

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYSE
DES METALLIONENGEHALTES
DER CHOLINERGEN SYNAPTISCHEN VESIKEL
AUS DEM ELEKTRISCHEN ORGAN VON TORPEDO

D i p l o m a r b e i t

des Fachbereiches Chemie der
Johannes Gutenberg - Universität
Mainz

vorgelegt von Rupert Schmidt

Göttingen 1975

Meinen Eltern

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Vorwort und Danksagungen	VII
Nomenklatur und Abkürzungen	IX
1. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
1.1. Nervenzellen und Gliazellen	1
1.2. Die Synapsen	4
1.3. Das elektrische Organ von <i>Torpedo marmorata</i> als Modellsystem zur <u>Untersuchung cholinerg</u> er Synapsen .	7
1.4. Die cholinergen synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von <i>Torpedo</i>	13
1.5. Problemstellung der Untersuchungen	15
2. <u>Methoden und Ergebnisse der qualitativen Analyse des Metallionengehaltes</u>	17
2.1. HCl- und H ₂ S-Gruppe	17
2.2. Urotropin-Gruppe	19
2.3. (NH ₄) ₂ S-Gruppe	21
2.4. Ammoniumcarbonat-Gruppe	23
2.5. Lösliche Gruppe	23
2.6. Ergebnis	24
3. <u>Material und Methoden</u>	25
3.1. Allgemeine Maßnahmen beim Arbeiten mit sub- zellulären Fraktionen	25
3.2. Die Stimulation des elektrischen Organs von <i>Torpedo marmorata</i>	25
3.3. Die Isolierung der cholinergen synaptischen Vesikel	28
3.3.1. Kontinuierliche Dichtegradienten in Zonalrotoren	29

	Seite
3.3.2. Diskontinuierliche Dichtegradienten in Ausschwingrotoren	31
3.3.3. Varianten der Vesikelpräparation	33
3.4. Der Aufschluß der Präparationsvorstufen	36
3.5. Morphologische Methoden	38
3.6. Azetylcholinbestimmung mit dem Blutegelmuskel	38
3.6.1. Extraktion	39
3.6.2. Präparation des Blutegelmuskels	39
3.6.3. Messung	40
3.6.4. Lösungen	41
3.7. ATP-Bestimmung	41
3.8. Proteinbestimmung	42
3.9. Esterasebestimmung	42
3.10. Die Bestimmung von Metallkationen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie	43
3.10.1. Arbeitsweise	43
3.10.2. Störungen bei der Atomabsorptionsspektral- photometrie und ihre Beseitigung	47
3.10.2.1. Durch die Meßmethodik bedingte Störungen	47
3.10.2.2. Durch die Probenzusammensetzung bedingte Störungen	51
3.10.3. Die Bestimmung von Metallionen unter den Bedingungen der extremen Spurenanalyse	56
3.10.3.1. Lithium	57
3.10.3.2. Natrium	58
3.10.3.3. Kalium	59
3.10.3.4. Magnesium	59
3.10.3.5. Kalzium	60
3.10.3.6. Zink	61

	Seite
3.11. Verwendete Chemikalien	63
3.12. Auswertung der Ergebnisse	65
4. <u>Ergebnisse</u>	70
4.1. Quantitative Analyse der Präparationsvorstufen	70
4.2. Quantitative Analyse der Dichtegradienten	85
4.2.1. Kontinuierliche Gradienten von Zonalrotoren .	85
4.2.2. P_3^+ -beladene Glycingradienten des Typs III ...	85
4.2.3. P_3^+ -beladene Glycingradienten des Typs II	97
4.3. Untersuchung möglicher Artefakte und Berechnung der Konzentrationsverhältnisse in der Vesikel- fraktion	107
4.3.1. Einflüsse des Suspensionsmediums	107
4.3.2. Auswascheffekte	108
4.3.3. Gradienten des Typs I	109
4.3.4. Konzentrationsverhältnisse in der Vesikel- fraktion	109
5. <u>Diskussion</u>	111
5.1. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und Zink im elektrischen Organ von <i>Torpedo marmorata</i>	111
5.2. Der Ionengehalt im Blutplasma, in der Cerebrospinal- flüssigkeit und im elektrischen Gewebe	112
5.3. Die Metallionen in den subzellulären Fraktionen des elektrischen Organs können mit Hilfe der Atomabsorp- tionsspektralphotometrie quantitativ bestimmt werden	114
5.4. Präparation der subzellulären Fraktionen	115
5.5. Natrium, Kalium und Magnesium als frei gelöste Ionen	117
5.6. Kalzium als physiologisch aktiver Membranbestand- teil	118

	Seite
5.7. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Zink und zugeseztes Lithium als Bestandteile der cho- linergen synaptischen Vesikel	119
5.8. Die reizabhängige Ablösung des Kalziums von der Membran	120
5.9. Ionenaustausch in den synaptischen Vesikeln als Folge der Transmitterfreisetzung	130
5.10. Zur Vesikelheterogenität	138
5.11. Über die Beteiligung einer Magnesium-ATPase	141
6. <u>Zusammenfassung</u>	142
Anhang 1: Datenverarbeitung	A-1
Programm "LESEN"	A-2
Programm "AUSWERTEN"	A-5
Anhang 2: Literaturverzeichnis	A-17

Vorwort und Danksagungen

Die biologischen Systeme haben die Fähigkeit entwickelt, ihren Zustand, fern vom thermodynamischen Gleichgewicht, beizubehalten (Fließgleichgewicht) und ihre genetisch festgelegte Information zu replizieren. Das Nervensystem kann darüber hinaus Informationen in Form einer subjektiven Darstellung aufnehmen, verarbeiten und abgeben. Selbst wenn man von der medizinischen Relevanz der Fragestellung absieht, stellt die Untersuchung des Nervensystems, das in seinen zentralen Teilen bei den höchstentwickelten biologischen Spezies durch die faszinierenden Eigenschaften der Urteilsbildung, des Willens und des Bewußtseins ausgezeichnet ist, eine große Herausforderung an den menschlichen Kenntnisdrang dar.

Mein ganz gesonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Dose dafür, daß er bereit war, die Betreuung einer Diplomarbeit zu übernehmen, die ich aus experimenteller Notwendigkeit nur außerhalb der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz anfertigen konnte. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dose für die zahlreichen ausführlichen Diskussionen, die ich mit ihm während meiner experimentellen Tätigkeit führen durfte; sie waren eine reiche Quelle kritischer Hilfen und ermutigender Anregungen.

Die Experimente zu dieser Diplomarbeit habe ich im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut) in Göttingen, in der Abteilung für Neurochemie, durchgeführt, die von Herrn Prof. Dr. V.P. Whittaker geleitet wird. Die Großzügigkeit, mit der er mir die apparativen Möglichkeiten

des Instituts zur Verfügung stellte, sein Entgegenkommen, wenn experimentelle Komplikationen spezielle Anschaffungen notwendig machten, und nicht zuletzt seine reiche Erfahrung in den Fragen der Fraktionierung subzellulärer Organellen waren eine immer verfügbare Hilfe, ohne die die Durchführung dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre. Hierfür bin ich Herrn Prof. Whittaker zu tiefstem Dank verpflichtet.

Herr Dr. H. Zimmermann führte mich mit nie nachlassender Sorgfalt in die Arbeitsweisen der Neurochemie und -biologie ein. Außerdem haben mir unsere täglichen Diskussionen zahlreiche Gesichtspunkte erschlossen, viele Methoden aufgezeigt und mich auch immer wieder auf mögliche Fehlerquellen aufmerksam gemacht. Ihm gebührt mein herzlichster Dank. Die elektronenmikroskopischen Kontrolluntersuchungen zu dieser Arbeit wurden von Herrn Dr. Zimmermann durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn C.R. Denston für seine zuverlässige technische Assistenz bei zahlreichen Experimenten, und Herrn H. Scharwächter, der beim Einlesen einiger zehntausend Meßwerte in den Computer behilflich war, und Frau A. Bast für das Tippen der Arbeit.

Bei Herrn Prof. C. Cazaux, Station Biologique d'Arcachon, Frankreich, bedanke ich mich für die regelmäßige Versorgung mit Versuchstieren.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes bin ich für das großzügige Stipendium dankbar, das sie mir gewährt hat.

Nomenklatur und Abkürzungen

Neben den von der IUPAC zur Verwendung empfohlenen Abkürzungen werden folgende Symbole benutzt:

AAS	Atomabsorptionsspektralphotometrie
ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
AChR	Azetylcholin-Rezeptor
ACoA	Azetyl-Coenzym A
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ASK	absolute spezifische Konzentration, vgl. S. 66
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CAT	Cholin-Azetyltransferase
Ch	Cholin
CoA	Coenzym A
E.C.	Enzymkatalog nach den Richtlinien der Enzymkommission der IUB
g	Erdbeschleunigung
GE	Gesamtesterase, vgl. S. 43
GK	Glycinpräparation, Kontrollorgane
GS	Glycinpräparation, stimulierte Organe
NK	Natriumchloridpräparation, Kontrollorgane
p	Irrtumswahrscheinlichkeit. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ werden als signifikant, Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ als hochsignifikant bezeichnet. Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 1 und 5%, so wird das Ergebnis als fast signifikant bezeichnet.

P_n siehe unten

Prot. Protein

RSK relative spezifische Konzentration, vgl. S. 66

S_n siehe unten

S.E.M. Standardabweichung des Mittelwertes

In der Zellfraktionierung ist es üblich, die Bodensätze von Differentialzentrifugationen mit P (pellet) und die Überstände mit S (supernatant) abzukürzen. Entspricht die Beschleunigung der Zentrifugation einem Gravitationsfeld von etwa 1 000 g (Zelltrümmer und Zellkerne gehen in den Bodensatz), so erhalten die Symbole den Index 1, entspricht sie einem Feld von etwa 10 000 g (Mitochondrien und Synaptosomen gehen in den Bodensatz), so erhalten sie den Index 2, und bei einer Beschleunigung von 100 000 g, bei der die Mikrosomen und synaptischen Vesikel sedimentieren, den Index 3. Wird der erste Zentrifugationsschritt übersprungen, so erhält der bei ca. 10 000 g gewonnene Bodensatz die Bezeichnung P_{12} , der Überstand entsprechend S_{12} . Ein hochgestelltes Stern oder ein hochgestelltes Pluszeichen deuten an, daß die betreffende Fraktion einen Reinigungsschritt durchlaufen hat (z.B.: P_3^+ - die zugehörige Waschlösung heißt dann S_3^+).

Zur Unterscheidung von den Fraktionen, die von den Dichtegradienten gewonnen werden, werden die durch Differentialzentrifugation erhaltenen Fraktionen als Präparationsvorstufen bezeichnet.

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Nervenzellen und Gliazellen

Im Nervensystem treten hauptsächlich zwei Klassen von Zellen auf, die Nervenzellen (Neuronen) und die Gliazellen, welche miteinander in engem morphologischen und funktionellen Kontakt stehen.

Die spezifische Aufgabe der Neuronen ist, Informationen zu verarbeiten und weiterzugeben. Sie bestehen aus einem den Zellkern umschließenden Zellkörper (Soma), der zahlreiche Fortsätze besitzt: die stark verzweigten afferenten Dendriten und das weniger oder gar nicht verzweigte efferente Axon (Abb. 1).

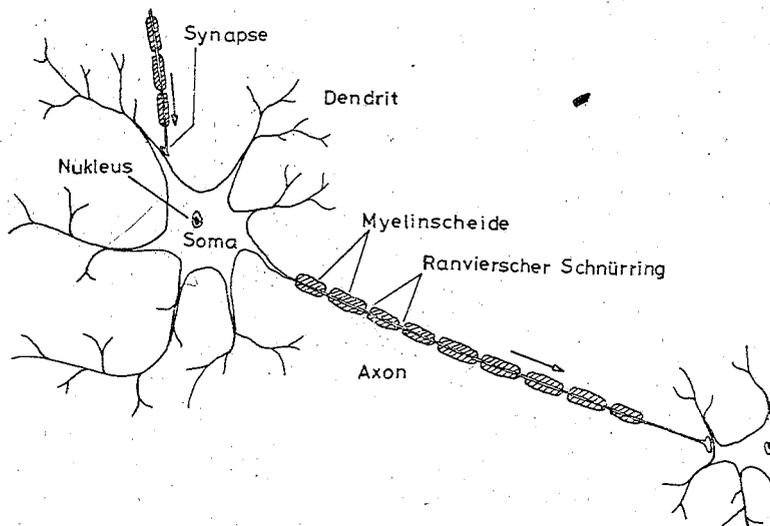


Abb. 1: Neuron, schematisch

Am Zellkörper und seinen Fortsätzen, besonders den Dendriten, liegen die Synapsen, Kontaktstellen, welche Informationen von

anderen Nervenzellen übertragen. Die einlaufenden Nachrichten werden von der Nervenzelle integriert und gegebenenfalls mit einem Signal beantwortet, das über das oft viele Zentimeter lange Axon zur nächsten Station weitergeleitet wird; dabei kann es sich um ein anderes Neuron handeln, oder um eine sogenannte Effektorzelle, zum Beispiel eine Muskel- oder Drüsenzelle.

Entlang der Axone läßt sich die Erregungsleitung elektrophysiologisch als eine sehr schnelle Änderung des Membranpotentials verfolgen: Verglichen mit seiner Umgebung ist das Innere der Axone ca. 10mal ärmer an Natrium und 20 bis 50mal reicher an Kaliumionen. Unter der Annahme, daß sich die Chloridionen im ruhenden Gewebe in Gleichgewichtsverteilung befinden (Hodgkin, 1958), läßt sich durch Einsetzen der jeweiligen Kalium- und Natriumaktivitäten in die Nernstsche Gleichung das Ruhepotential der Axonmembran

$$(1) \quad E = V_{\text{innen}} - V_{\text{außen}} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{außen}} + b[Na^+]_{\text{außen}}}{[K^+]_{\text{innen}} + b[Na^+]_{\text{innen}}}$$

berechnen.

Hierin ist R : die universelle Gaskonstante,
 T : die absolute Temperatur,
 F : das Faraday, die elektrische Ladung eines Grammäquivalentes einwertiger Ionen,
 $b = \frac{p_{Na}}{p_K}$: das durch Isotopenversuche bestimmte Verhältnis von Natrium- zu Kaliumpermeabilität.

Die errechneten Werte stimmen gut mit den gemessenen (je nach Nerv ca. -70 bis -90 mV) überein.

Die Erregung des Axons äußert sich als Depolarisierung; erreicht sie einen Wert, der positiver als ca. -40 mV ist, so führt sie zu einer kurzfristigen Öffnung der Natriumkanäle in der Membran. Na^+ strömt ein, und das Zellinnere wird noch stärker depolarisiert (bis zu einer Gesamtdepolarisierung von ca. 100 mV). Nach etwa 2 msec bricht dieser autokatalytische Prozeß ab. Die Na^+ -Schleusen werden geschlossen, während gleichzeitig die Kaliumleitfähigkeit der Membran ansteigt; K^+ verläßt das Zellinnere und die Depolarisierung wird dadurch rückgängig gemacht (Hodgkin & Huxley, 1952a-c). Der Anstieg der Kaliumleitfähigkeit ist ein Vorgang mit negativer Rückkopplung, der sich fortschreitend selbst abschaltet. Diesen zeitlichen Potentialverlauf bezeichnet man als Aktionspotential. Die ursprüngliche Ionenverteilung wird durch eine ATP-abhängige Natrium-Kalium-Austauschpumpe wiederhergestellt (Hodgkin & Keynes, 1955). Über die durch dicke Myelinscheiden isolierten Bereiche des Axons (s. Abb. 1) wird das Signal durch passive Ionenleitung weitergegeben. Die durch die schlechten Kabeleigenschaften dieses Leiters auftretenden Verluste werden jedoch an den nicht isolierten Ranvierschen Schnürringen mittels des geschilderten Prozesses sich selbst verstärkender Depolarisierung ausgeglichen.

An einigen Synapsen wird die Information ebenfalls durch Potentialänderungen übermittelt (sogenannte elektrische Synapsen). Zahlreicher sind allerdings die chemischen Synapsen, an denen eine spezielle Substanz, der Transmitter, freigesetzt wird, wenn ein Aktionspotential einläuft. Sie diffundiert durch den synaptischen Spalt an die postsynaptische Zellmembran und ruft dort eine De- oder Hyperpolarisierung hervor. Die chemische Form der

Übertragung ermöglicht, daß die synaptischen Prozesse gerichtet ablaufen. Außerdem bildet sie eine einfache Voraussetzung für die hemmende Übertragung und verhindert ungewünschte Interferenz zwischen funktionell verschiedenen, aber topologisch benachbarten Neuronen.

Der Glia schreibt man hauptsächlich Stütz-, Versorgungs- und Isolationsfunktionen zu. So schieben sich zum Beispiel die Astrozyten zwischen die Blutkapillaren und Neuronen und bilden somit die bekannte Blut-Hirn-Schranke, die den Übertritt von bestimmten zirkulierenden Substanzen in das Gehirn spezifisch verhindert. Die Oligodendrozyten des Zentralnervensystems, beziehungsweise die Schwannschen Zellen der Peripherie, wickeln durch Hypertrophie ihrer Zellmembran die Axone mit einer festen isolierenden Umhüllung ein.

1.2. Die Synapsen

Sowohl die Nervenzellen als auch die Gliazellen lassen sich nach morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten in viele Untergruppen einteilen. Erstere werden je nach ihrem Transmitter als cholinerg (Transmitter: Azetylcholin), adrenerg (Transmitter: Adrenalin), noradrenerg (Transmitter: Noradrenalin), glutaminerg (Transmitter: Glutaminsäure) usw. bezeichnet. Nur für wenige Synapsen ist der Transmitter bekannt; gut untersuchte Beispiele sind die postganglionären sympathischen Nervenendigungen des autonomen Nervensystems der Vertebraten (noradrenerg) (Übersichtsartikel: Iversen, 1967), die sympathischen Neuronen des Froschherzens und der Krötenlunge (adrenerg) (Falck, Häggendal &

Owman, 1963; Wood & Burnstock, 1967), die exzitatorischen neuromuskulären Endplatten der Insekten und Krustazeen (glutaminerg) (Usherwood & Grundfest, 1965; Robbins, 1959), und die inhibitorischen Nerv-Muskel-Synapsen der Insekten und Krustazeen (gabaminerg) (Usherwood & Grundfest, 1964; Bazemore, Elliott & Florey, 1957) und die präganglionären sympathischen Neuronen der Wirbeltiere, zum Beispiel im oberen Zervikalganglion, (cholinerg) (Hebb & Krnjević, 1962; Eccles, 1964).

Trotz der verschiedenen Transmitter weisen die Nervenzellen jedoch zahlreiche Gemeinsamkeiten auf: Betrachtet man eine chemische Synapse unter dem Elektronenmikroskop, so sieht man eine deutliche Aufweitung des Zellfortsatzes, den sogenannten Endknopf, der, je nach Art der betrachteten Synapse, durch einen 200 - 600 Å breiten "synaptischen Spalt" von der postsynaptischen Zelle getrennt ist. Den direkt unter dem Endknopf liegenden Teil der postsynaptischen Zelle bezeichnet man als subsynaptisch.

Auch der innere Aufbau der Nervenendigung ist für die verschiedenen chemischen Synapsen von bemerkenswerter Ähnlichkeit. Eine große Zahl kleiner, nahezu sphärischer Bläschen, der synaptischen Vesikel, findet sich im Zytoplasma. Außerdem treten wesentlich mehr Mitochondrien auf als in den weiter zum Nukleus hin gelegenen Teilen des Axons (Abb. 2).

In fast allen Gebieten des Zentralnervensystems treten die verschiedenen Nervenzellen gemeinsam mit Gliazellen in sehr heterogener Verflechtung auf, so daß biochemische Untersuchungen am gesamten Gehirn oder mit Gewebescheiben in ihren Aussagemöglich-

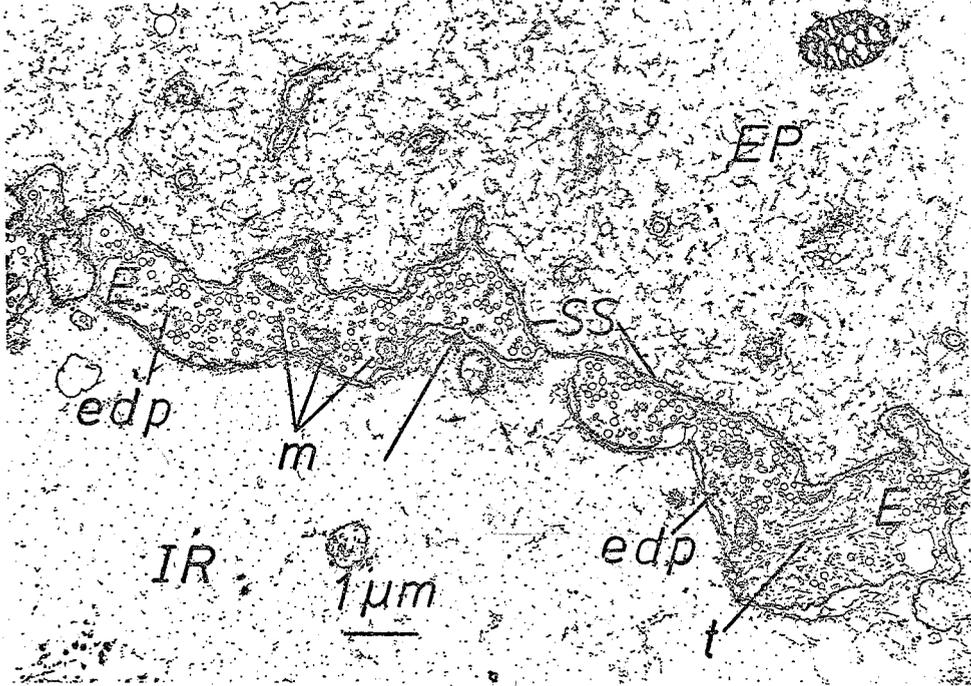


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Synapsen im elektrischen Organ von *Torpedo marmorata*. Die Nervenendigungen, E, sind durch einen schmalen synaptischen Spalt, SS, von der Elektroplaquezelle, EP, getrennt. Innerhalb der Nervenendigung finden sich außer den sphärischen synaptischen Vesikeln Mitochondrien, m, Mikrotubuli, t, sowie zahlreiche elektronendichte Partikel, edp, die möglicherweise aus Glykogen bestehen (vgl. Sheridan et al., 1966). Gelegentlich beobachtet man Vesikel bei der Exozytose, die von einem charakteristischen Mantel umgeben sind (Pfeil). IR: Interzellulärraum. Vergrößerung: 9450fach.

keiten eingeschränkt sind. Die Geometrie der Nervenzelle und ihre feste Bindung an Nachbarzellen erschweren die Isolierung von einzelnen Nervenzellen beträchtlich. Seit den Untersuchungen von Whittaker und de Robertis ist es jedoch möglich, die Technik subzellulärer Fraktionierung auf das Nervengewebe anzuwenden und nahezu jeden Teil des Neurons sowie seine Organellen in funktionsfähiger Form zu isolieren (Whittaker, 1959, 1969; de Robertis

et al., 1961; de Robertis, 1969). Solche mit Gehirngewebe durchgeführte Präparationen ergeben aber heterogene Populationen, da die erhaltenen Organellen von chemisch unterschiedlichen Zelltypen stammen.

Man begann daher bald, nach Modellsystemen zu suchen: Die Drüsenzellen des Nebennierenmarks, die sich aus hypertrophierten adrenergen Neuronen entwickelt haben, schütten bei Stimulation Katecholamine aus. Die Speicherung dieser Hormone in kleinen, durch Membranen begrenzten Bläschen (chromaffine Granula), ihre Kalzium-abhängige, exozytotische Sekretion sowie ihre Synthese durch eine Reihe regulativer Enzyme ähneln den Vorgängen an der adrenergen Synapse so sehr, daß dieses System zum fruchtbarsten Modell für die adrenerge Transmitterfreisetzung geworden ist.

Zur Untersuchung der cholinergen Übertragung haben sich vor allem die neuromuskulären Endplatten der Wirbeltier-Motoneuronen bewährt, also Synapsen jener efferenten Nervenfasern, die mit der quergestreiften Muskulatur gebildet werden (Dale, Feldberg & Vogt, 1936).

1.3. Das elektrische Organ von *Torpedo marmorata* als Modellsystem zur Untersuchung cholinergischer Synapsen

Auch das elektrische Organ von *Torpedo* hat sich embryologisch aus Muskelgewebe entwickelt (Babuchin, 1876; Fritsch, 1890; Ogneff, 1897), und es lag nahe, auch hier cholinerge Innervation zu erwarten. Zum erstenmal wurde diese Möglichkeit von Elliott

(1914, in seiner Sydney Ringer Gedächtnisvorlesung) diskutiert. Er schreibt außer von eigenen vergeblichen Versuchen, die "aktive Substanz" aus Muskelgewebe zu isolieren, auch von Herrings erfolglosen Bemühungen, diese Substanz (den Transmitter) aus dem elektrischen Organ des Glattrochens, Raja, zu gewinnen. Die Torpedineen gehören zu den Knorpelfischen. Seitlich der Kiemenbögen liegen die großen, flachen, paarigen elektrischen Organe, die dem Zitterrochen zum Beutefang und zur Verteidigung dienen. Sie füllen den Raum zwischen ventraler und dorsaler Haut vollständig aus (Abb. 3).

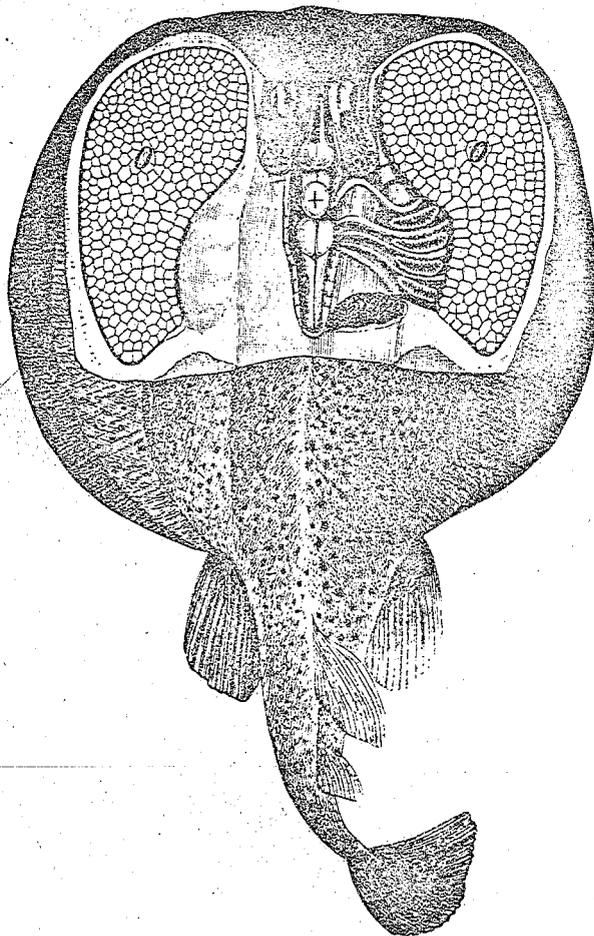


Abb. 3: Rückenansicht von *Torpedo marmorata* mit freigelegten elektrischen Organen, O, Gehirn und den Nervensträngen, die zum elektrischen Organ ziehen. Die Länge eines ausgewachsenen Zitterrochen dieser Art beträgt etwa 50 cm. Aus Fritsch, 1890.

Bei einem ausgewachsenen Fisch der Art *Torpedo marmorata* sind die Elektroplaquezellen ca. 4 mm breit, aber nur 10 - 20 μ m dick. Im Ruhezustand sind sie innen negativ polarisiert (Abb. 4).

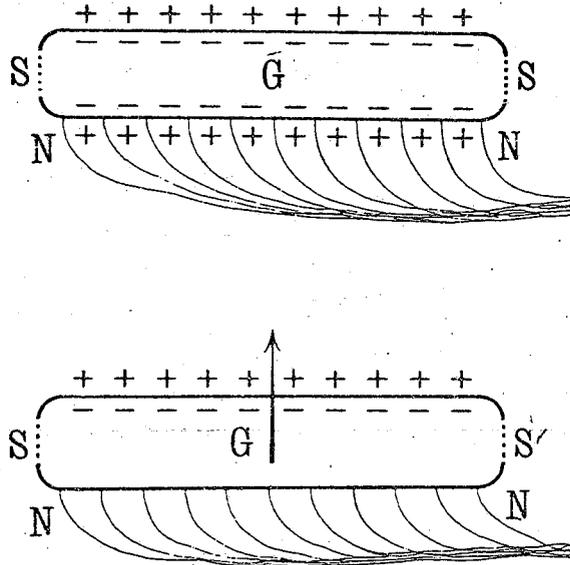


Abb. 4: Die Elektroplaquezelle, G, wird an ihrer ventralen Seite von mehreren Nervenfasern, N, innerviert. Im Ruhezustand (oben) ist die Zelle innen negativ polarisiert. Bei der elektrischen Entladung (unten) wird die ventrale Seite depolarisiert, so daß sich die Potentialdifferenzen der dorsalen Zellwände zu einem Spannungsstoß addieren. S steht für die seitliche Zellmembran. Nach Bernstein, 1912.

Sie sind zu ca. 400 Zellen wie Geldrollen übereinandergestapelt (Abb. 5). Etwa 500 solcher Säulen sind in einem elektrischen Organ in Bienenwabenart dicht aneinandergepackt (Fritsch, 1890).

Die Elektroplaquezellen werden an ihrer ventralen Seite von je 5 bis 7 verzweigten Ästen der stark myelinisierten Elektromotoneuronen (ca. 50 000 auf jeder Seite (Fritsch, 1890)) innerviert (Wagner, 1847), deren Zellkörper sich in den der Medulla oblongata aufliegenden Lobi electrici befinden. Von hier ziehen

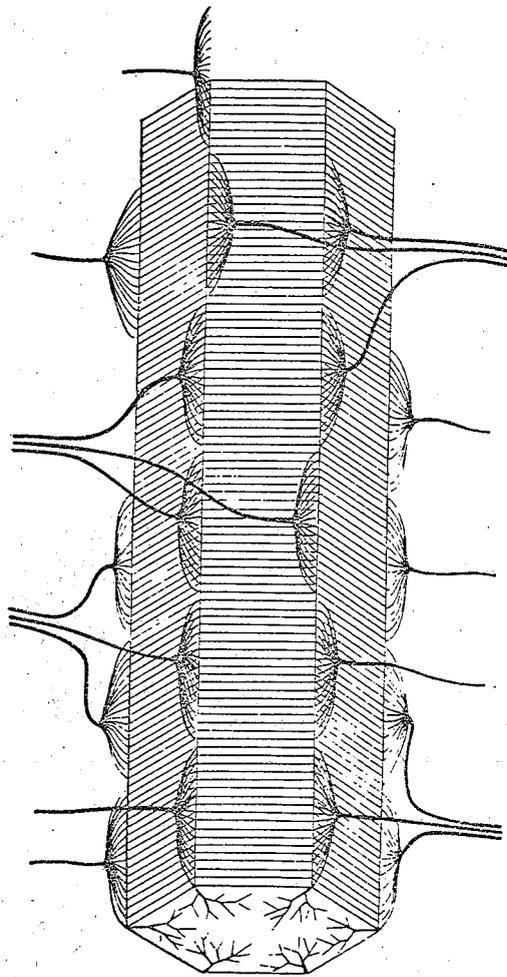


Abb. 5: Anordnung der Elektroplaquezellen, schematisch. Die Zellen werden an ihrer ventralen Seite innerviert. Aus Fritsch, 1890.

beidseitig je vier Nerven zwischen den Kiemenbögen hindurch zum elektrischen Organ (s. Abb. 3 und 6).

