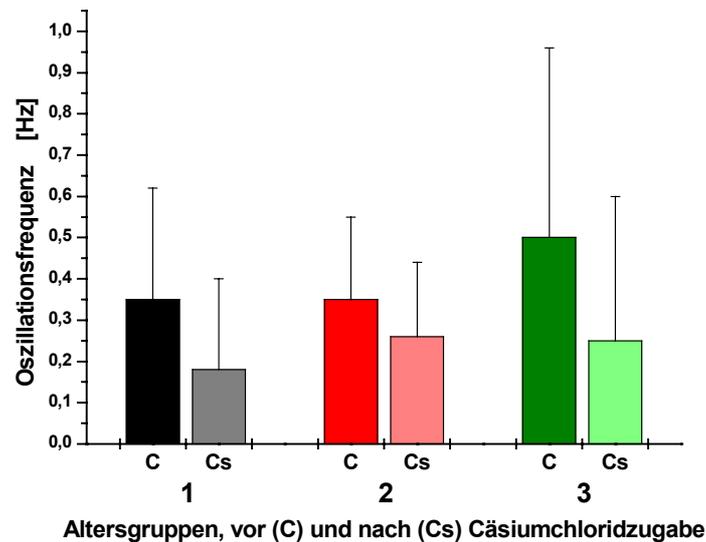


Abb. 22 Cäsiumchlorideffekt auf die Frequenz von Kalziumoszillationen in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(9...15) d

C : Kontrollgruppe
 Cs : nach Zugabe von CsCl (2 mmol/l)

Die folgende Tabelle (Tab.10) zeigt die zur Abbildung 22 gehörigen Zahlenwerte. Es sind Mittelwerte, Standardabweichungen, die Anzahl der untersuchten Zellen und die p-Werte zu entnehmen.

Tab. 10 Mittelwerte und Standardabweichungen der Oszillationsfrequenzen in Hz in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter. Die Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte sind auch zu entnehmen. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte paarweise.

Altersgruppe	Mittelwert (Hz)	Standardabweichung	N	p
1 C	0,35	0,27	33	$9,3 \times 10^{-4}$
1 Cs	0,18	0,22	33	
2 C	0,35	0,2	53	$3,08 \times 10^{-6}$
2 Cs	0,26	0,18	53	
3 C	0,50	0,46	43	$3,41 \times 10^{-5}$
3 Cs	0,25	0,33	43	

In Tabelle 11 sind prozentual die Zellen angegeben, deren Oszillationsfrequenz nach Cäsiumchloridzugabe abnimmt, gleich bleibt oder zunimmt. Die 1. Gruppe zeigte bei 84,8% aller Zellen eine Frequenzabnahme und bei 15,2% eine Zunahme. Die Zellen der 2. Gruppe verringerten die Frequenz in 69,8% der Fälle, bei 13,2% blieb sie gleich und bei 17% nahm sie zu. Diese Werte betragen bei der 3. Altersgruppe 93%, 2,4% und 4,6%.

Tab. 11 Prozentuale Angabe der Zellen, deren Frequenz abnimmt, gleich bleibt oder zunimmt. Aufsteigend nach den 3 Gruppen nahm die Frequenz bei 84,8%, 69,8% und 93% ab. Bei 0%, 13,2% und 2,4% blieb sie gleich. Eine Frequenzzunahme erfuhren 15,2%, 17% und 4,6%.

Alters- gruppe	prozentualer Anteil der Zellen mit		
	Abnahme der Oszillations- frequenz	Konstanz der Oszillations- frequenz	Zunahme der Oszillations- frequenz
1	84,8 %	0 %	15,2 %
2	69,8 %	13,2 %	17 %
3	93 %	2,4 %	4,6 %

3.10 Cäsiumchlorideffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter

Der Cäsiumchlorideffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Aufteilung der Zellen in 3 Altersgruppen, 5+(2...4) d, 5+(5...8) d und 5+(9...15) d, erfolgte wie bei der Untersuchung der Oszillationsfrequenzen. Der durchgeführte t-Test zeigte, dass in allen 3 Gruppen eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten nach Zugabe von Cäsiumchlorid (2 mmol/l) erfolgte.

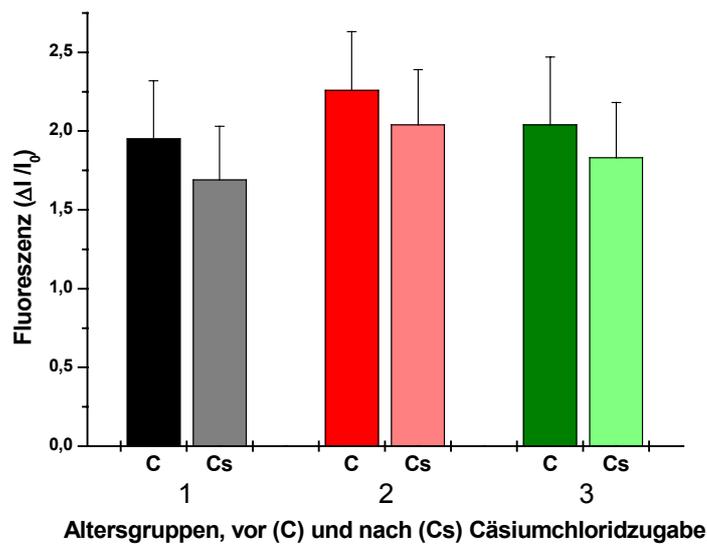


Abb. 23 Cäsiumchlorideffekt auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter.

Altersgruppe 1 5+(2...4) d
 Altersgruppe 2 5+(5...8) d
 Altersgruppe 3 5+(9...15) d

C : Kontrollgruppe
 Cs : nach Zugabe von CsCl (2 mmol/l)

Die Zahlenwerte, welche zu Abbildung 23 gehören, sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Aufgeführt sind neben Mittelwerten und Standardabweichungen auch die Anzahl der untersuchten Zellen und die p-Werte.

Tab. 12 Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit vom Alter, Anzahl N der untersuchten Zellen und die p-Werte. Die Signifikanzebene wurde mit $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Der t-Test erfolgte paarweise.

Alters- gruppe	Mittelwert	Standard- abweichung	N	p
1 C	1,95	0,37	25	$1,79 \times 10^{-4}$
1 Cs	1,69	0,34	25	
2 C	2,26	0,37	34	0,008
2 Cs	2,04	0,35	34	
3 C	2,04	0,43	46	$1,05 \times 10^{-4}$
3 Cs	1,83	0,35	46	

3.11 Beobachtung von verschiedenen Kalziumsignalen in Kardiomyozyten

In den untersuchten Kardiomyozyten wurden die unterschiedlichsten Kalziumsignale beobachtet, welche im Folgenden dargestellt werden.

3.12 Kernkalzium

3.12.1 Zellen, deren Kern bei Oszillationen stärker fluoresziert als das umgebende Zytosol

Es wurden Zellen in allen Altersgruppen beobachtet, deren Kern während der Oszillationen eine stärkere Fluoreszenz aufwies als das umgebende Zytosol. Als Beispiele sind ein 5+8 d alter Kardiomyozyt in Abbildung 24 und ein 5+12 d alter Kardiomyozyt in Abbildung 25 dargestellt.

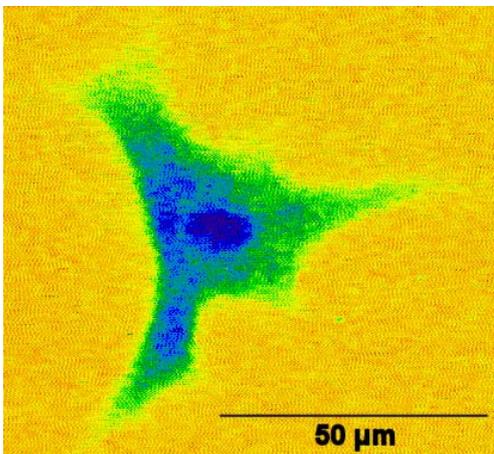


Abb. 24 5+8 d alter Kardiomyozyt (2. Gruppe) mit einem im Vergleich zum Zytoplasma deutlich stärker fluoreszierenden Kern (dunkelblau).

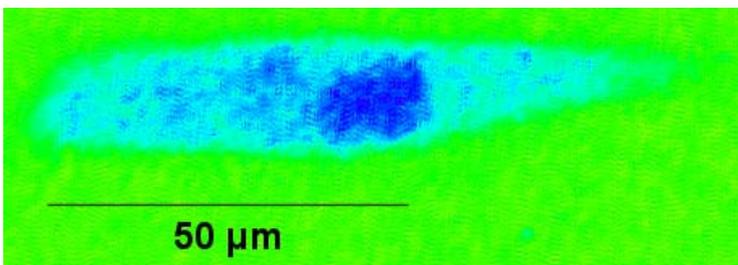


Abb. 25 5+12 d alter Kardiomyozyt (3. Gruppe) mit stark fluoreszierendem Kern (dunkelblau).

Die 5+12 d alte Herzzelle in Abbildung 26 weist neben annähernd gleicher Fluoreszenzintensität von Kern und Zytoplasma einen Ring geringerer Fluoreszenz um den Kern auf.

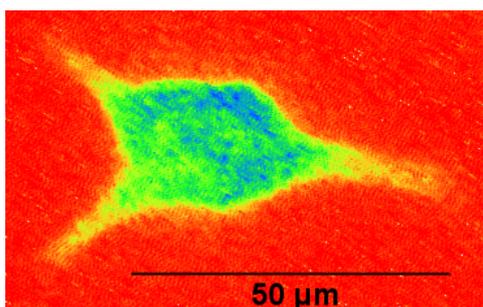


Abb. 26 5+12 d alte Zelle (3. Gruppe), deren Kern die gleiche Fluoreszenzintensität wie das Zytoplasma aufweist, jedoch von einem weniger fluoreszierenden Ring umgeben ist.

In Abbildung 27 wird der Kalziumtransient im Kern einer 5+9 d alten Herzzelle gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Kern eine allgemein höhere Grundfluoreszenz aufweist (0 ms, Kern hellblau).

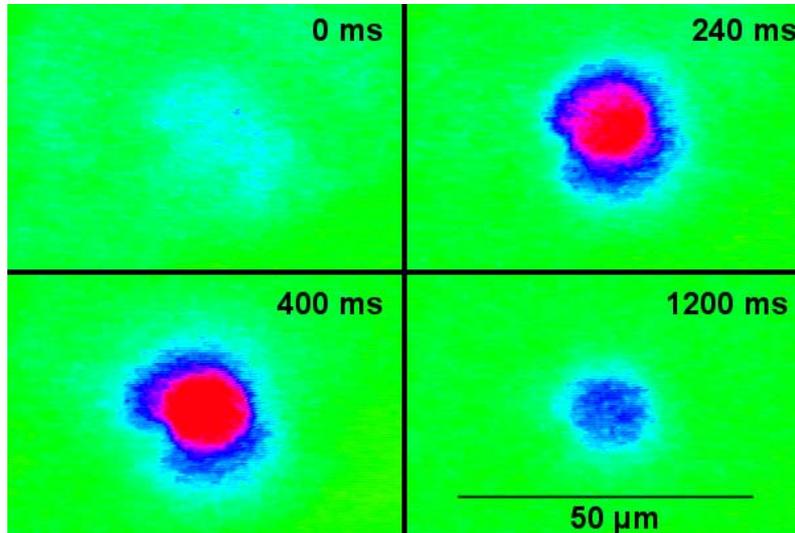


Abb. 27
Momentaufnahmen während eines Kalziumtransienten im Kern eines 5+9 d alten Kardiomyozyten (Haberland et al., 2000).

Abbildung 28 und 29 zeigen die Intensitätsprofile vom Anstieg und Abfall des Kalziumtransienten. Der maximale Anstieg ist bei ca. 400ms, um bei 2000ms die Ausgangsfluoreszenz wieder zu erreichen.

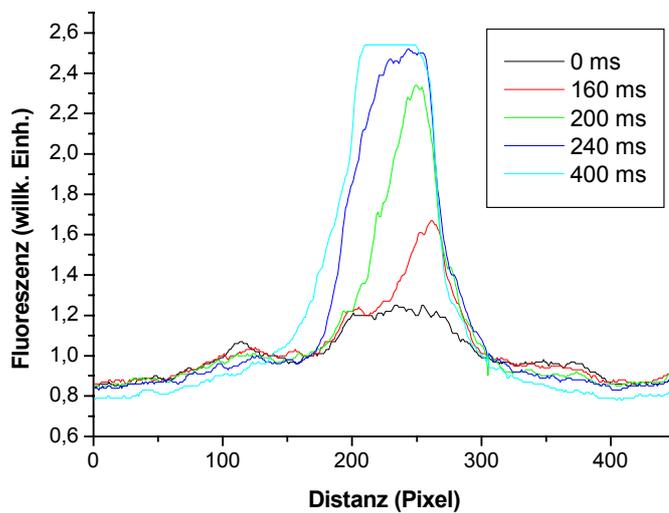


Abb. 28
Zu Abbildung 27 gehörendes Intensitätsprofil vom Anstieg des Kalziumtransienten (Haberland et al., 2000).

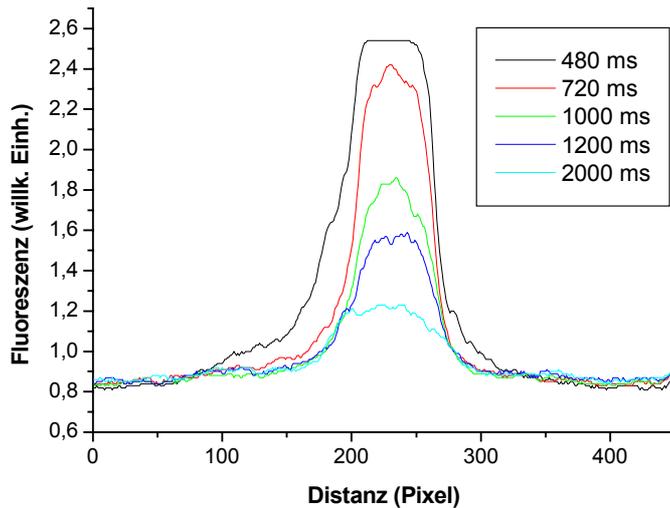


Abb.29
Zu Abbildung 27 gehörendes
Intensitätsprofil vom Abfall
des Kalziumtransienten
(Haberland et al., 2000).