Die Erregung der Elektromotoneuronen führt zur Ausschüttung von Azetylcholin (ACh), das von den Rezeptoren der (ventralen) postsynaptischen Membran erkannt wird und durch Ionenströme die Depolarisierung der ventralen Elektroplaquezellenmembran bewirkt. Jetzt summieren sich die Membranpotentiale der dorsalen Elektro-

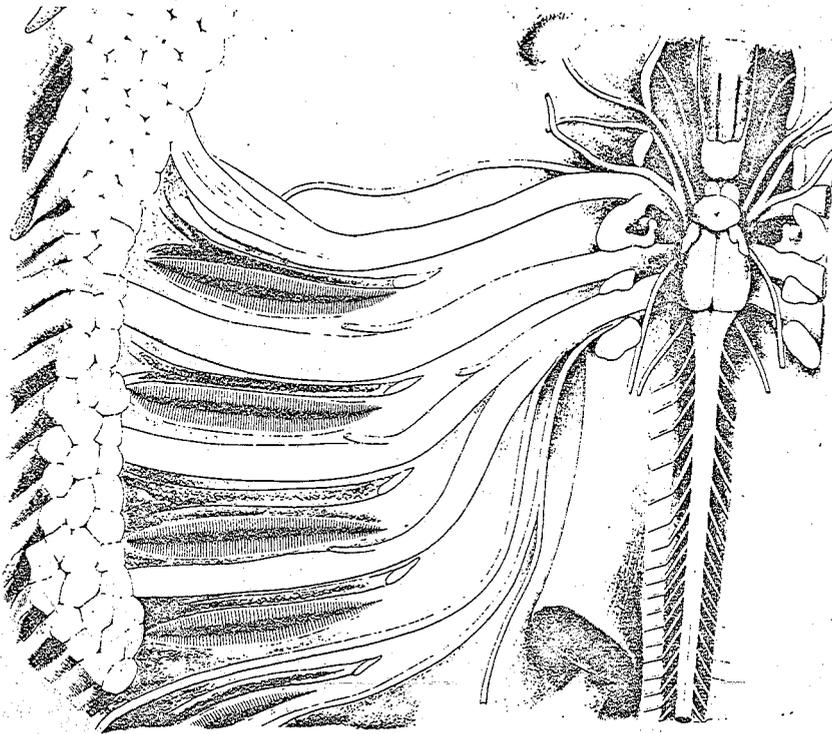


Abb. 6: Verlauf der Nervenstränge von den Lobi electrici zum elektrischen Organ. Aus Fritsch, 1890.

plaquezellmembranen zu einem Spannungsstoß von 30 bis 60 V (Bernstein, 1912) (s. Abb. 4).

Das freigesetzte ACh wird bald durch Azetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.), ein außerordentlich reaktives Enzym (Wechselzahl ca. 3×10^6), das in hoher Konzentration in der postsynaptischen Membran auftritt (Mathewson, Wachtel & Grundfest, 1959; Tsuji, Rieger & Peltre, 1973), zu Cholin und Azetat gespalten. Während die Hauptmenge des Azetats (und ein Teil des Cholins) durch die Zirkulation der Interstitialflüssigkeit wegtransportiert wird, wird der größte Teil des Cholins über zwei Cholin-Carrier-Systeme unterschiedlicher Affinität ($K_m = 2 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$) wieder in die präsynaptische Nervenendigung eingeschleust (Dowdall & Simon, 1973; Yamamura & Snyder, 1973; Haga & Noda, 1973). Auch ein Teil des Azetats wird wieder präsynaptisch auf-

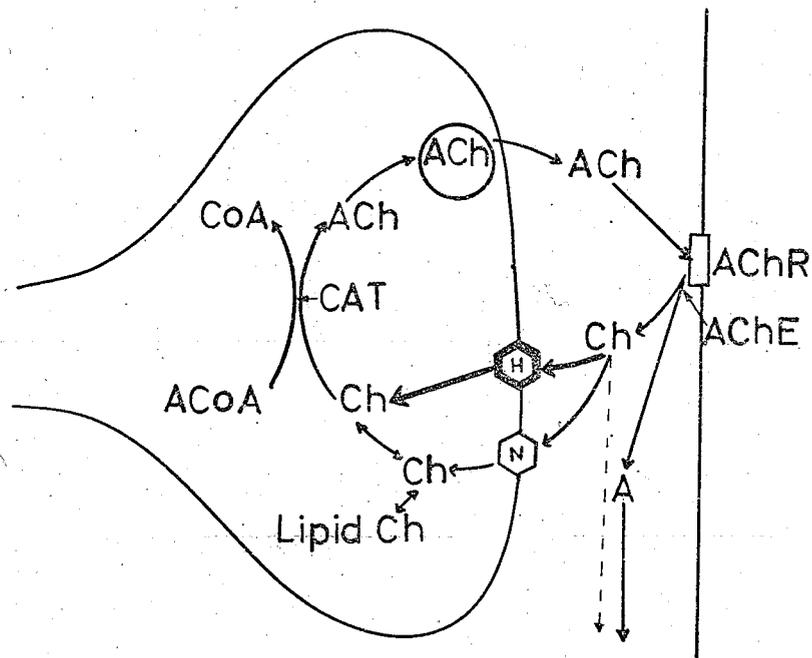


Abb. 7: Mechanismus der cholinergen Synapse, schematisch. A: Azetat, ACh: Azetylcholin, AChE: Azetylcholinesterase, AChR: Azetylcholin-Rezeptor in der subsynaptischen Membran, ACoA: Azetyl-Coenzym A, CAT: Cholin-Azetyltransferase, Ch: Cholin, CoA: Coenzym A, H: hochaffiner Cholin-Aufnahmemechanismus, N: niederaffiner Cholin-Aufnahmemechanismus. Vgl. Text.

genommen. Hier wird im Cytoplasma aus Azetyl-Coenzym A und Cholin durch das Enzym Cholin-Azetyltransferase (E.C. 2.3.1.6.) ACh synthetisiert (Abb. 7). Besonders von der neuromuskulären Endplatte ist bekannt, daß auch ohne Erregung der Motoneuronen spontan ACh freigesetzt wird - allerdings in sehr viel kleineren Mengen, die ganzzahlige Vielfache kleinster Quanten sind. Sowohl diese spontane als auch die induzierte Transmitterfreisetzung unterbleiben in Abwesenheit von Kalziumionen.

1.4. Die cholinergen synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo

Die Arbeit von Sheridan, Whittaker & Israë"l (1966) und spätere methodische Verbesserungen (Israë"l, Gautron & Lesbats, 1968, 1970) ermöglichten erstmals die Isolierung synaptischer Vesikel aus dem elektrischen Gewebe durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Es zeigte sich, daß 50% des gesamten Azetylcholins in der Vesikelfraktion wiedergefunden werden konnte, d.h., daß mindestens die Hälfte des ACh's im Innern der synaptischen Vesikel gebunden ist und so vor dem Abbau durch die im Homogenat des Organs vorhandene Azetylcholinesterase geschützt wird.

Weitere Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der cholinergen synaptischen Vesikel von Torpedo zeigten, daß diese je ACh-Molekül 0,1 bis 0,25 ATP-Moleküle enthalten (Whittaker, Dowdall & Boyne, 1972; Whittaker, 1972; Dowdall, Boyne & Whittaker, 1974) und mindestens aus vier verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sind. Drei der Proteine beteiligen sich am Aufbau der phospholipidreichen Vesikelmembran (Whittaker & Dowdall, 1972); das vierte liegt im Innern der Vesikel vor (Whittaker, 1971, 1972a; Whittaker, Dowe & Scotto, 1971; Whittaker et al., 1974) und wurde deshalb Vesikulin genannt. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 10 000 und enthält nur 9 basische, aber 23 saure Aminosäuren. Ihre negativen Ladungen helfen mit, die positiven Ladungen der ACh-Moleküle elektrisch zu neutralisieren.

Bereits 1942 hatten Feldberg und Fessard in Perfusionsexperimenten

gezeigt, daß die Stimulation der Nerven des elektrischen Organs zur ACh-Freisetzung in das Perfusat führt. Zimmermann entwickelte später eine Stimulationstechnik mit dem elektrischen Organ in situ durch elektrische Stimulation der *Lobi electrici* am Hirnstamm (Zimmermann & Whittaker, 1973; Whittaker & Zimmermann, 1974; Whittaker 1973a, 1973b). Dabei wurden zuvor die Nerven zu einem der Organe durchtrennt, um eine unstimulierte Kontrollprobe desselben Tieres zum Vergleich zu haben. Eine kombinierte biochemische, elektrophysiologische und morphologische Untersuchung (Zimmermann & Whittaker, 1974) zeigte bei anhaltender Stimulation einen deutlichen Abfall in der Amplitude der elektrischen Entladung, Zunahme der Fläche der präsynaptischen Membran sowie eine Abnahme der Vesikeldurchmesser von ca. 84 (vgl. Sheridan, Whittaker & Israël, 1966) auf ca. 60 nm. Nach 5 000 Impulsen war die Anzahl der Vesikel pro Flächeneinheit im elektronenmikroskopischen Bild auf die Hälfte gesunken. Die isolierte Vesikelfraktion zeigte zugleich eine Abnahme des ACh- und ATP-Gehaltes um ca. 90% und eine Abnahme der Protein- und Gesamtnukleotidkonzentration um 50%. Auch der Vesikulingehalt sank auf die Hälfte. Diese Beobachtungen stehen mit der Interpretation in Einklang, daß die Vesikel bei Stimulation mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und dabei das ACh exozytotisch freisetzen. Man kann sich auch vorstellen, daß sich die synaptischen Vesikel nur kurzfristig an die äußere Zellmembran anlagern und ihren Inhalt durch sich öffnende Kanäle ausschütten.

1.5. Problemstellung der Untersuchungen

Eine Reihe von Fragen bleibt jedoch vorläufig ungeklärt: Es ist möglich, daß sich die neu auftretende Population kleinerer Vesikel durch Pinozytose bildet. Da die Gesamtnukleotid- und Vesikulinkonzentration in den nach Stimulation noch vorhandenen Vesikeln unverändert ist, während ihre ACh-Konzentration abgenommen hat, würden sie einen negativen Ladungsüberschuß tragen, wenn dieser nicht durch andere Ionen ausgeglichen wird. Hierfür kommen besonders pinozytotisch eingeschleuste Metallkationen aus dem synaptischen Spalt in Frage.

Unbekannt ist ferner, wie die durch die Axonmembran fließenden Ionenströme die Vesikel zur Anlagerung an die Zellmembran stimulieren und die Transmitterfreisetzung hervorrufen. Auch die Rolle des Ca^{2+} , das für die ACh-Freisetzung ebenso erforderlich ist wie für die Noradrenalinausschüttung und die Sekretion von Hormonen (vergl. S. 7) ist unbekannt.

Die Klärung dieser Fragen ist keinesfalls ausschließlich für die Funktion der cholinergen Synapse von Bedeutung: Die Morphologie und chemische Zusammensetzung verschiedener chemischer Synapsen ähneln einander so sehr, daß funktionelle Analogien vermutet werden müssen. Die Ähnlichkeiten erstrecken sich jedoch noch weiter: In zahlreichen Hormondrüsen sind mit ultrastrukturellen Methoden kleine der Sekretspeicherung dienende Vesikel nachgewiesen worden. Für einen Teil dieser Systeme wurde die funktionelle Beteiligung von Metallkationen am Sekretionsprozeß gezeigt.

Obwohl die neuronalen Transmitter definitionsgemäß durch ihre direkte Einwirkung auf die postsynaptische Membran deutlich von den in die Blutbahn ausgeschütteten Hormonen abgegrenzt werden, gibt es in den Neurosekreten einen bemerkenswerten Übergang: Die Neuronen des Nukleus supraopticus und des Nukleus paraventricularis ziehen in die Neurohypophyse (Hinterlappen), wo ihre Endigungen aus neurosekretorischen Granula (Vesikeln) die Hormone Vasopressin und Oxytocin in die Blutbahn abgeben. Auf die Analogien verschiedener Sekretionsprozesse und die Rolle der Metallkationen in ihnen wird in der Diskussion noch näher eingegangen werden.

Die vorliegende Arbeit versucht, anhand des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata* einen Beitrag zur Klärung der skizzierten Fragenkomplexe zu liefern.

Folgende Aspekte werden untersucht:

1. Welche Metallkationen treten im elektrischen Organ auf?
2. Wie ist es möglich, die extrem kleinen Metallionenkonzentrationen dieser subzellulären Fraktionen zu bestimmen?
3. Können subzelluläre Fraktionen, insbesondere von cholinergen synaptischen Vesikeln, frei von kontaminierenden Metallionen (z.B. des Zytoplasmas) gewonnen werden?
4. Ist es möglich, Veränderungen im Metallionengehalt durch elektrische Stimulation hervorzurufen?

2. Methoden und Ergebnisse der qualitativen Analyse des Metallionengehaltes

Um festzustellen, welche Metallionen quantitativ zu erfassen seien, wird zunächst eine qualitative Analyse durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an Analysesubstanz zur Verfügung zu haben, wird von Gewebeproben des elektrischen Organs ausgegangen; nur die im gesamten Gewebe auftretenden Ionen können am Aufbau der synaptischen Vesikel beteiligt sein. Von elf verschiedenen Fischen werden jeweils 2 g elektrisches Gewebe entnommen und nach der in Kapitel 3.4. beschriebenen Methode mit Salpetersäure aufgeschlossen. Die Proben werden vereinigt und einem Kationentrennungsgang unterworfen, der sich in seinen Grundzügen an den 1840 von R. Fresenius entworfenen Trennungsgang anschließt, welcher hauptsächlich auf der unterschiedlichen Löslichkeit der verschiedenen Metallsulfide im sauren und alkalischen Medium beruht. Die Prinzipien dieses Trennungsganges sind ausführlich von Jander und Blasius (1967) beschrieben worden. Der Trennungsgang wird im Halbmikro-Maßstab durchgeführt.

Alle Tests werden von Blindproben begleitet, d.h. bei positivem Resultat werden die Nachweise mit den reinen Reagentien ohne Probelösung, bei negativem Ergebnis unter Zusatz des gesuchten Ions wiederholt.

2.1. HCl- und H₂S-Gruppe

Zunächst wird eine kleine Probemenge mit 2 N HCl, anschließend

mit gesättigter Na_2S -Lösung versetzt (siehe Abb. 8). Keiner der Zusätze fällt einen Niederschlag aus. Die Probelösung enthält also keines der folgenden Ionen

Ag^+ , As^{3+} , As^{5+} , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , Sb^{5+} , Sn^{2+} und Sn^{4+}

in nachweisbarer Konzentration.

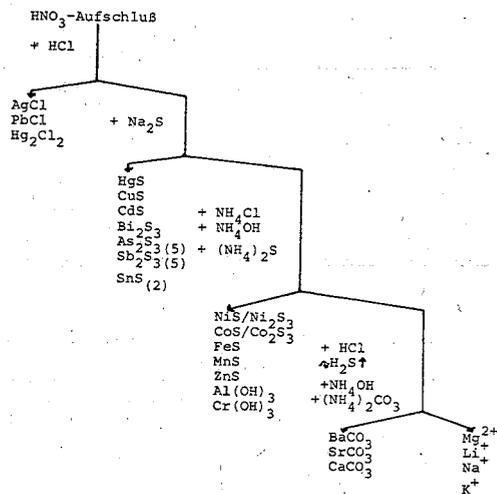


Abb. 8: Allgemeines Schema zur Auftrennung der wichtigsten Metallkationen in Gruppen.

Auf Zusatz von Ammoniak und $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ bildet sich ein Niederschlag. Für die Elemente der Ammoniumsulfid-Urotropin-Gruppe, der Ammoniumcarbonat-Gruppe und der löslichen Gruppe wird daher ein detaillierter Trennungsgang entworfen und mit einer frischen Probenmenge durchgeführt (siehe Abb. 9).

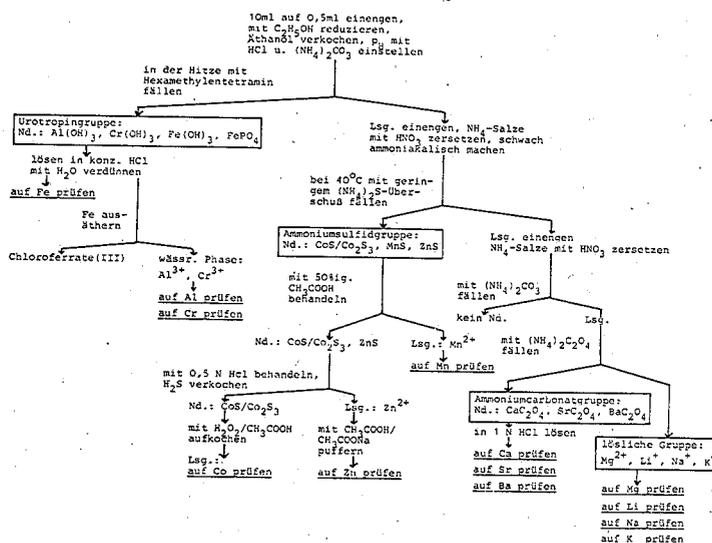
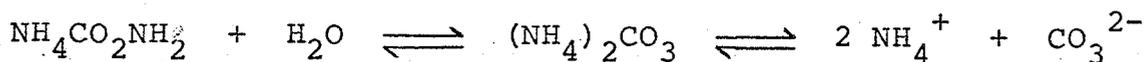


Abb. 9: Auftrennungsschema für die Urotropin-, Ammoniumsulfid-, Ammoniumcarbonat- und lösliche Gruppe. Vgl. Text.

2.2. Urotropin-Gruppe

10 ml der stark HNO_3 -sauen Probelösung werden auf 0,5 ml eingengt. Hierbei wird gegebenenfalls anwesendes Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxydiert. Die resultierende Lösung ist kräftig gelb gefärbt. Da diese Farbe außer durch $Fe(III)$ -komplexe durch CrO_4^{2-} - und MnO_4^- -Ionen (mit)verursacht sein kann, wird mit 3 ml C_2H_5OH zum Sieden erhitzt, um gegebenenfalls vorhandenes Chromat oder Permanganat zu Cr^{3+} beziehungsweise Mn^{2+} zu reduzieren. Der überschüssige Äthylalkohol wird verkocht. Anschließend wird die Lösung mit 1 N HCl auf ein Volumen von 3 ml gebracht und in der Wärme solange tropfenweise mit einer konzentrierten Lösung von Ammoniumcarbaminat



versetzt, bis der sich an der Eintropfstelle bildende Niederschlag gerade nicht mehr in Lösung geht. Er wird durch Zusatz eines Tropfens 1 N HCl in Lösung gebracht; zusätzlich wird eine Spatelspitze NH_4Cl hinzugefügt. Diese p_H -Einstellung gewährleistet, daß die Ionen Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} , sowie die Elemente der Ammoniumcarbonat-Gruppe und der löslichen Gruppe bei der folgenden Fällung mit Hexamethylentetramin (Urotropin) in Lösung bleiben.

Zur Fällung wird eine 10%ige Lösung von Hexamethylentetramin verwendet, die mit HCl exakt auf den p_H 5,5 gebracht worden ist. Die Fällung wird bei Siedetemperatur vorgenommen, der gebildete Niederschlag warm zentrifugiert und mit wenig warmem Fällungsreagenz kurz gewaschen. Die Waschlösung wird mit dem Zentrifugat vereinigt.

Der Niederschlag kann (neben $\text{Ga}(\text{OH})_3$, $\text{Be}(\text{OH})_2$, FeVO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{U}_2\text{O}_7$, $\text{Zr}(\text{OH})_4$, $\text{Ti}(\text{OH})_4$ und $\text{La}(\text{OH})_3$) aus $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$ und FePO_4 bestehen. Mit der Anwesenheit nachweisbarer Mengen der eingeklammerten Verbindungen braucht angesichts des biologischen Probematerials nicht gerechnet zu werden. Die Anwesenheit der übrigen Metalle wird wie folgt überprüft:

Der Niederschlag wird mit konzentrierter Salzsäure gelöst und mit etwas weniger als der gleichen Menge Wasser verdünnt.

Ein Teil dieser Lösung wird auf Fe^{3+} untersucht:

1. Nach Abstumpfen der Azidität mit Ammoniak wird mit einer 1 M NH_4SCN -Lösung versetzt. Das sich bildende blutrote $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ läßt sich mit einem Äther-Amylalkoholgemisch ausschütteln und entfärbt sich auf Zusatz von F^- -Ionen (Bildung des stabileren FeF_6^{3-} -Komplexes).

2. Durch Zusatz von $K_4(Fe(CN)_6)$ wird zunächst kein Niederschlag gefällt. Läßt man die Lösung jedoch in einer dünnen Glaskapillare an einem $K_4(Fe(CN)_6)$ -Körnchen vorbeifließen, so verfärbt sich dieses unter Bildung von Berliner Blau.

Die verbleibende Lösung wird mit einem gleichen Volumen HCl-gesättigten Äthers ausgeschüttelt. Hierbei gehen die komplexen Chloroferrate(III) in die Ätherphase.

Die wäßrige Phase wird auf Al und Cr untersucht:

1. Al: Ein Teil der sauren Lösung wird mit KOH stark alkalisch gemacht, vom Niederschlag (vor allem verschlepptes $Fe(OH)_3$) abzentrifugiert, mit Eisessig angesäuert und mit einer gesättigten Lösung von Morin in Methanol versetzt. Auch bei Betrachtung im UV-Licht zeigt sich keine Fluoreszenz.

2. Cr: Die verbleibende Lösung wird mit HNO_3 versetzt, mit Äther überschichtet und in der Kälte mit einigen Tropfen 2,5 M H_2O_2 geschüttelt. Es ist kein CrO_5 nachzuweisen.

2.3. $(NH_4)_2S$ -Gruppe

Das Zentrifugat der Urotropinfällung wird eingeengt, und durch Kochen mit konzentrierter HNO_3 von überschüssigen Ammoniumsalzen befreit. Dann wird, um Mg^{2+} in Lösung zu halten, mit etwas festem NH_4Cl versetzt, mit NH_4OH alkalisch gemacht, mit einem geringen Überschuß (gegen $Pb(NO_3)_2 \rightarrow PbS \downarrow$ feststellbar) an $(NH_4)_2S$ -Lösung versetzt, und einige Minuten auf $40^\circ C$ erwärmt. Der gebildete weiße Niederschlag wird nach dem Waschen mit 50%iger CH_3COOH behandelt, und die Lösung auf Mn untersucht:

1. Mit $\text{NH}_4\text{OH} + (\text{NH}_4)_2\text{S}$ läßt sich kein MnS ausfällen.
2. Oxydatives Kochen mit PbO_2 in starker HNO_3 führt nicht zur Bildung von MnO_4^- -Ionen.

Der verbleibende Niederschlag wird mit wenigen ml kalter 0,5 N HCl behandelt, wobei er fast vollständig in Lösung geht. Im Zentrifugat wird gebildetes H_2S verkocht, dann neutralisiert und mit $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ gepuffert. In dieser Lösung kann Zn^{2+} mit folgenden Methoden nachgewiesen werden:

1. Mit Na_2S -Lösung: rein weißer Niederschlag von ZnS .
2. Mit 0,1 M $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ -Lösung Niederschlag von $\text{K}_2\text{Zn}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)_2$, löslich in konz. HCl und 5 N NaOH .
3. Mit einer Lösung von 6 g HgCl_2 und 6,5 g NH_4SCN in 10 ml H_2O bilden sich Kristalle von $\text{Zn}(\text{Hg}(\text{SCN})_4)$, die unter dem Mikroskop an ihrer Form identifiziert werden.
4. Nach Versetzen mit einem Überschuß an 2 N NaOH werden einige Tropfen einer Lösung von 10 mg Diphenylthiocarbazon (Dithizon) in 100 ml CCl_4 zugegeben. Beide Phasen färben sich deutlich rot.

Der restliche Niederschlag der $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -Fällung, der dem Aussehen nach aus Schwefel besteht, wird vorsichtshalber mit $\text{H}_2\text{O}_2 = \text{CH}_3\text{COOH}$ -Gemisch aufgeköcht und auf Co untersucht.

1. Nach Zusatz von $(\text{NH}_4)\text{SCN}$ läßt sich mit Äther-Amylalkoholgemisch weder $\text{Co}(\text{SCN})_2$ noch $\text{H}_2(\text{Co}(\text{SCN})_4)$ ausschütteln.
2. Auch der dem Zn -Nachweis analoge mikrochemische Test auf $\text{Co}(\text{Hg}(\text{SCN})_4)$ verläuft negativ.

2.4. Ammoniumcarbonat-Gruppe

Das Zentrifugat der $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -Fällung wird wie bereits zuvor beschrieben eingeengt und von überschüssigen Ammoniumsalzen befreit. In der ammoniakalischen Lösung läßt sich mit Ammoniumcarbammat nur noch eine leichte Trübung erzielen. Auf Zusatz von Ammoniumoxalat bildet sich jedoch ein deutlicher feinkristalliner Niederschlag. Dieser wird abzentrifugiert und in 1 N HCl gelöst. In dieser Lösung kann Ca

1. spektroskopisch,
2. mit konz. H_2SO_4 als $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in Form dünner monokliner Nadeln unter dem Mikroskop nachgewiesen werden.

Beide Nachweise sind zugleich negativ bezüglich Ba und Sr.

2.5. Lösliche Gruppe

Im verbleibenden Zentrifugat wird auf Mg, Li, Na und K geprüft.

- Mg: 1. Aus ca. 1 N HCl-Lösung fällt nach Zugabe einiger Tropfen 2,5 N $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung und einiger Tropfen 5 N Ammoniaks nach dem Erhitzen im Wasserbad feinkristallines $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Identifizierung unter dem Mikroskop).
2. Aus NH_4Cl -haltiger ammoniakalischer Lösung wird mit einer 3%igen Lösung von 8-Hydroxychinolin in 10%iger Essigsäure grüngelbes Mg-Oxinat gefällt.

- Li: 1. Mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$ beim Kochen kein Niederschlag von LiPO_4 .
2. spektroskopisch: negativ.

- Na: 1. Mit Magnesiumuranylacetat als hellgelbe Oktaeder und Dodekaeder der Zusammensetzung $\text{NaMg}(\text{UO}_2)_3(\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

unter dem Mikroskop. Reagenz: a) 10 g $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 6 g Eisessig und 100 ml H_2O gelöst. b) 33 g $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 10 g Eisessig und 100 ml H_2O gelöst. a) und b) vereinigt.

2. spektroskopisch.

- K:
1. In schwach essigsaurer Lösung ($p_{\text{H}} = 3,5$) mit Natriumhydrogentartrat Niederschlag von $\text{KH}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)$.
 2. Mit Natriumtetraphenylborat voluminöser, weißgelber Niederschlag.
 3. spektroskopisch.

2.6. Ergebnis

Im elektrischen Organ sind Eisen, Zink, Kalzium, Magnesium, Natrium und Kalium mit der Halbmikro-Arbeitstechnik nachweisbar. Das gefundene Eisen dürfte hauptsächlich aus dem Hämoglobin des Blutes stammen. Es ist bekannt, daß die cholinergen synaptischen Vesikel von Torpedo kein Eisen enthalten (Zimmermann, 1974, persönliche Mitteilung). Die quantitative Analyse hat sich also auf die Metalle Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und Zink zu erstrecken.

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeine Maßnahmen beim Arbeiten mit subzellulären Fraktionen

Isolierte subzelluläre Organellen sind extrem labil, da sie aus ihrer natürlichen Umgebung konstanter Osmolarität und regulierter Ionenkonzentrationen entfernt worden sind. Außerdem enthalten die Präparate zahlreiche Lysoenzyme, die in der lebenden Zelle in eigenen Kompartimenten eingeschlossen sind, und somit nicht auf andere Strukturen einwirken können. Subzelluläre Fraktionen müssen daher möglichst schnell in einem Kältelabor bei 0 - 4°C isoliert und weiterverarbeitet werden, in dem auch die kühlbaren Zentrifugen installiert sind. Alle Prozeduren, außer den enzymatischen Bestimmungen und den Ionenmessungen werden bei dieser Temperatur durchgeführt. Die verwendeten Geräte, wie Rotoren, Mörser, Trichter, Meßzylinder, Pipetten etc., werden vor den Experimenten über Nacht im Kältelabor vorgekühlt. Das gleiche gilt für die bei der Präparation verwendeten Saccharose-, NaCl- und Glycinlösungen. Die Saccharoselösungen werden für jedes Experiment frisch angesetzt, da sie bei Lagerung schnell verderben. Detergentien, Schwermetalle und andere Verunreinigungen werden sorgfältig von den Präparaten ferngehalten. Es ist wichtig, daß alle Geräte nach dem Waschen mit Detergentien gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden.

3.2. Die Stimulation des elektrischen Organs von Torpedo marmorata

Die Experimente werden mit Knorpelfischen der Art Torpedo marmorata

durchgeführt, die von der Station Biologique d'Arcachon, Frankreich, per Luftfracht geliefert wurden. Die Tiere werden in Aquarien mit zirkulierendem Seewasser bei 18°C im Dunkeln gehalten. Die Stimulation erfolgt gemäß der von Zimmermann und Whittaker (1974) beschriebenen Methode:

Zunächst werden die Zitterrochen, um Entladungen zu vermeiden, möglichst vorsichtig mit einem Fischnetz gefangen. Sie werden in einem kleinen Becken mit einer 0,05%igen Lösung von M.S.222 (Tricain-Methansulfonat, dem Methansulfonat des m-Aminobenzoesäureäthylesters) in Seewasser betäubt, bis die Atembewegungen der Spritzlöcher aufhören. Die Fische werden dann in eine flache Sektionsschale übertragen, und das Kiemensystem wird mit einer 0,01%igen Lösung von M.S.222 in Seewasser von 18°C durch das Maul überströmt. Die Dorsalseite des Rochens ragt dabei aus dem Wasser heraus, wird aber mit nassem Zellstoffpapier feucht gehalten. Um ein Kontrollorgan desselben Tieres zur Verfügung zu haben, werden die vier Nervenstränge der Elektromotoneuronen durchtrennt, ca. 1 cm von jener Stelle entfernt, an der sie die Knorpelummhüllung des Gehirns verlassen (vgl. Abb. 6). Es ist wichtig, dabei die in enger Nachbarschaft verlaufenden Blutgefäße nicht zu verletzen. Um die Lobi electrici zugänglich zu machen, wird die Schädelplatte des Fisches an jener Stelle entfernt, die ein gleichseitiges Dreieck mit den beiden Spritzlöchern bildet. Die aus Platin gefertigte Stimulationselektrode wird mit einem Mikromanipulator vorsichtig auf die an ihrer gelben Farbe, der ovalen Form und den von rostral caudad vorbeiziehenden Blutgefäßen deutlich erkennbaren Lobi electrici aufgesetzt. Zur Stimulation werden

Rechteckimpulse von 1,5 msec Dauer, einer Amplitude von 20 V und einer Frequenz von 5 Hz verwendet (Students Stimulator, C.F. Palmer Ltd., London). Es wird mit 5 000 Impulsen ($\hat{=}$ 16,7 min) stimuliert. Die elektrische Antwort des innervierten Organs wird über zwei Elektroden abgeleitet, von denen eine der dorsalen Haut aufliegt, während die andere in das zirkulierende Seewasser taucht. Die abzugreifenden Spannungen betragen anfangs 25 - 60 V. Nach ca. 15 min sind sie auf weniger als 1 V abgefallen.

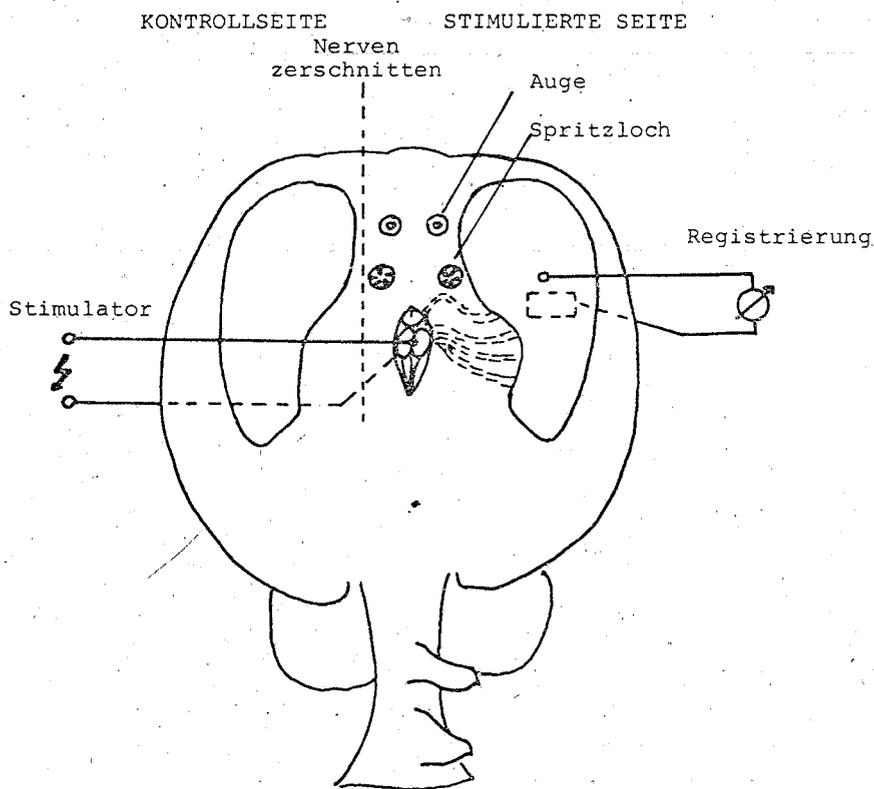


Abb. 10: Anordnung zur Stimulation und Registrierung der elektrischen Entladung.

Das Gehirn der Torpedineen wird von mehreren Meningen umgeben (vgl. Bargmann, 1954), die Flüssigkeitsräume umschließen. Nach der elektrischen Reizung werden diese Flüssigkeiten gemeinsam mit einer Pipette entnommen und analog den Vorfraktionen be-

handelt (Kap. 3.4.). Sie werden hier unter dem Namen Cerebrospinalflüssigkeit zusammengefaßt. Aus dem Herz des Fisches wird etwas Blutplasma entnommen und ebenfalls auf Metallionen untersucht.

3.3. Die Isolierung der cholinergen synaptischen Vesikel

Unmittelbar nach Beendigung der elektrischen Stimulation wird die dorsale Haut über den elektrischen Organen abgezogen, die beiden Organe werden entnommen und im folgenden ganz analog behandelt. Sie werden gewogen und in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff gefroren. Das Gewebe kann so bis zu 4 h gelagert werden, ohne daß die Ausbeute an synaptischen Vesikeln beeinträchtigt wird (Zimmermann & Whittaker, 1974), es wird in den beschriebenen Versuchen jedoch nicht länger als 30 min aufbewahrt. Ca. 50 g des elektrischen Organs werden in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Porzellanmörser (Durchmesser ca. 18 cm) zu einem grobkörnigen weißlichen Pulver zerschlagen; hierbei zerbrechen die äußeren Zellmembranen. Falls das Gewebe aufzutauen beginnt, ehe es genügend zerkleinert ist, wird es mit einer kleinen Menge flüssigen Stickstoffs übergossen. Es wird darauf geachtet, das Zerschlagen des Gewebes nicht länger als bis zu einer Korngröße von ca. 1 mm Kantenlänge fortzusetzen, um nicht die synaptischen Vesikel selbst anzugreifen. Diese Methode der Zellzertrümmerung ist der Homogenisation mit Scherkräften in Homogenisatoren oder mit sich drehenden Messern überlegen, bei denen zahlreiche artefizielle Vesikel gebildet werden. Man läßt das zerschlagene Gewebe langsam auftauen. Sobald es sich mit einem Flüssigkeitsfilm zu überziehen

beginnt, verdünnt man mit eineinhalb Gewichtsäquivalenten einer 0,4 M NaCl- bzw. 0,8 M Glycin-Lösung und vermischt diese mit dem Gewebe zu einem homogenen Brei. Die zugesetzte Lösung ist dem elektrischen Gewebe isoosmolar (Israël, Gautron & Lesbats, 1968), so daß die Vesikel keine osmotisch bedingten Veränderungen erleiden. Das erhaltene Homogenat wird durch eine vierfache Schicht von Baumwollgaze gepreßt. Der Extrakt entspricht in seinem Gewicht etwa der eingesetzten Gewebemenge. Der Extraktionsrückstand wird verworfen. Der Extrakt wird 30 min lang einer Differentialzentrifugation bei 13 300 g in einer Sorvall RC2-B-Zentrifuge unterworfen. Im Bodensatz, P_{12} , finden sich Zelltrümmer, Mitochondrien, Zellkerne und der überwiegende Teil der Zellmembranen. Er wird verworfen. Der Überstand, S_{12} , enthält die löslichen zytoplasmatischen Bestandteile, synaptische Vesikel, Mikrosomen und einen Teil der Zellmembranen. Aus diesem Überstand können die synaptischen Vesikel direkt durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden (vgl. Abb. 11). Für die Bestimmung der Metallkationen werden allerdings weitere Reinigungsschritte in den Präparationsprozeß eingeschoben, die der Übersicht halber im Kapitel 3.3.3. beschrieben sind. Zwei verschiedene Arten von Dichtegradienten werden verwendet: kontinuierliche Gradienten in Zonalrotoren und diskontinuierliche Gradienten in Ausschwingrotoren.

3.3.1. Kontinuierliche Dichtegradienten in Zonalrotoren

Die Auftrennungen werden in einem Beckman Ti-14 Zonalrotor in einer präparativen Ultrazentrifuge (Modell L2 65B beziehungs-

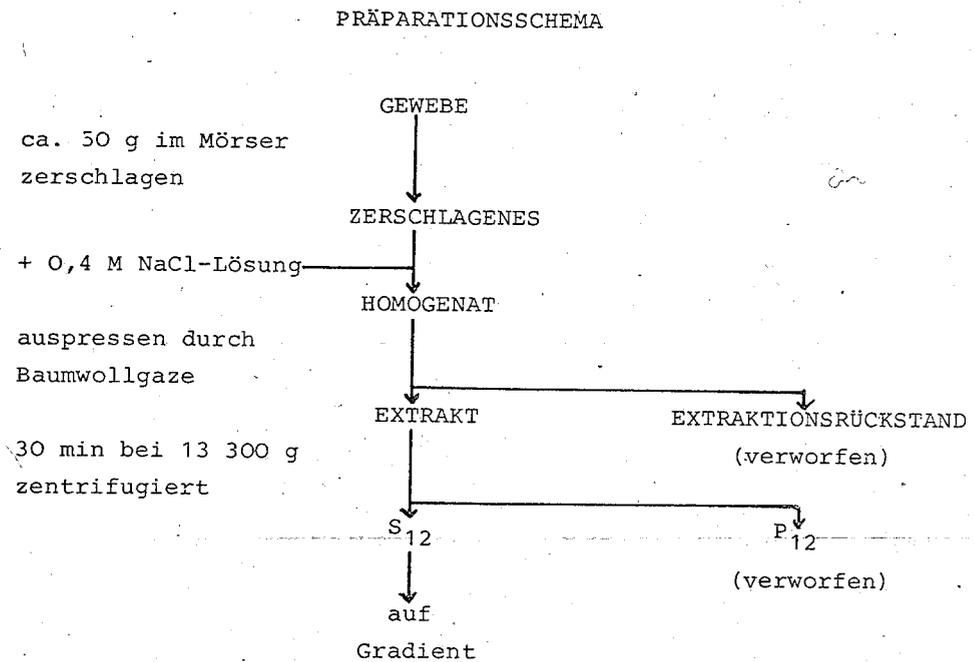


Abb. 11: Allgemeines Präparationsschema zur Isolierung cholinergischer synaptischer Vesikel. Vgl. Text.

weise L5.50) durchgeführt. 50 ml der Fraktion S₁₂ werden auf einen Dichtegradienten gegeben, dessen Lösungen von 0,2 M bis 1,45 M Saccharose variieren und jeweils soviel NaCl enthalten, daß die Osmolarität der Gradientenlösungen mindestens 800 mosmol beträgt. Der Gradient wird durch Mischen einer leichten und einer schweren Saccharoselösung mit einer Beckman Hochkapazitäts-Gradientenpumpe, Modell 141, hergestellt und bei geringer Rotorgeschwindigkeit (3 000 Umdrehungen/min) über ein Kanalsystem an die äußere Wandung des Rotors geleitet. Die Steuerkurve der Pumpe ist so geschnitten, daß die Saccharosekonzentration dem Abstand vom Zentrum des Rotors (nicht dem Volumen) proportional ist. Die Beziehung zwischen der Konzentration C und dem Volumen V gehorcht der Gleichung

$$(2) \quad C = C_1 + (C_s - C_1) \sqrt{(V/V_t)},$$

worin C_1 und C_s die Konzentrationen der leichten und schweren Saccharoselösungen und V_t das Gesamtvolumen des Rotors (650 ml) sind. Die leichte Saccharoselösung ist 0,2 M an Saccharose und 0,3 M an NaCl, die schwere Lösung 0,5 M an Saccharose und 0,15 M an NaCl. Nach 400 ml wird die 0,5 M Lösung gegen eine 1,45 M Saccharoselösung ausgetauscht, um einen S-förmigen Anstieg des Gradienten herbeizuführen. Sobald der Rotor gefüllt ist, wird die die synaptischen Vesikel enthaltende Suspension durch die zentrale Einfüllröhre injiziert und mit 50 ml 0,4 M NaCl-Lösung überschichtet. Die Zentrifugationszeit beträgt 3 h bei 115 000 g. Durch Unterschichten mit 1,45 M Saccharoselösung wird der Rotor über einen Fraktionssammler entleert. 65 Fraktionen von je 10 ml werden aufgefangen.

3.3.2. Diskontinuierliche Dichtegradienten in Ausschwingrotoren

Es werden Beckman SW 27 Rotoren in der Ultrazentrifuge L2 65B beziehungsweise L5.50 benutzt. Die Gradienten werden in Cellulosenitrat-Röhrchen (Beckman, Nr. 302237) von 38 ml Fassungsvermögen (Durchmesser 1") geschichtet, indem die mit NaCl bzw. Glycin auf mindestens 800 mosmol/l gebrachten Saccharoselösungen abnehmender Dichte vorsichtig gegen die Wandung des Röhrchens pipettiert werden. Zwei Arten von diskontinuierlichen Dichtegradienten, Typ I und Typ II, werden verwendet (Abb. 12). Die Gradienten des Typs II dienen der Untersuchung der Vesikelheterogenität.

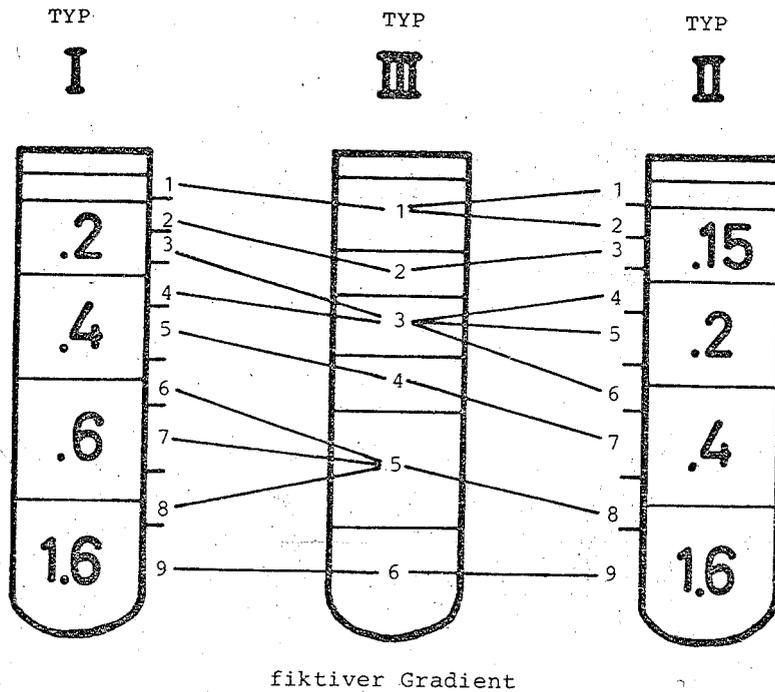


Abb. 12: Diskontinuierliche Dichtegradienten. Zwei Arten von diskontinuierlichen Dichtegradienten werden verwendet: Typ I und Typ II. Die Gradienten des Typs II dienen zur Untersuchung der Vesikelheterogenität. Die fiktiven Gradienten des Typs III werden zum Vergleich der Ergebnisse benutzt, die mit den Gradienten I und II gewonnen werden (vgl. Kap. 3.12., S. 67).

Der Gradient wird knapp eine Stunde vor dem Beladen mit der vesikelhaltigen Suspension (4 ml) angesetzt, damit sich lokale Inhomogenitäten ausgleichen können. Steht er zu lange, so verwischen natürlich die Grenzflächen. Es wird 135 min bei 57 750 g zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen werden dem Rotor entnommen und in einem abgedunkelten Raum bei seitlich einfallendem Licht betrachtet. Die synaptischen Vesikel selbst sind ihres geringen Durchmessers wegen natürlich nicht sichtbar. Die durch Lichtstreuung an größeren Teilchen hervorgerufenen Banden ermöglichen jedoch eine Beurteilung der Auf-

trennung. Die Stellen, an denen der Gradient zerschnitten werden soll, werden mit einem Filzschreiber markiert. Es werden in der Regel 9 Fraktionen à ca. 4 ml abgetrennt. Die Röhrchen werden in eine von Schuster konstruierte Schneidevorrichtung eingespannt (vgl. Randolph & Ryan, 1950; Hebb & Whittaker, 1958) und an der obersten markierten Stelle geschnitten. Die über der Schneide stehende Flüssigkeit wird mit einer Pasteurpipette abpipettiert und in das bereitstehende Reagenzglas gegeben. Die Pipette wird gewechselt, und die folgende Fraktion analog gewonnen. Nach dem Abmessen der Fraktionsvolumina werden kleine Probemengen zur ACh- und ATP-Bestimmung entnommen. Der Rest der Fraktionen wird bis zum Gebrauch im Tiefkühlfach bei -30°C aufbewahrt.

3.3.3. Varianten der Vesikelpräparation

Im Kapitel 3.3., S. 28, wurde bereits ein allgemeines Schema zur Isolierung der cholinergen synaptischen Vesikel besprochen (vgl. auch Abb. 11, S. 30). In dem erhaltenen Überstand, S_{12} , sind außer den synaptischen Vesikeln die Bestandteile des Zytoplasmas sowie einige schwerere Partikel enthalten, insbesondere Bruchstücke der äußeren präsynaptischen, der postsynaptischen und der dorsalen Elektroplaquezellmembranen. Erste Orientierungsversuche zeigten, daß es nicht möglich ist, den Ionengehalt der Vesikelfraktion zu bestimmen, wenn der zytoplasmareiche S_{12} -Überstand auf den Dichtegradienten geladen wird, da der dominierende zytoplasmatische Ionenpeak die

150 000 g unterworfen. Der erhaltene Bodensatz, P_3 , enthält nun die synaptischen Vesikel und größeren Membranteilchen, während die löslichen Bestandteile im Überstand, S_3 , zurückbleiben (vgl. Abb. 13).

Präparationsschema

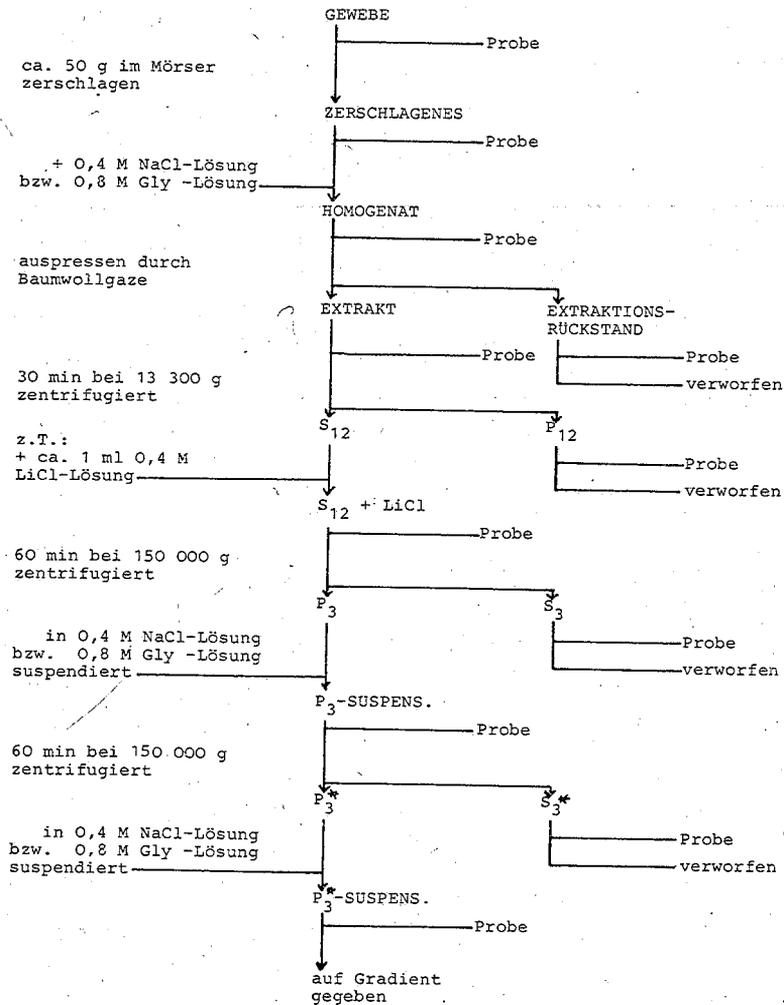


Abb. 13: Präparationsschema für die Abtrennung der cholinergen synaptischen Vesikel mit zwischengeschalteten Reinigungsschritten, vgl. Text. Von jeder Präparationsvorstufe wird eine Probe zur Analyse abgezweigt, um eventuelle artefizielle Veränderungen des Materials während der Präparation zu erkennen und um Hinweise über die allgemeine Verteilung der verschiedenen Substanzen zu erhalten.

Der Bodensatz wird suspendiert, um die aneinander haftenden Partikel zu trennen: Er wird mit wenigen ml 0.4 M NaCl- (bzw. 0.8 M Gly-)Lösung übergossen, durch eine Pipette angesaugt und wieder ausgeblasen. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis eine homogen erscheinende Suspension erhalten wird, In einigen Experimenten wird die P_3 -Suspension direkt auf den Dichtegradienten geladen. In der Mehrzahl der Experimente wird sie jedoch zunächst ein weiteres Mal 60 min lang bei 150 000 g differentialzentrifugiert. Die überständige Waschlösung, S_3^+ , wird verworfen. Der gereinigte Bodensatz, P_3^+ , wird in der gleichen Weise suspendiert, wie es oben beschrieben wurde, und auf den Gradienten geladen.

In einem Teil der Experimente wird NaCl-Lösung als Homogenisations- und Suspensionsmedium benutzt. Hierbei handelt es sich um die in der Nervenchemie übliche Methode. Um jedoch auch den Gehalt an Natriumionen untersuchen zu können, wird in den meisten Experimenten stattdessen eine isoosmolare Glycin-Lösung verwendet. Außerdem soll durch den Wechsel des Mediums untersucht werden, ob es die Ionenzusammensetzung oder die Verteilung der subzellulären Fraktionen beeinflusst.

In zwei Experimenten wird dem S_{12} eine geringe Menge 0,4 M LiCl-Lösung zugesetzt, ca. 1 ml, entsprechend 1/10 der Na^+ -Konzentration in dieser Lösung. An Hand der Verteilung dieses nicht natürlich anzutreffenden Ions soll durch Vergleichen überprüft werden, ob die übrigen Ionen in der Lösung ebenfalls frei vorliegen, oder ob spezifische Bindungsverhältnisse bestehen.

3.4. Der Aufschluß der Präparationsvorstufen

Die chemische Analyse sehr kleiner Konzentrationen, die sogenannte extreme Spurenanalyse, führt zwangsläufig zu großen Streuungen der Meßwerte, die durch mehrere Faktoren bedingt sein können:

1. Ungünstiges Signal: Rausch-Verhältnis,
2. Einschleppen von Spuren an Metallionen durch zugesetzte Chemikalien,
3. Herauslösen von Metallionen aus den Gefäßen,
4. Adsorption von Ionen an aktiven Oberflächen der Gefäße,
5. Staubaufnahme aus der Atmosphäre,
6. Veränderungen der chemischen Zusammensetzung subzellulärer Organellen, nachdem sie aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt worden sind,
7. Biologische Unterschiede des Probematerials, z.B. infolge einer unterschiedlichen ionalen Zusammensetzung des Seewassers.

Die Störungen 2 - 6 werden besonders dann entscheidend, wenn eine Präparation, wie im vorliegenden Fall, zahlreiche Stadien durchläuft. Um die erwähnten Veränderungen zu erfassen, wird von jeder Präparationsstufe eine kleine Probe abgezweigt. Zur Analyse müssen diese Proben in eine lösliche Form übergeführt werden. Zunächst wurde versucht, den in der Literatur vielfach beschriebenen Weg der Trockenveraschung zu beschreiten (z.B.: Hanig & Aprison, 1965): Die Proben wurden in Quarztiegelchen gegeben und 18 h bei 95°C, dann 24 h bei 550°C zu den Metall-oxiden verascht. Die Rückstände sollten mit einigen ml konz.

HNO₃ gelöst werden. Es zeigte sich jedoch, daß sich bereits bei diesen Temperaturen ein erheblicher Teil der Metalloxide mit dem Quarz zu milchigen, unlöslichen Gläsern verband, und somit der Analyse entging (Platin-Tiegel standen nicht zur Verfügung). Deshalb wird ein nasses Aufschlußverfahren mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefäß durchgeführt, das 1972 von Kotz et al. beschrieben wurde. Die Aufschlußapparatur besteht aus zehn Teflongefäßen von je 10 ml Fassungsvermögen, die in Stahlzylinder eingesetzt werden. Die Gefäße werden mit Teflondeckeln verschlossen, die durch Federn fest

aus:

L. KOTZ, G. KAISER, P. TSCHÖPEL und G. TÖLE

Z. Anal. Chem., Band 260, Heft 3 (1972)

Aufschlußapparatur. 1 Teflongefäß; 2 Teflondeckel; 3 Edelstahlzylinder; 3a Schraubendeckel dazu; 4 Druckfeder; 5 Heizblock; 6 Thermofühler; 7 Heizpatronen je 200 W; 8 Teflonanschlüsse für Wasserkühlung; 9 Querschnitt von 3 mit Anordnung der Nuten

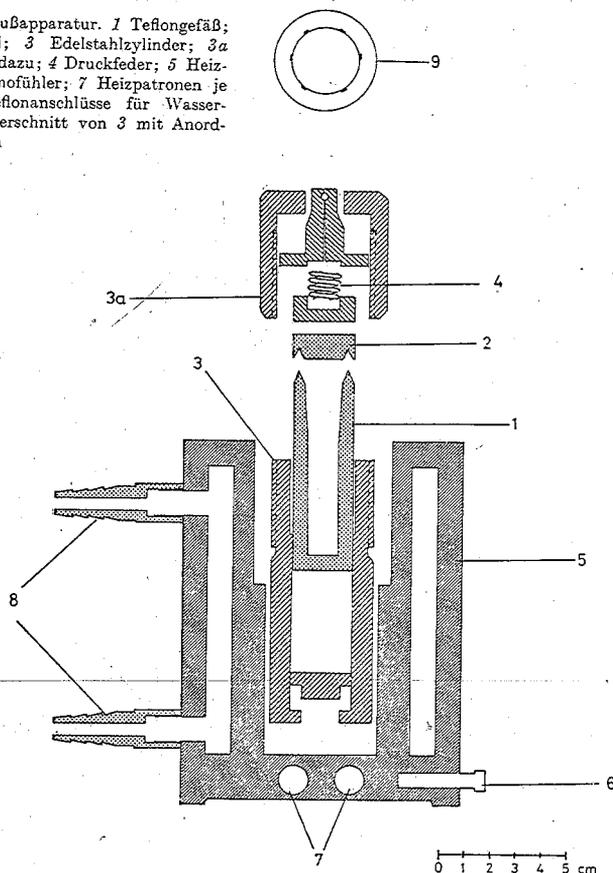


Abb. 14: Teflonaufschlußapparatur

aufgepreßt werden. Bei zu hohem Innendruck können die Gase durch Nuten im Stahlmantel nach außen abgeblasen werden. Die Stahlzylinder werden in einem elektrisch heizbaren Aluminiumblock thermostatisiert (vgl. Abb. 14; in der Abbildung ist nur ein einzelner Stahlzylinder mit Teflongefäß wiedergegeben). Nach dem Aufschluß wird der doppelwandige Heizblock mit Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt. Zum Aufschluß wird eine Probenmenge von je 500 mg verwendet, die mit 0,5 ml hochreiner 65%iger HNO_3 105 min lang bei einer Blocktemperatur von 185°C zersetzt wird (höhere Temperaturen würden zu Verformungen der Teflongefäße führen). Es werden hellblaue, klare Aufschlußlösungen erhalten. Wegen der geringen Benetzbarkeit des Teflons braucht nur zweimal mit je 0,5 ml H_2O gespült zu werden.

3.5. Morphologische Methoden

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Fraktionen wird nach der von Zimmermann und Whittaker (1974) beschriebenen Methode durchgeführt. Die subzellulären Fraktionen werden in 1%igem Glutaraldehyd fixiert, osmiert und in Epon eingebettet. Die Dünnschnitte (LKB-Ultratome III) werden mit Bleizitrat und Uranylazetat imprägniert und in einem JEM 100B Elektronenmikroskop (JEOL) ausgewertet.

3.6. Azetylcholinbestimmung mit dem Blutegelmuskel

Azetylcholin wird mit einem biologischen Test gemessen, der auf der Kontraktion präparierter Rückenmuskeln von Blutegeln bei künstlicher Zufuhr des Transmitters beruht (Szerb, 1961).

Die wiederholt verbesserte Methode wird in einem Mikrobäd (Gaddum & Stephenson, 1958) durchgeführt und ist ausführlich von Whittaker und Barker (1972) beschrieben worden. Die Abhängigkeit der Muskelkontraktion von der Azetylcholinosis ist sigmoid und kann in dem mittleren Meßbereich näherungsweise als linear angenommen werden.

3.6.1. Extraktion

Das Azetylcholin wird aus seinen Kompartimenten mit einer Extraktionsmethode in Freiheit gesetzt, die gleichzeitig die anwesende Azetylcholinesterase zerstört (Hebb & Whittaker, 1958): Die Suspension der subzellulären Partikel wird mit eiskalter, verdünnter HCl exakt auf den pH 4,0 eingestellt. Die saure Suspension wird 10 min in einem siedenden Wasserbad gekocht und anschließend mit Eiswasser abgekühlt. Wird die Messung nicht am selben Tag vorgenommen, so werden die Proben tiefgefroren.

3.6.2. Präparation des Blutegelmuskels

Der ventrale Hautmuskelschlauch eines Blutegels wird aufgeschnitten, und die Eingeweide werden unter dem Binokular entfernt. Der etwa 0,5 mm breite, mediodorsale Längsmuskelstreifen wird mit einem Doppelskalpell durch einen Sagitalschnitt von seitlich gelegenem Muskelgewebe abgetrennt und mit zwei dünnen Polyesterfäden so verknotet, daß das Muskelstück ca. 8 mm lang ist. Im Inkubationszylinder des Mikrobades wird der Muskel unten über einen der Fäden befestigt, der andere wird an den

Hebel der Registriervorrichtung gebunden. Der entspannte Muskel wird in der Apparatur 20 min lang mit Lösung B überströmt (100 Tropfen/min).

3.6.3. Messung

Das Azetylcholin wird bestimmt, indem die durch die Problelösungen hervorgerufenen Kontraktionen mit denen geeigneter Standards verglichen werden. Proben und Standards müssen soweit mit Lösung C verdünnt worden sein, daß sie in den quasilinearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve fallen.

Die den Muskel überströmende Lösung B wird gegen C gewechselt. Durch das enthaltene Eserinsulfat wird die Azetylcholinesterase gehemmt, so daß die Muskelkontraktion intensiviert wird. Nachdem 1 h mit C gespült worden ist, wird mit der Messung begonnen. Der Flüssigkeitsstrom wird unterbrochen, und der Schreiber angeschaltet. Sobald das Medium abgesaugt ist, wird die Probe- oder Standardlösung in 0,2 ml der eserinierten Locke-Lösung (C) appliziert. Die Wirkung wird 90 sec registriert. Dann wird wieder mit C gespült, bis nach 2,5 min die nächste Dosis aufgegeben wird. (Der Muskel muß sich in dieser Zeit auf seine ursprüngliche Länge entspannt haben; der Schreiber also auf seine Nulllinie zurückgekehrt sein.) Jede Messung eines Extraktes wird von zwei Standardmessungen flankiert, da sich die Empfindlichkeit des Muskels schnell ändern kann.

3.6.4. Lösungen

- A: 90 g NaCl, 4,2 g KCl und 2,4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pro Liter Wasser.
Diese Vorratslösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.
- B: 100 ml A, 2 g Glucose und 0,2 g NaHCO_3 auf 1 l mit Wasser verdünnt (Lockesche Lösung).
- C: Zu 0,4 l H_2O werden 0,5 l B und 9 mg Eserinsulfat (= Phystigminsulfat) gegeben (eserinisierte Locke-Lösung).
- D: Azetylcholinchloridstandard: Je 0,908 mg Azetylcholinchlorid werden pro ml 0,1 M NaH_2PO_4 gelöst. 0,1 ml davon werden mit H_2O auf 50 ml verdünnt. 0,5 ml von dieser Lösung werden mit C auf 50 ml verdünnt. Bei Bedarf wird weiter in C verdünnt.
- E: HCl 0,1 M
- F: NaOH 0,1 M

3.7. ATP-Bestimmung

Adenosintri-phosphat wird mit der Luziferin-Luziferase-Methode (Stanley & Williams, 1969), modifiziert gemäß Dowdall, Boyne und Whittaker (1974), bestimmt. Die Methode beruht auf dem ATP-abhängigen oxidativen Abbau des Luziferins, der über zur Lichtemission angeregte Zwischenprodukte verläuft (McElroy, 1969). 50 μl einer Suspension von 50 mg getrockneter Leuchtorgane der Leuchtkäfer (Familie der Lampyridae) in 5 ml eines Magnesiumsulfat (20 mM) - Kaliumarsenat (5mM) - Puffers (p_H 7,4), Sigma, werden in ein Szintillationsgläschen gegeben, das 3 ml einer Pufferlösung (14,7 mM MgSO_4 , 33 mM Na_2HAsO_4 , 3,3 mM KH_2PO_4) vom p_H 7,4 und 50 μl der Probelösung enthält, welche mit 1/10 Volumen 0,25 M HClO_4 behandelt worden ist, um

gebundenes ATP in Freiheit zu setzen. Nach 40 sec wird das emittierte Licht 30 sec lang im Tritium-C¹⁴-Kanal eines Beckman LS 150 Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen, und die Werte mit Standardmessungen bekannter ATP-Konzentrationen verglichen.

3.8. Proteinbestimmung

Die phenolischen Hydroxylgruppen der Aminosäurereste werden mit der Folin-Ciocalteu-Farbreaktion nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

0,5 ml der Probelösung werden mit 1 ml der Lösung E vermischt. Nach 17,5 min wird 0,1 ml der Lösung D zugesetzt und sofort gemischt. Nach 50 min wird die Extinktion bei 750 nm in einem Unicam SP 500 Spektralphotometer gemessen (Wolframlampe). Als Standard dient Albumin aus Rinderserum.

Lösungen

A: 2%ige Lösung von Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH

B: 0,5%ige Lösung von CuSO₄·5H₂O in Wasser

C: 1%ige Lösung von Natriumkaliumtartrat in Wasser

D: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, mit Wasser auf das 2,5fache Volumen verdünnt

E: 50 ml A, 1 ml B und 1 ml C; stets frisch angesetzt.

3.9. Esterasebestimmung

Azetylcholinesterase setzt aus Azetylthiocholin Thiocholin in

Freiheit, das 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB) zum Thiol reduziert (Ellman et al., 1961). Einige andere Esterasen besonders die Butyrylcholinesterase, stören. Die wie unten bestimmte Esterase wird daher im folgenden Gesamtesterase genannt.

Die auf 3 ml verdünnte Probe wird mit 0,1 ml der Lösung B und 20 µl der Lösung C versetzt. Die Extinktion des gebildeten Thiols wird im Absorptionsmaximum bei 412 nm gemessen. Die Meßwerte werden als Relativgrößen in Einheiten/min.ml angegeben.

Lösungen

A: 0,1 M Kalium-Natrium-Phosphat-Puffer, p_H 7,2 (65,8 ml einer 0,5 M KH_2PO_4 -Lösung und 111 ml einer 0,5 M Na_2HPO_4 -Lösung mit Wasser auf 1 l verdünnt).

B: 39,6 mg DTNB und 15 mg $NaHCO_3$ in 10 ml A gelöst. Bei 4°C ca. 2 Wochen haltbar.

C: 0,075 M Lösung von Azetylthiocholinjodid in Wasser. Bei 4°C ca. 10 - 15 Tage haltbar.