3.12.2 Zellen, deren Kern während einer Oszillation deutlich weniger fluoresziert als das umgebende Zytosol

Die Abbildung 30 zeigt eine Zelle der 1. Altersgruppe, deren Kern eine wesentlich geringere Fluoreszenz aufweist als das umgebende Zytosol.

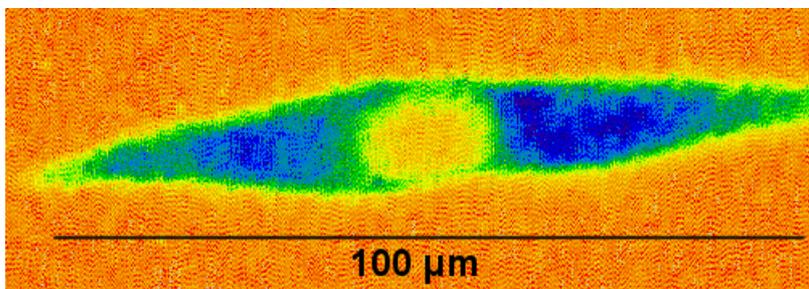


Abb. 30 5+4 d alter Kardiomyozyt (1. Altersgruppe), dessen Kern nur sehr wenig fluoresziert.

Folgende zwei Zellen der mittleren Altersgruppe (Abb. 31 und 32) besitzen einen im Vergleich zum Zytosol weniger stark fluoreszierenden Kern.

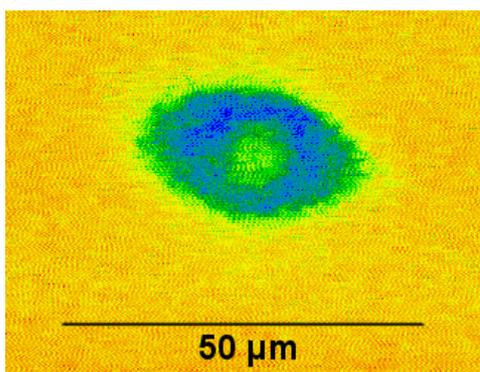


Abb. 31 Kardiomyozyt der mittleren Altersgruppe 5+7 d, dessen Kern wenig fluoresziert.

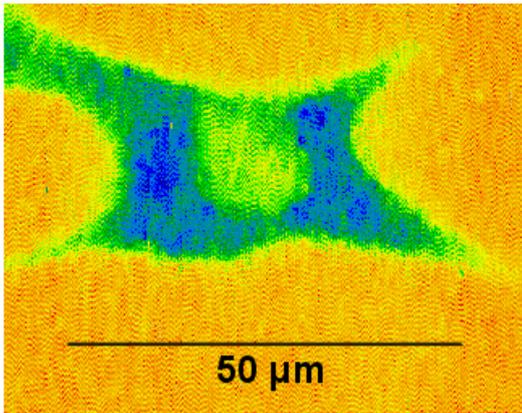


Abb. 32 5+8 d alter Kardiomyozyt (mittlere Altersgruppe), dessen Kern ebenfalls eine geringere Fluoreszenz aufweist.

3.13 Phänomene des zytosolischen und nukleären Kalziums

In der Abbildung 33 ist die Fluoreszenzintensität eines 7+9 d alten Kardiomyozyten dargestellt. Nach einer anfänglich schwachen zytosolischen und nukleären Kalziumkonzentration, folgt dem Anstieg des zytosolischen ein Anstieg des nukleären Kalziums.

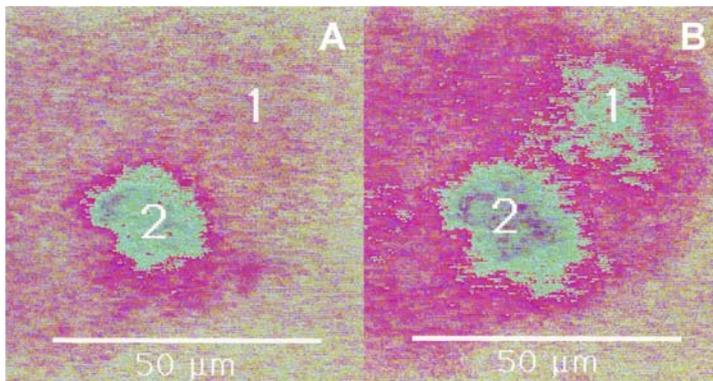


Abb. 33 7+9 d alter Kardiomyozyt. Anfänglich schwache zytosolische (1) und nukleäre (2) Kalziumkonzentration (Bild A). Dem Anstieg der zytosolischen folgt ein Anstieg der nukleären Kalziumkonzentration (Bild B).

3.13.1 Kalziumsparks

Als weiteres Phänomen wurde das Auftreten von Kalziumsparks beobachtet. Es handelt sich hierbei um lokal fluoreszierende Stellen unterschiedlicher Häufigkeit und Intensität im Zytosol und sehr selten auch im Kern. Ursache der Kalziumsparks im Zytosol ist vermutlich die Öffnung eines oder weniger Ryanodinrezeptoren. In Abbildung 34 ist eine 5+9 d alte Zelle dargestellt, in welcher Sparks im Zytoplasma und zusätzlich im Kern auftraten. Der Kern fluoreszierte heller.

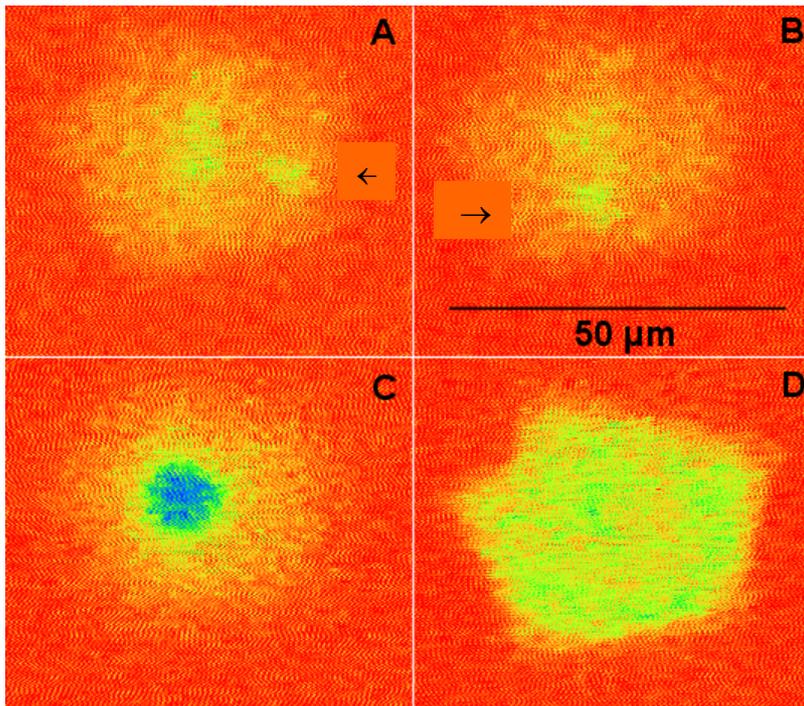


Abb. 34 5+9 d alter Kardiomyozyt aufgenommen zu vier verschiedenen willkürlich festgelegten Zeitpunkten. Auftreten von Sparks (schwarze Pfeile) an verschiedenen Stellen im Zytosol (A und B), Kernfluoreszenz mit Sparks (C) und Oszillation der gesamten Zelle (D).

Kalziumsparks traten mit zunehmender Häufigkeit in allen drei Altersgruppen auf. Abbildung 35 zeigt eine Herzzelle der 1. Altersgruppe (5+4 d) mit Sparkaktivität und Oszillation der ganzen Zelle.

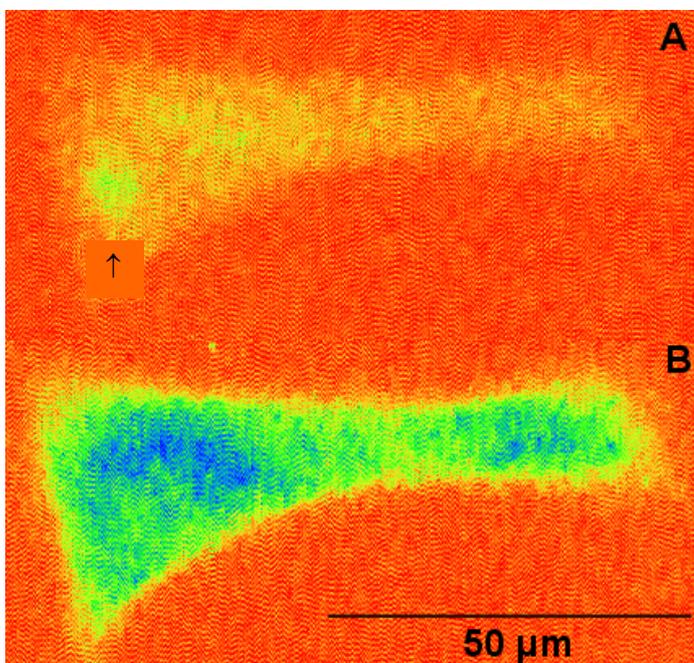


Abb. 35 Beispiel einer 5+4 d alten Herzzelle, die bereits Sparkaktivität zeigt. Spark (A, schwarzer Pfeil), und Oszillation der ganzen Zelle (B).

Die folgende Originalregistrierung zur globalen Fluoreszenzintensität der Zelle aus Abbildung 35 lässt die Sparkaktivität deutlich werden. Die niedrigeren Intensitätsspitzen entsprechen dem Auftreten der Sparks, während die hohen Intensitätsspitzen die Gesamtozillation der Zelle darstellen.

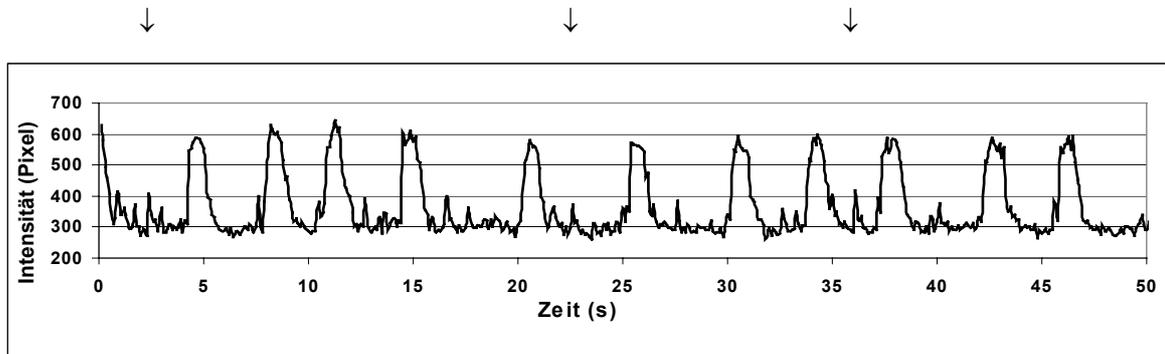


Abb. 36 Zu Abbildung 35 gehörendes Oszillogramm der Fluoreszenzintensität. Das Auftreten von Sparks ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die hohen Intensitätsspitzen kennzeichnen die Oszillation der gesamten Zelle.

Abbildung 37 zeigt einen Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe (5+8 d) mit gut erkennbarer Sparkaktivität.

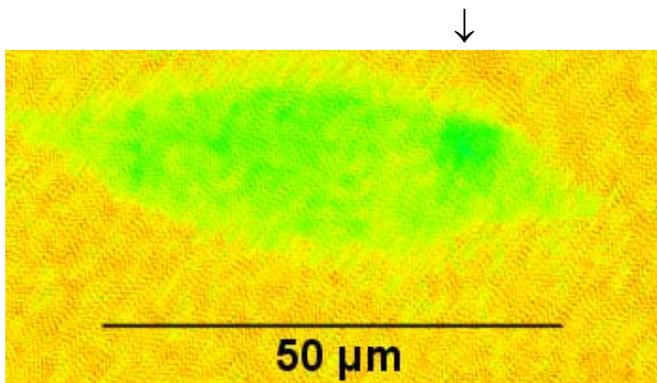


Abb. 37
5+8 d alte Herzzelle (mittlere Altersgruppe) mit Spark, der durch den Pfeil gekennzeichnet ist.

3.13.2 Lange andauernde Oszillationen

Die Dauer, mit welcher die Herzzellen oszillieren, ist sehr unterschiedlich. Die Spanne reicht von wenigen Millisekunden bis zu mehreren Sekunden. In 13% aller Herzzellen konnten Oszillationen beobachtet werden die länger als 5 Sekunden andauerten. 51% dieser Zellen gehören zur mittleren Altersgruppe. In Abbildung 38 ist eine Zelle zu sehen, deren Oszillationsdauer sich über mehrere Sekunden erstreckt.

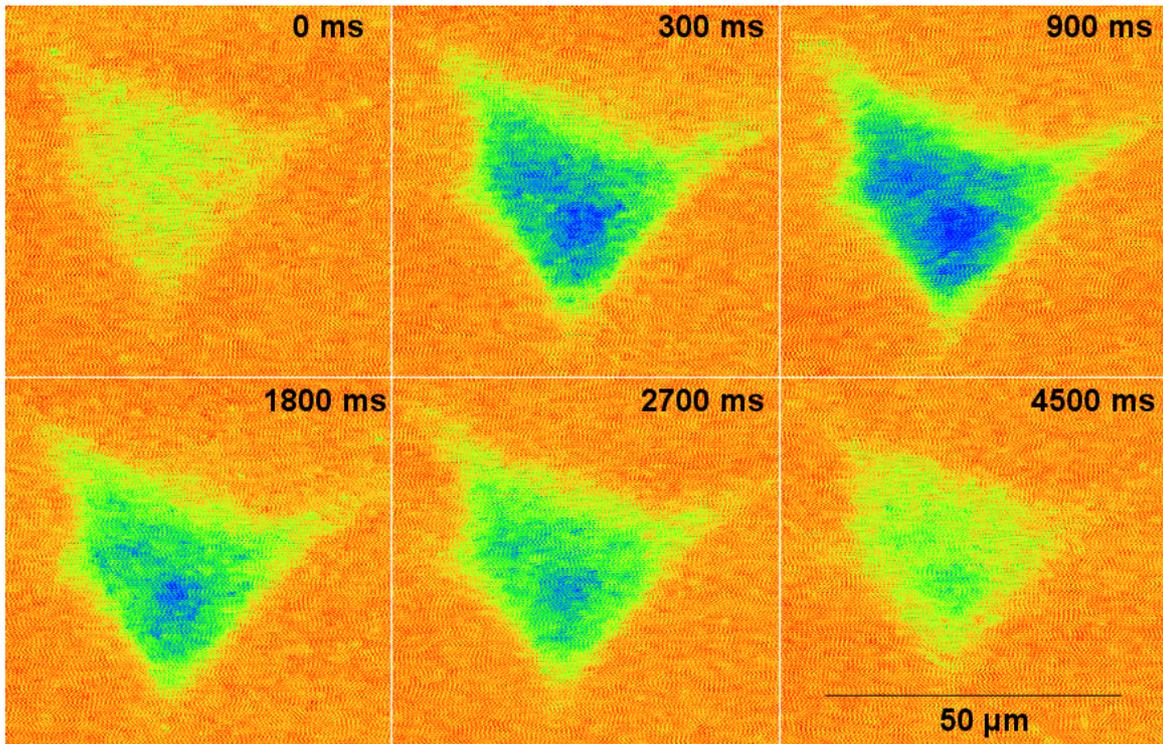


Abb. 38 5+7 d alte Herzzelle, deren Oszillation erst nach 4500 ms die Grundfluoreszenz beinahe wieder erreicht hat.

In Abbildung 39 wird die lange andauernde Oszillation der Zelle aus Abbildung 38 durch das dazugehörige Oszillogramm der Fluoreszenzintensität veranschaulicht. Während die ersten beiden Oszillationen ca. 4500 ms dauern, hält die dritte Oszillation fast 10 Sekunden an.

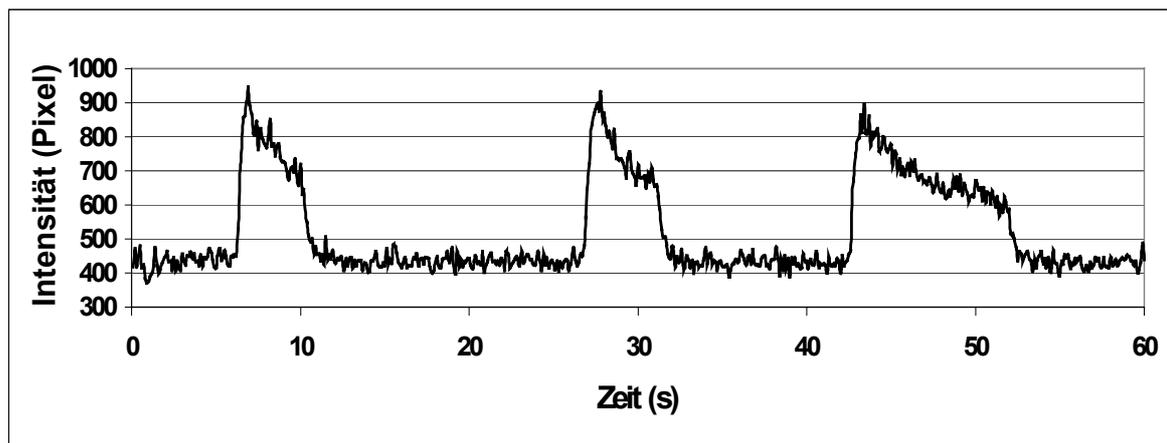


Abb. 39 Zu Abbildung 38 gehörendes Oszillogramm der Fluoreszenz. Die ersten beiden Oszillationen dauern ungefähr 4500 ms. Die dritte Oszillation erreicht eine Dauer von fast 10 Sekunden.

3.13.3 Kalziumwellen

Neben Oszillationen treten in Reaktions-Diffusionssystemen auch Wellen auf (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al., 1997, 1999, 2001; Wussling und Mair 1999). Für die Ausbreitung von Kalziumwellen in Herzzellen ist die Freisetzung von Kalzium aus dem SR über RyRs, Kalziumdiffusion zwischen den Clustern von RyRs und die Wiederaufnahme von Kalzium durch die SERCA wichtig. Abbildung 40 und 41 zeigen zwei nebeneinander liegende, aber unabhängig voneinander agierende Kardiomyozyten, die zeitlich versetzt oszillieren und Kalziumwellen generieren.

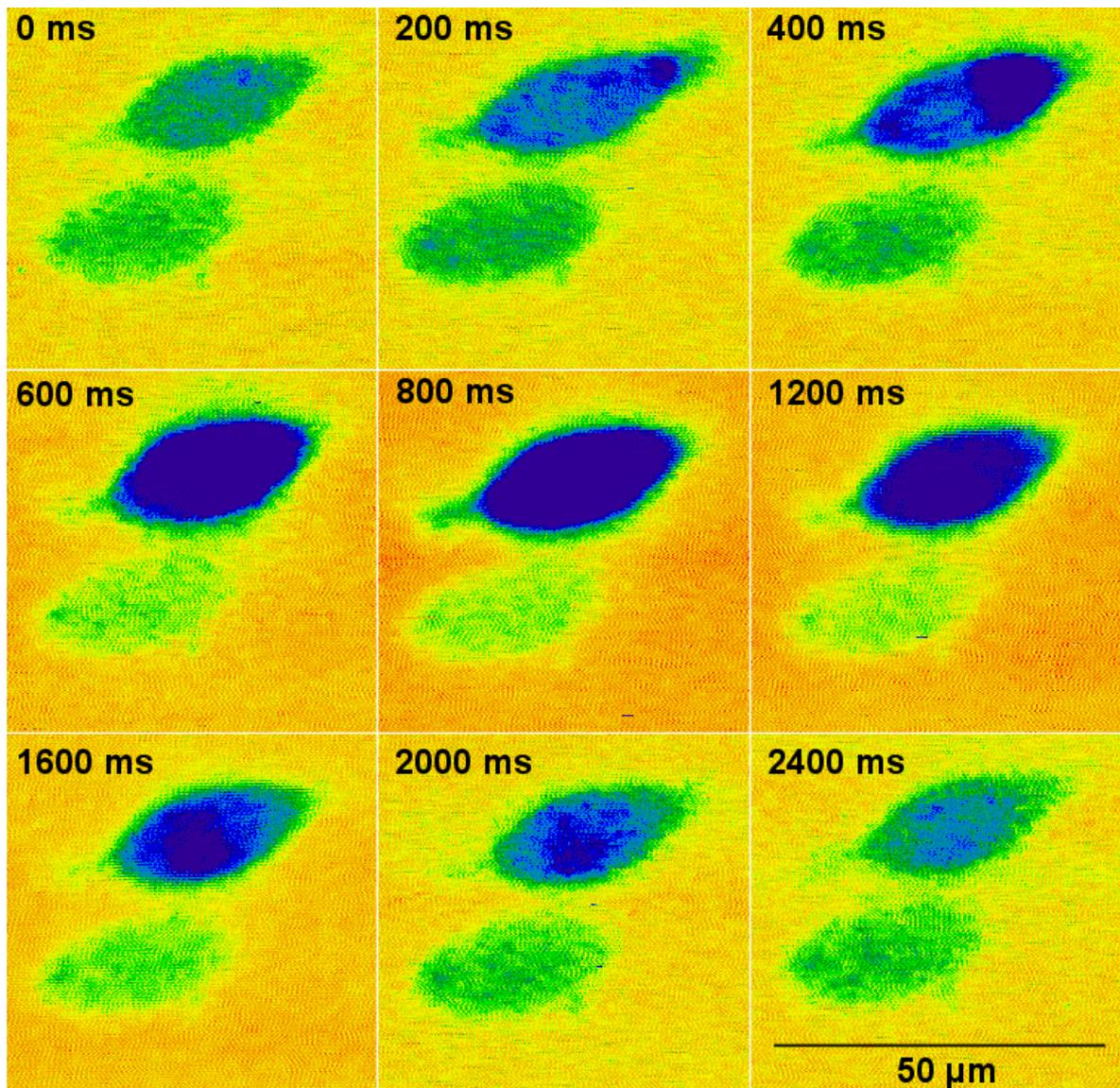


Abb. 40 7+10 d alter Kardiomyozyt, der spontan eine Welle generiert. Die Geschwindigkeit der Welle beträgt ca. 66,3 $\mu\text{m/s}$.

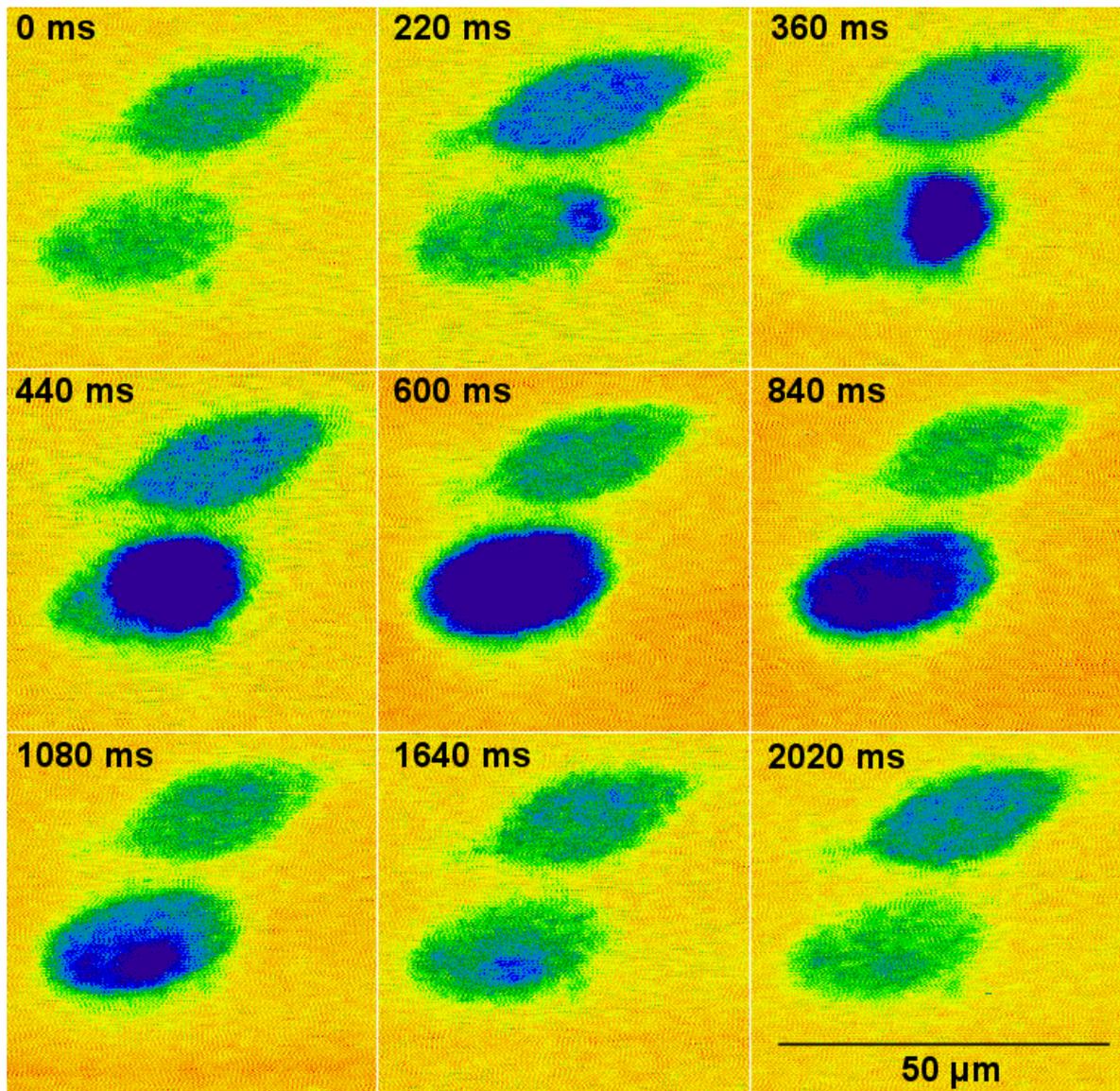


Abb. 41 7+10 d alter Kardiomyozyt der eine Welle mit der Geschwindigkeit von $58,8 \mu\text{m/s}$ generiert. Die darüberliegende Zelle (s. Abb. 40) oszilliert zeitlich versetzt.

Im Folgenden (Abb. 42) werden Momentaufnahmen einer Zelle gezeigt, deren spontane Kalziumwelle eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von $105,8 \mu\text{m/s}$ aufweist. Die Welle ist also fast doppelt so schnell wie jene in Abbildung 40 ($66,3 \mu\text{m/s}$). Beide Zellen gehören jedoch der terminal differenzierten Altersgruppe an.