3.10. Die Bestimmung von Metallkationen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie

3.10.1. Arbeitsweise

Atome können nur in bestimmten Energiezuständen vorliegen, die für jedes Element verschieden sind und prinzipiell durch die Regeln der Quantenmechanik definiert werden. Um in ein höheres Niveau potentieller Energie überzugehen, muß ein Atom also ein diskretes, für dieses Element und diesen Übergang charakteristisches Energiequantum

$$(3) \quad E_{(\text{Übergang})} = h \cdot \nu_{(\text{Übergang})}$$

aufnehmen. Bietet man einer Ansammlung von Atomen in einer "Küvette" Strahlungsenergie der entsprechenden Frequenz $\nu_{(\text{Übergang})}$ an, so wird ein Teil der Strahlungsintensität zur Anregung der Atome benutzt, und die Extinktion ist, dem Lambert Beerschen Gesetz entsprechend, der Konzentration der Atome in der Küvette proportional. Dies ist das Prinzip der Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS).

Als Strahlungsquelle dient i.a. eine Hohlkathodenlampe, ein mit Edelgas unter wenigen Torr Druck gefüllter, mit einer Quarzplatte verschlossener Quarz- oder Glaszylinder, in den eine Anode (meist aus Wolfram) und eine Kathode aus dem zu bestimmenden Element eingelassen sind (Abb. 15).

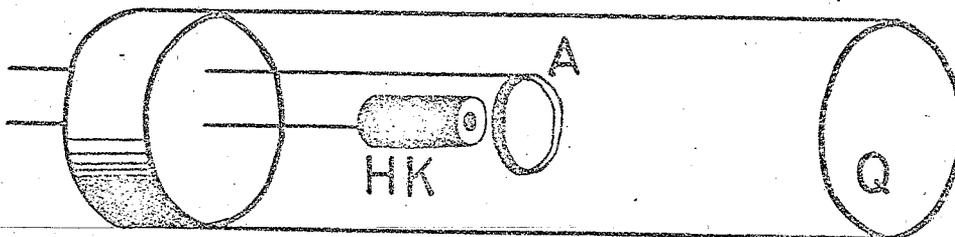


Abb. 15: Hohlkathodenlampe, mit Hohlkathode, HK, und Anode, A. Der Zylinder ist mit einer Quarzplatte, Q, verschlossen.

Legt man an die Elektroden eine Hochspannung von ca. 300 V an (Abb. 16), so kommt es zu einer Entladung; das Edelgas wird ionisiert, die Ionen werden beschleunigt und treffen auf die Kathode. Dort schlagen sie Metallatome aus der Elektrode heraus, die ihrerseits durch Zusammenstöße mit Edelgasatomen und -ionen angeregt werden. Diese Metallatome fallen nach 10^{-8} sec in niedrigere Energieniveaus zurück und emittieren dabei das charakteristische Linienspektrum dieses Elements. Das Spektrum wird jedoch von dem Linienspektrum des Edelgases überlagert. Die hochreinen Kathodenmetalle werden in der Regel

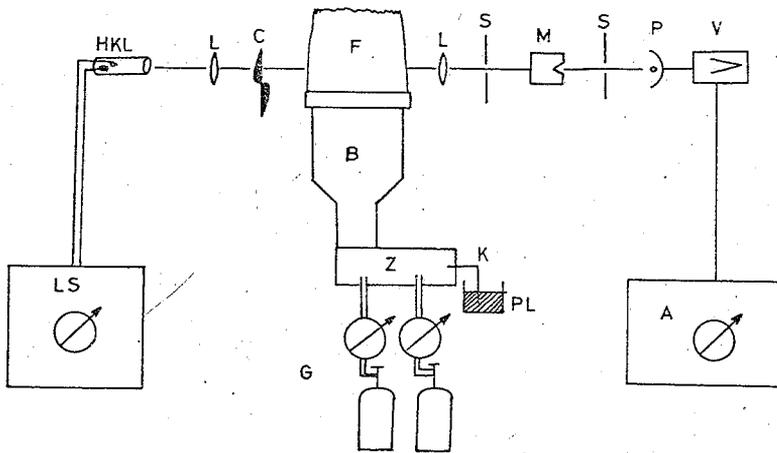


Abb. 16: Schema eines Atomabsorptionsspektralphotometers.

Abkürzungen: A: Anzeigevorrichtung, B: Brenner, C: Chopper (Zerhacker), F: Flamme, G: Gasversorgung, HKL: Hohlkathodenlampe, K: Ansaugkapillare, L: Linse, LS: Stromversorgungsteil für die Hohlkathodenlampen, M: Gittermonochromator, P: Photodetektor, PL: Probelösung, S: Spalt, V: Verstärker, Z: Zerstäuberchamber.

elektrolytisch gewonnen und enthalten daher Wasserstoff, dessen Spektrum sich dann ebenfalls überlagert. Das emittierte Licht wird mit einer Linse, L, gebündelt und durchstrahlt "die Küvette". Bei einigen leicht verdampfenden Metallen, z.B. Quecksilber, kann man tatsächlich mit einer Glaskammer arbeiten, in der die Atome eingeschlossen sind. Am häufigsten dient jedoch ein kleiner Ausschnitt einer Flamme, F, als Küvette. Die Probelösung, PL, wird durch die ausströmenden Flammengase über eine Kapillare, K, angesaugt und in einer Zerstäuberkammer, Z, zu einem feinen Nebel verteilt. Dieser wird dann in der Flamme getrocknet, und die meisten der vorhandenen Verbindungen werden in Atome gespalten. Es ist für die Messung entscheidend, die verschiedenen Parameter (Flammentemperatur, Strömungsgeschwindigkeit der Gase, Zusammensetzung der Probematrix etc.) so zu wählen, daß alle Verbindungen des zu analysierenden Elementes gespalten werden, da die Verbindungen natürlich ein anderes Absorptionsspektrum besitzen als die Atome des betreffenden Elementes. Auch dürfen die Verbindungen nicht zu Ionen dissoziieren, da diese zu hohe Anregungsenergien besitzen. Die freien Atome im Innern der Flamme werden durch das Licht der Hohlkathodenlampe angeregt und schwächen hierdurch die Intensität des Strahlenbündels. Nach 10^{-9} - 10^{-8} sec fallen sie in ihren Grundzustand zurück und emittieren das zuvor aufgenommene Licht dabei nach allen Seiten. Das geschwächte Strahlenbündel passiert eine zweite Linse, L, und einen Spalt, S, wird an einem Gittermonochromator, M, gebeugt und trifft auf einen im Strahlengang angebrachten Photodetektor, P. Die Intensität des geschwächten Lichtstrahles, I,

wird mit der Intensität eines Referenzstrahles, I_0 , verglichen und in Einheiten der Extinktion, E , umgerechnet:

$$(4) \quad \log_{10} \frac{I_0}{I} = E = a \cdot b \cdot c$$

mit a , dem molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten, b , der durchstrahlten Länge der Flamme, und c , der molaren Konzentration der Probe in der Flamme.

Wäre der molare dekadische Extinktionskoeffizient für das betreffende Element bekannt, so könnte aus der Konzentration in der Flamme die Konzentration der Probelösung berechnet werden. Es ist jedoch schwer, diesen Umrechnungsfaktor konstant zu halten, besonders, weil die Strömungsgeschwindigkeit der Flammengase nur mäßig reproduzierbar ist und durch Aufwärmeeffekte des Brenners beeinflusst wird. Auch hängt die Effektivität der Atomisierung stark von der exakten Einstellung aller anderen Geräteparameter ab. In der Praxis vergleicht man daher die durch eine Probelösung hervorgerufene Extinktion mit den Extinktionen einer geeigneten Standardreihe.

3.10.2. Störungen bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie und ihre Beseitigung

3.10.2.1. Durch die Meßmethodik bedingte Störungen

Eine Reihe möglicher Störungen sind prinzipiell mit der Methodik der Atomabsorptionsspektralphotometrie verknüpft:

Die zur Atomisierung verwendete Flamme emittiert Licht, das

auf den Photodetektor fällt und gemeinsam mit dem Licht der Hohlkathodenlampe gemessen wird. Die Eigenemission der Flamme kann elektrisch unterdrückt werden, indem man das Strahlenbündel der Hohlkathodenlampe mit Hilfe eines Choppers, C (vgl. Abb. 16, S. 45), zerhackt, der synchron mit einem Wechselstromverstärker, V, arbeitet. Aber die Flamme emittiert nicht nur, sie absorbiert auch Licht. Diese Störung kann ausgeschaltet werden, indem die Extinktion der Flamme allein vermessen wird, während durch die Kapillare das benutzte Lösungsmittel angesaugt wird. Die gemessene Extinktion wird elektrisch als Nullwert definiert. Fluktuationen der Lampenintensität werden korrigiert, indem man in den Strahlengang einen Strahlenteiler einbaut (Abb. 17). Einer der beiden Strahlen wird durch die Flamme geleitet, der Referenzstrahl wird an ihr vorbeigeführt. Anschließend werden beide Strahlen wieder vereinigt und entsprechend der Choppermodulation abwechselnd vom Photodetektor registriert. Auf diese Weise kann zwischen Intensitätsschwankungen unterschieden werden, welche durch die Lampenintensität, beziehungsweise durch die angesaugte Probelösung hervorgerufen werden.

Die Strahlenteilung liefert zugleich die Basis für die elektrische Division der Intensität des Referenzstrahles durch die Intensität des Probenstrahls. Der Logarithmus dieses Quotienten ist nach dem Lambert Beerschen Gesetz der Konzentration der absorbierenden Molekeln in der Flamme proportional. Eine Fehlerquelle, welche besondere Berücksichtigung verdient, ist die Lampenstromstärke: Die Halbwertsbreite der von der

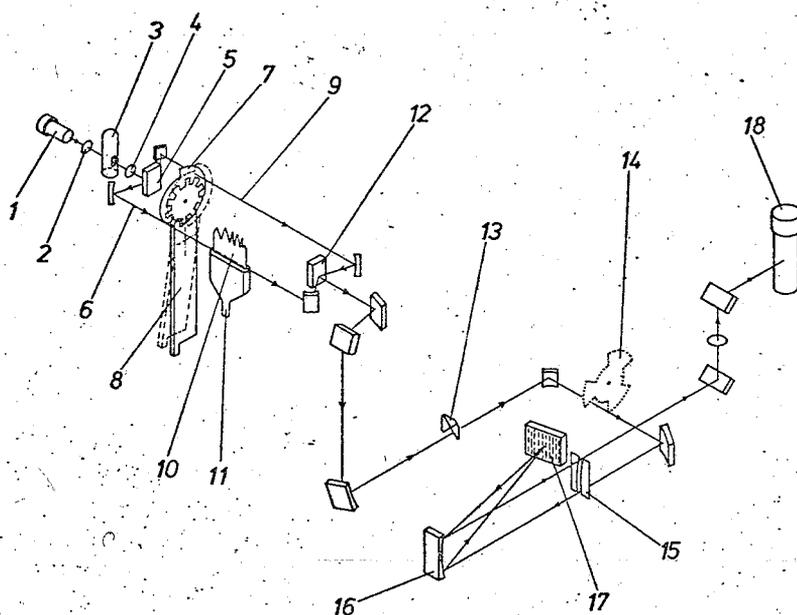


Abb. 17: Strahlengang in dem verwendeten Atomabsorptions-spektralphotometer (Beckman 1248). 1: Hohlkathodenlampe, 2: Quarzkondensator, 3: Deuteriumlampe, 4: Quarzlinse, 5: Strahlenteiler, 6: Probenstrahl, 7: Chopperrad, 8: Schwenkarm, 9: Referenzstrahl, 10: Flamme, 11: Brennerkopf, 12: Strahlenvereiniger, 13: Ordnungsfilter, 14: Chopperanordnung, 15: Eintritts/Austrittsspalt, 16: Kollimatorspiegel, 17: Beugungsgitter, 18: Photomultiplier. Aus der Bedienungsanleitung des Gerätes.

Lichtquelle ausgesendeten Emissionslinie sollte wesentlich kleiner sein als die Halbwertsbreite der Absorptionslinie, deren natürliche Halbwertsbreite ca. 10^{-4} \AA beträgt. Tatsächlich wird die Halbwertsbreite der Absorptionslinie jedoch durch unterschiedliche Geschwindigkeiten der Atome (Doppler-Effekt), durch Zusammenstöße mit Atomen anderer Elemente (Lorentz-Effekt) oder desselben Elementes (Holtsmark-Effekt), sowie durch magnetische Felder (Stark-Effekt) vergrößert. Eine Er-

höhung der Lampenstromstärke führt zur Verbreiterung der Emissionslinie und dadurch zu abnehmender Empfindlichkeit der Messung. Bei sehr hohen Stromstärken bildet sich zwischen Kathode und Anode eine Atomwolke aus, die das gerade emittierte Licht sofort absorbiert (sogenannte Selbstumkehr). Die Emissionslinie hat dann die in Abb. 18b wiedergegebene Form: das Zentrum der Absorptionslinie fällt in das durch Selbstumkehr induzierte Tal der Emissionslinie, und die gemessenen Extinktionen sind zu niedrig.

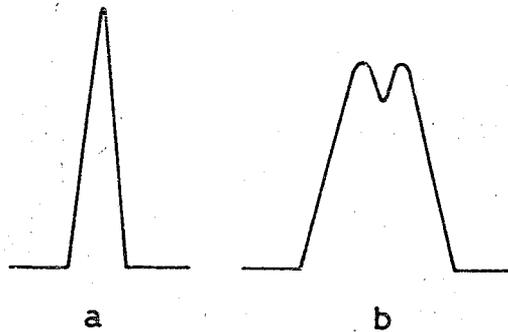


Abb. 18: Linienverbreiterung und Selbstumkehr bei der Emissionslinie. a: normale Lampenstromstärke, b: zu hohe Lampenstromstärke.

Die relative Nachweisempfindlichkeit ergibt sich aus dem Signal: Rausch - Verhältnis. Sie wird als diejenige Konzentration definiert, die ein Signal hervorruft, das doppelt so hoch wie

der Rauschpegel ist. Das Signal: Rausch - Verhältnis kann wesentlich verbessert werden, indem das Signal über eine längere Zeit integrierend vermessen wird. Jedoch kann diese Verbesserung in der Neurochemie infolge zu kleiner Probemengen nur unbefriedigend ausgenutzt werden.

3.10.2.2. Durch die Probenzusammensetzung bedingte Störungen

Eine gute analytische Methode sollte empfindlich, reproduzierbar und selektiv sein. Für die Atomabsorptionsspektrophotometrie ist vor allem die Frage entscheidend, ob die gemessene Extinktion spezifisch durch das zu bestimmende Element hervorgerufen wird. Eine Überlappung zwischen Absorptionslinien verschiedener Atome kann bei richtiger Einstellung der Resonanzwellenlänge wegen deren geringer Halbwertsbreite ausgeschlossen werden. Komplikationen treten jedoch auf, wenn mit der spezifischen Absorption sogenannte unspezifische Lichtabsorptionen durch Moleküle oder Radikale konkurrieren, oder wenn die Extinktion durch Lichtstreuung hervorgerufen wird.

Bei der Absorption durch Moleküle und Radikale muß zwischen Elektronenbanden und Dissoziationskontinua unterschieden werden. Die den Elektronenübergängen in Molekülen und Radikalen entsprechenden Banden besitzen eine Rotationsschwingungsfeinstruktur mit Halbwertsbreiten von weniger als einem nm (Massmann, 1973). Im Gegensatz dazu erstrecken sich die Dissoziationskontinua über größere Wellenlängenbereiche (von mehr als 10 nm) (L'vov, 1970; Massmann, 1973).

Die Lichtstreuung an festen und flüssigen Teilchen gehorcht der Gleichung

$$(5) \quad \tau = \log \frac{I_0}{I} = \frac{24 \pi^3}{\ln 10} \cdot \frac{N v^2 l}{\lambda^4} \cdot \left(\frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2n^2} \right)^2 .$$

Dabei ist τ der in Einheiten der Extinktion gemessene Lichtverlust,

I_0 die Intensität des einfallenden Lichtes,

I die Intensität des durchgelassenen Lichtes,

N die Teilchenzahl pro Volumeneinheit,

v das Teilchenvolumen,

l die Schichtdicke,

λ die Wellenlänge des Lichtes,

n_1 der Brechungsindex der Teilchen,

n der Brechungsindex der Teilchenumgebung.

Aus Gleichung 5 folgt

$$(6) \quad \left| \frac{\Delta \tau}{\tau} \right| = 4 \left| \frac{\Delta \lambda}{\lambda} \right| .$$

Für kleine Änderungen $\Delta \lambda$ kann also die relative Änderung der Extinktion $\frac{\Delta \tau}{\tau}$ im Wellenlängenbereich der Atomabsorptionsspektrophotometrie (ca. 200 bis 800 nm) vernachlässigt werden.

Die geringe Wellenlängenabhängigkeit der Lichtstreuung und der Dissoziationskontinua eröffnet eine Möglichkeit, diese unspezifischen Lichtverluste zu kompensieren: Man bringt zu diesem Zweck eine zweite, jedoch kontinuierliche, Strahlungsquelle im Strahlengang an, meist eine Deuteriumlampe, die mit gepulstem Gleichstrom betrieben wird (Abb. 19).

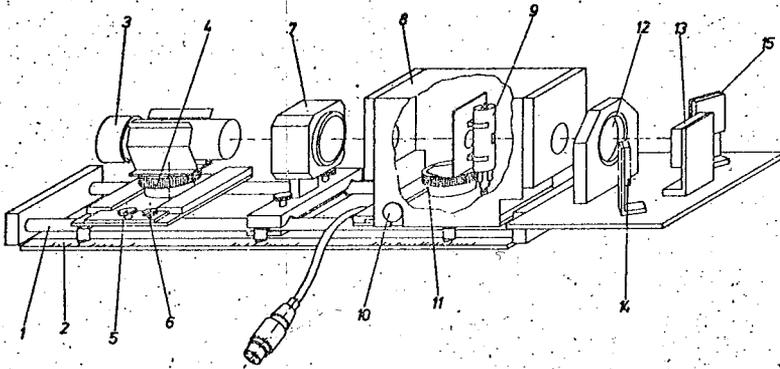


Abb. 19: Anordnung der Hohlkathodenlampe und Deuteriumlampe.
1: Optische Bank, 2: Wellenlängenlineal, 3: Hohlkathodenlampe,
4-6: zur Einstellung der Hohlkathodenlampe, 7: Quarzlinse,
8: Gehäuse für die Deuteriumlampe, 9: Deuteriumlampe, 10-11: zur
Einstellung der Deuteriumlampe, 12: Quarzlinse, 13-15: Strahlen-
teiler mit Umlenkspiegeln. Aus der Bedienungsanleitung des
Gerätes.

Das Licht dieser Strahlungsquelle wird im Bereich der Resonanzwellenlänge im selben Ausmaß geschwächt wie das Licht der Hohlkathodenlampe bei der Resonanzwellenlänge. Wegen der geringen Wellenlängenabhängigkeit der genannten Störeffekte wird das Licht der Deuteriumlampe jedoch auch in den der Resonanzwellenlänge benachbarten Bereichen im gleichen Ausmaß geschwächt. Werden Hohlkathodenlampe und Deuteriumlampe mit gepulstem Gleichstrom unterschiedlicher Frequenz betrieben, so können die spezifische Absorption bei der Resonanzwellenlänge einerseits, und der unspezifische Lichtverlust bei einer

benachbarten Wellenlänge andererseits, von demselben Photodetektor registriert und mit verschiedenen Wechselstromverstärkern getrennt verstärkt werden. Der unspezifische Lichtverlust kann nun elektrisch von der bei der Resonanzwellenlänge registrierten Summe aus spezifischen und unspezifischen Lichtverlusten subtrahiert werden. Aus der Formel 6, Seite 52, wird deutlich, daß diese Korrektur insbesondere für Messungen bei kleinen Wellenlängen erforderlich ist, zumal wenn mit der Anwesenheit größerer Partikel (Membranbruchstücke) zu rechnen ist.

Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich durch chemische Reaktionen der Atome in der Flamme. Über chemische Prozesse im Innern von Flammen ist nicht viel bekannt. Zwei Phänomene sind jedoch offensichtlich: Atome können sich durch Ionisation und durch Verbindungsbildung der Bestimmung entziehen (Abb. 20). Beide Prozesse können kontrolliert werden, indem die Atomkonzentration durch Zugabe geeigneter am chemischen Gleichgewicht beteiligter Reaktionspartner erhöht wird. Um die Ionisation einzudämmen muß also ein Überschuß an Elektronen angeboten werden. Dies kann dadurch erreicht werden, daß der Probelösung eine besonders leicht ionisierbare Verbindung zugesetzt wird. Lithiumsalze haben sich besonders bewährt.

Die Verbindungsbildung in der Flamme erstreckt sich natürlich vor allem auf thermisch stabile Verbindungen, besonders Oxide, Sulfide, Phosphate und Spinelle der Erdalkalimetalle. Die Lage des chemischen Gleichgewichts kann also zu Gunsten einer hohen Konzentration an freien Atomen ausgenutzt werden, indem die

zu berücksichtigen. Da verhältnismäßig große Mengen dieser Stoffe zugesetzt werden müssen, dürfen nur Chemikalien höchster Reinheitsgrade verwendet werden. Obwohl solche Chemikalien von zahlreichen Firmen angeboten werden, werden die gegebenen Reinheitsgarantien fast nie eingehalten (vgl. Kap. 3.11., S. 63).

In der vorliegenden Arbeit werden hauptsächlich Lösungen vermessen, die von Dichtegradienten gewonnen werden und einen Saccharosegehalt von bis zu 1,6 mol/l besitzen. Um Störungen durch unterschiedliche, viskositätsbedingte Ansauggeschwindigkeiten zu vermeiden, werden die Proben vor der Messung auf das 10fache Volumen verdünnt. Trotzdem bleibt die Störung durch den Saccharose- und Proteingehalt der Probematrix erheblich: Die Lösungen konzentrieren sich an der heißen Schneide des Brennerkopfes zu karamelartigen Produkten, die nicht nur den Brenner verstopfen, sondern auch Metallsalze zurückhalten. Abhilfe kann dadurch geschaffen werden, daß der Brennerkopf gegen einen anderen ausgetauscht wird, der mit einem eingebohrten Kanalsystem versehen ist. Er wird mit gekühltem Wasser durchströmt. Mit Hilfe dieser technischen Verfeinerungen kann die Grenzkonzentration der Nachweise bis auf ca. $5 \cdot 10^{-11}$ mol/ml herabgesetzt werden.

3.10.3. Die Bestimmung von Metallionen unter den Bedingungen
der extremen Spurenanalyse

Die Bestimmung von Metallionen unter den Bedingungen der extremen Spurenanalyse erfordert eine besondere Berücksichtigung möglicher Verunreinigungen. Metallionen sind allgegenwärtig: sie

sind im Staub ebenso vertreten, wie in den Detergenzien, die zur Reinigung der Laborgeräte benutzt werden. Aus Glasgeräten wird von neutralen Lösungen pro Tag ca. 1 mg Ca/l herausgelöst. Die genannten Kontaminationen werden durch den ausschließlichen Gebrauch von Polyäthylengefäßen eingeschränkt, welche gründlich mit 0,5 N HCl gewaschen werden. Auch die zur Präparation benutzten Chemikalien enthalten Metallionen: Insbesondere die für die Dichtegradienten verwendete Saccharose wird industriell unter Zusatz überschüssiger Kalziumhydroxidmengen zum Rübensirup hergestellt, um giftige Pflanzensäuren auszufällen (z.B. Oxalsäure). Auch hochreine Saccharose enthält somit beträchtliche Mengen Kalzium. Der Kalziumgehalt der Saccharoselösungen kann um ca. 50% (von 3,3 auf 1,84 mg/l) gesenkt werden, indem sie durch eine Ionenaustauschersäule aus Chelex 100 geschickt werden. Der Ionenaustauscher wird zuvor mit 0,1 N HCl in seine saure Form übergeführt und gewaschen. Auch die verwendeten Glycinlösungen werden mit Chelex 100 gereinigt. Die verbleibenden Verunreinigungen werden in Rechnung gestellt, indem jede Präparation von einem Dichtegradienten ohne biologisches Material begleitet wird, dessen Blindwerte von den jeweiligen Meßwerten subtrahiert werden. Die Messungen werden mit einem Beckman Atomabsorptionsspektrophotometer, Modell 1248, durchgeführt (für einen Teil der Vorversuche wird das Modell 448 verwendet). Im folgenden sind die gewählten Meßbedingungen für die verschiedenen Elemente aufgeführt.

3.10.3.1. Lithium

Die Bestimmung des Lithiums bei 670,78 nm bereitet keine Schwierigkeiten.

rigkeiten. Die Resonanzwellenlänge ist gut von anderen Linien der Argon-gefüllten Hohlkathodenlampe abgetrennt, die erhaltene Eichkurve ist linear.

Standardreihe: 0,02 - 1,00 mg/l mit je 0,85% La, 1% HCl

Gasdruck: C_2H_2 : 0,7 kp/cm²

Preßluft : 1,7 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 4 mm über der Brennerschneide

Spalt: 5 (entspricht 0,1 mm geometrischer Spaltbreite, 0,20 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 25 mA

Dynodenspannung: 440 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,001 mg/l

3.10.3.2. Natrium

Natrium kann mit sehr hoher Empfindlichkeit bei seiner Resonanzwellenlänge von 589,0 nm bestimmt werden, wenn durch Anwendung schmaler Spalte von der Emissionslinie bei 589,5 nm abgetrennt wird. Es wird eine Neon-gefüllte Hohlkathodenlampe verwendet.

Standardreihe: 0,02 - 10 mg/l mit je 0,5% LiCl (als Ionisationspuffer)

Gasdruck: C_2H_2 : 0,8 kp/cm²

Preßluft : 1,7 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 2 mm über der Brennerschneide

Spalt: 2 (entspricht 0,04 mm geometrischer Spaltbreite, 0,11 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 15 mA

Dynodenspannung: 490 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,002 mg/l

3.10.3.3. Kalium

Die Resonanzlinie der mit Neon gefüllten Kaliumhohlkathodenlampe bei 766,49 nm ist gut von anderen Emissionslinien abtrennbar, sie gibt allerdings kein sehr ruhiges Signal. Auch ist das Rauschen des Photomultipliers im roten Bereich größer. Trotzdem wird wegen der hohen Empfindlichkeit bei dieser Wellenlänge gemessen.

Standardreihe: 0,02 - 10 mg/l mit je 0,5% LiCl

Gasdruck: C_2H_2 : 0,7 kp/cm²

Preßluft : 1,8 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 2 mm über der Brennerschneide

Spalt: 7 (entspricht 0,20 mm geometrischer Spaltbreite, 0,54 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 30 mA

Dynodenspannung: 580 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,005 mg/l

3.10.3.4. Magnesium

Oszillatorenstärke und wird weder durch Begleitlinien des Elementes noch durch Linien des Füllgases (Argon) gestört.

Mg wird mit Deuteriumkompensation gemessen.

Standardreihe: 0,02 - 5 mg/l mit je 0,85% La, 1% HCl

Gasdruck: C_2H_2 : 0,7 kp/cm²

Preßluft : 1,7 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 2 mm über der Brennerschneide

Spalt: 7 (entspricht 0,20 mm geometrischer Spaltbreite, 0,54 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 8 mA

Dynodenspannung: 410 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,0005 mg/l

3.10.3.5. Kalzium

Obwohl die Resonanzwellenlänge bei 422,67 nm sowohl von anderen Linien des Kalziums als auch Emissionslinien des Füllgases Neon gut abgetrennt ist, bereitet eine genaue Bestimmung des Kalziums Schwierigkeiten, da das Ca stark zur Verbindungsbildung in der Flamme neigt. Lanthanzusätze verschieben das Gleichgewicht zugunsten der freien Atome. Auch die Verwendung der heißeren N_2O -Azetylen-Flamme ist vorteilhaft, jedoch sind bisher keine kühlbaren Brennerköpfe für N_2O -Azetylen-Flammen verfügbar.

Standardreihe: 0,01 - 10 mg/l mit je 0,85% La, 1% HCl

Gasdruck: C_2H_2 : 0,8 kp/cm²

Preßluft : 1,7 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 2 mm über der Brennerschneide

Spalt: 7 (entspricht 0,20 mm geometrischer Spaltbreite, 0,54 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 10 mA

Dynodenspannung: 410 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,005 mg/l

3.10.3.6. Zink

Die Bestimmung des Zinks mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrophotometrie ist schwierig. Die Resonanzwellenlänge bei 213,86 nm befindet sich in einem sehr linienreichen Gebiet der neongefüllten Hohlkathodenlampe. Die Resonanzlinie wird am einfachsten gefunden, indem man das Lampenspektrum im Emissionsbetrieb aufzeichnet und anschließend das Spektrum überschreibt, das bei Messung einer Zn-haltigen Lösung (10 mg/l) erhalten wird (Abb. 21). Wegen der Lage der Resonanzwellenlänge im UV-Bereich wird mit Deuteriumkompensation für unspezifische Lichtverluste gearbeitet.

Standardreihe: 0,02 - 1,00 mg/l mit je 0,85% La und 1% HCl

Gasdruck: C_2H_2 : 0,7 kp/cm²

Preßluft : 1,7 kp/cm²

Brennerhöhe: Apertur 4 mm über der Brennerschneide

Spalt: 6 (entspricht 0,15 mm geometrischer Spaltbreite, 0,41 nm spektraler Spaltbreite)

Lampenstrom: 10 mA

Dynodenspannung: 460 V

Integrationszeit: 16 s

Betriebsart: integrierend

erreichte Nachweisgrenze: 0,0005 mg/l

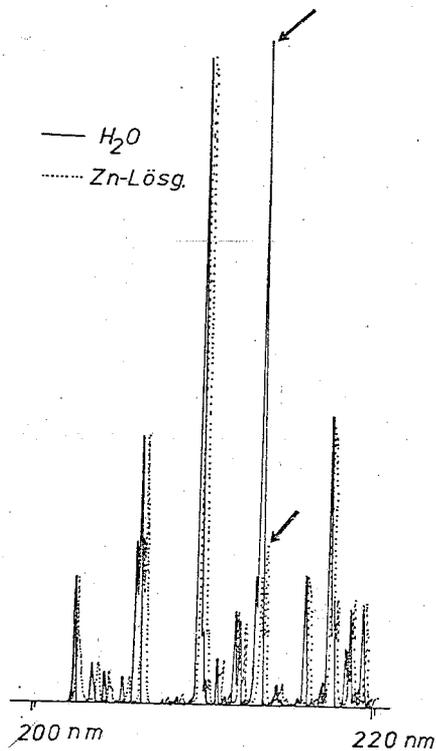


Abb. 21: Emissionsspektrum einer neuen, mit Neon gefüllten Zink-Hohlkathodenlampe im Bereich von 200 bis 220 nm. Die Resonanzwellenlänge (Pfeil) bei 213,86 nm kann leicht gefunden werden, indem durch die Ansaugkapillare zunächst Wasser eingespritzt wird (durchgezogene Linie), und anschließend das Emissionsspektrum über diese Aufzeichnung geschrieben wird, das man beim Einspritzen einer zinkhaltigen Lösung erhält (gepunktete Linie). Zur besseren Übersicht sind die beiden Spektren in der Abbildung etwas gegeneinander verschoben. Meßbedingungen: C₂H₂-Druck: 0,7 kp/cm², Preßluftdruck: 1,8 kp/cm², Apertur 4 mm über der Brennerschneide, Spalt: 3 (entspricht 0,05 mm geometrischer Spaltbreite, 0,14 nm spektraler Spaltbreite), Lampenstrom 20 mA, Dynodenspannung: 400 V, Betriebsart: kontinuierliche Energiemessung.

3.11. Verwendete Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz, Boehringer, Mannheim
Albumin aus Rinderserum, kristallin, reinst, Serva, Heidelberg
Azetylcholinchlorid, Merck, Darmstadt
Azetylthiocholinjodid, Merck, Darmstadt
Chelex 100, 100-200 mesh, Natriumform, Bio-Rad Laboratories,
München
2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure, DTNB, Merck, Darmstadt
Eserinsulfat, Physostigminsulfat, Sigma, München
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Merck, Darmstadt
Glycin, Riedel- de Haën, Seelze-Hannover
Lanthan-III-chlorid, Merck, Darmstadt. Vgl. Anmerkung!
Lanthan-III-oxid, Merck, Darmstadt. Vgl. Anmerkung!
Lithiumchlorid, Suprapur, Merck, Darmstadt
Luziferin-Luziferase-Gemisch, Rohextrakt aus den Leuchtorganen
von Leuchtkäfern, Sigma, München
Natriumchlorid, Suprapur, Merck, Darmstadt
Saccharose für die Dichtegradientenzentrifugation, Merck,
Darmstadt
Salpetersäure, Suprapur, Merck, Darmstadt
Salzsäure, Suprapur, Merck, Darmstadt
Tricain-Methansulfonat, M.S.222, Sandoz, Basel

Alle übrigen Chemikalien waren von der höchsten verfügbaren
Reinheit, in der Regel p.A. oder Suprapur.