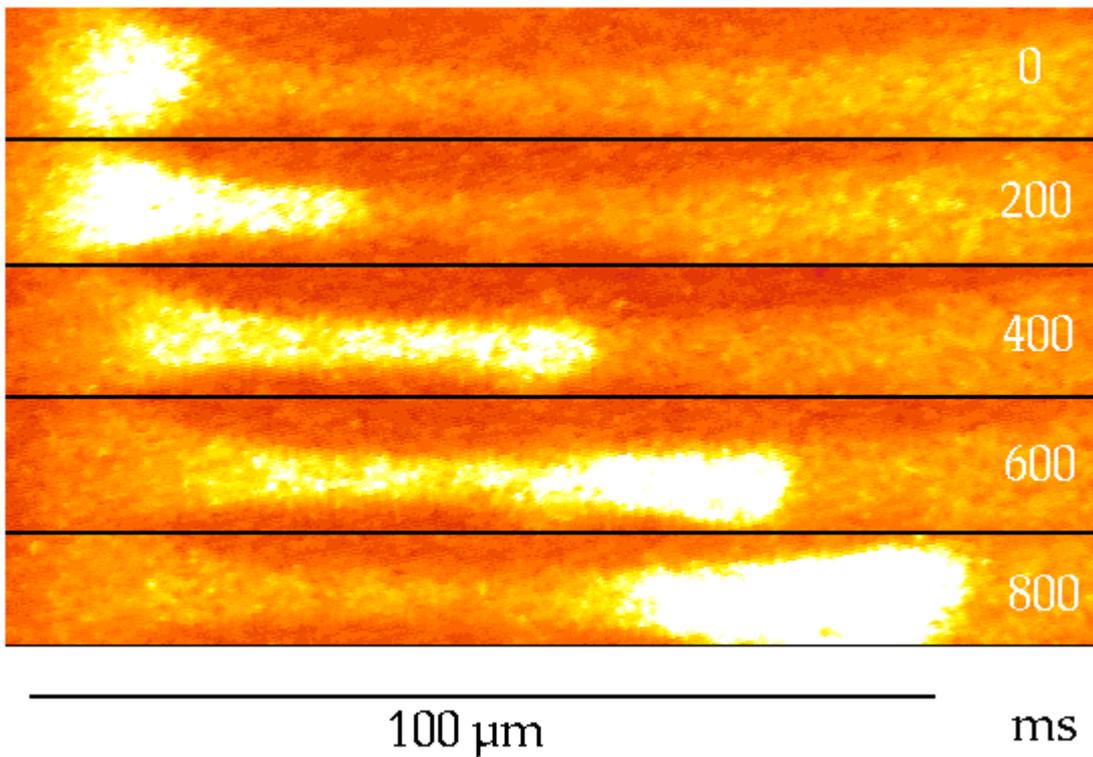


Abb. 42 7+9 d alter Kardiomyozyt, welcher spontan eine Kalziumwelle generiert, deren Ausbreitungsgeschwindigkeit $102,9 \mu\text{m/s}$ beträgt (Haberland et al., 2000).

3.13.4 Abortive Wellen

Es können Kalziumwellen entstehen, die nicht den gesamten Zellkörper durchlaufen, sondern nur einen Teil von ihm. Ein Beispiel wurde bereits in Abbildung 15 gezeigt, in der sich die Welle auf einen Zellfortsatz beschränkt. Ein weiteres Beispiel einer abortiven Welle ist in Abbildung 43 dargestellt. Es entstehen sowohl am oberen als auch am unteren Zellpol kleine Wellen, die zeitlich versetzt aufeinander zulaufen, aber einander nicht erreichen. Sie entstehen unabhängig von der Gesamtoszillation der Zelle.

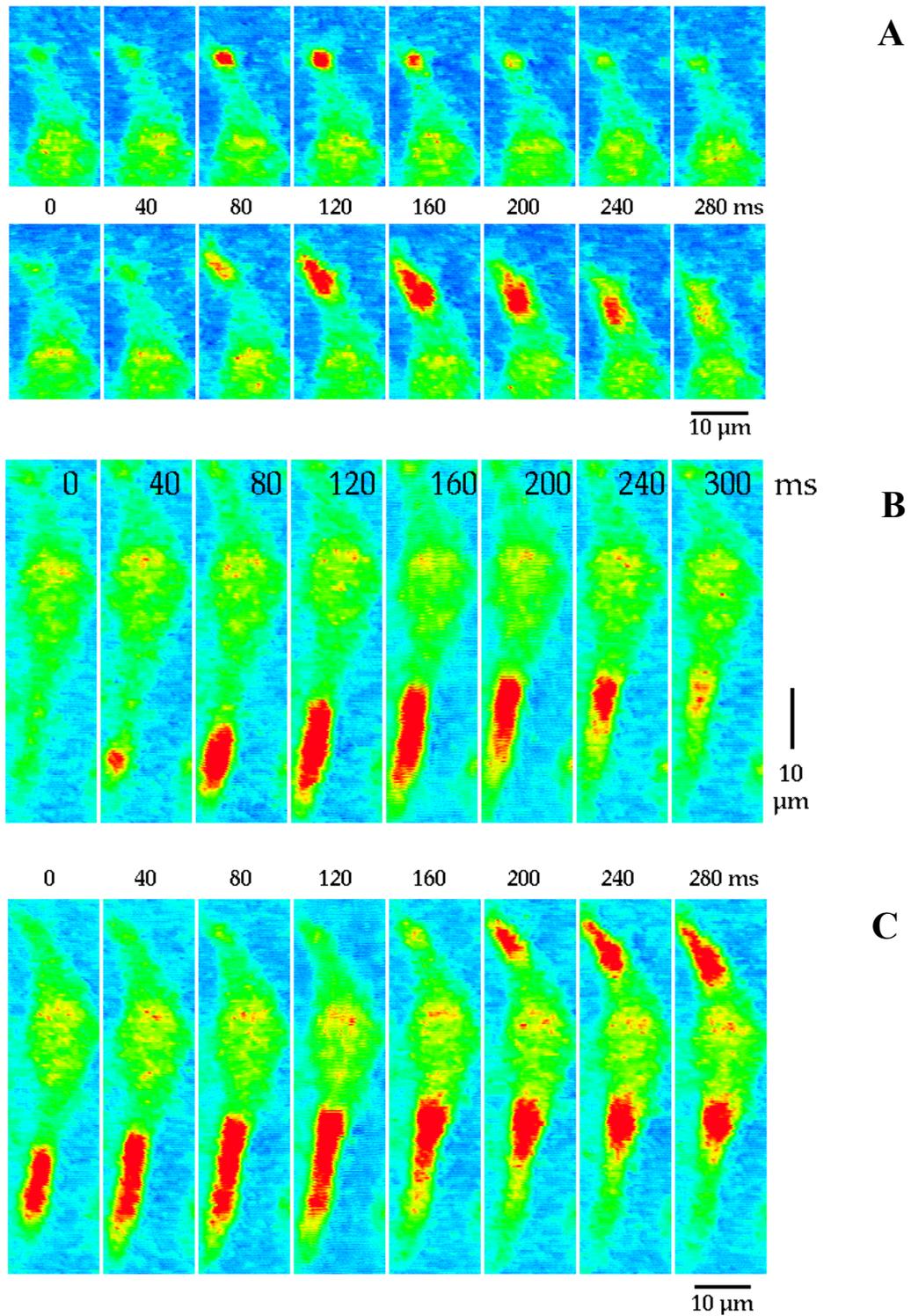


Abb. 43 5+9 d alter Kardiomyozyt mit Spark und abortiver Welle im oberen Zellpol (A) und abortiver Welle am unteren Zellpol (B). Beide Wellen erreichen einander nicht (C).

4. Diskussion

Das Kalziumion ist ein wichtiges Ion der intra- und interzellulären Signalkaskaden und Stoffwechselfvorgänge. In zahlreichen Zelltypen kommt es zur Entstehung spontaner Oszillationen und Wellen wie z.B. in Hepatozyten (Höfer, 1999), humanen Gefäßendothelzellen (Viana et al., 1998), primitiven entodermalen Zellen (Sauer et al., 1998) und Herzzellen (Viatschenko-Karpinski et al., 1999), die sich aus ES-Zellen differenziert haben. Wellen wurden auch in adulten Rattenherzzellen gefunden (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al., 1997; Wussling und Mair, 1999) Diese Kalziumsignale sind folglich in erregbaren und nicht erregbaren Zellen zu finden. Wegen ihrer Bedeutung für die Zellfunktion sind sie Gegenstand intensiver experimenteller und theoretischer Untersuchungen.

Die Einteilung der Herzzellen in 3 Altersgruppen (s. Einleitung) erfolgte gemäß dem genetischen Expressionsmuster der herzspezifischen Ionenkanäle und Formen der Aktionspotentiale. Das frühe Stadium, 5+2 bis 5+4 d, zeigt den Ca^{2+} -Strom und den K^{+} -Strom. Diese frühen Schrittmacherzellen bilden genauso wie die Zellen des mittleren Stadiums, 5+5 bis 5+8 d, spontan Aktionspotentiale. Letztere sind durch den Na^{+} -, Ca^{2+} - und I_f -Strom, sowie den K^{+} -Strom charakterisiert. Im terminal differenzierten Stadium (5+9 bis 5+18 d) werden sinusnotenartige, atriale und ventrikelartige Zellen ausgebildet. Spontane Aktionspotentiale werden in dieser Gruppe von sinusnotenartigen Zellen gebildet, bei denen der Ca^{2+} - und I_f - Strom sowie der K^{+} -Strom gefunden wurden. Getriggerte Aktionspotentiale zeigen die atrialen und ventrikelartigen Zellen (Na^{+} -, Ca^{2+} - und K^{+} -Strom) (Maltsev et al., 1993, 1994; Hescheler et al. 1997).

Von Interesse war die Frage, ob die Oszillationsfrequenzen mit dem Alter und der Morphologie der Kardiomyozyten in Zusammenhang stehen. Die Zellen wurden in die 3 Altersgruppen und in 6 Morphotypen unterteilt. Typische Kardiomyozyten haben kurz nach ihrer Isolierung (1-3 Tage) eine runde, spindelförmige, dreieckige oder vieleckige Form. Nach ein- bis zweiwöchiger Kultivierung entwickeln sie sich in flache polymorphe Zellen mit pseudopodienähnlichen Fortsätzen. Die Zellmorphologie und Sarkomerformation sind denen in lebenden Kardiomyozyten ähnlich (Westfall et al., 1997). Mit 40-100 μm (an der Stelle ihres größten Durchmessers) können sie gut von den kleineren Stammzellen (20-30 μm) und den größeren Epithelzellen (150-200 μm) unterschieden werden (Maltsev et al., 1993). Gruppe 1 stellt Purkinje- und Ventrikelzellen dar. Gruppe 2 und 4 sind vermutlich atriale Zellen. Die Zellen der Gruppe 5 sind Schrittmacherzellen. Kardiomyozyten der Gruppen 3 und 6 konnten nicht zugeordnet

werden. Es müssten zur exakt sicheren Identifikation der Morphotypen Patch-Clamp-Analysen durchgeführt werden. Denn nur anhand des Aktionspotentials ist die Zuordnung zu einem bestimmten Herzzelltyp möglich.

Der 1. Morphotyp zeigt eine kontinuierliche Frequenzzunahme von der 1. bis zur 3. Gruppe. Der 2. Morphotyp lässt eine Erhöhung der Frequenz von der 1. zur 2. Gruppe erkennen und fällt in der 3. Gruppe wieder ab. Die Frequenz von Morphotyp 3, der in der 3. Gruppe nicht zu finden war, stieg von der 1. zur 2. Gruppe an. Der 4. Morphotyp hatte in der 1. und 2. Gruppe ähnliche Frequenzen, die in der 3. Gruppe noch zunahmen. Der 5. Morphotyp, von dem keine Zellen der 1. Gruppe auf Videoband gespeichert wurden, erfuhr ebenfalls eine Frequenzzunahme von der 2. zur 3. Gruppe. Der 6. Morphotyp war auch nur in der 2. und 3. Gruppe mit ähnlichen Oszillationsfrequenzen zu finden.

Nachdem die Alters- und Morphologieabhängigkeit der Oszillationsfrequenzen untersucht wurde, war die Altersabhängigkeit der Oszillationsfrequenz aller Zellen von Interesse. Es zeichnete sich nach ersten Versuchen in der 3. Altersgruppe eine wesentliche Zunahme der Oszillationsfrequenz ab. Daraufhin wurde das Zellmaterial nochmals in 2 Gruppen unterteilt. Die 3. Altersgruppe besteht somit aus Zellen des Alters 5+(9...11) d und die 4. Altersgruppe aus 5+(12...15) d alten Zellen. Generell kam es bei den vorliegenden Untersuchungen mit steigendem Alter der Herzzellen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Oszillationsfrequenz. Die Schwankungsbreite der Frequenzen zwischen den einzelnen Zellen einer Altersgruppe war groß. Dies wurde auch in anderen Untersuchungen festgestellt (Viatschenko-Karpinski et al., 1999; Maltsev et al., 1993). Dort betrug die Frequenz zwischen 0,5–5 Hz.

Frühere Untersuchungen (Viatschenko-Karpinski et al., 1999) ergaben, dass in der 1. Altersgruppe, wenn die genetische und funktionelle Expression der Ionenkanäle noch inkomplett ist, die Kalziumoszillationen spontane Kontraktionen triggern. Die Oszillationen, welche ohne Beziehung zu Membrankanälen auftreten, induzieren die Aktionspotentiale in diesen Kardiomyozyten. Nach Hinzugabe von Thapsigargin, einem Hemmstoff der SERCA, kam es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und einem sofortigen Oszillationsstop (Viatschenko-Karpinski et al., 1999).

Es könnte also sein, dass die Oszillationsfrequenz in dieser Gruppe mit der Kontraktionsfrequenz identisch ist. Kontraktionen synchron zu Kalziumoszillationen wurden bei anderen Untersuchungen in den 3 Altersgruppen gefunden (Sauer et al., 2001). Die Oszillationen bleiben selbst unter einem starken Anstieg der extrazellulären K^+ -

Konzentration, die am adulten Herz zum Stillstand führt, und der Gabe von 2 μM Nisoldipin, einem Blocker des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals, weiter bestehen. Das schließt eine Beeinflussung der Oszillationen durch extrazelluläre Faktoren aus. Im Terminalstadium hingegen (7+9 bis 7+15 d) sind die transmembranösen Ströme (L-Typ Ca^{2+} , K^+ und I_f) für die Kontraktion ausschlaggebend. Bei einigen, aber nicht allen von uns untersuchten Zellen, wurde die Synchronität von Kalziumoszillationen und Kontraktionen in allen Altersgruppen auch festgestellt. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass sich unsere Zellen in einem Medium mit einer unphysiologisch hohen Kalziumkonzentration von 3,6 mmol/l befanden. Dieser Umstand kann dazu führen, dass es zu Oszillationen kommt, die keine Kontraktion der Zelle nach sich ziehen. Die Oszillationsfrequenz kann folglich höher als die Kontraktionsfrequenz sein.

Auch andere Autoren zeigten, dass die spontane Kontraktionsfrequenz mit steigendem Alter zunimmt (Yang et al., 2002). Die Entwicklung der strukturellen Organisation der Myofilamente während der embryonalen und fetalen Periode ist wichtig für die Kontraktionskraftsteigerung (Siedner et al., 2003).

Ryanodinrezeptoren kommen in 3 Untergruppen vor. RyR-1 ist im Skelettmuskel, RyR-2 im Herzmuskel und RyR-3 im glatten Muskel lokalisiert. Sie werden von separaten Genen kodiert. Der RyR-2 Rezeptor (spezifisch für Herzmuskel) wurde als wichtiger Vermittler für den Anstieg der Oszillationsfrequenz gefunden. Der Anstieg der Kontraktionsfrequenz wird in Herzzellen, deren RyRs nicht richtig funktionieren, merklich unterdrückt. Solche aus ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten zeigen eine Verlangsamung der spontanen diastolischen Depolarisation und Kalziumsparks fehlen völlig (Yang et al., 2002).

Mutante Mäuse, welche den RyR-2 nicht ausbilden, sterben am 10. Tag nach der Befruchtung mit einer morphologisch abwegigen Entwicklung des Herzschlauches (Takeshima et al., 1998). Vorher kommt es zur Ausbildung von strukturell abnormalen Mitochondrien und einem großen vakuolenartigen SR, das hohe Ca^{2+} -Konzentrationen enthält. In Kontrollkardiomyozyten hatte Ryanodin (blockiert RyRs im Offenzustand) keinen großen Effekt auf spontane Kontraktionen. In den mutanten Mäusen wurden Kalziumtransienten verhindert, nachdem Koffein (Aktivator der RyRs) hinzugegeben wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die Rolle der RyRs nicht in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung, sondern in der Regulation der Kalziumhomöostase besteht (Takeshima et al., 1998).

Darüberhinaus ist bekannt, dass die Dichte der RyRs, welche schon im sehr frühen Stadium ausgebildet sind, mit steigendem Alter zunimmt (Sauer et al., 2001). Auch das

Volumen des SR, an dem sich die RyRs befinden, nimmt mit fortschreitender Zellreifung zu. Die dichteste Anhäufung wurde im frühen Stadium in der kernnahen Region beobachtet. Die relativ geringe Beladung des SR mit Kalzium im frühen Stadium erklärt, dass auch die entsprechende Kalziumoszillationsfrequenz relativ gering ist.

Auswertungen der relativen Fluoreszenzintensitäten in den genannten vier Altersgruppen ergaben eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten aller Gruppen bis auf die Werte zwischen der 1. und 2. Altersgruppe. Mit zunehmendem Alter der Zellen kommt es zu einer Reifung SR. Die Anzahl der Ryanodinrezeptoren vervielfacht sich und die Menge an SERCA nimmt auch zu (Sauer et al., 2001). Die SERCA, welche eine ATP-abhängige Kalzium-Magnesium-ATPase ist, pumpt unter Verbrauch eines ATP-Moleküls ein Kalziumion in das Lumen des SR (Misquitta et al., 1999). Eine größere Effizienz der SERCA-Pumpen mit zunehmendem Alter und der damit verbundenen schnelleren Wiederaufnahme des Kalziums vom Zytosol in die Speicher des SR könnte eine Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten sein.

Für die Zellen ist es wichtig, eine niedrige zytosolische Kalziumkonzentration für eine adäquate Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Zu hohe Konzentrationen schädigen die Struktur von Nukleinsäuren und einigen Proteinen, was schließlich zum Zelltod führen kann. Mitochondrien dienen zeitweise als „Sammelbecken“ für Kalziumionen, um die hohen zytosolischen Konzentrationen abzupuffern. Drei Dehydrogenasen des Krebszyklus werden durch Kalziumionen aktiviert (Rizzuto et al., 2000). Im Stoffwechsel sind die Mitochondrien wichtig für die oxidative Phosphorylierung, die Substratoxidation, die Gluconeogenese, die Lipidoxidation, die DNA- und die RNA- Synthese. Nicht zuletzt sind sie Auslöser für die Apoptose.

Der Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien erfolgt über einen Uniporter entlang eines elektrochemischen Gradienten. Für den Ausstrom, mit dem Gradienten erfolgt, stehen zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung: 1. ein $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Austauscher und 2. ein Na^{+} -unabhängiger Efflux (womöglich ein $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher). Ein zusätzlicher Weg für die Kalziumfreisetzung ist die PTP, ein nicht selektiver hochleitender Kanal (Rizzuto et al., 2000). Der mitochondriale CICR wird durch die vorübergehende Öffnung der PTP gesteuert (Ichas et al., 1997).

Der Kalziumausstrom wird durch verschiedene zweiwertige Ionen (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) und Antimycin A gehemmt. Antimycin A hemmt auch den Komplex III der Atmungskette im Mitochondrium dahingehend, dass der Elektronentransport unterbrochen wird, was in einer verminderten ATP-Synthese resultiert (Jouaville et al., 1995). ATP ist essentiell für

alle energieverbrauchenden Prozesse in der Zelle wie auch die Herzmuskelkontraktion. In adulten Rattenherzzellen wurde beobachtet, dass Entkoppler der Atmungskette nach einer spontan generierten Kalziumwelle eine Verminderung des Kalziumabtransportes aus dem Zytosol auf die Hälfte verursachten (Bowser et al., 1998).

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob es eine Wirkung von Antimycin A, einem Hemmstoff der Atmungskette, auf die Frequenz von Kalziumoszillationen gibt. In der 1. Altersgruppe war eine statistisch signifikante Abnahme der Frequenzen zu verzeichnen. Dies war bei 100% der untersuchten Zellen der Fall. Zellen der 2. Gruppe zeigten nur in 69% der Fälle eine Frequenzabnahme, statistische Signifikanz lag auch hier vor. Bei der 3. Gruppe (64% der Zellen zeigten Frequenzabnahme) wurde keine Signifikanz erreicht. Global gesehen kommt es zu einer Hemmung der Oszillationsfrequenzen durch Antimycin A.

Um die konfokalmikroskopischen Beobachtungen zu erklären, wurden zusätzlich Messungen der spezifischen Aktivität des Komplex III der Atmungskette in allen 3 Altersgruppen durchgeführt. Die Aktivitätsmessung ist eine sehr empfindliche Reaktion. Die gemessenen Aktivitäten waren sehr gering, da sie sich an der Nachweisgrenze befanden. Eine zu geringe Zellzahl pro Probenvolumina könnte der Grund dafür gewesen sein. Zusätzlich wurde das Leitenzym der Glycolyse, Phosphohexoseisomerase (PHI), gemessen. Der in Prozent dargestellte Quotient aus Komplex III und PHI lag in der 1. Gruppe mit 4,1% deutlich über denen der 2. (1,33%) und 3. Gruppe (1,12%). Die hohen Standardabweichungen rühren vermutlich von den Unterschieden der einzelnen Zellkulturen her. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Verhältnis „Menge der Mitochondrien“-„Vorhandensein von Glycolyseleitenzymen“ in der 1. Gruppe zugunsten der Mitochondrien verschoben ist. Es ist zu vermuten, dass das noch unausgereifte SR die komplette Kalziumspeicherfunktion nicht vollständig übernimmt. Wahrscheinlich wird ein großer Teil der Speicherfunktion von den Mitochondrien übernommen. Wie bei adulten Rattenherzzellen gefunden wurde, induziert Antimycin A einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die mitochondrialen Kalziumspeicher entleeren sich. Es verhindert den mitochondrialen CICR und blockiert das Auftreten der normalen ATP-induzierten Kalziumantwort in intakten Zellen (Icha et al., 1994). Dies korreliert mit den Beobachtungen bei unseren Zellen: 1. Die Hemmung des Elektronentransportes der Atmungskette und resultierender geringerer ATP-Synthese und 2. Auslaufen der mitochondrialen Kalziumspeicher, was die Bildung von Kalziumsignalen verhindert. Die Ergebnisse anderer Arbeiten (Jaconi et al., 2000) zeigten, dass bei neonatalen

Rattenherzzellen eine IP₃-induzierte Modulation der zytosolischen Kalziumoszillationen stattfindet. Es besteht eine Kontrolle zwischen dem Füllungszustand des ER/SR und den Mitochondrien. In keiner anderen Zellart befinden sich die Mitochondrien so nah am ER wie in Rattenherzzellen. Die IP₃-induzierte Kalziumfreisetzung aus dem ER ruft in der Nähe der Mitochondrien eine hohe Ca²⁺-Konzentration hervor. Sie nehmen die Ionen teilweise auf und fangen einen Teil des durch den Uniporter aus dem SR gelangenden Kalziums ab. Darüberhinaus steht das SR mit dem ER derart in Kommunikation, dass das ER nach der mitochondrialen Kalziumsequestration aus ihm wieder mit Kalzium beladen wird. Sauer et al. (2001) fand heraus, dass bereits in 5 bis 7 d alten Herzvorläuferzellen Oszillationen aber noch keine Kontraktionen zu finden sind. Die Inkubation dieser Zellen mit 10 mM Koffein resultierte in einem vorübergehenden Anstieg des zytosolischen Kalziums, was auf funktionierende RyRs hindeutet. Diese Kalziumfluktuationen könnten durch die IP₃-Kaskade und/oder Mitochondrien verursacht worden sein, denn sie bestanden in hochkonzentrierten Kaliumlösungen und in Anwesenheit von Blockern des spannungsabhängigen Kalziumkanals fort (Sauer et al., 2001).

Der Quotient aus Komplex III und PHI sank in der 2. Gruppe auf 1,33% und in der 3. Gruppe auf 1,12%. Die Ursache kann eine verminderte Anzahl an Mitochondrien oder eine größere Menge an PHI im Vergleich zur 1. Altersgruppe sein. Vermutlich ist die Reifung des SR mit einer verbesserten Kalziumspeicherfunktion einhergegangen und die Oszillationen gehen nun nicht mehr nur vorwiegend von den Mitochondrien aus. So könnte sich der geringere Hemmeffekt in der 2. und 3. Gruppe erklären lassen. Falls mehr PHI vorhanden ist, ist hierdurch auch eine gesteigerte ATP-Synthese denkbar.

Die relativen Fluoreszenzintensitäten nahmen nach Antimycinzugabe in allen 3 Altersgruppen statistisch signifikant ab. Als Ursache dafür käme eine verminderte Kalziumausschüttung der Mitochondrien in Betracht, weil durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials die Kalziumspeicher nach und nach entleert werden (Icha et al., 1994).

Der Cholinester Carbachol, ein direktes Parasympathomimetikum, erregt Muskarinrezeptoren (M₂) an Herzzellen vom Schrittmachertyp. Hierdurch wird der einwärts gerichtete K⁺-Strom aktiviert. Dies führt zu einer verlangsamten diastolischen Depolarisation und einem negativ chronotropen Effekt (Wobus et al., 1992; Maltsev et al., 1993 und 1994; Hescheler et al., 1997). Kommt es zu einem negativ chronotropen Effekt, deutet das auf eine funktionelle Expression der M₂-Rezeptoren hin. Der M₂-Rezeptor moduliert neben dem K⁺-Strom auch I_f (Abi-Gerges et al., 2000).

Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen der 3 Altersgruppen ergaben, dass es nach Zugabe von Carbachol (Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$) nur in der 2. Gruppe zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Oszillationsfrequenzen kam. 68% der Zellen zeigten diese Frequenzabnahme. In der 1. und 3. Gruppe waren es nur 48,4% bzw. 20%. Hescheler et al. (1997) fand im 1. Stadium bei nur 20% der sich aus ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten eine Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials durch Carbachol. Später (Hescheler et al., 2002) wurde ein negativ chronotroper Effekt in der 1. Gruppe festgestellt (auch ohne Membranhyperpolarisation). Im Gegensatz dazu findet sich in unseren Ergebnissen in der 1. Gruppe keine statistisch signifikante negative Chronotropie vorausgesetzt, dass die Oszillationsfrequenz gleich der Kontraktionsfrequenz ist. Erst in der 2. Gruppe ist die Frequenzabnahme statistisch signifikant. Im terminal differenzierten Stadium ist ein Carbacholeffekt nur nach vorausgegangener β -adrenerger Stimulation möglich (Ji et al., 1999). Dieses Ergebnis geht mit unserem, nämlich keinem Effekt auf die Oszillationsfrequenzen in der 3. Altersgruppe, konform.

Auch an Herzzellen, die sich aus P19 embryonalen Karzinomzellen differenziert haben, ruft Carbachol am M_2 -Rezeptor zum Beispiel keine herzspezifische Wirkung (negative Chronotropie) hervor (Wobus et al., 1994b).

I_f wurde in frühen Zellen, Schrittmacherzellen und purkinjeähnlichen Zellen gefunden, in atrialen und ventrikelartigen Zellen allerdings nicht (Hescheler et al., 1997). Carbachol hemmt I_f . Die funktionelle Folge ist eine verlangsamte diastolische Depolarisation und eine Abnahme der Schlagfrequenz. In einer anderen Arbeit wurde eine funktionelle Expression von I_f erst in der mittleren Altersgruppe gefunden, was unser Ergebnis der 1. Altersgruppe wiederum stützt (Maltsev et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurde I_f in anderer Quelle in 65% der 7+(3...4) d (1. Gruppe), 50% der 7+(5...8) d (2. Gruppe) und in 45% der 7+(9...12) d alten Zellen (3. Gruppe) gefunden (Abi-Gerges et al., 2000).