Anmerkung: Im Kap. 3.10.2.2., S. 56, wurde auf die besondere
Bedeutung hingewiesen, die der Reinheit jener Chemikalien zu-
kommt, die bei der AAS-Bestimmung zugesetzt werden. Eine Reihe

von Firmen bietet zu diesem Zweck hochreine Chemikalien an, für die sie maximale Verunreinigungen garantieren, welche aber häufig nicht eingehalten werden. Dies sei am Beispiel der Kalziumverunreinigungen von Lanthanverbindungen demonstriert:

Hersteller und Reinheitsbezeichnung der Chemikalien	garantierte maximale Ca-Verunreinigung in mg/kg La	gemessener Ca-Gehalt in mg/kg La
Fluka, Lanthanoxid, purissimum a	5,86	101,41 ± 0,12
Hopkins & Williams, Lanthannitrat für die AAS	9,35	24,00 ± 2,12
Merck, Lanthanoxid, LAB, Juli 1974	-	0,00 ± 1,18
Merck, Lanthanoxid, LAB, September 1974	-	60,35 ± 2,47
Merck, Lanthanoxid, LAB, Oktober 1974	-	92,35 ± 0,59
Merck, Lanthanchlorid, LAB	-	4,82 ± 1,18

Tabelle 1: Kalziumverunreinigungen verschiedener Lanthanprodukte, im Vergleich zu den garantierten Reinheiten. Auch das Lanthannitrat "for Flame Enhancement in Atomic Absorption" der Firma Baker, 'Baker'-Grade, wurde untersucht. Es entspricht in seiner Reinheit etwa dem Produkt von Hopkins & Williams. Etwa zur selben Zeit als Merck das Lanthanchlorid auf den Markt brachte, nahm die Reinheit des Lanthanoxids beträchtlich ab.

3.12. Auswertung der Ergebnisse

Die Meßwerte der Vorfraktionen werden mit einem pdp 11 Prozeßrechner (digital) analysiert, die Meßwerte der Dichtegradienten mit einem 265 K - Großcomputer, UNIVAC 1 100. Als Programmiersprache verwende ich BASIC, beziehungsweise deren UNIVAC-Version, UBASIC. Die Programme werden aus zahlreichen Subroutines angelegt, um eine variable Anwendung zu ermöglichen. Die experimentellen Daten der einzelnen Versuche werden auf Magnetbändern sukzessiv gespeichert und sind so jederzeit einer neuen Mittelwertbildung oder einem anderen Berechnungsschema zugänglich. Die zu diesem Zweck entworfenen Programme sind im Anhang wiedergegeben. Folgende Rechenschritte werden durchgeführt:

1. Die Blindwerte der unbeladenen Gradienten werden von den Meßwerten subtrahiert.
2. Führt die Differenzbildung zu negativen Werten, weil das Referenzwasser bei der Bestimmung der Ionenkonzentration unterschiedliche Reinheit besaß (vgl. S. 48), so wird die Nulllinie entsprechend verschoben.
3. Die analytischen Einheiten (mg/l) werden in biochemische Einheiten (mMol) umgerechnet.
4. Die Konzentrationen der Komponenten werden mit dem Volumen der betreffenden Fraktion multipliziert, um absolute Mengen zu erhalten.
5. Die Absolutmenge wird auf ein Gramm eingesetztes Gewebe (Naßgewicht) bezogen und der so erhaltene Quotient als spezifische Konzentration bezeichnet.
6. Werden während der Präparation Proben zu Meßzwecken abgezweigt,

so wird der Nenner für alle folgenden Fraktionen entsprechend vermindert.

7. Um die relative Konzentrierung einer Komponente in einer bestimmten Fraktion auszudrücken, wird das Verhältnis der prozentualen Anteile der wiedergefundenen Komponenten in der betreffenden Fraktion gebildet. In der Regel wird dabei auf Protein bezogen, d.h. der prozentuale Anteil der gesamten wiedergewonnenen Komponente, der in der betrachteten Fraktion auftritt, wird geteilt durch den prozentualen Anteil des gesamten wiedergefundenen Proteins, der in dieser Fraktion auftritt. Dieser Quotient wird üblicherweise relative spezifische Konzentration, bei biologisch aktiven Substanzen auch relative spezifische Aktivität, genannt. Beide Bezeichnungen geben Anlaß zu Mißverständnissen: Erstens handelt es sich schon der Dimension nach nicht um eine Konzentration, sondern um eine Relation von Konzentrationen, d.h. um die Konzentrierung einer Komponente relativ zu einer anderen. Zweitens wird die relative spezifische Aktivität in der Enzymchemie anders definiert. In dieser Arbeit wird daher der formale Ausdruck RSK-Wert bevorzugt. Analog wird unter dem ASK-Wert der Quotient aus der Absolutmenge einer Komponente und der absoluten Proteinmenge in derselben Fraktion verstanden.

8. Schließlich wird berechnet, welcher Prozentsatz der ursprünglich vorhandenen Komponente in den aufgetrennten Fraktionen wiedergefunden wird, im folgenden als Ausbeute bezeichnet. Die Ausbeute ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der verwendeten Techniken.

9. Von den aufgeführten Größen werden jeweils Mittelwerte aus allen Versuchen gebildet, und die Standardabweichungen der Mittelwerte ausgerechnet, im folgenden auch als S.E.M. (standard

error of the mean) abgekürzt.

10. Die berechneten Werte werden hinsichtlich der Präparationsweise ($P_3:P_3^+$; Glycin:NaCl) und der biologischen Vorbehandlung (unstimuliert : stimuliert) mit einem gepaarten t-Test, der die Mittelwerte verschiedener Gradienten eines Experimentes als ein physiologisches Ereignis behandelt, und mit einem ungepaarten t-Test, der jede Bestimmung als ein Meßereignis wertet, auf signifikante Unterschiede analysiert.

11. Einerseits werden die mit den diskontinuierlichen Gradienten des Typs II erhaltenen Mittelwerte allein untersucht, um Aussagen über die Heterogenität der synaptischen Vesikel zu erhalten.

12. In einem weiteren Auswertungsschritt werden die mit beiden Gradienten erhaltenen Resultate auf einen gemeinsamen fiktiven Gradienten (Typ III) projiziert, indem die spezifischen Konzentrationen von Fraktionen, die bei nur einem der beiden experimentellen Gradienten auftreten, der nächst dichteren Fraktion zugeschlagen werden, die beiden Gradienten gemeinsam ist (vgl. Abb. 12, S. 32).

Mit Hilfe der RSK-Werte bezieht man die Konzentrationen aller Komponenten auf die Konzentrationen einer Komponente (i.a. Protein). Fehler bei der Bestimmung dieser Komponente führen daher zu systematischen Fehlern in den RSK-Werten aller Komponenten. Dies gibt besonders dann Anlaß zu Fehlinterpretationen, wenn die RSK-Werte für unterschiedlich behandelte Proben (z.B. stimulierte und unstimulierte elektrische Organe) verglichen werden. Ich möchte daher eine graphische Auftragung vorschlagen, die es erlaubt, RSK-Werte zu vergleichen und gleichzeitig

festzustellen, ob die Differenzen der RSK-Werte lediglich auf unterschiedlichen Meßwerten für die Bezugssubstanz beruhen.

Es sei:

X die spezifische Konzentration der Komponente x

Y die spezifische Konzentration der Komponente y

P die spezifische Konzentration der Bezugssubstanz (Protein)

1 die 1. Art der betrachteten Proben (z.B. stimuliertes Gewebe)

2 die 2. Art der betrachteten Proben (z.B. unstimuliertes Gewebe)

Ist

$$(7) \quad RSK_X(1) = \frac{X(1)}{P(1)} > \frac{X(2)}{P(2)} = RSK_X(2) \quad \text{und}$$

$$(8) \quad RSK_Y(1) = \frac{Y(1)}{P(1)} > \frac{Y(2)}{P(2)} = RSK_Y(2) ,$$

so können diese Relationen durch zu niedrige Werte P(1) oder zu hohe Werte P(2) bedingt sein. Bildet man das Verhältnis der beiden Gleichungen, so kürzen sich P(1) und P(2) heraus, und wenn keine unterschiedlichen spezifischen Konzentrationen für X(1) und X(2) beziehungsweise Y(1) und Y(2) gegeben waren, muß gelten

$$(9) \quad \frac{RSK_X(1)}{RSK_Y(1)} = \frac{RSK_X(2)}{RSK_Y(2)}$$

Also nach Umstellung:

$$(10) \quad \frac{RSK_X(1)}{RSK_X(2)} = \frac{RSK_Y(1)}{RSK_Y(2)}$$

oder:

$$(11) \quad \log RSK_X(1) - \log RSK_X(2) = \log RSK_Y(1) - \log RSK_Y(2)$$

In einer logarithmischen Auftragung der RSK-Werte sind dann die Abstände zwischen Wertepaaren verschieden behandelter Proben gleich.

In der Zellfraktionierung ist es notwendig, die erhaltenen Fraktionen elektronenmikroskopisch oder mittels Leitsubstanzen (z.B. Azetylcholin für die cholinergen synaptischen Vesikel) zu charakterisieren. Auch in diesem Zusammenhang möchte ich ein logarithmisches Auswertungsverfahren einführen: Sind zwei Substanzen a und b in zwei Fraktionen 1 und 2 im selben Verhältnis enthalten, $a_1 : b_1 = a_2 : b_2$, so erhält man bei logarithmischer Auftragung äquidistante Wertepaare ($\log a_1 - \log b_1 = \log a_2 - \log b_2$), die die Annahme stützen, daß beide Komponenten von den gleichen biologischen Partikeln in einem festen Verhältnis gebunden werden. Sind die verbindenden Linien für die beiden Fraktionen dagegen nicht parallel, so muß eine Bindung der Komponenten an mindestens zwei verschiedene Spezies gefolgert werden. Dieses Auswertungsverfahren bewährt sich vor allem dann, wenn eine große Anzahl von Komponenten in mehreren Fraktionen verglichen werden soll, zumal wenn unterschiedlich behandelte Proben vorliegen (stimuliert und unstimuliert etc.). Es kann so einfach zwischen gleichförmigem Verlust (Aufnahme) mehrerer Komponenten und spezifischen Veränderungen einer einzigen Komponente unterschieden werden.

4. Ergebnisse

4.1. Quantitative Analyse der Präparationsvorstufen

Ein Vergleich der ionalen Zusammensetzung des elektrischen Gewebes mit der des Blutplasmas und der der Cerebronalflüssigkeit (vgl. S. 28) veranschaulicht, daß das elektrische Gewebe viel ärmer an Natrium und Lithium, hingegen viel reicher an Kalium und Magnesium ist (Abb. 22).

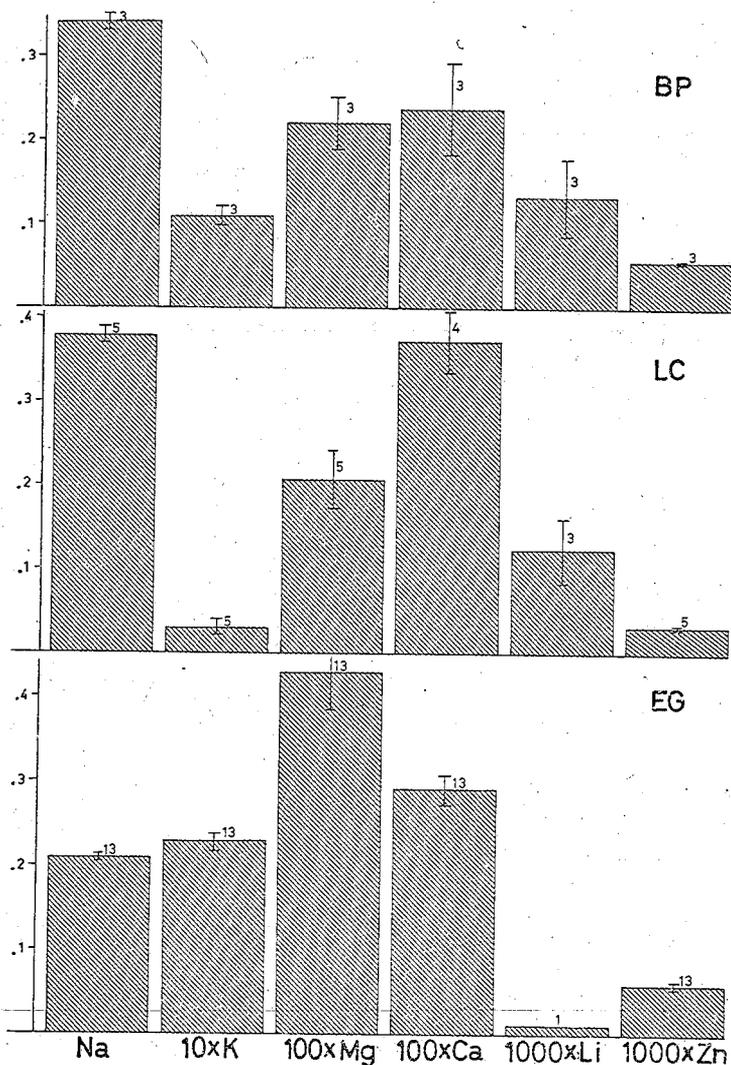


Abb. 22: Spezifische Ionenkonzentrationen des Blutplasmas, BP, der Cerebrospinalflüssigkeit, LC, und des elektrischen Gewebes, EG, (in mmol/g). Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, sind die Werte für Kalium mit dem Faktor 10, für Magnesium und Kalzium mit dem Faktor 100, und für Lithium und Zink mit dem Faktor 1000 multipliziert. Mittelwert \pm S.E.M.

Die quantitative Analyse der Präparationsvorstufen zeigt, ob während der Präparation Metallionen verloren bzw. eingeschleppt werden und welche generellen Tendenzen unterschiedlicher

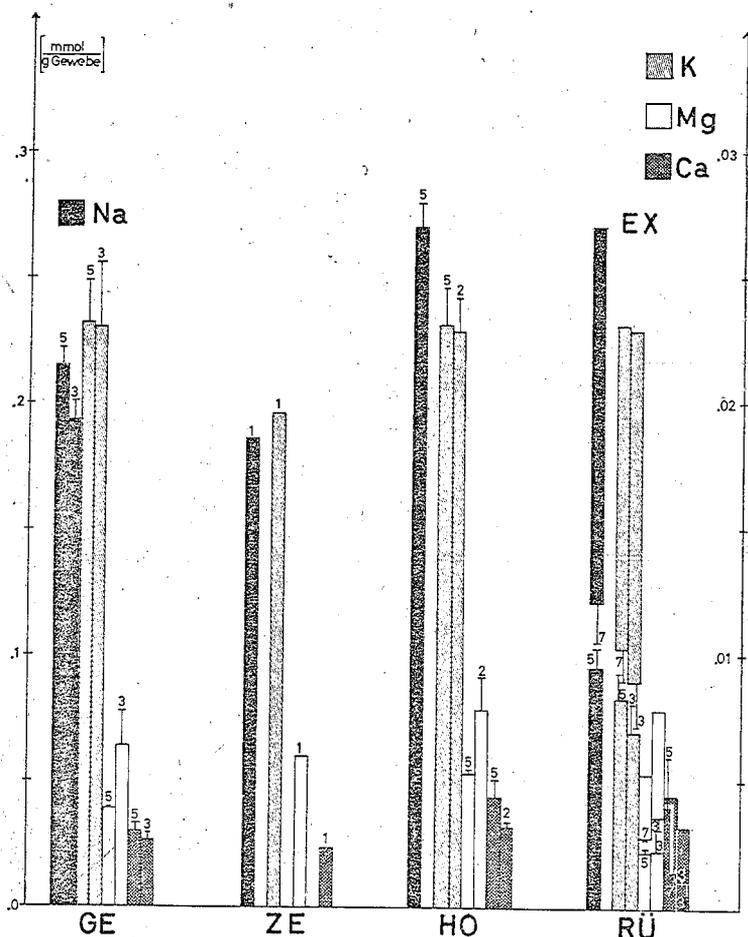


Abb. 23: Spezifische Ionenkonzentrationen des Gewebes (GE), des zerschlagenen Gewebes (ZE), des Homogenates (HO), des Extraktionsrückstandes (RÜ) und des Extraktes (EX) in mmol/g Gewebe. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, ist die Skala für Natrium (links) gegenüber der Skala für die anderen Ionen (rechts) um den Faktor 10 gestaucht. Die linken Säulen beziehen sich jeweils auf die Glycin-Präparationen, die rechten auf die NaCl-Präparationen. Die Werte für den Extrakt sind vom oberen Ende der vorangehenden Säulen des Homogenates aus nach unten eingezeichnet, so daß die Abstände zwischen den Auftragungen des Extraktes und des Extraktionsrückstandes den Verlust an Ionen anzeigen. Mittelwerte \pm S.E.M.

Löslichkeit für die Ionen bestehen. Die NaCl-Präparationen wurden im Mai und Juni durchgeführt, die Glycin-Präparationen in der Zeit von Juli bis November. Abgesehen von einem um 30% höheren Magnesiumgehalt der ersten drei Fische, sind keine jahreszeitlichen Veränderungen im Ionengehalt feststellbar (Abb. 23).

Während des Zerschlagens ändert sich die ionale Zusammensetzung des Gewebes nicht, insbesondere wird weder Magnesium noch Kalzium aus dem Material des Porzellanmörser s eingeschleppt. Mit der Homogenisationslösung werden geringe Mengen an allen untersuchten Ionen eingeschleppt; es zeigt sich jedoch, daß durch keines der beiden Medien ein Ion spezifisch eingeschleppt wird (außer natürlich Na^+ durch das NaCl). Ein Vergleich der ersten drei Vorfraktionen läßt die Meßwerte für das zerschlagene Gewebe, die von nur einer Probe stammen, als etwas zu niedrig erscheinen.

Bei der ersten Auftrennung in Extrakt und Extraktionsrückstand bleibt etwa ein Drittel der Ionen im Rückstand, von den Erdalkalimetallionen geringfügig mehr als von den Alkalimetallen. Etwa 10% des Natriums, Kaliums und Magnesiums werden in den aufgetrennten Fraktionen nicht wiedergefunden, während etwas Kalzium, vermutlich von der Baumwollgaze, eingeschleppt wird. Der Mehrgehalt der ersten Fische an Magnesium erscheint ausschließlich im Extrakt. Ein Vergleich zwischen der Ionenverteilung der Bodensätze (Extraktionsrückstand, P_{12} , P_3 und P_3^+) und Überstände (Extrakt, S_{12} , S_3 und S_3^+) macht deutlich, daß sich Natrium, Kalium und Magnesium analog verhalten, während das Kalzium eine unterschiedliche Verteilung zeigt (Abb. 24): Bei den ersten drei Ionen bestehen praktisch keine Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Proben. Auch zwischen NaCl- und Glycin-

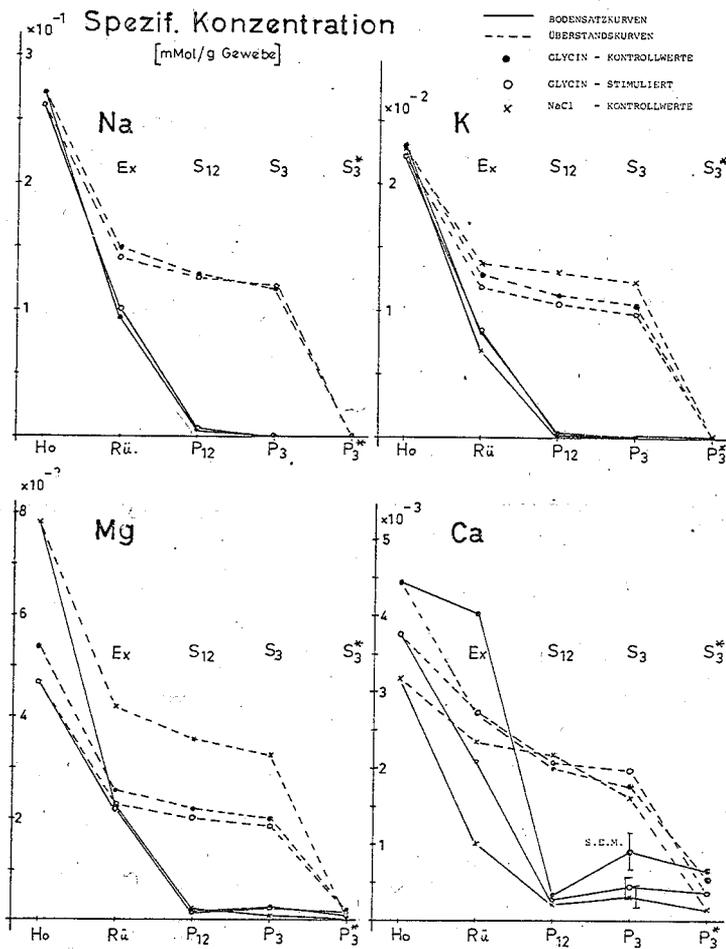


Abb. 24: Ionenverteilung zwischen den Bodensätzen, Extraktionsrückstand (Rü), P_{12} , P_3 und P_3^+ , und den Überständen, Extrakt (Ex), S_{12} , S_3 und S_3^+ , ausgehend vom Homogenat (Ho). Um den optischen Vergleich zu erleichtern, ist die Ordinate für jedes Ion charakteristisch gedehnt. Mittelwerte aus 3 - 8 Messungen.

Präparaten zeigt sich, abgesehen von der etwas größeren Kaliumverunreinigung durch das NaCl, keine Differenz. Der höhere Magnesiumgehalt der ersten Fische findet sich stets in der löslichen Fraktion. Im P_{12} verbleiben ca. 2% der Alkalimetalle und 3% des Magnesiums, während der P_3 nur noch einen verschwindenden Prozentsatz des ursprünglich vorhandenen Natriums und Kaliums,

aber immer noch 3 - 4% des Magnesiums enthält.

Für das Kalzium ähneln die Kurven, welche die Überstandsfractionen miteinander verbinden, noch grob denen der anderen Ionen, während die zu den Bodensätzen gehörigen Kurven ganz anders verlaufen. Am höchsten liegen die Meßwerte der in Glycinlösung präparierten Kontrollorgane, der Kalziumgehalt der stimulierten Proben ist niedriger (fast signifikant), und die Kurve für die unstimulierten, aber in NaCl-Lösung präparierten elektrischen Organe liegt noch tiefer. Die spezifischen Kalziumkonzentrationen des Extraktionsrückstandes, des P_3 und P_3^+ sind höher, und die Unterschiede zwischen den NaCl- und Glycin-Kontrollproben und den stimulierten Präparaten sind größer als im P_{12} .

Es zeigt sich also, daß die Alkalimetallionen im wesentlichen frei gelöst vorliegen, während das Kalzium bedeutend fester an sedimentierende Strukturen gebunden ist; das Magnesium ähnelt in seiner Verteilung mehr den Alkalimetallen als dem Kalzium. Ein fester Prozentsatz der löslichen Ionen sedimentiert gemeinsam mit den besonders leicht sedimentierenden Strukturen (P_{12}), die wahrscheinlich von Membranen umgeben sind (z.B. Synaptosomen), während ein höherer Anteil des Magnesiums und besonders des Kalziums fest an leichtere Strukturen, möglicherweise Membranbruchstücke, gebunden ist. Das Kalzium wird bei elektrischer Stimulation und bei Behandlung mit Natriumchloridlösung von diesen Strukturen abgegeben. Das Verhalten des Kalziums wird besonders deutlich, wenn man die Unterschiede im Ausgangsmaterial herausnormiert, indem man die spezifischen

Konzentration der Fraktionen als Prozentsatz der spezifischen Konzentration des Homogenates berechnet (Abb. 25): Den niedrigeren Kurven der stimulierten und NaCl-behandelten Bodensätze entsprechen erwartungsgemäß höhere Kurven für die Überstände (Extrakt, S_{12} , S_3). Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch für die Werte der Waschlösung S_3^+ um, die lediglich die Zusammensetzung der entsprechenden Bodensätze widerspiegelt. Das Waschen des P_3 führt also zu einem Auswaschen gebundener Ionen, und damit artefiziell zu niedrigen Werten.

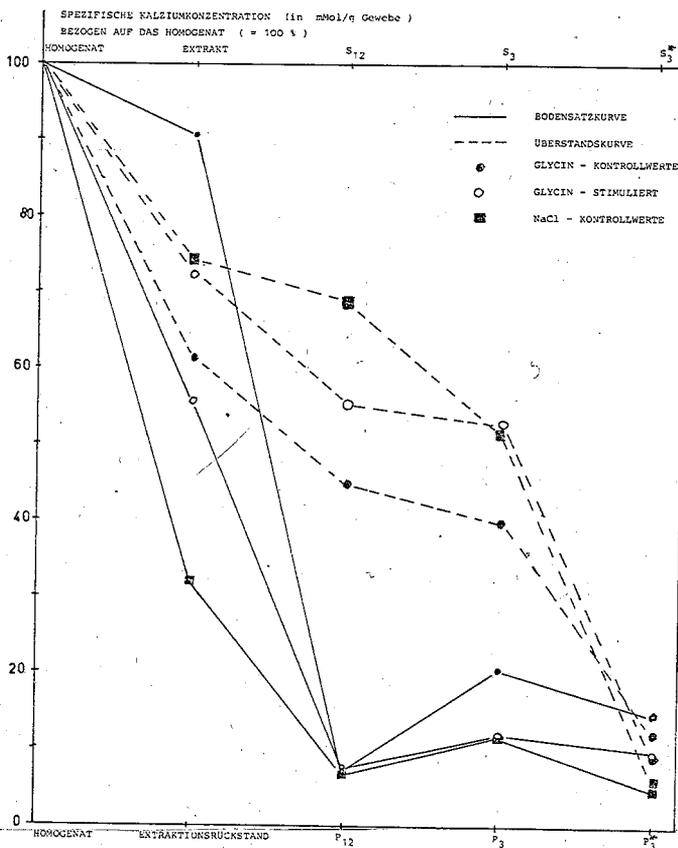


Abb. 25: Auf das Homogenat (= 100%) normierte Darstellung der Kalziumverteilung zwischen den Bodensätzen und Überständen. Mittelwerte aus 3 - 8 Messungen.

Verteilung, Verluste und eingeschleppte Verunreinigungen lassen sich für die verschiedenen Ionen, Protein, Azetylcholin, ATP und Gesamtesterase gut an Hand einer gemeinsamen Auftragung der spezifischen Konzentrationen in Prozenten der spezifischen Konzentrationen der betreffenden Ausgangsfraction beurteilen (Abb. 26). Die obere Reihe zeigt die Auftrennung des S_{12} in S_3 und P_3 , die untere die des P_3 in S_3^* und P_3^* . Bei den Glycin-Präparationen der Kontrollorgane werden im P_3 , der nur 20% des Proteins enthält, 80% des Azetylcholins wiedergefunden. Für die stimulierten Proben ist die Ausbeute geringer. Dieser Unterschied kann durch eine höhere Permeabilität der Vesikelmembranen für Azetylcholin nach Stimulation verursacht sein.

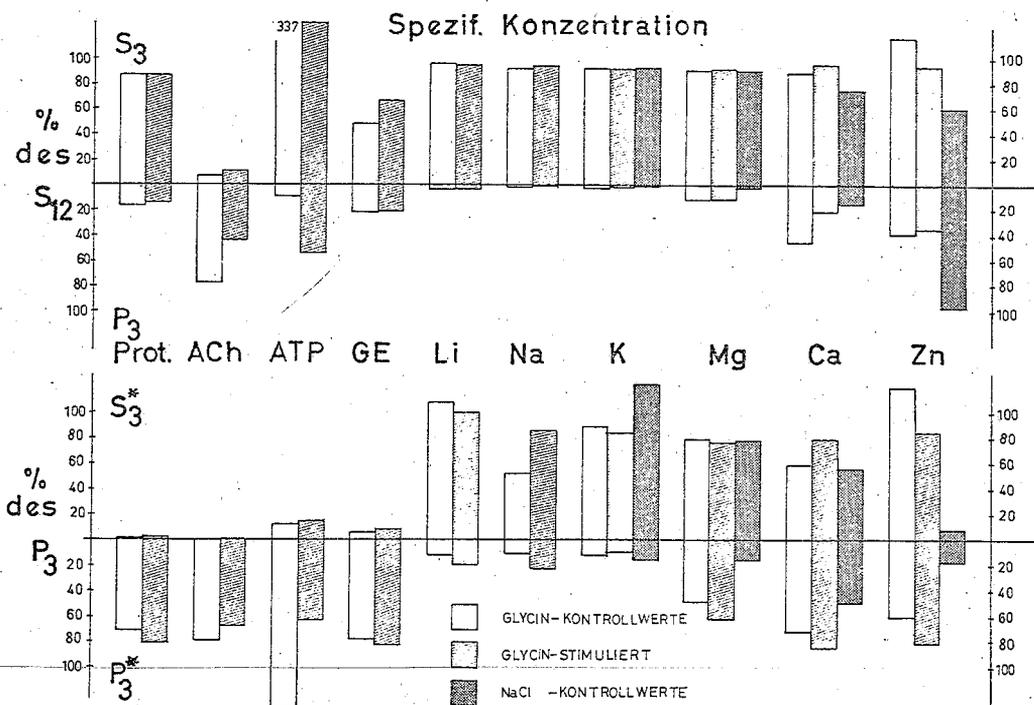


Abb. 26: Verteilung des Proteins (Prot.), Azetylcholins (ACh), ATP's, der Gesamtesterase (GE) und der Metallionen, aufgetragen in Prozenten der Ausgangsfractionen. Mittelwerte aus 6 - 8 Messungen (Glycin-Präparationen), bzw. 3 Messungen (NaCl-Präparationen).

(Wegen der Anwesenheit der hochaktiven Azetylcholinesterase muß auch das im S_3 wiedergefundene Azetylcholin im Innern von membranumgebenen Strukturen geschützt vorliegen.) Zugleich zeigt sich, daß die gesamte Vesikelpopulation durch die Stimulation leichter wird (Verschiebung der Azetylcholinsäule nach oben). Die ATP-Werte sind bedeutungslos, da in Abwesenheit von ATPasehemmern in den verschiedenen Vorfraktionen unterschiedliche Mengen des freien, nicht durch Membranen geschützten ATPs gespalten werden. Auf den Zusatz eines ATPasehemmers mußte verzichtet werden, da mit ihm Ionen eingeschleppt worden wären.

Die schon genannten Unterschiede in der Ionenverteilung sind natürlich auch aus dieser Auftragung abzulesen. Die Zinkausbeuten zwischen 120 und 160% sind schlecht. Teilweise ist das durch die in Kap. 3.10.3.6. genannten Schwierigkeiten bedingt, Zink mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie zu bestimmen, zumal die absoluten Zinkkonzentrationen ca. 100mal niedriger liegen als z.B. jene des Natriums. Möglicherweise stammt ein Teil des eingeschleppten Zinks von den Kappen, mit denen die Zentrifugenröhrchen verschlossen werden. Das mit eingezeichnete Lithium ist nicht physiologischen Ursprungs, sondern wurde dem S_{12} zugesetzt (vgl. S. 35). Ein Verlust von Natrium- oder Kaliumionen aus Strukturen des Bodensatzes infolge der harten Zentrifugationsbedingungen müßte zu relativ (zu Lithium) höheren Natrium- beziehungsweise Kaliumwerten im Überstand S_3 führen; dies ist jedoch nicht der Fall. Der Lithiumgehalt des Bodensatzes ist jedoch etwas größer als sein Natrium- und Kaliumgehalt. Seine Zusammensetzung wird also

durch die gelösten Ionen des S_{12} beeinflusst, welche die suspendierten Partikel umgeben, entweder, indem Ionen aufgenommen werden, oder indem sie den Teilchen anhaften. Die untere Reihe der Abb. 26 illustriert die Veränderungen in der Zusammensetzung des Bodensatzes, die durch den Waschvorgang hervorgerufen werden. 20 - 30% des Proteins und Azetylcholins, und 10% der Esterasen werden nicht wiedergefunden. Die entwichenen Azetylcholin- und ATP-Mengen sind bei den stimulierten Proben größer. Während der größte Teil der monovalenten Ionen in die Waschlösung entweicht, bleiben die divalenten Ionen größtenteils im P_3^+ zurück. Die spezifischen Konzentrationen des P_3 und P_3^+ werden in Abb. 27 direkt miteinander verglichen. Die Standardabweichung der Mittelwerte und die Anzahl der Experimente ist jeweils eingezeichnet. Während die spezifischen Konzentrationen an Azetylcholin, ATP, Gesamtesterase, Protein und Kalzium infolge der Stimulation abnehmen, bleibt die Menge der anderen Ionen nahezu unverändert (Kalium) oder nimmt leicht zu (Lithium, Natrium, Magnesium und Zink).