Hier inhibierte Carbachol (1 $\mu\text{mol/l}$) I_f in der 1. Gruppe. Dieser Effekt war nach Auswaschung komplett reversibel. Bei der 3. Gruppe trat wie bei uns kein Effekt auf. Das geht auch mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten konform (Ji et al., 1999; Abi-Gerges et al., 2000; Hescheler et al., 2002), wo ein signifikanter Effekt auf die APs ventrikelartiger Zellen in der 3. Gruppe nicht beobachtet werden konnte. Schließlich muss davon ausgegangen werden, dass neben Schrittmacherzellen in der 3. Gruppe auch ein großer Anteil an ventrikelartigen Zellen zu finden ist. Bei den ventrikelartigen Zellen kann die Aktionspotentialdauer nur nach vorheriger Gabe von 1 μM Adrenalin reduziert werden. Sinusknotenartige APs verlangsamten sich (Maltsev et al., 1993).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Beeinflussung der Oszillationsfrequenz durch Carbachol (1 $\mu\text{mol/l}$) bei unseren Untersuchungen nur in der 2. Gruppe einer extrazellulären Modulation durch den muskarinischen Acetylcholinrezeptor zu unterliegen scheint.

Bei der Messung des Carbacholeffektes auf die relativen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Alter wurde in der 1. und 2. Gruppe eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten beobachtet. Eine schlüssige Erklärung dafür wurde nicht gefunden. Die Werte der 3. Altersgruppe konnten nicht ermittelt werden, weil nicht genügend Daten zur Verfügung standen.

Ein Hauptmerkmal des Herzens ist die spontane elektrische Aktivität. Das autonome Nervensystem moduliert seine Chronotropie. Der Schrittmacherstrom I_f wird durch sympathische und parasympathische Neurotransmitter geregelt. Er ist verantwortlich für die diastolischen Depolarisationen im Sinusknoten und im ventrikulären Erregungsleitungssystem. Alle Zellen, welche I_f generieren, bilden spontane Aktionspotentiale aus. Die Ionenkanaluntereinheiten von I_f wurden als zur HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated)-Familie gehörig identifiziert. HCN 1, 2 und 4 sind im Herzen der adulten Maus zu finden. HCN 2 befindet sich in nicht spontan aktiven Kardiomyozyten (Biel et al., 2002).

Die Generierung des Schrittmacherpotentials wird als komplexes Spiel zwischen mindestens 4 Ionenkanälen (T-Typ- und L-Typ Ca^{2+} , K^+ und I_f) beschrieben (Biel et al., 2002). Die Aktivierungskurven des I_f -Stromes verschwinden in kationenfreiem Medium fast vollständig, was ihre Durchlässigkeit für sie zeigt (Maltsev et al., 1994; Hescheler et al., 1997). In Purkinjefasern des Schafes wurden Na^+ -Ionen als Träger von I_f beim Gleichgewichtspotential und K^+ -Ionen bei anderen Potentialen gefunden. Der für beide Ionen gleichermaßen durchlässige Kanal ist allerdings für K^+ 10-20 mal permeabler (Glitsch et al., 1986). Es wurde der direkte Beweis erbracht, dass sich die intrazelluläre Natriumaktivität während der Generierung von I_f ändert (Ginneken et al., 1991). In Kardiomyozyten, die sich aus ES-Zellen differenziert haben, wurde I_f in frühen, Schrittmacher- und purkinjeähnlichen Zellen gefunden, jedoch nicht in atrialen und ventrikelartigen. Wie bereits erwähnt, wurden in der 1. Altersgruppe 65% der Zellen mit funktionell exprimiertem I_f gefunden, in der 2. 50% und in der 3. 45%.

I_f wird während der embryonalen Entwicklung durch die Adenylatcyclaseaktivität moduliert. Das gebildete cAMP bindet an die I_f Kanäle, welche durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden (Abi-Gerges et al., 2000; Song et al.,

2002). Dies belegt eine Stimulierung von I_f in den frühen Zellen nach Zellinfusion mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen PKA. Die Öffnung von I_f geschieht bei hohen cAMP-Dosen schneller und kompletter. Bei cGMP-Gabe wäre eine 10 mal höhere Dosis nötig (Biel et al., 2002).

I_f kann durch Cäsiumionen, in Form von gelöstem CsCl blockiert werden (Glitsch et al., 1986; Ginneken et al., 1991; Maltsev et al., 1994; Biel et al., 2002). I_f wird deshalb auch als Cs^+ -gehemmter Membranstrom bezeichnet (Glitsch et al., 1986). Die Hemmkonzentration der CsCl-Lösung ist 2 mmol/l. Der Effekt ist wahrscheinlich stark spannungsabhängig, da eine Blockade bei negativeren Potentialen größer ist (Ginneken et al., 1991). Das Resultat ist eine Abnahme der Schlagfrequenz.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde der Cäsiumchlorideffekt (2 mmol/l) auf die Oszillationsfrequenz in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Eine statistisch signifikante Abnahme der Frequenzen war in allen 3 Altersgruppen zu beobachten. Wenn man von einem Auftreten der I_f -Kanäle in 65% der Zellen der 1. Gruppe ausgeht, dann dürften theoretisch auch nur 65% der Zellen eine Hemmung zeigen. Hier sind es aber 84,8%, also 19,8% mehr. In der 2. Gruppe sind es 50%, die I_f zeigen, hier zeigten ebenfalls 19,8% mehr Zellen eine Frequenzabnahme (69,8%). In der 3. Gruppe war die Differenz an Zellen, die I_f exprimieren (45%) und solchen, die mit einer Hemmung reagierten (93%) am größten. Sie betrug 48%. Diese Ergebnisse sind widersprüchlich, weil unter den terminal differenzierten Zellen bereits viele atriale und ventrikelartige vorhanden sind, die kein I_f ausbilden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass zufällig überdurchschnittlich viele Zellen, die I_f exprimieren, auf Videoband aufgezeichnet wurden.

Die Messung der relativen Fluoreszenzintensitäten vor und nach Cäsiumchloridzugabe in Abhängigkeit vom Alter ergab eine statistisch signifikante Abnahme der Intensitäten in allen drei Altersgruppen. Eine schlüssige Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden, weil der I_f keinen Einfluss auf die freigesetzte Kalziummenge hat.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der sich aus ES-Zellen differenzierenden Kardiomyozyten waren neben den Oszillationen andere von ihnen ausgehende Kalziumsignale. Es wurden Zellen beobachtet, deren Kern weitaus stärker fluoreszierte als das umgebende Zytosol. Lichtmikroskopisch konnte festgestellt werden, dass es sich tatsächlich um den Kern handelte. Umgekehrt wurden auch Zellen gefunden, deren Kerne eine geringere Fluoreszenz aufwiesen als das Zytosol. In der 3. Altersgruppe

wurde eine Zelle beobachtet, deren Anstieg des zytosolischen Kalziums ein Anstieg des nukleären folgte.

Carafoli et al. (1997) fassten in ihrer Arbeit die Ergebnisse verschiedener Autoren zusammen, die u.a. beinhalteten, dass es zu unterschiedlicher Reaktivität der Fluoreszenzindikatoren in zytosolischer und nukleärer Umgebung kommen kann. Einige Autoren fanden heraus, dass es zu keiner Verzögerung der Kalziumtransmission zwischen Zytosol und Kern kommt, andere wiederum stellten unter bestimmten Bedingungen fest, dass es zu keiner Erhöhung des nukleären nach Anstieg des zytosolischen Kalziums kam. In dieser Arbeit wurden sogar Kalziumtransienten nur im Kern beobachtet. Andere Untersuchungen an Leberzellkernen zeigten, dass der Kalziumtransport über die Außenmembran der Kernhülle mittels einer ATP-getriebenen Pumpe, die zuvor durch eine Proteinkinase A phosphoryliert wurde, realisiert wird. Dieser Vorgang wird bei hohen Kalziumkonzentrationen gehemmt. Ein alternativer Weg besteht über die IP₃-Kaskade, die auch bei hohen Kalziumkonzentrationen wirksam ist.

Für die Entlassung des Kalziums in das Kernplasma steht ein IP₃-aktivierter Kanal an der inneren Kernmembran zur Verfügung. Sternfischoozytenkerne könnten ein Extrembeispiel für die Undurchlässigkeit für Kalzium und ihre Fluoreszenzindikatoren sein. Es gibt aber IP₃-und cADP-Ribose-aktivierte Kanäle, durch welche Kalziumtransienten induziert werden. Letztere haben sogar oszillierenden Charakter. Das nukleäre Kalzium spielt eine Rolle im Zellwachstum und bei der Apoptose. Hier ist besonders der Kalzium-Calmodulinkomplex als Schlüssel zur Gentranskription zu erwähnen (Carafoli et al., 1997).

Das Auftreten von Kalziumsparks war ein häufig zu beobachtendes Ereignis. Cheng et al. (1993) gehörten zu den Ersten, die in adulten Rattenherzzellen Kalziumsparks fanden. Von jeder Altersgruppe ist eine Zelle mit Sparkaktivität dargestellt. In einer Zelle der 3. Gruppe (Abb. 34, Ergebnisse) wurden Sparks sowohl im Zytosol als auch im heller fluoreszierenden Kern entdeckt. Je länger die Zellen kultiviert wurden, desto mehr sparkbildende Zellen wurden gefunden. Diese Beobachtungen machten auch andere Autoren (Sauer et al., 2001). Sie stellten bei 9% der 8 Tage alten, 51% der 9-10 Tage alten und 74% der 15-25 Tage alten sich aus ES-Zellen differenzierenden Kardiomyozyten Sparks fest. Sie treten spontan durch Kalziumfreisetzung aus dem SR über RyRs auf. Daher sind sie durch die Expression von RyRs, deren Dichte mit zunehmendem Alter ansteigt, und den Ladungszustand des SR mit Kalzium charakterisiert. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Die [Ca]_i beträgt bei den

frühen Zellen $92,8 \pm 9,5$ nM und im Terminalstadium $99,8 \pm 4,3$ nM (Sauer et al., 2001). Die größten Amplituden und Frequenzen von Kalziumsparks sind in diesen terminal differenzierten Zellen zu finden.

Der RyR selbst wird nach Depolarisation der Zellmembran durch den Einstrom von Kalzium durch die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, wobei Ca^{2+} -Sparks auch ohne Depolarisation der Zellmembran entstehen können (Cheng et al., 1993). Es öffnen sich immer nur einer oder wenige RyRs. Eine Häufung von Sparks wurde an den Stellen der T-Tubuli festgestellt. Cheng et al. (1993) stellte eine ryanodinabhängige Sparkkinetik fest. Geringe Ryanodinkonzentrationen steigern die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyRs. Höhere Konzentrationen blockieren sie und bei einer Konzentration von $>1\mu\text{M}$ treten keine Sparks mehr auf. Es wird eine mögliche resultierende Wellenbildung aus den Sparks beschrieben. Hierbei treten mehrere Sparks in jener Region, in der die Welle gestartet wird, auf. Die $[\text{Ca}]_i$ beträgt an diesen Stellen 200-300 nM. Am Punkt der Initiation konnte ein Makrospark, der sich aus mehreren Sparks zusammensetzt, festgestellt werden. Die $[\text{Ca}]_i$ ist an diesen Stellen 500 nM (Cheng et al., 1993).

Ein weiteres Phänomen ist das Auftreten von lange andauernden Oszillationen. Bei 13% aller Zellen finden sich länger als 5 Sekunden andauernde Oszillationen. 51% von ihnen gehören der mittleren Altersgruppe an, zu der auch die Zelle in Abbildung 38 und 39 (Ergebnisse) zählt. Maltsev et al. (1993) zeigten, dass es sich um den Übergang zwischen zwei Phänotypen handeln könnte, wenn lange andauernde Aktionspotentiale von 0,3 – 1 Sekunde im Alter von 7+5 bis 7+12 d gemessen wurden.

Ein weniger häufig zu beobachtendes Ereignis war das Auftreten von Kalziumwellen, von denen drei Beispiele dargestellt sind. Das Auftreten von abortiven Wellen, die hauptsächlich in den Zellfortsätzen zu finden waren, wurde im Vergleich dazu wesentlich häufiger beobachtet. Es ist eine Zelle der 3. Altersgruppe dargestellt (Abb. 43, Ergebnisse). Intrazelluläre Wellen in Kardiomyozyten sind von Bedeutung für die Kontraktion (Amundson und Clapham, 1993; Berridge et al., 1998). Sie rühren von einer koordinierten Aktivität intrazellulärer Kalziumkanäle her. Für das Fortschreiten der Wellen ist die Freisetzung von Kalzium aus dem SR über RyRs, Kalziumdiffusion zwischen den Clustern von RyRs und Wiederaufnahme durch die SERCA nötig. Die Diffusionsrate von einem Kanal zum benachbarten Freisetzungsort ist der limitierende Schritt für die Wellengeschwindigkeit (Berridge, 1996).

Räumlich-zeitliche Kalziumstrukturen in lebenden Zellen zeigen allgemeine Eigenschaften von Reaktions-Diffusions-Wellen, 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). Dies ergaben Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie an enzymatisch isolierten Rattenherzzellen (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al. 1997; Wussling und Mair 1999). Es wurden Wellengeschwindigkeiten von 85 bis 110 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Cheng et al. (1993) fanden heraus, dass in Rattenherzzellen eine Welle durch eine besonders hohe Sparkaktivität initiiert werden kann. Kalziumwellen wurden auch in verschiedensten anderen erregbaren (Neurone, Myozyten) und nicht erregbaren Zellen (Oozyten, pankreatische Azinuszellen, Hepatozyten, endotheliale Zellen, Astrozyten und Fibroblasten) gefunden. Die Kalziumfreisetzung kann hier auch über IP_3 aus dem ER erfolgen (Amundson und Clapham, 1993). Es wurden Geschwindigkeiten zwischen 3 und 100 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Kalziumwellen können aber nicht nur in lebenden Zellen, sondern auch in weniger komplexen Systemen isolierter Zellorganellen entstehen. Wussling et al. (1999 und 2001) beobachteten Kalziumwellen in Clustern von kalziumbeladenen SR-Vesikeln. Hierbei ist die Immobilisation der Vesikel in einem Agarose-Gel wichtig, um störende Bewegungen praktisch auszuschließen. Die experimentellen Ergebnisse indizieren die Ähnlichkeit eines *in vitro*-Systems mit einem erregbaren Medium.

Die Zellen aus Abbildung 40 und 41 (Ergebnisse) sind ein gutes Beispiel für isolierte Herzzellen, die unabhängig voneinander Wellen bilden und oszillieren. Die erste Welle setzt sich mit einer Geschwindigkeit von 66,3 $\mu\text{m/s}$ fort und Letztere mit 58,8 $\mu\text{m/s}$. Diese Geschwindigkeiten sind geringer als solche in adulten Rattenherzzellen. Die Welle aus Abbildung 42 schreitet mit 102,9 $\mu\text{m/s}$ fort, was der Ausbreitungsgeschwindigkeit adulter Rattenherzzellen entspricht (Wussling und Salz, 1996; Wussling et al. 1997; Wussling und Mair 1999). Die Abbildung 43 (Ergebnisse) zeigt eine Zelle, in deren oberen und unteren Zellpol initial eine Welle entsteht. Die Ausbreitungsrichtung erfolgt aufeinander zu in Richtung Zellkern. Hier erreichen sich die beiden Wellen aber nicht, denn sie werden schon vorher ausgelöscht. Ursächlich dafür kann eine im Verlauf der Welle abnehmende Freisetzung von Kalzium aus den RyRs sein. Denkbar wäre auch eine zu geringe Dichte der RyRs am SR, was die Diffusionsstrecken zwischen den Kalziumfreisetzungskanälen vergrößert und so zum Abbruch der Welle führt.

5. Zusammenfassung

Räumlich-zeitliche Kalziumsignale wie Ca^{2+} -Oszillationen und -Wellen sind in zahlreichen Zelltypen essentiell für eine reguläre Funktion und daher Gegenstand intensiver Forschung. Die Entstehung beider Phänomene beruht auf der Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern (z.B. ER und SR) und ihrem Rücktransport mittels energieverbrauchender Ionenpumpen. Gegenstand unserer Untersuchungen waren Kardiomyozyten, die sich aus ES-Zellen differenziert haben (Maus, Zelllinie R1). Sie entwickeln sich als Cluster innerhalb sogenannter „Embryoid Bodies“. Die Cluster von Herzzellen wurden mit einem Skalpell unter dem Lichtmikroskop herausgeschnitten und durch das Enzym Collagenase in einzelne Zellen isoliert, um anschließend physiologischen Analysen zur Verfügung zu stehen. Nach Sichtbarmachung der Kalziumionen mittels Fluoreszenzindikatoren wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet und mithilfe eines Videobandes aufgezeichnet, um späteren Auswertungen zur Verfügung zu stehen.

Die wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit bezogen sich auf die Charakterisierung von Kalziumsignalen wie Ca^{2+} -Oszillationen,-Wellen und -Sparks, die in den Zellen auftraten. Darüberhinaus wurde untersucht, ob die Mitochondrien als Bestandteile der Zelle Einfluss auf die Signalentstehung haben und ob die Ca^{2+} -Oszillationen durch extrazelluläre Faktoren beeinflussbar sind.

Nach Unterteilung der Zellen in sechs Morphotypen wurde die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Es kam, abhängig vom Morphotyp, zu einer unterschiedlich starken Zunahme der Frequenz. Für eine sichere Identifikation des Phänotyps der Zellen wären Patch-Clamp-Analysen nötig gewesen, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Lässt man die Morphologie außer Acht und teilt die Zellen nur in Altersgruppen ein, so stellt man fest, dass die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen mit zunehmendem Alter statistisch signifikant zunimmt. Durch die relativ hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration (3,6 mmol/l) ist mit spontaner Kalziumfreisetzung, Ca^{2+} -Oszillationen und der Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen eher zu rechnen als unter Normalbedingungen. Eine Ca^{2+} -Oszillation muss nicht unbedingt eine Kontraktion nach sich ziehen. Relative Fluoreszenzintensitäten in allen Altersgruppen nahmen statistisch signifikant ab, was vermutlich durch schnellere Aufnahme der Kalziumionen in die Speicher des SR sowie eine effektiver arbeitende SERCA-Pumpe verursacht wird.

Die Atmungskette, welche der ATP-Bereitstellung dient, ist in den Mitochondrien lokalisiert. Ein Hemmstoff des Elektronentransportes am Komplex III der Atmungskette, Antimycin A, wurde in einer Konzentration von 60 $\mu\text{mol/l}$ appliziert. Die in der 1. Altersgruppe bei 100% der Zellen aufgetretene Hemmung der Ca^{2+} -Oszillationsfrequenzen wurde durch Messung der spezifischen Aktivität des Komplex III und des Leitenzyms der Glycolyse (PHI) näher untersucht. Der Quotient aus Komplex III und PHI (dargestellt in %) lag deutlich über dem der 2. und 3. Altersgruppe. Deshalb wird vermutet, dass die Mitochondrien in der 1. Altersgruppe eine dominante Rolle bei der Ca^{2+} -Oszillationsentstehung spielen. Wahrscheinlich übernehmen sie einen großen Teil der Kalziumspeicherfunktion und somit der Oszillationsentstehung, weil das SR noch nicht voll ausgereift ist. Die Entleerung der mitochondrialen Kalziumspeicher und die durch Hemmung des Elektronentransportes reduzierte ATP-Synthese ziehen eine abnehmende Oszillationsfrequenz nach sich. Der Hemmeffekt lässt mit zunehmendem Alter der Zellen nach. Die relativen Fluoreszenzintensitäten nahmen nach Antimycinapplikation in allen Altersgruppen statistisch signifikant ab. Ursächlich könnte die Entleerung der mitochondrialen Speicher und somit eine verminderte Kalziumausschüttung der Mitochondrien sein.

Der Cholinester Carbachol ruft an Herzzellen vom Schrittmachertyp einen negativ chronotropen Effekt hervor. Es sollte herausgefunden werden, ob die Ca^{2+} -Oszillationen von extrazellulär beeinflussbar sind oder aber völlig autonom in der Zelle entstehen. Aus der Applikation von Carbachol (1 $\mu\text{mol/l}$) resultierte in der 2. Altersgruppe im Gegensatz zur 1. und 3. eine statistisch signifikante Abnahme der Oszillationsfrequenz. Der fehlende Effekt in der 3. Altersgruppe geht mit den Quellenangaben (Carbacholeffekt nur nach vorausgegangener β -adrenerger Stimulation) konform.

Der Strom I_f bestimmt die Frequenz von Schrittmacherzellen. Er lässt sich in aus ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten durch Applikation von CsCl (2 mmol/l) blockieren. Wenn man von einem Auftreten des I_f -Stromes in allen drei Altersgruppen ausgeht (zur 1. Gruppe wurden in der Literatur gegensätzliche Angaben gemacht), dann unterliegt I_f einer extrazellulären Modulation durch CsCl. Es kam in den drei Altersgruppen zu statistisch signifikanter Abnahme der Frequenz von Ca^{2+} -Oszillationen. Es kann davon ausgegangen werden, dass zufällig sehr viele Schrittmacherzellen auf Videoband aufgenommen wurden, weil der prozentuale Anteil der gehemmten Zellen deutlich über dem in der Literatur angegebenen Prozentsatz an Zellen lag, in denen der I_f -Strom gemessen wurde.

Neben dem Auftreten von Ca^{2+} -Oszillationen wurden Kardiomyozyten beobachtet, deren Kerne stärker oder schwächer fluoreszierten als das umgebende Zytosol. Eine wesentliche Aufgabe des Kernkalziums besteht u.a. in der Steuerung der Transkription.

Ein anderes interessantes Phänomen ist das Auftreten von Kalziumsparks sowohl im Zytosol als auch im Kern. Es konnte eine Zunahme der Sparkaktivität mit fortschreitendem Alter der Zellen beobachtet werden, was mit anderen Quellenangaben übereinstimmt. Die Entstehung der Sparks beruht auf der spontanen Öffnung eines oder mehrerer RyRs. Vermutlich erklärt eine zunehmende Dichte der RyRs und die stärkere Beladung des SR mit Kalzium das sich stetig vermehrende Auftreten von Sparks. Sparks können schließlich auch eine Ca^{2+} -Welle initiieren. Am Ursprung der Welle tritt ein sogenannter Makrospark auf, welcher durch eine besonders hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration gekennzeichnet ist.

Ein weiteres Phänomen ist das Auftreten lange andauernder Ca^{2+} -Oszillationen hauptsächlich in Zellen der mittleren Altersgruppe.

Ca^{2+} -Wellen sind in Kardiomyozyten der Maus, die sich aus ES-Zellen differenziert haben, ein selten zu beobachtendes Ereignis. Abortive Wellen sind hingegen häufiger zu finden. Ca^{2+} -Wellen treten in Zusammenhang mit Kontraktionen auf. Sie rühren von koordinierter Aktivität intrazellulärer Kalziumkanäle her. Kalziumionen werden aus dem SR über RyRs freigesetzt, diffundieren zwischen den Clustern von RyRs und werden anschließend durch die SERCA zurückgepumpt. Kalziumwellen mit Geschwindigkeiten zwischen 3 und 100 $\mu\text{m/s}$ wurden auch in nicht erregbaren Zellen gefunden (z.B. Oozyten, Hepatozyten, Fibroblasten). Die Kalziumfreisetzung erfolgt dabei über die IP_3 -Kaskade aus dem ER. Eine Ca^{2+} -Wellenentstehung in isolierten Zellorganellen wurde auch beschrieben. Die experimentellen Ergebnisse indizieren eine Ähnlichkeit von solch einem *in vitro*-System mit einem erregbaren Medium.

Wenn die Experimente fortgeführt würden, so wäre es zweckmäßig Patch-Clamp-Analysen durchzuführen, um die Morphotypen den Phänotypen exakt zuzuordnen. Dann könnten die Hemmstoffe gezielt an den Phänotypen getestet werden. Darüberhinaus wären weiterführende Untersuchungen über die Funktion der Mitochondrien in den drei Altersgruppen, besonders aber in der ersten Gruppe, interessant.

6. Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges N., Ji G. J., Lu Z. J., Fischmeister R., Hescheler J. and Fleischmann B. K.; Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell- derived cardiomyocytes. *J Physiol* 523/2 (2000) 377-389
- Antoni H.: Erregungsphysiologie des Herzens. In: Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995, S.472-484
- Amundson J., Clapham D.: Calcium waves. *Curr opin Neurobiol* 3 (1993) 375-382
- Bergmeyer H.U. (Editor): *Methods of enzymatic analysis*. Third Edition, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 1983, Volume IV, S.308.
- Berridge M.J.: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499/2 (1996) 291-306
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P.: Calcium- a life and death signal. *Nature* 395 (1998) 645-648
- Biel M., Schneider A., Wahl Ch.: Cardiac HCN channels: Structure, Function, and Modulation. *Trends Cardiovasc Med* 12 (2002) 206-213
- Boitier E., Rea R., Duchen M.R.: Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca^{2+} waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol* 145 (1999) 795-808
- Bowser D.N., Minamikawa T., Nagley P., Williams D.A.: Role of mitochondria in calcium regulation of spontaneously contracting cardiac muscle cells. *Biophys J* 75 (1998) 2004-2014
- Brakenhoff G.J., Van der Voort H.T.M., Van Spronsen E.A., Nanninga N.: Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy. *J Microsc* 153/2 (1989) 151-159
- Carafoli E., Nicotera P., Santella L.: Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell calcium* 22/5 (1997) 313-319
- Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B.: Calcium sparks: elementary events underlying excitation –contraction coupling in heart muscle. *Science* 262 (1993) 740-744
- Clapham E.: Calcium signalling. *Cell* 80 (1995) 259-268
- Clapham D.E., Sneyd J.: Intracellular calcium waves. *Adv in Second Messenger Phosphoprotein Res* 30 (1995) 1-24
- Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M., Vaughan D.M.: Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266/6 (1994) C1485-C1504

- Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N., Ward J.M.: The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 66 (1999) 167-179
- Fässler R., Rohwedel J., Maltsev V., Bloch W., Lentini S., Guan K., Gullberg D., Hescheler J., Addicks K. and Wobus A.M.: Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of $\beta 1$ integrin; *J cell science* 109 (1996) 2989-2999
- Ginneken A.C.G., Giles W.: Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-activated inward current I_f in single cells from rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 434 (1991) 57-83
- Glitsch H.G., Pusch H. and Verdonck F.: The contribution of Na and K ions to the pace-maker current in sheep cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 406 (1986) 464-471
- Guan K., Czyz J., Fürst D.O., Wobus A.M.: Expression and cellular distribution of $\alpha(v)$ integrins in $\beta(1)$ integrin-deficient embryonic stem cell-derived cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 33/3 (2001) 521-532
- Guan K., Schmidt M.M., Ding Q., Chang H., Wobus A.M.: Embryonic stem cells in *vitro*-Prospects for cell and developmental biology, embryotoxicology and cell therapy. *Altex* 16/3 (1999) 135-141
- Gunter T.E., Pfeiffer D.R.: Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258 (Cell Physiol 27), (1990) 755- 786
- Haberland A., Wilhelm M., Wobus A.M., Wussling M.H.P.: Confocal calcium signals in cardiac myocytes derived from embryonic stem (ES) cells. *European J Physiol* 439/6 (2000) P 21-22
- Haugland R.P.: Handbook of Fluorescent Probes and research chemicals. 6. Aufl. Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA., (1996)
- Hescheler J., Fleischmann B.K.: Regulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the early developing heart: role of beta 1 integrins. *Basic Res Cardiol* 97 (2002) 153-158
- Hescheler J., Fleischmann B.K., Lentini S., Maltsev V.A., Rohwedel J., Wobus A.M., Addicks K.: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36 (1997) 149-162
- Höfer T.: Model of intracellular calcium oscillations in hepatocytes: Synchronization of Heterogeneous Cells. *Biophys J* 77 (1999) 1244-1256
- Ichas F., Jouaville L.S., Mazat J.-P.: Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89 (1997) 1145-1153
- Ichas F., Jouaville L.S., Sidash S.S., Mazat J.-P., Holmuhamedov E.L.: Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Letters* 348 (1994) 211-215