Ein Vergleich der Streuungen der verschiedenen Meßwerte zeigt, daß sie alle ungefähr gleich zuverlässig sind. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sinken etwa proportional zu den Absolutmengen, d.h. die Meßmethoden sind für die in sehr kleinen Konzentrationen vorliegenden Komponenten ebenso genau wie für die übrigen. Die Streuungen können dreierlei Ursache haben: individuelle Unterschiede im physiologischen Zustand der untersuchten elektrischen Organe, Unterschiede in der Präparationsweise und mangelnde Reproduzierbarkeit bei den

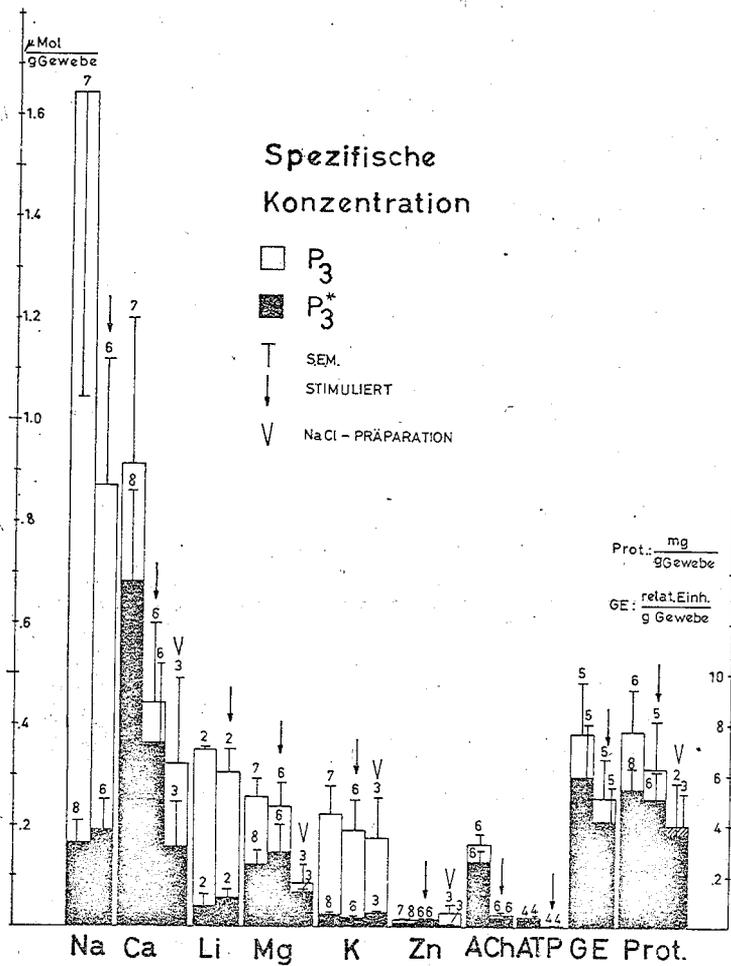


Abb. 27: Vergleich der spezifischen Konzentrationen des P₃ und P₃⁺. Die Werte für das Protein (Prot.) und die Gesamtesterase (GE) beziehen sich auf die rechte Ordinate. Über den Markierungen für die Standardabweichung der Mittelwerte ist die Zahl der Meßwerte angegeben.

Messungen. Da erstens die Standardabweichungen der Mittelwerte mit der Anzahl der Experimente nicht abnehmen und zweitens die Standardabweichungen für das zugesetzte Lithium deutlich kleiner sind als beispielsweise für das biologisch aktive Kalzium, muß die Streuung der Meßwerte hauptsächlich durch individuelle Unterschiede zwischen den untersuchten elektrischen Organen

oder durch Manipulationen mit den ersten Vorfraktionen bedingt sein.

Um zu überprüfen, wie weitgehend die Ionenverteilung lediglich die Proteinverteilung reflektiert, weil Ionen unspezifisch an Proteine gebunden werden, werden die RSK-Werte berechnet (vgl. Kap. 3.12.). Sie sind in Abb. 28 für den P_3 , S_3 , P_3^+ und S_3^+ gemeinsam in einer logarithmischen Auftragung (vgl. dazu S. 67 ff) wiedergegeben.

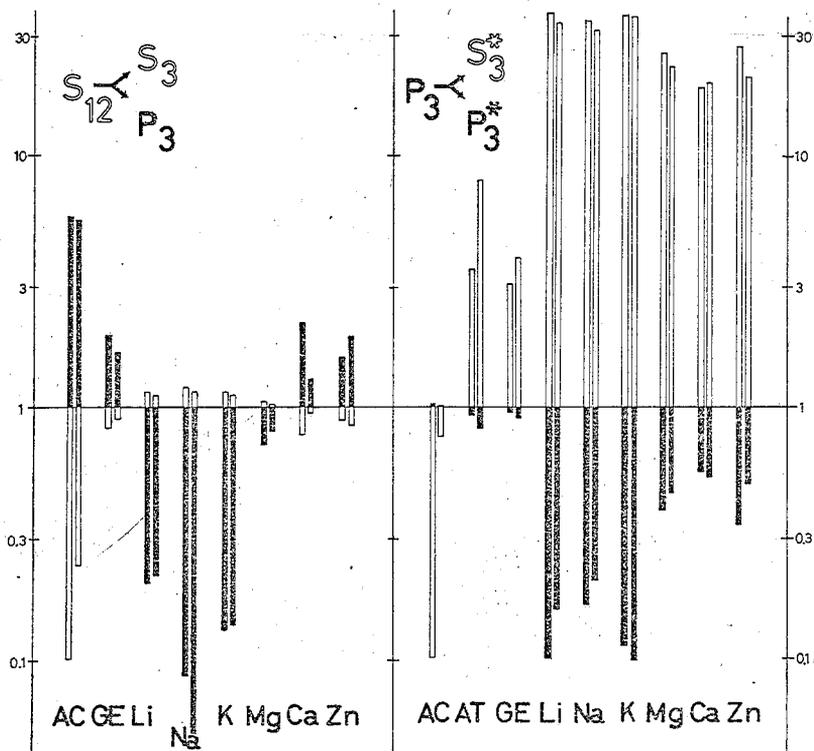


Abb. 28: Logarithmische Auftragung der RSK-Werte für den P_3 und S_3 (Ausgangsfraction S_{12}) links, und für den P_3^+ und S_3^+ (Ausgangsfraction P_3), rechts. Die Endpunkte der Balken markieren Werte auf einer Zahlengeraden (Ordinate); den Flächen kommt keine Bedeutung zu. Die ausgefüllten Balken beziehen sich auf die Bodensätze, die offenen Balken auf die Überstände. Die linken Balken gelten für die unstimulierten Proben, die rechten für die stimulierten (Glycin-Präparation). AC: Azetylcholin, AT: ATP, GE: Gesamtesterase. Die RSK-Werte sind aus Mittelwerten von 6 - 8 Messungen berechnet.

Folgende Ergebnisse lassen sich ablesen:

1. Keine der untersuchten Komponenten verteilt sich analog dem Protein.

Annahme (1. Näherung): Alle Komponenten x sind homogen.

Ist $RSK_x > 1$, so wird x in der Fraktion angereichert.

2. Azetylcholin, Kalzium, Zink und die Gesamtesterase werden im P_3 relativ zum Protein angereichert. Die anderen Komponenten liegen zu einem größeren Anteil in freier Form vor als die Proteine.

Es ist möglich, daß eine Komponente x im S_{12} an eine Struktur, die sich im Bodensatz anreichert, gebunden war, aber infolge der harten Zentrifugationsbedingungen abgelöst wurde. Für den Überstand S_3 muß dann $RSK_x < RSK_{Li}$ gelten, da das Lithium dem S_{12} zugesetzt wurde.

3. Magnesium war an Strukturen des Bodensatzes gebunden, wurde aber durch die Zentrifugation von diesen abgelöst.

Annahme: Die Komponente x ist heterogenen Ursprungs.

Ist ein Teil der Komponente x weniger stark an Bodensatzstrukturen gebunden als Lithium, ein anderer Teil hingegen stärker, so wird, nachdem der überwiegende Teil von x mit dem S_3 weggelöst worden ist,

$$RSK_x(P_3^+) > RSK_{Li}(P_3^+).$$

4. ATP und Natrium sowie eventuell das Kalium der unstimulierten Proben sind teilweise fester an den Bodensatz gebunden als das zugesetzte Lithium.

Jedoch geht von allen Komponenten außer dem Azetylcholin durch das Waschen des P_3 ein großer Teil in die Waschlösung verloren,

ohne daß die Reinheit des Bodensatzes zunimmt (d.h. ohne daß RSK-Werte > 1 auftreten). Der Vergleich der RSK-Werte für die unstimulierten und stimulierten Proben zeigt:

5. Nur für Kalzium ergeben sich markante Unterschiede in der relativen (nicht absoluten!) Anreicherung. Wie die äquidistanten Wertepaare für alle anderen Ionen zeigen, lassen sich die Differenzen in den RSK-Werten auf Unterschiede der mittleren Proteingehalte zurückführen (vgl. die Erläuterungen zur logarithmischen Auftragsweise in Kap. 3.12., S. 67 ff). Zum numerischen Vergleich ist das Verhältnis $RSK_X(\text{stimuliert}) / RSK_X(\text{unstimuliert})$ für den S_3 in Tabelle 2 angeführt: Ein Fehler von 2% bei den Mittelwerten der Proteinbestimmung würde also alle Differenzen in den RSK-Werten zwischen stimulierten und unstimulierten Proben erklären (außer für das Ca).

VERHÄLTNIS DER RSK - WERTE

$RSK_X(\text{stim.}) / RSK_X(\text{kontr.})$

X	S_3	S_3^+
Li ⁺	.980	.918
Na ⁺	.985	.931
K ⁺	.982	.997
Mg ⁺⁺	.979	.874
Ca ⁺⁺	1.212	1.064
Zn ⁺⁺	.946	.755

Tabelle 2: Verhältnis der RSK-Werte der stimulierten zu den RSK-Werten der Kontrollseite für den S_3 und den S_3^+ . Vgl. Text.

6. Wie Spalte 3 der Tabelle 2 und Abb. 28 zeigen, sind die unterschiedlichen RSK-Werte für den S_3^+ jedoch nicht durch Differenzen bei der Proteinbestimmung bedingt. In Abb. 29 ist die relative Abnahme der Ionen in der Waschlösung infolge der Stimulation gegen das Ionenpotential, d.i. den Quotienten aus elektrischer Ladung und Ionenradius, aufgetragen. Mit Ausnahme des Kalziums werden alle Ionen von dem Bodensatz der stimulierten Proben stärker zurückgehalten. Der Austauscheffekt ist für Kalium, Natrium, Lithium und

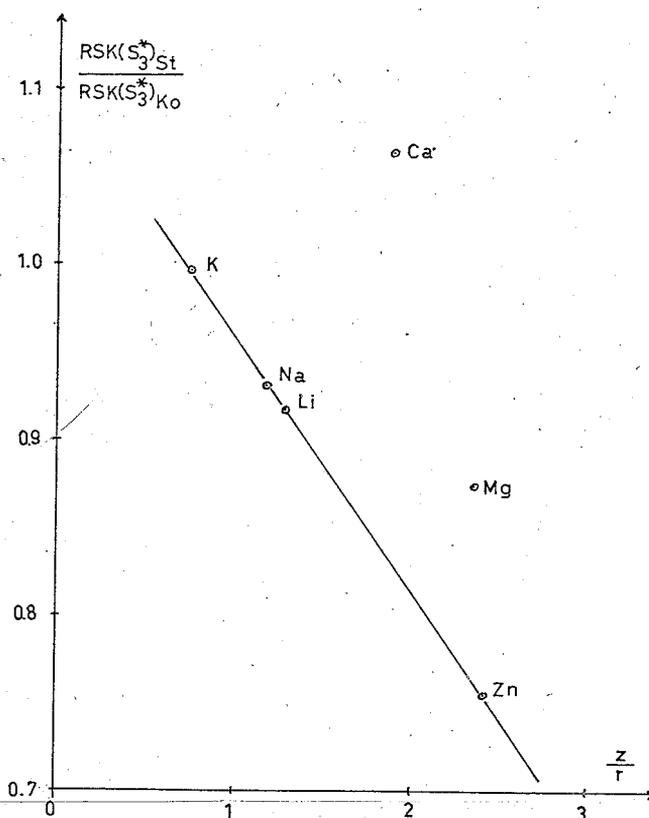


Abb. 29: Relative Zunahme (Ca) bzw. Abnahme (übrige Ionen) der relativen spezifischen Ionenkonzentration in der Waschlösung S_3^+ infolge der Stimulation, aufgetragen gegen das Ionenpotential (z/r).

Zink linear vom Ionenpotential abhängig. Mit anderen Worten: Durch Stimulation des elektrischen Organs nimmt die Zahl der negativen Ladungen im Bodensatz P_3 zu, so daß Ionen unspezifisch, entsprechend ihrem Ionenpotential, gebunden werden. Kalzium wird jedoch nach Stimulation in geringerem Ausmaß gebunden, oder - was gleichbedeutend ist - es war vor der Stimulation spezifisch gebunden. Auch Magnesium ist in der Waschlösung der stimulierten Proben höher konzentriert, als es seinem Ionenpotential entspricht.

In Tabelle 3 sind die jeweils auf die erste untersuchte Vorfraktion bezogenen Ausbeuten der Komponenten angegeben.

Komponente	bezogen auf	Ausbeute
Protein	S_{12}	99,1 %
Gesamtesterase	S_{12}	75,9 %
Azetylcholin	S_{12}	54,9 %
Li (zugesetzt)	S_{12}	99,9 %
Na	Homogenat	85,2 %
K	Homogenat	86,6 %
Mg	Homogenat	89,9 %
Ca	Homogenat	140,0 %
Zn	Homogenat	163,2 %

Tabelle 3: Mittlere Ausbeuten der Komponenten, bezogen auf die erste untersuchte Vorfraktion. Bezüglich des hohen Kalziumwertes vergleiche S. 72, bezüglich des Zinkwertes S. 77. Für ATP läßt sich keine Ausbeute angeben, da ohne ATPasehemmer gearbeitet wurde, vgl. S. 77.

4.2. Quantitative Analyse der Dichtegradienten

4.2.1. Kontinuierliche Gradienten von Zonalrotoren

Wird der S_{12} auf einen kontinuierlichen Dichtegradienten aus Saccharose / NaCl gegeben, so überdeckt der Ionenpeak der löslichen Fraktion (hauptsächlich Bestandteile des Zytoplasmas) die Vesikelfraktion. Experimente mit der auf Saccharose / Glycingradienten aufgetrennten P_3^+ -Suspension führen zu analogen Ergebnissen, wie sie im Kap. 4.2.3. besprochen werden; allerdings werden für die Alkalimetalle die Nachweisgrenzen des AAS unterschritten, so daß hier auf eine Wiedergabe dieser Resultate verzichtet wird.

4.2.2. P_3^+ -beladene Glycingradienten des Typs III

Die mittleren spezifischen Konzentrationen der Komponenten in den Fraktionen der Gradienten des Typs III sind in Tabelle 4 wiedergegeben und exemplarisch für ACh, Na, K, Mg und Ca in Abb. 30 dargestellt. Die Komponenten verteilen sich hauptsächlich auf drei Fraktionen: Fraktion 1 ("lösliche Fraktion") ist reich an (freien) Metallionen, die Vesikelfraktion 3 (vgl. Abb. 31a) ist reich an ACh, ATP und Metallionen und die Fraktion 5 ("Membranfraktion"), die Membranbruchstücke, Synaptosomen sowie einige Mitochondrien enthält (vgl. Abb. 31c), ist reich an Protein, Gesamtesterase und besonders an Ca. Diese Fraktion enthält auch etwa 20% des AChs und ATPs. Bei Stimulation sinkt der Ca-Gehalt der Membranfraktion hochsignifikant. Auch die spezifische Ca-Konzentration der löslichen Fraktion, die vor allem Ca^{++} enthält, das während der Präpa-

F	Protein	Azetyl- Cholin	ATP	Gesamt- esterase	Lithium	Natrium	Kalium	Magnesium	Kalzium	Zink
1	GK ,080±,014	2,47±1,33	0,83±0,37	370±126	14,64±3,15	136,86±20,98	15,55±2,95	6,40±0,90	58,0±9,6	1,22±0,17
1	GS ,111±,031	0,52±0,12	0,26±0,06	293±82	21,01±4,36	100,56±21,80	11,89±2,18	3,79±0,70	29,1±4,3	1,36±0,25
1	NK	0,16±0,09	0,14±0,06				18,59±5,67	6,47±1,65	47,3±9,9	
2	GK ,059±,007	7,53±1,33	2,81±0,67	255±66	4,48±0,52	29,99±7,21	5,89±1,29	2,78±0,22	23,7±3,0	1,16±0,43
2	GS ,063±,012	0,71±0,12	0,22±0,04	375±126	6,02±0,49	19,07±3,78	3,07±0,44	2,67±0,35	16,3±3,5	0,69±0,13
2	NK	0,76±0,33	0,30±0,10				3,88±0,97	2,01±0,52	14,4±4,1	
3	GK ,228±,038	51,20±10,16	11,85±1,68	939±204	10,62±1,01	76,62±17,76	9,74±1,93	6,01±0,91	61,5±11,8	5,39±1,87
3	GS ,216±,042	4,60±1,17	1,07±0,34	776±162	12,70±1,16	44,71±10,66	6,31±1,27	8,88±1,43	41,8±7,7	2,76±0,64
3	NK	49,41±9,66	10,22±2,99				13,71±3,67	3,98±0,75	16,4±3,2	
4	GK ,103±,011	7,55±1,51	1,48±0,20	386±78	1,89±0,59	23,44±10,63	2,62±0,89	1,29±0,17	27,9±5,2	2,77±1,05
4	GS ,095±,011	0,90±0,24	0,21±0,05	268±69	1,49±0,21	8,68±2,30	1,02±0,19	1,95±0,23	11,3±1,8	1,16±0,29
4	NK	9,00±2,13	2,68±0,66				5,53±1,70	3,00±0,93	10,9±2,4	
5	GK ,731±,082	13,16±1,98	2,55±0,35	3205±857	4,49±0,40	43,17±24,74	5,71±2,42	3,09±0,35	154,6±28,5	3,15±1,26
5	GS ,767±,061	2,93±1,03	0,50±0,21	2392±476	4,78±0,45	10,28±1,68	1,97±0,25	6,99±0,74	34,5±4,5	0,95±0,23
5	NK	20,11±3,78	5,48±1,11				4,36±1,29	6,46±2,72	79,4±20,2	
6	GK ,133±,030	1,15±0,26	0,40±0,07	254±83	3,18±1,90	19,03±12,51	2,20±1,00	0,22±0,08	41,2±10,3	1,60±0,65
6	GS ,090±,018	0,13±0,04	0,20±0,04	97±31	2,39±1,18	7,91±3,77	1,22±0,66	0,19±0,96	7,4±3,4	1,58±0,47
6	NK	0,33±0,12	0,36±0,11				12,58±4,72	1,51±0,66	5,7±2,8	
	GK	10	15	15	4	15	15	15	15	15
	GS	9	9	9	4	9	9	9	9	9
	NK	5	4	8	4	9	8	8	8	9

Tabelle 4: Spezifische Konzentrationen der mit dem P₃ beladenen Gradienten vom Typ III in nmol/g Gewebe, Protein in mg/g Gewebe. F: Fraktionsnummer. Fraktion 1: "lösliche Fraktion", Fraktion 3: Vesikel-fraktion, Fraktion 5: Membranfraktion. In Spalte 2 bedeuten GK: Glycinpräparation, Kontrollorgane, GS: Glycinpräparation, stimulierte Organe, NK: Natriumchloridpräparation, Kontrollorgane (vgl. Kap. 4.3.1.). Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. In der letzten Zeile ist die Zahl der Gradienten angegeben, die auf die jeweilige Komponente untersucht wurden. Das Lithium ist nicht endogen, sondern wurde während der Präparation und Ca-Abnahme in der Membranfraktion unterbedingte Ach- und ATP-Abnahme in der Vesikelfraktion und die Mg-Abnahme in der löslichen Fraktion sind signifikant, die Li-Zunahme in der Vesikelfraktion und die Mg-Abnahme in der löslichen Fraktion sind signifikant, und die Mg-Zunahme in den schweren Fraktionen fällt fast in den Signifikanzbereich (Fraktion 3: p = 0,08, Fraktion 4: p = 0,03) oder ist sogar hochsignifikant (Fraktion 5: p = 0,0001).

GEHALT DER FRAKTIONEN

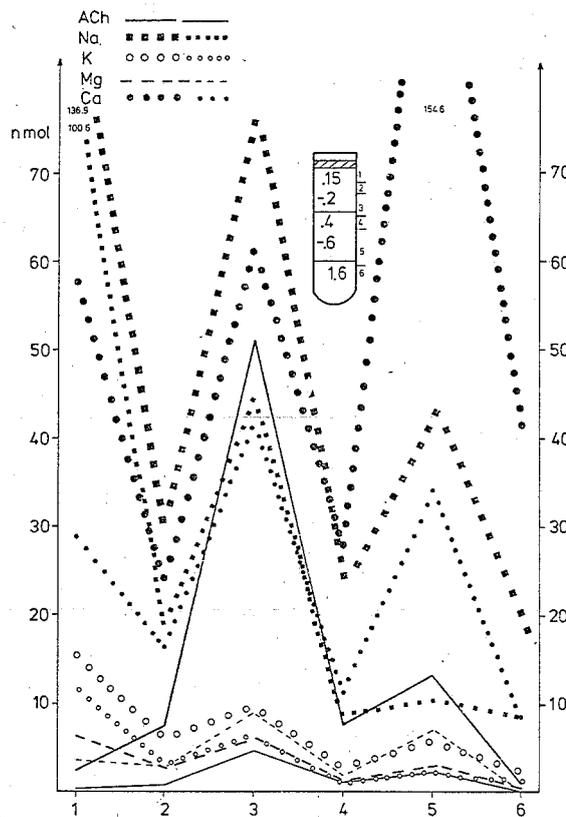


Abb. 30: Spezifische Konzentrationen des mit dem P_3^+ beladenen Glycingradienten Typ III in nmol/g Gewebe. Die großen Symbole und fetten Kurven beziehen sich auf die Kontrollorgane (Mittelwerte aus 15 Gradienten), die kleinen Symbole und mageren Striche auf die stimulierten Organe (Mittelwerte aus 9 Gradienten). Die ACh-Abnahme, die Ca-Abnahme und die Mg-Abnahme (Fraktion 1) bzw. Mg-Zunahme (Fraktion 3 - 5) als Folgen der Stimulation sind statistisch signifikant.

ration von anderen Strukturen abgegeben wurde, sinkt infolge der Stimulation deutlich, während der Ca-Gehalt der Vesikelfraktionen weniger stark abnimmt; vermutlich durch eine überlagerte Aufnahme von Ca-Ionen in die synaptischen Vesikel (vgl. unten).

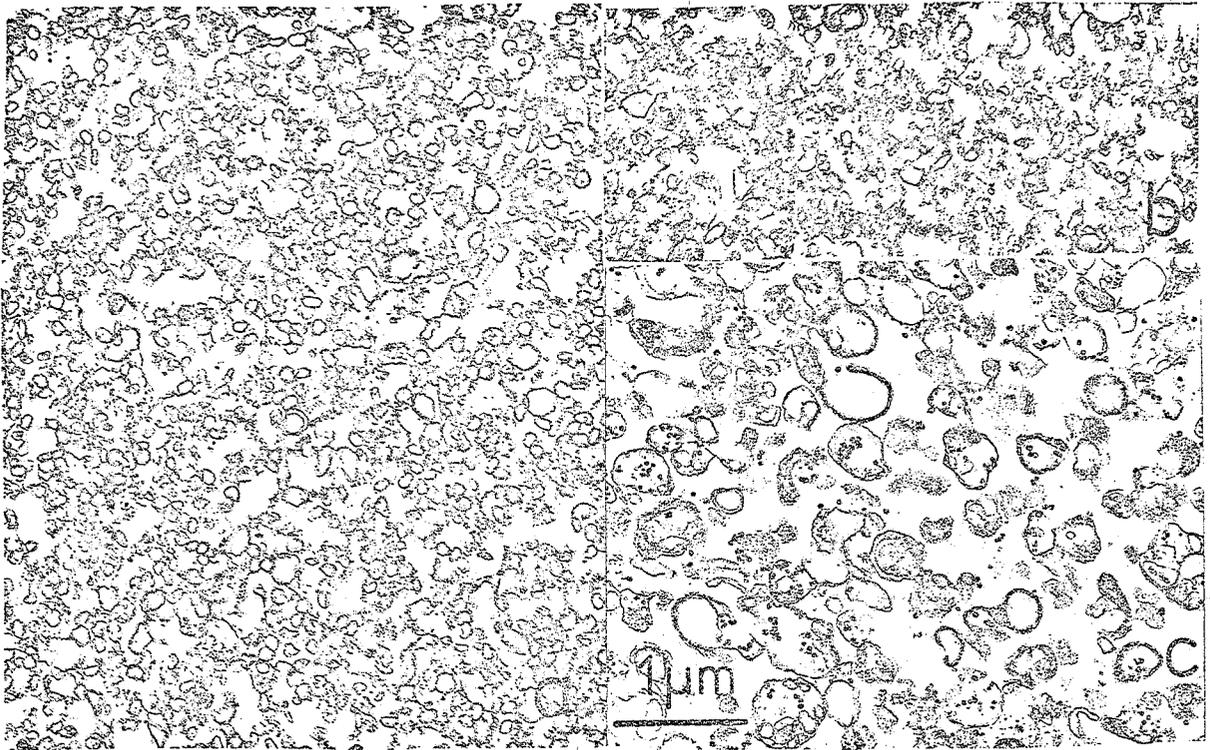


Abb. 31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der subzellulären Fraktionen von Glycin-Dichtegradienten. Vergrößerung: 18000fach.

a) Vesikelfraktion, unstimuliertes elektrisches Organ.

b) Vesikelfraktion, stimuliertes elektrisches Organ. Die synaptischen Vesikel sind kleiner, und es finden sich mehr Verunreinigungen durch größere Membranfragmente als in a).

c) Membranfraktion (stimuliertes Organ): Die größeren Membranfragmente sind häufig geschlossen und enthalten vielfach synaptische Vesikel sowie z.T. Mitochondrien (sind also Synaptosomen). Daneben finden sich freie synaptische Vesikel, die wahrscheinlich aus aufgeplatzten Synaptosomen stammen. Die zahlreichen kleinen, elektronendichten Partikel deuten auf einen hohen Gehalt an präsynaptischem Material, vgl. Abb. 2. Die Membranfraktion des unstimulierten Organs unterscheidet sich ultrastrukturell nicht von der des stimulierten Organs.

Magnesium wird bei Stimulation durch die in den Fraktionen 3 - 5 anwesenden Partikel signifikant aufgenommen. Die Konzentrationsänderungen der anderen Metallionen sind nicht signifikant.

Die logarithmische Auftragung (Abb. 32) zeigt, daß nach Stimulation die Fraktionen 1 und 5 relativ zu den Fraktionen 2 - 4 reicher an ACh sind (zu den logarithmischen Auftragungen vgl. Kap. 3.12.). Dies kann durch eine Neubildung sehr leichter ACh-haltiger Vesikel erklärt werden, die bevorzugt in schwere Strukturen eingeschlossen werden (möglicherweise durch ihren Entstehungsort bedingt), oder durch eine stärkere ACh-Freisetzung aus den "typischen" Vesikeln der Fraktionen 2 - 4.

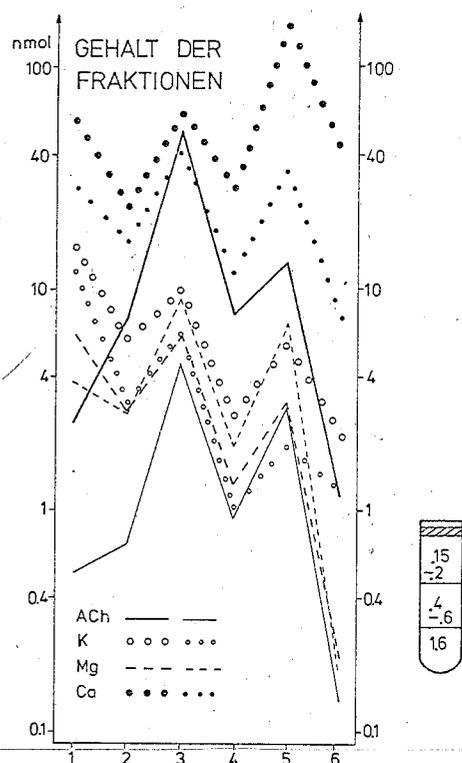


Abb. 32: Logarithmische Auftragung der spezifischen Konzentrationen für die P_3^+ -beladenen Glycingradienten des Typs III. Vergleiche Legende zu Abb. 30.

Die ATP-Verteilung ist der ACh-Verteilung weitgehend parallel, allerdings sind die leichteren Vesikel etwas reicher an ATP (Abb. 33). Nach Stimulation haben die synaptischen Vesikel 91,8% des ACh's und 92,3% des ATP's verloren. Die ATP-reichen

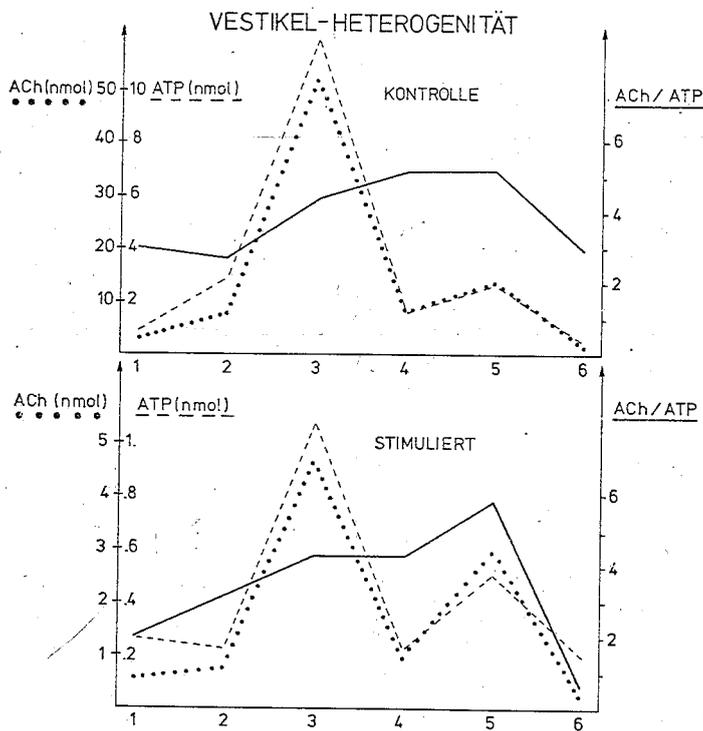


Abb. 33: Spezifische ACh- und ATP-Konzentrationen in den P_3^+ -beladenen Glycingradienten des Typs III (linke Skalen) und ACh/ATP-Verhältnis (rechte Skalen). Die Skalen der ACh- und ATP-Konzentrationen (links) für die stimulierten Organe (unten) sind um den Faktor 10 gegenüber den Skalen für die Kontrollorgane (oben) gedehnt. Die leichteren Vesikel haben ein kleineres ACh/ATP-Verhältnis. Mittelwerte aus 15 (Kontrollseiten) bzw. 9 (Stimulationsseiten) Gradienten. Die Standardabweichungen der Mittelwerte betragen etwa 20% der Absolutwerte.