- Jaconi M., Bony C., Richards S.M., Terzic A., Arnaudeau S., Vassort G., Puecat M.: Inositol 1,4,5- triphosphate directs Ca^{2+} flow between mitochondria and the endoplasmatic/ sarcoplasmatic reticulum: A role in regulating cardiac autonomic Ca^{2+} spiking. *Molec Biol of Cell* 11 (2000) 1845-1858
- Ji G. J., Fleischmann B. K., Bloch W., Feelisch M., Andressen C., Addicks K., Hescheler J.: Regulation of L- type Ca^{2+} channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase- mediated inhibition. *FASEB* 13 (1999) 313-324
- Jouaville L.S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.D.: Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377 (1995) 438-441
- Jouaville L.S., Pinton P., Bastianutto C., Rutter G.A., Rizzuto R.: Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long term metabolic priming. *PNAS* 96 (1999) 13807-13812
- Krähenbühl S., Talos C., Wiesmann U., Hoppel C.L.: Development and evaluation of a spektrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans. *Clin Chim Acta* 230 (1994) 177-187
- Krannich, K.: Konfokale Kalziumsignale in einem *in vitro*-System mit Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., (2001) S.15
- Maltsev V.A., Rohwedel J., Hescheler J. and Wobus A.M.: Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech develop* 44 (1993) 41-50
- Maltsev V.A., Wobus A.M., Rohwedel J., Bader M., Hescheler J.: Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac- specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75 (1994) 233-244
- Misquitta C.M., Mack D.P., Grover A.K.: Sarco/Endoplasmatic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25(4) (1999) 277-290
- Pawley J.B.: Handbook of Biological Confocal Microscopy. 2. Auflage, Plenum Press, New York, 1995
- Pich U., Pütz D., Wobus A.M.: Screeningverfahren zur Messung chronotroper Effekte an Herzzellen. *Bioforum* 20 (1997) 536-540
- Prelle K., Vassiliev I. M., Vassilieva S. G., Wobus A. M.: Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species- present status and future prospects. *Cells Tissues Organs* 165 (1999) 220-236
- Ragan C.I., Wilson M.T., Darley-USmar V.M., Lowe P.N.: Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the protein of oxidative phosphorylation. In: Darley-USmar V.M., Rickwood D., Wilson M.T. (Hrsg.): *Mitochondria, a Practical Approach*. Oxford, Washington DC: IRL Press 98 (1987)

- Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T.: Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529/1 (2000) 37-47
- Rohwedel J., Guan K., Wobus A.M.: Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells tissues organs* 165 (1999) 190-202
- Sauer H., Hofmann C., Wartenberg M., Wobus A.M. and Hescheler J.: Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell- derived primitive endodermal cells. *Exp cell res* 238 (1998) 13-22
- Sauer H., Theben T., Hescheler J., Lindner M., Brandt M.C. and Wartenberg M.: Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells; *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281 (2001) H411- H421
- Schmidt M.M., Guan K., Wobus A.M.: Lithium influences differentiation and tissue-specific gene expression of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. *Int J Dev Biol* 45/2 (2001) 421-429
- Siedner S., Krüger M., Schroeter M., Metzler D., Roell W., Fleischmann B.K., Hescheler J., Pfitzer G., Stehle R.: Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* (2003) p.000-000
- Simpson P.B., Russell J.T.: Role of mitochondrial Ca^{2+} regulation in neuronal and glial cell signalling. *Brain Res Rev*, 26 (1998) 72-81
- Song G.L., Tang M., Liu C.J., Luo H.Y., Liang H.M., Hu X.W., Xi J.Y., Gao L.L., Fleischmann B., Hescheler J.: Developmental changes in functional expression and beta-adrenergic regulation of I_f in the heart of mouse embryo. *Cell Res* 12(5-6) (2002) 385-394
- Szalai G., Csordas G., Hantash B.M., Thomas A.P., Hajnoczky G.: Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chemistry* 275 (2000) 15305-15313
- Takehima H., Komazaki S., Hirose K., Nishi M., Noda T., Iino M.: Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* 17/12 (1998) 3309-3316
- Thomas K.R., Capecchi: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryoid-derived stem cells. *Cell* 51 (1987) 503-512
- Viana F., De Smedt H., Droogmans G., Nilius B.: Calcium signalling through nucleotide receptor P2y2 in cultured human vascular endothelium. *Cell Calcium* 24/2 (1998) 117-127
- Viatschenko- Karpinski S., Fleischmann B. K., Liu Q., Sauer H., Gryshchenko O., Ji G. J., Hescheler J.: Intracellular Ca^{2+} oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 8259- 8264

- Westfall M.V., Pasyk K.A., Yule D.I., Samuelson L.C., Metzger J.M.: Ultrastructure and cell-cell- coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. *Cell Motil Cytoskeleton*, 36 /1 (1997) 43-54
- Wobus A.M., Guan K., Shan J., Wellner M. C., Rohwedel J., Ji G., Fleischmann B., Katus H.A., Hescheler J., Franz W.M.: Retinoic acid accelerates embryonic stem cell- derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997b) 1525-1539
- Wobus A.M., Guan K.: Embryonic stem cell- derived cardiac differentiation: Modulation of differentiation and „Loss-of-function“ analysis *in vitro*. *Trends Cardiovasc Med* 8 (1998) 64-74
- Wobus A.M., Hescheler J.: Development of an *in vitro* cardiomyocytes cell model for embryotoxicological and pharmacological studies. *Altex* 9/2 (1992) 29-42
- Wobus A.M., Holzhausen H., Jäkel P., Schöneich J.: Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152 (1984) 212-219
- Wobus A.M., Kleppisch T., Maltsev V., Hescheler J.: Cardiomyocyte-like cells differentiated *in vitro* from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca²⁺ channels. *In Vitro Cell Biol Anim* 30A (7) (1994) 425-434
- Wobus A.M., Rohwedel J., Maltsev V.A., Hescheler J.: *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specially modulated by retinoic acid. *Roux's Arch Dev Biol* 204 (1994a) 36-45
- Wobus A. M., Rohwedel J., Sehlmeier U.: Embryonale Stammzellen als Modellobjekt der Entwicklungsgenetik und Reproduktionsbiologie. In: Schöffl H., Spielmann H., Tritthart H.A. (Ed): Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen; Springer Wien New York (1997) S.88-98
- Wobus A.M., Wallukat G., Hescheler J.: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48/3 (1991) 173-182
- Wussling M.H.P., Krannich K., Drygalla V., Podhaisky H.: Calcium waves in agarose gel with cell organelles: implications of the velocity curvature relationship. *Biophys J* 80 (2001) 2658-2666
- Wussling M.H.P., Krannich K., Landgraf G., Herrmann-Frank A., Wiedenmann D., Gellerich F.N., Podhaisky H.: Sarcoplasmatic reticulum vesicles embedded in agarose gel exhibit propagating calcium waves. *FEBS letters* 463 (1999) 103-109
- Wussling M.H.P., Mair T.: Calcium waves in rat cardiac myocytes underlie the principles of self-organization in excitable media. In: S.C. Müller, Parisi J., Zimmermann W. (eds.): Transport and structure: their competitive roles in biophysics and chemistry; Lecture notes in physics; Vol.532; Springer, Berlin, Heidelberg, New York usw. (1999) S.151-163

Wussling M.H.P., Salz H.: Nonlinear propagation of spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 70 (1996) 1144-1153

Wussling M.H.P., Scheufler K., Schmerling S., Drygalla V.: Velocity-curvature relationship of colliding spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J* 73 (1997) 1232-1242

Yang H.T., Tweedie D., Wang S., Guia A., Vinogradova T., Bogdanov K., Allen P.D., Stern M.D., Lakatta E.G., Boheler K.R.: The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 99/14 (2002) 9225-9230

7. Thesen

1. Ca^{2+} -Ionen spielen als intrazelluläre Botenstoffe im Stoffwechsel praktisch aller Zellen eine wichtige Rolle.
2. Ca^{2+} -Signale wie Ca^{2+} -Oszillationen, -Wellen und -Sparks können auch in Kardiomyozyten beobachtet werden, die sich *in vitro* aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus differenziert haben.
3. Kardiomyozyten differenzieren sich in Clustern innerhalb sogenannter „Embryoid Bodies“. Durch mechanische Entfernung dieser Cluster (mithilfe eines Skalpells) und anschließende enzymatische Isolierung (unter Einwirkung von Collagenase) können die Zellen physiologischen Analysen zugänglich gemacht werden.
4. Die zu untersuchenden Herzzellen werden mit Fluoreszenzindikatoren für ionales Kalzium beladen. Dadurch wird die Beobachtung von intrazellulären Ca^{2+} -Signalen in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop möglich.
5. Das Zellmaterial konnte anhand charakteristischer Gestaltsmerkmale in verschiedene Morphotypen untergliedert werden. Eine zuverlässige Erkennung der Morphotypen würde die Anwendung elektrophysiologischer Methodik erfordern, worauf hier aber verzichtet wurde. Eine weitere Untergliederung erfolgte in verschiedene Altersgruppen.
6. Je nach Morphotyp kommt es mit zunehmendem Alter der Zellen zu einer unterschiedlich starken Zunahme der Ca^{2+} -Oszillationsfrequenz.
7. Wird der Morphotyp außer Acht gelassen, dann erfährt die Ca^{2+} -Oszillationsfrequenz von Altersgruppe zu Altersgruppe eine statistisch signifikante Zunahme und erreicht einen Sättigungswert, wenn die Kardiomyozyten etwa drei Wochen (5+15 d) alt sind.
8. Parallel dazu wurde mit zunehmendem Alter der Kardiomyozyten eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet. Dieser Effekt könnte auf eine altersabhängige Vergrößerung der Anzahl der SERCAs und/oder deren Aktivität

zurückgeführt werden. In beiden Fällen würde die Wiederaufnahme der Ca^{2+} -Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum beschleunigt werden.

9. Bei der Entstehung von Ca^{2+} -Oszillationen scheinen auch die Mitochondrien eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass ihr Anteil an der Ca^{2+} -Speicherfunktion umso größer ist, je jünger die Zellen sind.
10. Ca^{2+} -Oszillationen zeigen unter der Einwirkung des Cholinesters Carbachol ($1 \mu\text{mol/l}$) eine Frequenzabnahme, zu der es fast ausschließlich in der mittleren Altersgruppe kam. In der frühen und späten Altersgruppe war praktisch kein carbachol-induzierter statistisch signifikanter Effekt zu beobachten.
11. Cäsiumchlorid dagegen, das den Strom I_f in den Schrittmacherzellen blockiert, verkleinert in einer Konzentration von 2 mmol/l die Frequenz von Kalziumoszillationen in allen Altersgruppen statistisch signifikant.
12. Häufig wurden sogenannte Ca^{2+} -Sparks beobachtet, deren Entstehungsfrequenz mit zunehmendem Alter der Kardiomyozyten anstieg. Das Auftreten von Ca^{2+} -Sparks beruht auf der lokalen Öffnung eines oder mehrerer Ryanodinrezeptoren in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums. In relativ wenigen Zellen entwickelten sich aus Ca^{2+} -Sparks propagierende Ca^{2+} -Wellen, deren Geschwindigkeit 60 bis $100 \mu\text{m/s}$ betrug. Die Geschwindigkeitsdaten sind denen adulter Säugermyokardzellen ähnlich.
13. 13% der untersuchten Zellen, die zum größten Teil (51%) der mittleren Altersgruppe angehörten, zeigten lange andauernde Ca^{2+} -Oszillationen. In anderen Zellen konnten räumlich-zeitliche Strukturen innerhalb des Zellkerns beobachtet werden.
14. Nach unseren Beobachtungen zeigen Kardiomyozyten, die sich aus ES-Zellen der Maus differenziert haben, im Alter von etwa drei Wochen ($5+15 \text{ d}$) Kalziumsignale, wie sie auch an adulten Myokardzellen der Ratte beschrieben wurden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Haberland
Vorname	Anke
Geburtsdatum	30.01.1977
Geburtsort	Halle/Saale
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Wohnung	Forststraße 30, 08265 Erlbach

Schulbildung:

1983 – 1991	Polytechnische Oberschule „Frohe Zukunft“
1991 – 1995	Latina „August-Hermann-Francke“
Mai 1995	Abitur

Berufliche Tätigkeit:

Sept. 1995 - Sept. 1996	Au Pair- Jahr im US-Bundesstaat Massachusetts
seit Jan. 04	Ausbildungsassistentin

Studium:

Okt. 1996 – Okt. 2002	Studium der Zahnmedizin am Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
Juli 2002 – Okt. 2002	Staatsexamen
Juni 2003	Geburt der Tochter Melanie

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und nur unter Hinzuziehung der im Literaturverzeichnis angeführten Hilfsmittel verfasst habe.

Halle, den 11.01.2004

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich weder zum vorliegenden Thema, noch zu einem anderen Thema einen Promotionsversuch unternommen habe.

Halle, den 11.01.2004

Publikationen

Haberland A., Wilhelm M., Wobus A.M., Wussling M.H.P.: Confocal calcium signals in cardiac myocytes derived from embryonic stem (ES) cells. *European J Physiol* 439/6 (2000)P21-2

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. M. Wußling für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. A. M. Wobus vom IPK Gatersleben für die methodische Unterstützung und die Bereitstellung der Zellen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F.N. Gellerich möchte ich für die Zusammenarbeit bei den Versuchen an den Mitochondrien danken.

Frau S. Sommerfeld und Frau O. Weiß möchte ich meinen Dank aussprechen für die Anzucht der Kardiomyozyten.

Für die technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen danke ich Frau K. Hendrich.

Dem Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.