Vesikel der Fraktion 2 haben dabei etwas mehr ATP, die ACh-reicheren Vesikel der Fraktion 4 dagegen etwas mehr ACh freigesetzt (Abb. 34), wie es für einen exozytotischen Vorgang zu erwarten wäre. Die synaptischen Vesikel der Peak-Fraktion (3) verlieren deutlich mehr ihres ACh's und ATP's als jene der Membranfraktion (5). Die Veränderungen im Proteingehalt (Abb. 34) sind gering, allerdings nimmt das Ausmaß der Konta-

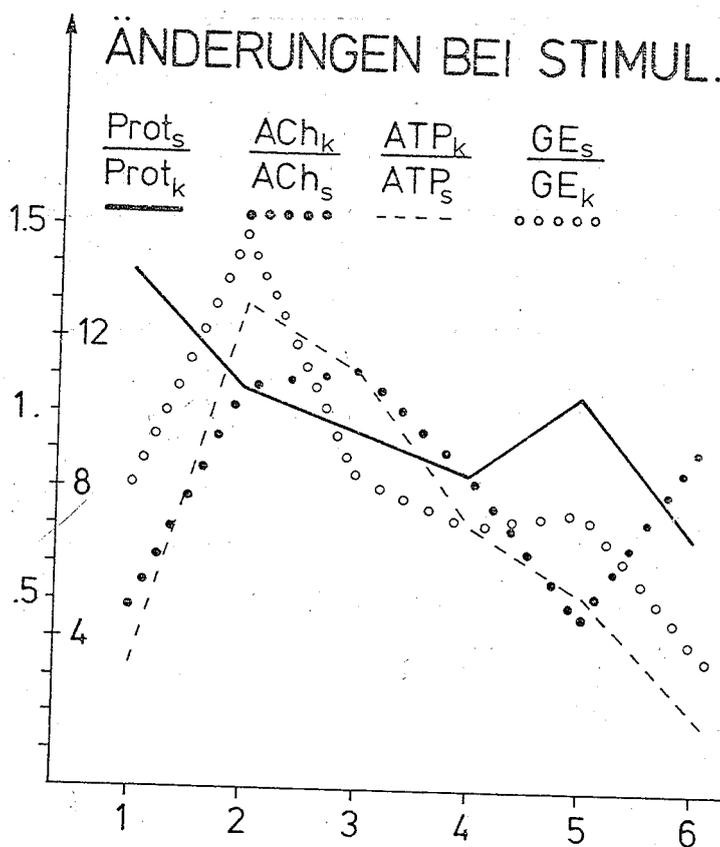


Abb. 34: Relative Konzentrationsänderungen als Folge der elektrischen Stimulation (P_3^+ -beladene Glycingradienten, Typ III). Für das Protein und die Gesamtesterase sind die Stimulationswerte durch die Kontrollwerte dividiert (äußere Skala), für das ACh und ATP hingegen die Kontrollwerte durch die der stimulierten Organe (innere Skala). Mittelwerte aus 8 - 15 Gradienten. Vgl. Text.

F	Azetyl- cholin	ATP	Gesamt- esterase	Lithium	Natrium	Kalium	Magnesium	Kalzium	Zink
1	GK 0,56±0,23	0,69±0,22	1,03±0,14	9,17±2,48	13,16±2,23	11,19±1,63	10,03±2,45	4,47±0,72	4,36±0,83
1	GS 0,10±0,19	2,29±0,36	1,04±0,23	7,62±2,76	12,81±2,00	11,09±1,65	3,47±0,89	3,94±0,59	4,38±1,21
2	GK 1,44±0,24	2,08±0,30	1,14±0,07	3,35±0,72	2,17±0,40	3,35±0,44	2,91±0,23	1,40±0,06	1,54±0,51
2	GS 2,13±0,37	2,69±0,44	2,00±0,39	3,05±0,38	2,69±0,46	3,19±0,45	2,72±0,31	2,88±0,54	2,05±0,46
3	GK 3,72±0,31	3,86±0,27	1,26±0,09	1,45±0,21	1,39±0,09	1,50±0,13	1,96±0,08	1,11±0,04	1,79±0,21
3	GS 3,36±0,16	3,08±0,14	1,38±0,16	1,56±0,35	1,64±0,23	1,50±0,27	2,50±0,17	2,04±0,16	2,31±0,30
4	GK 1,33±0,15	1,19±0,11	1,04±0,09	0,61±0,16	0,64±0,14	0,56±0,05	0,82±0,08	0,99±0,05	2,09±0,46
4	GS 1,25±0,23	1,34±0,11	0,88±0,12	0,42±0,06	0,65±0,12	0,63±0,11	1,13±0,09	1,17±0,10	2,03±0,38
5	GK 0,42±0,05	0,31±0,03	1,02±0,04	0,23±0,02	0,21±0,06	0,18±0,01	0,30±0,02	0,78±0,04	0,28±0,06
5	GS 0,45±0,08	0,27±0,07	0,93±0,05	0,20±0,02	0,11±0,02	0,17±0,04	0,49±0,04	0,45±0,03	0,23±0,06
6	GK 0,19±0,05	0,21±0,03	0,59±0,15	0,41±0,24	0,70±0,30	0,35±0,14	0,06±0,03	0,99±0,27	2,56±0,99
6	GS 0,27±0,09	1,52±0,20	0,66±0,32	0,88±0,48	0,67±0,28	0,78±0,35	0,20±0,12	0,72±0,16	2,74±0,53
	GK 11	11	9	4	11	11	11	11	11
	GS 9	9	8	4	9	9	9	9	9

Tabella 5: RSK-Werte für die P₃⁺-beladenen Glycingradienten, Typ III.
Vergleiche Legende zu Tabella 4.

mination nach Stimulation zu (vgl. Abb. 31b). Ein Teil der membrangebundenen Esterasen (Frakt. 5) ist durch die Stimulation abgelöst worden und wird jetzt in Fraktion 2 wiedergefunden (Abb. 34 und Tabelle 4).

Die RSK-Werte nehmen für alle Metallionen (außer Zn) kontinuierlich von Fraktion 1 bis 5 ab (Tabelle 5), bedingt durch den Überschuß an freien Ionen in den ersten Fraktionen. Die Unterschiede in der relativen (!) Verteilung der Alkalimetalle sind sowohl vor als auch nach der Stimulation sehr gering. Da das Lithium während der Präparation zugesetzt wurde, muß geschlossen werden, daß etwaige spezifische Bindungsverhältnisse für Alkalimetalle in den Fraktionen 1 - 5 während der Auftrennung nicht beibehalten werden können. Die zweiwertigen Ionen zeigen als Folge der Stimulation eine Umverteilung in die Vesikelfraktion, die mit einer Abnahme der RSK-Werte der löslichen Fraktion (Mg) beziehungsweise Membranfraktion (Ca) einhergeht. Trägt man das Verhältnis der RSK-Werte der Kontrollorgane zu jenen der stimulierten Organe (Tabelle 6) gegen das Ionenpotential auf (Abb. 35), so findet man ausschließlich für die Vesikelfraktion die bereits bei der Analyse der Vorfraktionen festgestellte lineare Abhängigkeit. Aufgrund der starken Konzentrationsabnahme in Fraktion 5 fällt der Wert für Kalzium (und Natrium) zu niedrig aus. Wie in Kap. 4.1. wird geschlossen, daß die negativen Ladungen in der Vesikelfraktion infolge der elektrischen Stimulation zunehmen, und ein negativer Ladungsüberschuß der Vesikelfraktion unspezifisch kompensiert werden muß.

X \ F	1	2	3	4	5	6	S ₃ ⁺	z/r
K ⁺	1.009	1.050	1.000	.889	1.059	.449	.997	.752
Na ⁺	1.027	.807	.848	.985	1.909	1.045	.931	1.179
Li ⁺	1.203	1.098	.929	1.452	1.150	.466	.9175	1.282
Ca ²⁺	1.135	.486	.544	.846	1.733	1.375	1.064	1.886
Mg ²⁺	2.982	1.070	.784	.726	.612	.300	.874	2.364
Zn ²⁺	.995	.751	.775	1.030	1.217	.934	.755	2.41

Tabelle 6: Verhältnis der RSK-Werte $RSK_X(\text{unstim.})/RSK_X(\text{stim.})$ für die verschiedenen Ionen X in den Fraktionen F. Für die Waschlösung S₃⁺ ist der entsprechende Kehrwert $RSK_X(\text{stim.})/RSK_X(\text{unstim.})$ angegeben. In der letzten Spalte ist das Ionenpotential z/r tabelliert.

Von Fraktion 5 zu Fraktion 6 steigen die RSK-Werte wieder an (Tabelle 5), was auf die Bildung sehr schwerer, membranumgebener Strukturen hinweist, welche freie Ionen eingeschlossen haben. Die logarithmische Auftragung (Abb. 32) zeigt, daß die Verteilung des Kaliums und Magnesiums (mit Ausnahme der freien Ionen in den Fraktionen 1 und 2 und den Ionen der sehr schweren Strukturen in Fraktion 6) der ACh-Verteilung gut proportional ist. Das gleiche gilt für Li und Na, sowie - weniger exakt - für Zn. Es kann daher angenommen werden, daß diese Ionen gemeinsam mit den synaptischen Vesikeln auftreten, während das Kalzium (vor Stimulation) außerdem zu einem größeren Teil an andere Partikel gebunden ist (Fraktion 5, s.u.). In der gesamten Vesikelfraktion der Typ III-Gradienten sinkt der Natrium-, Kalium- und Zink-Gehalt bei Stimulation

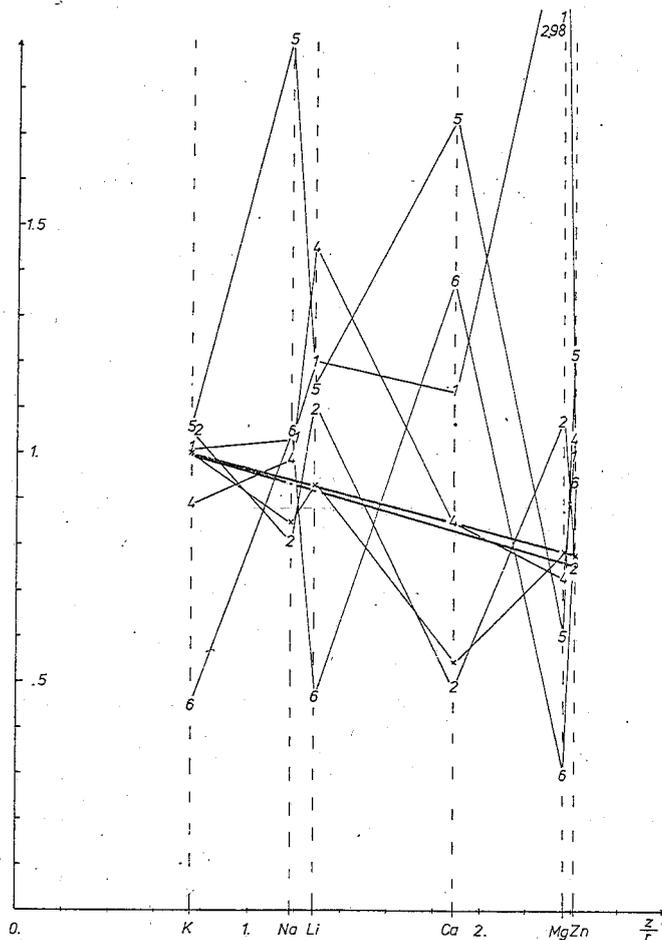


Abb. 35: Verhältnisse der RSK-Werte nach Tabelle 6 in Abhängigkeit vom Ionenpotential z/r . Nur für die Waschlösung S_3^+ (Punkte) und die Vesikelfraktion (Kreuze) läßt sich in guter Näherung eine lineare Abhängigkeit feststellen (dick eingezeichnete Geraden. Die Abweichungen von der Linearität sind im Text besprochen.). Für die übrigen Fraktionen (durch dünne Kurven verbundene Zahlen) läßt sich kein einfach verständlicher Zusammenhang feststellen.

um ca. 40%, aber dieser Abfall ist nicht signifikant. Er kann durch eine Abnahme der Vesikelzahl erklärt werden (vgl. Diskussion, S. 130 ff). Im Gegensatz zu den anderen Ionen werden Li und besonders Mg infolge der Stimulation signifikant von den Vesikeln aufgenommen (50% Zunahme für Mg).

Ein genauer Vergleich zeigt (Abb. 32), daß die Steigungen jener Kurven, die die stimulierten Proben der Fraktion 3 und 4 verbinden, besser mit den Kontrollwerten der ACh-Bestimmung parallelgehen, als mit denen der stimulierten Proben. Ferner zeigt sich, daß der Na-, K- und Ca-Verlust in der Vesikelfraktion geringer und die Li-Aufnahme größer sind als in den Nachbarfraktionen. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Quotienten aus den spezifischen Konzentrationen nach und vor der Stimulation aufträgt (Abb. 36). Die Vesikelfraktion zeigt für alle Ionen einen Peak oder - durch Auswascheffekte verringert - eine Schulter. Diese unspezifische Ionenaufnahme kann am besten als Ionenaustausch interpretiert werden (vgl. Diskussion, S. 130 ff). Die Tatsache, daß allein für Mg eine signifikante Aufnahme in die synaptischen Vesikel gezeigt werden kann, muß nicht bedeuten, daß diese Aufnahme spezifisch ist, denn

1. besitzt Mg ein viel höheres Ionenpotential als Na oder K,
2. sind die Vesikelmembranen für die Alkalimetallionen offenbar besser permeabel (vgl. die Hinweise auf Auswascheffekte, S. 81 f, 93),
3. kann Mg mit Hilfe der AAS besonders genau bestimmt werden,
4. sind die Ausbeuten für Mg besser als für die anderen Ionen,
5. gibt es bei Mg keine Kontaminationsprobleme durch Ionen aus anderen Fraktionen, Staub oder Ablösung von den Gefäßen.

Die Abbildung 36 zeigt weiterhin eine exakte Kovarianz zwischen

ÄNDERUNGEN DES IONENGEHALTES BEI STIMULATION

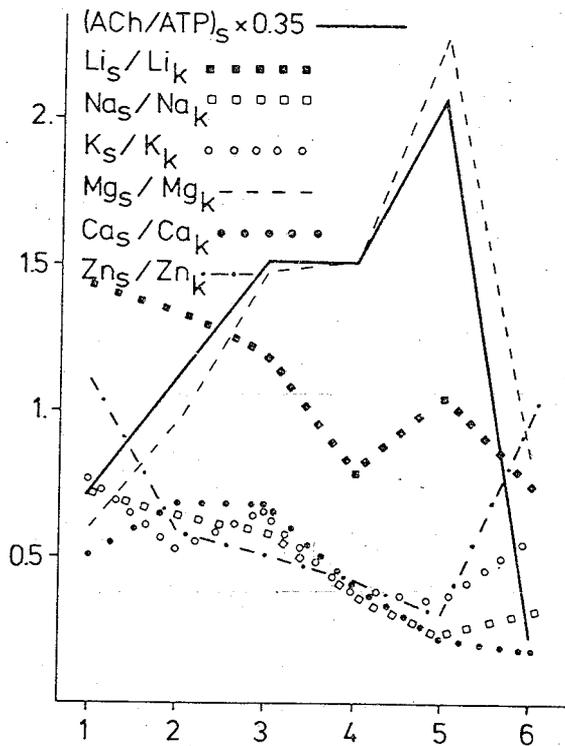


Abb. 36: Veränderungen der spezifischen Ionenkonzentrationen als Folge der elektrischen Stimulation und Kovarianz der Mg-Zunahme mit dem ACh/ATP-Verhältnis nach der Stimulation. Der Index s steht für stimulierte Organe, k für Kontrollorgane. Vgl. Text.

4.2.3. P_3^+ -beladene Glycingradienten des Typs II

Im Gegensatz zu den Meßwerten für die Gradienten des Typs III (7 Experimente), stammen die Meßwerte der Typ II-Gradienten von nur 4 Versuchstieren. Der hochaufgelöste Vesikelpeak erstreckt sich über die Fraktionen 4 bis 6, die Hauptmenge der freigelösten Komponenten findet sich in den Fraktionen 1 und 2, und

F	Protein	Azetyl- cholin	ATP	Gesamt- esterase	Lithium	Natrium	Kalium	Magnesium	Kalzium	Zink
1	GK ,022±,007	0,40±0,14	0,10±0,03	102± 30	8,79±2,08	57,85± 9,75	6,77±1,32	5,37±1,12	45,87± 8,86	0,41±0,09
1	GS ,047±,022	0,14±0,04	0,11±0,03	61± 22	12,29±2,53	77,22±15,77	8,59±1,67	1,71±0,46	11,15± 2,62	0,83±0,22
2	GK ,062±,013	0,76±0,30	0,16±0,04	390±154	5,85±1,07	38,59± 9,71	4,63±0,80	2,84±0,57	37,03± 5,60	0,55±0,17
2	GS ,090±,026	0,25±0,07	0,09±0,02	291± 86	8,72±1,89	43,51± 8,66	5,01±0,93	1,96±0,50	20,88± 4,62	0,42±0,20
3	GK ,053±,009	4,66±1,31	1,35±0,46	313± 90	4,48±0,52	20,96± 4,99	3,87±0,80	2,91±0,38	28,88± 5,59	0,39±0,15
3	GS ,061±,009	0,73±0,16	0,19±0,39	481±144	6,02±0,49	23,07± 3,53	3,61±0,35	3,00±0,36	19,10± 3,97	0,78±0,15
4	GK ,079±,026	22,44±7,55	3,36±0,91	425±116	2,83±0,10	17,90± 4,72	2,82±0,43	2,95±0,40	28,43± 4,86	0,51±0,06
4	GS ,082±,013	1,90±0,62	0,48±0,14	323± 60	4,08±0,20	19,60± 4,02	2,98±0,52	3,72±0,50	16,27± 2,56	1,01±0,27
5	GK ,087±,012	21,58±8,50	4,19±1,89	398± 74	2,15±0,96	22,62± 5,77	2,72±0,54	3,05±0,48	33,02± 4,79	0,70±0,20
5	GS ,080±,007	2,08±0,58	0,49±0,23	336± 54	3,49±0,76	20,49± 5,02	2,96±0,59	3,94±0,46	18,21± 2,58	1,16±0,28
6	GK ,103±,023	19,86±5,21	2,69±0,53	423± 64	5,64±1,48	16,27± 3,31	2,22±0,21	2,34±0,31	34,89± 7,05	0,52±0,11
6	GS ,112±,028	1,23±0,32	0,25±0,08	331± 37	5,13±1,25	15,26± 2,68	2,06±0,27	3,05±0,27	16,30± 2,45	1,10±0,28
7	GK ,111±,015	10,48±2,38	1,34±0,24	494± 88	1,89±0,59	12,53± 3,71	1,19±0,21	1,75±0,25	42,31± 7,85	0,76±0,15
7	GS ,106±,015	0,70±0,19	0,19±0,06	333± 74	1,49±0,21	10,27± 2,67	1,08±0,24	2,27±0,11	12,47± 2,02	1,32±0,35
8	GK ,752±,096	17,33±2,00	2,15±0,26	4184±108	4,49±0,40	13,60± 2,20	2,22±0,17	3,90±0,46	226,49±45,35	0,67±0,18
8	GS ,765±,091	1,42±0,28	0,19±0,07	2838±513	4,78±0,45	11,20± 2,02	1,79±0,21	7,48±0,82	35,36± 5,46	0,95±0,30
8	NK	14,06±3,42	3,80±0,90				1,73±0,44	3,93±1,39	44,84± 9,14	0,78±0,02
9	GK ,153±,041	1,78±0,40	0,36±0,11	340±109	3,18±1,90	2,41± 0,86	0,37±0,21	0,13±0,08	65,30±16,97	0,82±0,19
9	GS ,094±,028	0,14±0,05	0,17±0,04	119± 38	2,39±1,18	7,74± 4,87	1,36±0,85	0,14±0,08	7,69± 4,39	1,79±0,56
9	NK	0,33±0,12	0,36±0,11				12,58±4,72	1,51±0,66	5,66± 2,83	0,69±0,04
	GK GS NK	7 7 5	7 7 4	6 6	4 4	7 7	7 7 8	7 7 8	7 7 8	7 7 2

Tabelle 7: Spezifische Konzentrationen des P₃-beladenen Glycingradienten vom Typ II. Lösliche Fraktion: 1-2, Vesikelfraktion: 4-6, Membranfraktion: 8. Die Symbolik ist dieselbe wie in Tabelle 4.

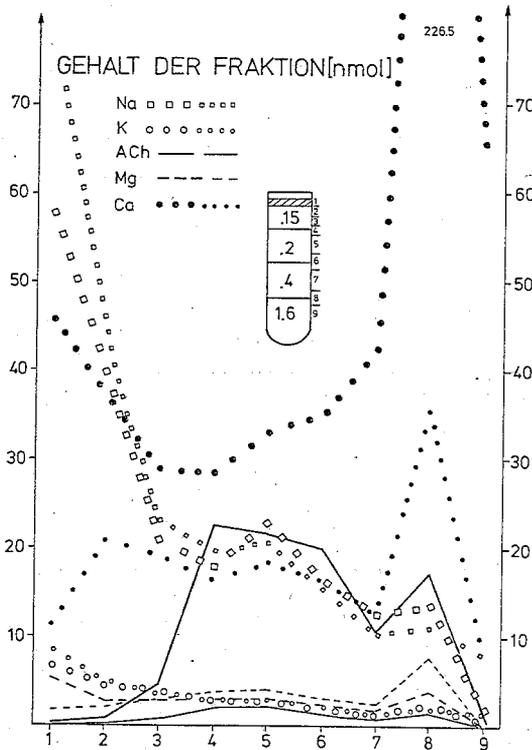


Abb. 37: Spezifische Konzentrationen des P_3^+ -beladenen Glycingradienten, Typ II, in nmol/g Gewebe. Die großen Symbole und fetten Kurven beziehen sich auf die Kontrollorgane, die kleinen Symbole und dünnen Kurven auf die stimulierten Organe. Mittelwerte aus 7 Gradienten.

die schweren Partikel sind in Fraktion 8 angereichert (Abb. 37 und 38). Die Meßwerte sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Auch hier machen die logarithmischen Auftragungen deutlich, daß sich das Ca der unstimulierten Organe analog dem Protein und den Esterasen der schweren Strukturen verteilt (Abb. 39), während die übrigen Ionen an die synaptischen Vesikel gebunden sind (Abb. 40, der Übersichtlichkeit halber sind nur Na, K und Mg

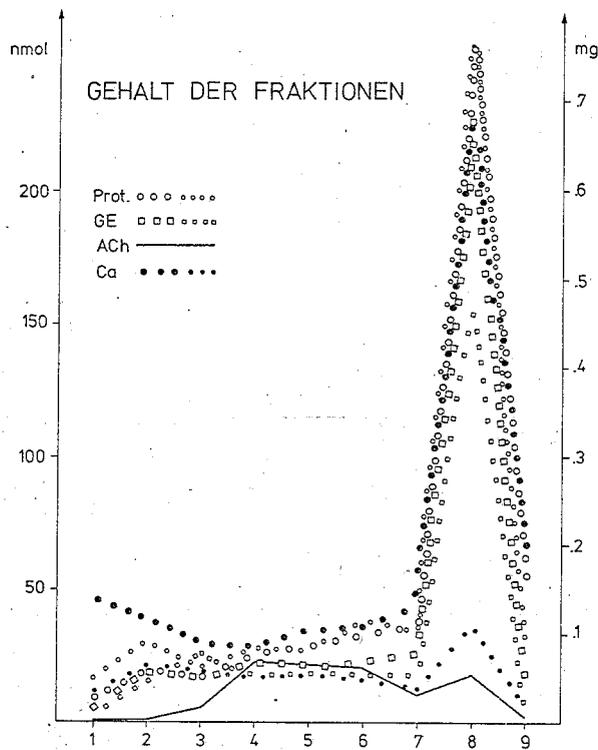


Abb. 38: Spezifische Konzentrationen des P_3^+ -beladenen Glycingradienten, Typ II. Prot.: Protein in mg/g Gewebe (rechte Skala), GE: Gesamtesterase (6 Gradienten, Relativwerte). Im übrigen vergleiche Legende zu Abb. 37.

eingetragen). Abb. 39 zeigt, daß sich jedoch auch das Ca der stimulierten Organe analog den anderen Ionen und dem ACh verteilt (zum Vergleich sind die Mg-Werte eingetragen), nachdem die schweren Membranen 85% ihres Kalziums verloren haben.

Die Gradienten des Typs II dienen der Untersuchung der Vesikelheterogenität: Das ACh:ATP-Verhältnis ist für die schwereren

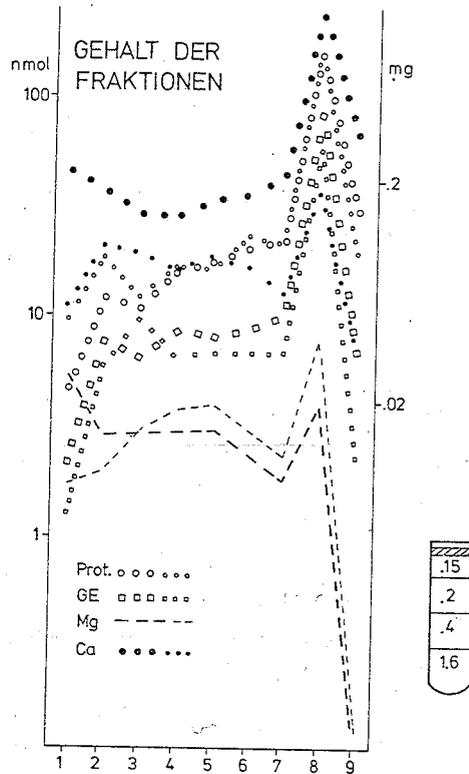


Abb. 39: Logarithmische Auftragung der spezifischen Konzentrationen für die P_3^+ -beladenen Glycinegradienten des Typs II. Vor der Stimulation verteilt sich das Ca analog dem Protein (Prot.) und der Gesamtsterase (GE), nach der Stimulation analog dem Mg. Die Proteinwerte beziehen sich auf die rechte Skala.

Vesikel der Fraktionen 6, 7 und 8 (z.T. in Synaptosomen eingeschlossen) höher als für die leichten synaptischen Vesikel (Abb. 41, oben). Nach Stimulation sinkt das ACh:ATP-Verhältnis im gesamten Vesikelpeak (Fraktionen 4 - 6), nicht jedoch bei den Vesikeln der schweren Membranfraktion (Abb. 41). Gleichzeitig erkennt man eine Verschiebung des Vesikelpeaks zu

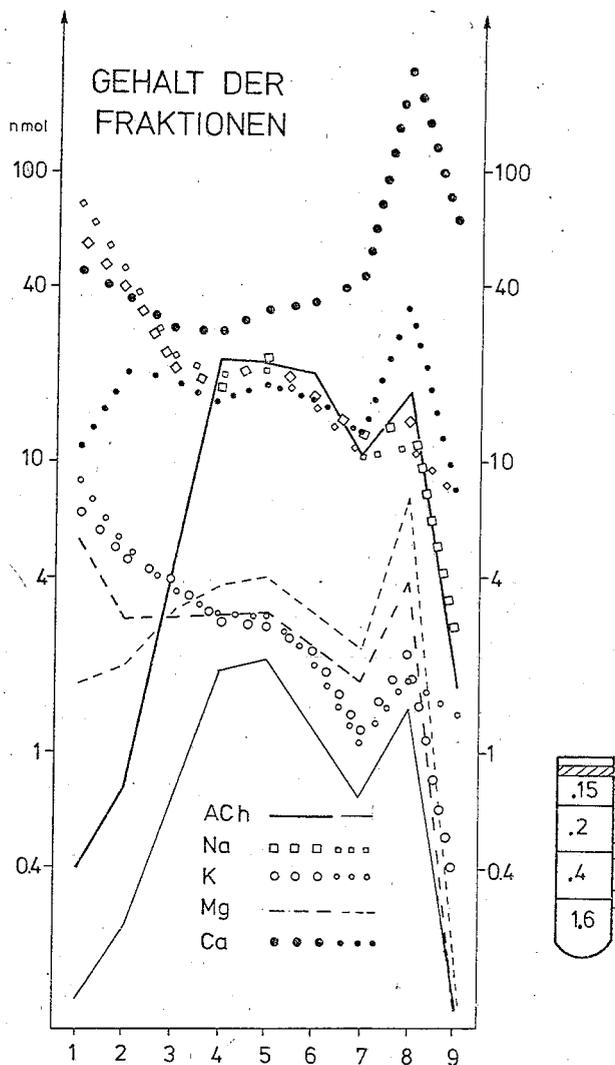


Abb. 40: Logarithmische Auftragung der spezifischen Konzentrationen der P_3^+ -beladenen Glycingradienten vom Typ II. Im Bereich der Vesikelfraktionen (4 - 6) ist die Verteilung der Metallkationen (außer den Kontrollwerten für Ca) der ACh-Verteilung proportional.

leichteren Fraktionen. Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigt, daß nach Stimulation mehr kleinere synaptische Vesikel gefunden werden (Abb. 31b), und daß sich diese kleineren Vesikel bevorzugt in der Fraktion 4 wiederfinden; sie sind zugleich jene Vesikel, die ein kleineres ACh:ATP-Verhältnis besitzen.

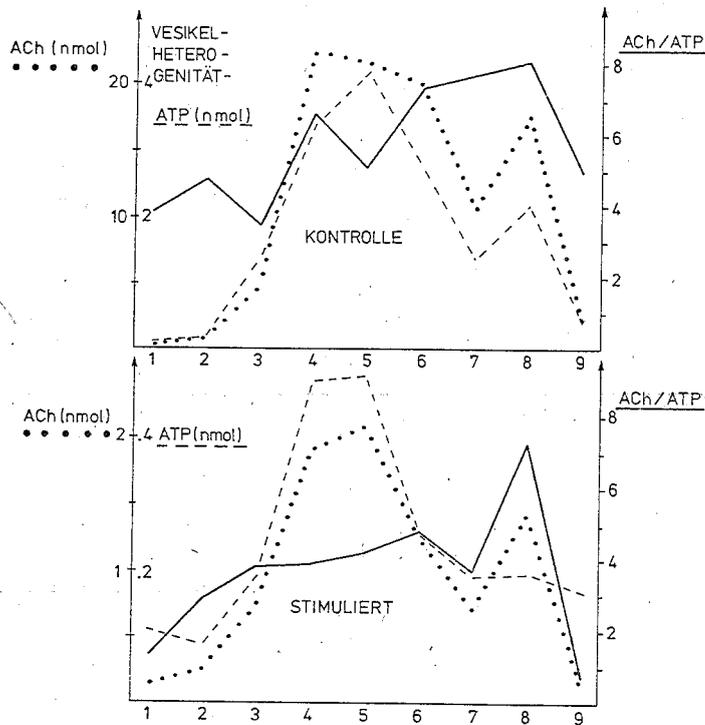


Abb. 41: Spezifische ACh- und ATP-Konzentrationen in den P_3^+ -beladenen Glycyngradienten des Typs II (linke Skalen) und ACh/ATP-Verhältnis (rechte Skala). Die Skalen der ACh- und ATP-Konzentrationen (links) für die stimulierten Organe (unten) sind um den Faktor 10 gegenüber den Skalen für die Kontrollorgane gedehnt. Mittelwerte aus 7 Gradienten.

Abb. 42 verdeutlicht die besonders hohe metabolische Aktivität der schwereren, freien synaptischen Vesikel in Fraktion 6. Zugleich zeigt sie den schon erwähnten Solubilisierungseffekt auf die Gesamtesterase.

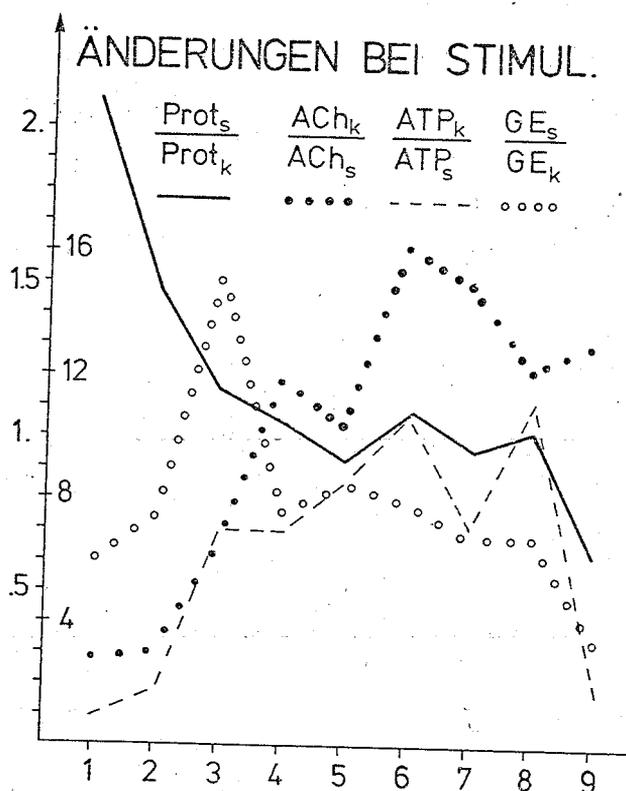


Abb. 42: Relative Konzentrationsänderungen als Folge der elektrischen Reizung (P_3^+ -beladene Glycingradienten, Typ II). Für das Protein (Prot.) und die Gesamtesterase (GE) sind die Stimulationswerte durch die Kontrollwerte dividiert (äußere Skala), für das ACh und ATP hingegen die Kontrollwerte durch die der stimulierten Organe (innere Skala). Mittelwerte aus 6 (GE) bzw. 7 Gradienten.

Abb. 43 zeigt die Kovarianz zwischen Mg-Aufnahme und dem ACh: ATP-Verhältnis nach der Stimulation. Ferner zeigt sie, daß sich nach Stimulation 3- bis 4mal mehr an jenen sehr schweren Strukturen bildet, die Na und K in einem festen Verhältnis aufnehmen (ca. 10 Na-Ionen pro Kalium-Ion). Möglicherweise

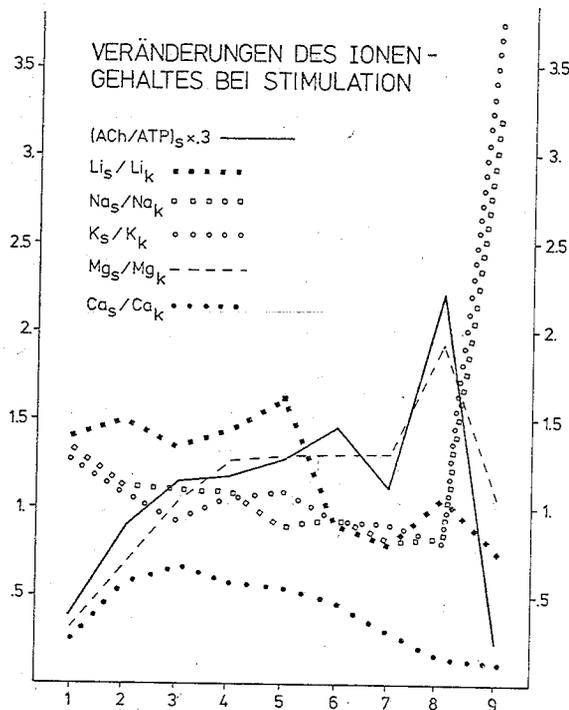


Abb. 43: Veränderungen der spezifischen Ionenkonzentrationen als Folge der elektrischen Reizung und Kovarianz der Mg-Zunahme mit dem ACh/ATP-Verhältnis nach der Stimulation (P_3^+ -beladene Glycingradienten, Typ II). s bedeutet stimuliert, k bedeutet Kontrollwert.

handelt es sich um Abschnürungen jener Einstülpungen der präsynaptischen Membran, die aufgrund der Stimulation zunehmen (vgl. Diskussion, S. 117). Der Lithiumgehalt variiert in dieser Fraktion hingegen nicht. Für den Vesikelpeak läßt sich keine signifikante Heterogenität hinsichtlich der Metall-

F	Azetyl- cholin	ATP	Gesamt- esterase	Lithium	Natrium	Kalium	Magnesium	Kalzium	Zink									
1	GK 16,9± 5,3±	3,7 1,6	11,34± 6,05±	7,79 2,80	3641± 1460±	747 747	347,7± 368,5±	126,5 151,4	3790,5± 3258,3±	1028,7 683,7	478,1± 390,7±	142,3 97,0	520,8± 94,1±	291,5 50,6	3135± 481±	875 199	40,26± 44,15±	16,40 17,08
2	GK 11,2± 3,0±	3,8 0,6	3,13± 1,69±	0,80 0,67	6245± 4416±	1899 1341	76,4± 102,7±	19,0 41,2	664,6± 732,0±	131,7 156,8	91,6± 88,5±	18,7 20,5	52,1± 37,1±	13,4 16,7	740± 361±	134 90	12,48± 8,26±	4,89 6,29
3	GK 81,8± 13,6±	19,8 3,5	24,55± 3,70±	7,79 1,00	5462± 7882±	614 1448	68,7± 85,8±	10,2 5,2	398,4± 445,8±	86,3 61,2	76,6± 68,2±	14,2 5,2	57,1± 58,8±	4,0 9,8	523± 347±	32 62	7,02± 14,76±	2,87 3,62
4	GK 399,0± 22,1±	130,4 4,7	68,07± 5,73±	24,50 1,08	7303± 4605±	2010 498	32,6± 51,8±	7,5 13,1	253,8± 276,7±	54,3 53,4	46,4± 43,5±	6,7 7,7	50,9± 52,8±	8,3 6,3	463± 223±	69 25	10,13± 13,64±	2,64 3,24
5	GK 238,3± 26,4±	89,3 8,4	49,14± 6,87±	19,70 3,59	4984± 4418±	1110 729	18,3± 40,0±	7,8 11,2	239,1± 256,3±	43,1 59,9	32,1± 39,4±	5,6 8,7	34,7± 53,9±	3,0 8,1	382± 238±	40 35	7,83± 14,98±	1,82 3,67
6	GK 207,4± 12,0±	69,0 2,9	29,19± 2,78±	6,74 1,11	4458± 3896±	611 873	41,0± 41,0±	9,0 6,5	166,7± 165,7±	36,6 35,9	26,3± 23,7±	4,9 4,5	25,1± 33,8±	2,8 4,2	341± 173±	28 27	6,38± 11,41±	1,85 2,67
7	GK 89,4± 7,2±	16,0 2,3	13,05± 2,39±	2,83 1,15	4306± 2837±	318 379	13,0± 11,8±	3,3 1,1	102,1± 100,5±	30,2 26,0	11,3± 10,6±	2,3 2,0	16,4± 25,1±	1,8 4,0	365± 133±	35 33	7,94± 12,83±	2,27 3,70
8	GK 24,2± 2,0±	2,6 0,5	3,25± 0,34±	0,67 0,19	4929± 3483±	780 632	4,8± 5,6±	0,1 0,5	18,7± 14,9±	3,0 2,1	3,2± 2,5±	0,3 0,5	5,2± 9,8±	0,2 0,2	286± 48±	25 7	1,02± 1,30±	0,28 0,40
9	GK 13,1± 2,1±	2,6 0,7	2,89± 1,20	1,20 0,99	2241± 2094±	651 1063	10,2± 23,4±	6,0 2,1	16,2± 53,7±	8,1 25,6	3,0± 16,1±	2,1 8,8	0,4± 1,8±	0,3 1,3	473± 69±	122 21	6,72± 19,63±	1,92 3,12
	GK 7 7		7 7		6 6		4 4		7 7		7 7		7 7		7 7		7 7	

Tabellle 8: ASK-Werte der P₃-beladenen Glycingradienten, Typ II. Vergleiche Legende zu Tabelle 4.

kationen feststellen: möglicherweise sind die Vesikel der Fraktion 5 etwas ionenreicher als jene der Fraktion 4 (Abb. 37).

Auch die auf Protein bezogenen ASK-Werte der Tabelle 8 verdeutlichen die Ionenzunahme in der Vesikelfraktion 5 bei elektrischer Stimulation. Bei dieser Auswertungsmethodik erweist sich auch die Zunahme der Zinkkonzentration als fast signifikant ($p = 0,02$).

4.3. Untersuchung möglicher Artefakte und Berechnung der Konzentrationsverhältnisse in der Vesikelfraktion

4.3.1. Einflüsse des Suspensionsmediums

Soweit vergleichbare Meßwerte vorliegen, sind in Tabelle 4 für die Typ III-Gradienten und in Tabelle 7 für die Typ II-Gradienten auch jene Mittelwerte eingetragen, die von Kontrollorganen bei Benutzung von NaCl als Homogenisations-, Suspensions- und (zusammen mit Saccharose) Gradientenmedium erhalten werden. Während die Kalziumwerte - mit Ausnahme der ersten und der Vesikelfraktion (!) - denen der stimulierten Organe gleichen (Zeilen GS und NK der Tabellen), ähneln die übrigen Mittelwerte eher den Werten der Glycin-behandelten Kontrollorgane (Zeilen NK und GS). Im statistischen Vergleich der beiden Präparationsflüssigkeiten sind außer der markanten Kalziumabnahme lediglich der höhere Kalium- und Magnesiumgehalt der schwersten Fraktion, der höhere ATP-Gehalt der Membranfraktion und die kleinere ACh-Konzentration der Fraktion 2 signifikant verschieden. Zur Diskussion dieser Unterschiede vergleiche S. 116 und S. 138 ff.

4.3.2. Auswascheffekte

Nachdem der größte Teil der zytoplasmatischen Stoffe mit dem S_3 entfernt worden ist, wird der P_3 bzw. P_3^+ in einem Medium suspendiert, das zwar dem Zytoplasma der Versuchstiere isosmolar ist, das aber eine artefizielle Zusammensetzung besitzt. Die P_3^+ -Präparate sind diesen künstlichen Bedingungen längere Zeit ausgesetzt, so daß die induzierten Veränderungen durch einen Vergleich der P_3 - und P_3^+ -Gradienten erkannt werden können, wie es in Tabelle 9 exemplarisch für Kalzium und Natrium

F	Glycin - Präparationen				NaCl - Präparationen	
	Kalzium		Natrium		Kalzium	
	P_3	P_3^+	P_3	P_3^+	P_3	P_3^+
1	77,2	58,0± 9,6	850,6	136,9±21,0	95,9±13,4	47,3± 9,9
2	24,2	23,7± 3,0	338,3	30,0± 7,2	22,2± 6,0	14,4± 4,1
3	53,7	61,5±11,8	117,0	76,6±17,8	16,9± 5,3	16,4± 3,2
4	27,8	27,9± 5,2	26,3	23,4±10,6	10,9± 2,4	10,9± 2,4
5	185,7	154,6±28,5	59,1	43,2±24,7	83,0±21,0	79,4±20,2
6	22,2	41,2±10,3	10,1	19,0±12,5	2,9± 1,5	5,7± 2,8
	1	15	1	15	6	8

Tabelle 9: Vergleich der P_3 - und P_3^+ -Präparationen (Auswascheffekt) am Beispiel eines Alkali- und eines Erdalkalimetalls. F: Fraktionsnummer. Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen. In der letzten Zeile ist angegeben, wieviele Gradienten zur Mittelwertbildung verwendet wurden.

gezeigt ist. Die P_3 -Präparate enthalten mehr Ionen in der löslichen Fraktion (1 und z.T. 2), wahrscheinlich überwiegend

eingeschleppte freie Ionen des Zytoplasmas. Die übrigen Meßwerte sind für das Erdalkalimetall jeweils sehr ähnlich, während das Alkalimetall bei der P₃-Präparation auch in der Vesikelfraktion (3) höher konzentriert ist.

4.3.3. Gradienten des Typs I

Bildet man allein für die NaCl- und Glycin-Gradienten vom Typ I mit der hohen Auflösung im Bereich der schweren Saccharoselösungen die Mittelwerte, so findet man beim Dichtesprung von der 0,4 zur 0,6 molaren Zuckerlösung keinen ACh- und keinen Ionenpeak. Neben den elektronenmikroskopischen Bildern und der Tatsache, daß die Ionenkonzentration für die meisten Metalle in der Vesikelfraktion höher ist als in der Membranfraktion, stützt auch dieser Befund die Annahme, daß es sich bei den ionenhaltigen Partikeln der Vesikelfraktion keinesfalls um Bruchstücke der schweren Membranen handeln kann.

4.3.4. Konzentrationsverhältnisse in der Vesikelfraktion

Abschließend ist eine Aufstellung über die Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Ionen in der Vesikelfraktion angeführt, die die spezifischen Konzentrationen auf ACh (= 1) bezieht (Tabelle 10).

	ATP	Li	Na	K	Mg	Ca	Zn
NK	0,211	-	-	0,297 (0,265)	0,087 (0,157)	0,281 (0,503)	-
GK	0,228	0,142	1,207 (3,518)	0,217 (0,466)	0,129 (0,106)	1,155 (1,005)	0,146 (0,196)
GS	0,240	2,014	8,347	1,187	1,702	7,365	0,496

Tabelle 10: Auf die ACh-Konzentration (= 1) bezogene Konzentrationen in der Vesikelfraktion für die P_3^+ -Präparationen und die P_3 -Präparationen (in Klammern). Für die Mittelwertbildung wurden von jedem der 39 Gradienten die spezifischen Konzentrationen der Fraktion mit dem höchsten ACh-Gehalt zugrunde gelegt. NK: Natriumchloridpräparation, Kontrollorgane; GK: Glycinpräparation, Kontrollorgane; GS: Glycinpräparation, stimulierte Organe.

5. Diskussion

Es ist bereits in der Einleitung erwähnt worden, daß die Erregung in den Nervenaxonen durch Ströme von Metallkationen (Natrium und Kalium) weitergeleitet wird und daß die Anwesenheit von Kalziumionen für die Transmitterfreisetzung ebenso erforderlich ist wie für andere sekretorische Prozesse, daß die subzelluläre Wirkungsweise dieser Metallkationen jedoch weitgehend ungeklärt ist. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, festzustellen, welche Metallionen im elektrischen Organ von Torpedo - das als Modellsystem cholinergere Synapsen gelten kann - auftreten, wie sie quantitativ bestimmt werden können und ob durch die Isolierung subzellulärer Fraktionen dieses Gewebes etwas über die Beteiligung der Metallionen am Mechanismus der synaptischen Transmitterfreisetzung in Erfahrung gebracht werden kann.

5.1. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und Zink im elektrischen Organ von Torpedo marmorata

Die Analyse von Gewebeaufschlüssen hat ergeben, daß im elektrischen Organ, von einer geringen Verunreinigung durch den Eisengehalt des Blutes abgesehen, lediglich Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und Zink auftreten. Die Anwesenheit dieser Alkali- und Erdalkalimetalle war zu erwarten, da Magnesium ein allgemeiner Bestandteil von Ribosomen und Mitochondrien ist, Kalzium in zahlreichen biologischen Membranen gefunden wurde und Natrium- und Kaliumionen erforderlich sind, um die Potentialdifferenzen der Elektroplaquezellen aufrecht zu erhalten.

Auch die Gegenwart von Zink erstaunt nicht, weil es Kofaktor für einige Enzyme ist. Insbesondere haben Hanig und Aprison (1967) Zink im Nervengewebe (Großhirnrinde, Cerebellum, Nukleus caudatus, Thalamus und Medulla oblongata) von Albino Kaninchen nachgewiesen. V. Euler (1962) fand es im Hippocampus von Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen und zeigte, daß die synaptische Übertragung zwischen den Moosfasern und den Pyramidenzellen durch lokale Ausfällung des Zinks mit Schwefelwasserstoff selektiv blockiert wird. Iyata und Otsuka (1968) konnten später ultrastrukturell nachweisen, daß das Zink in oder auf den synaptischen Vesikeln der Moosfasern lokalisiert ist. Auch in den sekretorischen β -Zellen des Pankreas wurde Zink gefunden (Okamoto & Kawanishi, 1966; Pihl & Falkmer, 1967). Es ist bemerkenswert, daß im elektrischen Organ von Torpedo kein Kupfer nachgewiesen werden konnte, wie es zu erwarten wäre, wenn auch noradrenerge Nervenendigungen vorlägen (Kupfer ist Kofaktor der Dopamin- β -hydroxylase).

5.2. Der Ionengehalt im Blutplasma, in der Cerebrospinalflüssigkeit und im elektrischen Gewebe

Neuere Untersuchungen über die ionale Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten von Rochen sind mir nur für das Kalzium im Blutplasma bekannt. Allerdings gibt es Daten über die Zusammensetzung des Blutplasmas und der Cerebrospinalflüssigkeit der eng verwandten Haie, die derselben Unterklasse der Elasmobranchii angehören. Sie sind in Tabelle 11 den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt. Die relative Ionenverteilung

Versuchstier	Na	K	Mg	Ca	Zn	Li	Zitat
Cerebrospinalflüssigkeit							
Torpedo marmorata	377,5	3,00	2,06	3,70	0,032	0,12	eigene Ergebnisse Maren, 1967
Raja	262	4	1	3	-	-	Thorson, 1967
Carcharinus leucas	247,4	4,7	1,8	3,0	-	-	
Blutplasma							
Torpedo marmorata	341,0	10,91	2,20	2,67	0,055	0,13	eigene Ergebnisse Maren, 1967
Raja und Squalus acanthias	255	6	3	5	-	-	Murdaugh & Robin 1967
Squalus acanthias	263	4,1	1,55	3,3	-	-	Burger, 1967
Squalus acanthias	250	4	1	3	-	-	Babel-Guérin, 1974
Torpedo marmorata	-	-	-	3,43	-	-	Babel-Guérin, 1974
'solution physiologique'	216,2	5,6	1,2	4,4	-	-	Babel-Guérin, 1974
Elektrisches Organ							
Torpedo marmorata	209,2	22,8	4,3	2,9	0,059	0,01	eigene Ergebnisse Babel-Guérin, 1974
Torpedo marmorata	-	-	-	2,4	-	-	

Tabelle 11: Ionengehalt in der Cerebrospinalflüssigkeit, dem Blutplasma und einer 'physiologischen Lösung' in mmol/l, sowie im elektrischen Organ in mmol/kg.

ist zwar bei den beiden Gattungen ähnlich, aber generell fällt ein höherer Natriumgehalt bei den Torpedineen auf. Zum Vergleich ist in die Tabelle außerdem die Zusammensetzung einer künstlichen "physiologischen Flüssigkeit" (Babel-Guérin, 1974) aufgenommen worden.

Auch für das gegenüber dem Blutplasma und der Cerebrospinalflüssigkeit Lithium- und Natrium-ärmere und Kalium- und Magnesium-reichere elektrische Gewebe liegt mir nur der Kalziumwert von Babel-Guérin vor, der meinem vergleichbar ist (Tabelle 11). Die von ihr festgestellten jahreszeitlichen Veränderungen im Kalziumgehalt (die "Sommertorpedos" sollen eine wesentlich höhere Ca-Konzentration besitzen als die "Wintertorpedos") kann ich allerdings nicht bestätigen. Allenfalls kann ein etwas höherer Gehalt (30%) an freiem Magnesium bei den im Sommer untersuchten Fischen festgestellt werden.

5.3. Die Metallionen in den subzellulären Fraktionen des elektrischen Organs können mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie quantitativ bestimmt werden

In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen des Metallionengehaltes, die unter Anwendung radioaktiver Isotope durchgeführt wurden. Diese Studien haben zwei entscheidende Nachteile: Die Aufnahme eines bestimmten Isotops in ein Gewebe oder eine subzelluläre Fraktion erlaubt keine Aussage darüber, ob die Bindung spezifisch für das untersuchte Element ist. Außerdem wird die gemessene Radioaktivität nicht nur durch

die Größe des betreffenden 'pools' sondern auch durch die Geschwindigkeit der Nettoaufnahme und die Austauschgeschwindigkeit mit den natürlichen Isotopen des betreffenden Elementes bestimmt. Aus diesen Gründen wurde die vorliegende Arbeit mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie durchgeführt. Durch eine Reihe arbeitstechnischer Verfeinerungen, die im methodischen Teil beschrieben sind, konnten die Nachweisgrenzen bis auf jene Werte herabgedrückt werden, die von den Geräteherstellern für optimale Meßbedingungen angegeben werden. Dadurch wurde es möglich, die Veränderungen der extrem kleinen Metallionenkonzentrationen in den synaptischen Vesikeln des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata* zu bestimmen, die bei der Aktivität des Nerven auftreten.

5.4. Präparation der subzellulären Fraktionen

Da Metallionen allgegenwärtig sind, ist zu ihrer quantitativen Bestimmung in subzellulären Strukturen eine bessere Isolierung von anderen Fraktionen erforderlich, als bei der Untersuchung anderer Stoffe. Diesem Umstand wird Rechnung getragen, indem in das allgemeine Präparationsschema für die cholinergen synaptischen Vesikel spezielle Reinigungsschritte eingeschoben werden: Durch Differentialzentrifugation des P_3 und P_3^+ können die störenden zytoplasmatischen Metallionen abgetrennt werden. Andererseits bedingt das Suspendieren in dem zwar isoosmolaren, aber unphysiologisch zusammengesetzten Medium, daß Alkalimetallionen aus den synaptischen Vesikeln ausgewaschen werden. Sie finden sich teilweise im S_3^+ und teil-

weise in der löslichen Fraktion der P_3^+ -beladenen Gradienten.

Glycinlösungen lassen den Kalziumgehalt der synaptischen Membranen unbeeinflusst (vgl. Tan, 1975). Benutzt man jedoch stattdessen NaCl-Lösungen, so zeigen sich artifizielle Veränderungen in den Kalziumkonzentrationen (vgl. Kap. 4.3.1.). Für die übrigen Metallionen macht sich der Wechsel des Mediums nur bei den Partikeln der schwersten Fraktion bemerkbar: Sie können ihren hohen Kalium- und Magnesiumgehalt in Abwesenheit von externen Natriumionen nicht aufrechterhalten. Möglicherweise handelt es sich um membranumgebene Strukturen, die eine Natrium-Kalium-Austauschpumpe besitzen, wie z.B. Synaptosomen (Hosie, 1965; vgl. auch Skou, 1960). Auch Ryall (1962, 1964) fand, daß Kalium aus isolierten Synaptosomen hinausdiffundiert.

Die Untersuchung der Präparationsvorstufen zeigt, daß beim Auspressen des Homogenates durch die Baumwollgaze (unreproduzierbar) Kalzium eingeschleppt wird. Das Zentrifugieren der suspendierten Bodensätze führt zu Zinkverunreinigungen, vermutlich aus den Kappen, mit denen die Zentrifugenröhrchen verschlossen werden. In beiden Fällen wäre ein Austausch gegen Kunststoffmaterial wünschenswert. Sonst werden während keiner der Präparationen nennenswerte Mengen an Ionen eingeschleppt oder verloren. Es muß jedoch auch in Erwägung gezogen werden, daß sich die Ionen während der Präparation umverteilen können (vgl. Holland & Auditore, 1955; Clemente & Meldolesi, 1975). Die Alkalimetalle, auch das zum S_{12} zugesetzte Lithium, ver-

teilen sich analog auf die verschiedenen Fraktionen. Falls es im nativen Zustand überhaupt spezifische Bindungsverhältnisse eines dieser Ionen gegeben haben sollte, so können sie jedenfalls während der Präparation nicht beibehalten werden.

5.5. Natrium, Kalium und Magnesium als frei gelöste Ionen

Schon in den ersten Präparationsschritten teilen sich die Metallkationen in zwei Gruppen auf (Abb. 24, S. 73): Natrium, Kalium und Magnesium gehen in den Extrakt (das im Extraktionsrückstand verbleibende Drittel kann durch unvollständige Zerstörung der Zellen beim Homogenisieren erklärt werden (Holland & Auditore, 1955)) und gelangen dann überwiegend in den Überstand S_3 . Nur 2 - 3% dieser Ionen bleiben mit den Partikeln des P_{12} zurück. Ein sehr kleiner Teil dieser besonders schweren Strukturen kommt über den P_3 in die dichteste Fraktion der Gradienten. Auch hier finden sich Natrium und Kalium in demselben festen Verhältnis von 10:1. Die Absolutmenge dieser Ionen steigt in der Fraktion jedoch infolge der elektrischen Reizung auf das 4-fache an (Tabelle 7, S. 98). Es ist möglich, daß es sich um Abschnürungen jener Invaginationen handelt, die infolge der Stimulation zunehmen. Das erst während der Präparation zugesetzte Lithium zeigt in dieser Fraktion für die Kontrollorgane und stimulierten Organe etwa gleiche Werte.

Ähnliche Auftrennungen liegen nur für anderes Untersuchungsmaterial vor. Der Vergleich wird jedoch dadurch erschwert, daß

sich die Präparationsschemata der Autoren erheblich unterscheiden. So finden Holland und Auditore (1955) bei der Untersuchung des Leber- und Nierengewebes von Meerschweinchen und Ratten in ihren Fraktionen D_f und M_f , die meinem Extraktionsrückstand plus P_{12} entsprechen, zusammen etwa 30% des Kaliums wieder (eigener Wert: 36%). Ryall (1962, 1964) kommt bei der subzellulären Fraktionierung von Meerschweinchen- und Rattengehirnen zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Darüber hinaus findet er 1% des Kaliums im P_3 wieder (eigener Wert: 0,97%). Hanig, Tachiki und Aprison (1972) erhalten aus Homogenaten des Kaninchenkortex 75% des Kaliums und Natriums in ihrer Fraktion S ($\cong S_3$) (eigene Werte, bezogen auf den Extrakt: K - 80%, Na - 81%). Von den zweiwertigen Ionen finden sie weniger in S.

5.6. Kalzium als physiologisch aktiver Membranbestandteil

Im Gegensatz zu diesen "löslichen" Ionen bleibt ein großer Teil des Kalziums im Extraktionsrückstand. Es wird nur wenig mit den besonders schweren Partikeln des P_{12} angereichert, sondern gelangt über den P_3 in die Membranfraktion der Dichtegradienten. Hier zeigt sich, wie schon im Extraktionsrückstand und dem P_3 , eine stimulationsbedingte hochsignifikante Abnahme des Kalziumgehaltes um ca. 85%. Die Natriumchloridbehandlung führt zu einer etwa gleich starken Ablösung des Kalziums von den Membranen wie die elektrische Reizung. Abb. 25 macht deutlich, daß die abgelösten Kalziumionen überwiegend als freie Ionen vorliegen und sich analog den übrigen Metallen verhalten.

5.7. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Zink und zuge-
setztes Lithium als Bestandteile der cholinergen
synaptischen Vesikel

Bei der Isolierung der synaptischen Vesikel wird das Gemisch aus intrazellulären und extrazellulären Flüssigkeiten, das die 'löslichen' Ionen enthält, mit Glycin- oder NaCl-Lösung versetzt. Das zum S_{12} zugesetzte Lithium wird dabei von den Vesikeln aufgenommen oder haftet ihnen an, zwei Möglichkeiten, zwischen denen aufgrund bisheriger Studien nicht unterschieden werden kann. Für spätere Untersuchungen bietet sich an, die isolierte Vesikelfraktion durch osmotischen Schock aufzubrechen und die zerplatzten Vesikel nach erneuter Zentrifugation auf ionale Veränderungen zu untersuchen. Wahrscheinlich verdrängt das Lithium andere Kationen von ihren Bindungsplätzen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß während der Präparation weitere Umverteilungen stattfinden.

Ein derartiger am Ionenpotential ($Li > Na > K$) orientierter Ionenaustausch könnte eine Reihe früherer Befunde erklären, z.B. den Austausch von "adsorbiertem oder eingeschlossenen" Kalium gegen Natrium im Froschmuskel (Armstrong & Lee, 1971), den Austausch von Natrium und Kalium gegen Lithium im oberen Zervikalganglion des Kaninchens (Woodward, Bianchi & Erulkar, 1969) und die Tatsache, daß das Kalium isolierter Synaptosomen aus dem Mäusegehirn zwar durch externes Natrium verdrängt wird, aber externes Kalium umgekehrt wenig Einfluß auf internes Natrium hat (Weinstein & Kuriyama, 1970).

Erst im letzten Stadium der Präparation, dem Waschvorgang,

werden die Vesikel in eine vollkommen artefizielle Umgebung gebracht. Hier verlieren sie unspezifisch einen Teil ihrer Ionen an die Waschlösung S_3^+ , wobei der Konzentrationsverlust vom Ionenpotential abhängt. Dieser Auswascheffekt ist wahrscheinlich nicht durch den Zentrifugationsvorgang bedingt (vgl. Hanig, Tachiki & Aprison, 1972), sondern durch das unphysiologische Medium.

Die im P_3^+ zurückbleibenden Metallkationen verteilen sich, außer dem membrangebundenen Kalzium der unstimulierten Organe, analog dem Azetylcholin und ATP. Sie finden sich in der Vesikelfraktion, z.T. gemeinsam mit synaptischen Vesikeln in Synaptosomen eingeschlossen in der Membranfraktion, und, soweit sie während der Dichtegradientenzentrifugation ausgewaschen wurden, als freie Ionen in der löslichen Fraktion. Die andersartige Proteinverteilung (Tabelle 4, S. 86) verdeutlicht, daß es sich bei den Ionen der löslichen Fraktion nicht um eingeschleppte Ionen des Zytoplasmas handelt. Auch zeigt ein Vergleich der Fraktionen 1 und 3 (Tabelle 4), daß die einwertigen Metalle mit ihrem kleinen Ionenpotential viel leichter ausgewaschen werden, als die zweiwertigen.

5.8. Die reizabhängige Ablösung des Kalziums von der Membran

Der durch die elektrische Reizung hervorgerufene 85%ige Abfall in der Kalziumkonzentration der Membranfraktion kann noch nicht endgültig erklärt werden. Hierzu ist eine genaue Charakterisierung der in der Fraktion auftretenden Membranen

erforderlich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht angestrebt wurde. Die notwendigen Experimente werden zur Zeit durchgeführt. Trotzdem soll die beobachtete Veränderung auch hier vor dem Hintergrund zahlreicher Untersuchungen an verwandten Systemen diskutiert werden.

Daß Kalzium erforderlich ist, um die Erregbarkeit von Muskelzellen (Ringer, 1883) und die Übertragbarkeit der Erregung vom Nerven auf den Muskel (Locke, 1894) aufrechtzuerhalten, wurde bereits im vorigen Jahrhundert erkannt. Die bahnbrechenden Arbeiten von Harvey & MacIntosh (1940) am perfundierten oberen Zervikalganglion der Katze und von Katz und Mitarbeitern (vgl. del Castillo & Katz, 1954; Katz & Miledi, 1965) an der neuromuskulären Endplatte zeigten, daß die Ca^{2+} -Ionen für die ACh-Freisetzung erforderlich sind, also präsynaptisch wirken. Insbesondere konnte bei sehr kleinen Kalziumkonzentrationen (Fatt & Katz, 1952) oder hohen Magnesiumkonzentrationen (del Castillo & Engbaek, 1954) gezeigt werden, daß die induzierten postsynaptischen Potentialänderungen (Endplattenpotentiale) ganzzahlige Vielfache kleinster sogenannter Miniaturendplattenpotentiale sind, die einer Poisson-Verteilung gehorchen (Liley, 1956). Die elektronenmikroskopische Entdeckung der synaptischen Vesikel (Sjöstrand, 1953; Palay & Palade, 1954 und de Robertis & Bennett, 1955) führte zu der Hypothese, daß sie jene kleinsten Quanten an Transmitter abgepackt enthalten, welche die Miniaturendplattenpotentiale hervorrufen (del Castillo & Katz, 1956), und schließlich zu ihrer Isolierung (Whittaker,

Michaelson & Kirkland, 1964). Inzwischen ist für eine Vielzahl von sekretorischen Systemen die intrazelluläre Kompartimentierung des Sekretes (im weitesten Sinne des Wortes) und die unabdingbare Beteiligung von Kalziumionen am Freisetzungsprozeß nachgewiesen worden, wobei die Beispiele sowohl Neurotransmitter, Neurosekrete und andere Hormone als auch Verdauungssäfte umfassen. In Tabelle 12 ist ein Überblick über einige der am besten untersuchten Systeme gegeben. Viele weitere, wie die Speicheldrüsen und Blutplättchen, das endokrine Pankreas, die Adenohypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde und die adrenergen Nervenendigungen, ließen sich in das Schema einfügen. Es gibt gute Übersichtsartikel, in denen die verschiedenen Systeme verglichen werden (Blaustein, 1974; Douglas, 1974; Hubbard, 1970; Katz, 1969; Rasmussen, 1970; Rubin, 1974; Smith, 1971; Triggle, 1972).

Eine Reihe von Gemeinsamkeiten fällt auf: Das Sekret ist in kleinen Bläschen (Vesikeln) gespeichert und wird auf einen elektrischen oder chemischen Reiz exozytotisch freigesetzt. Diese 'Stimulus-Sekretions-Kopplung' (Douglas & Rubin, 1963) erfordert die Gegenwart kleiner Kalziummengen, während Magnesium und auch überschüssiges Kalzium hemmend wirken (Übersicht s. Poste & Allison, 1973).

Frühe Untersuchungen an Nervenzellen betonen vor allem, daß die Erregungsschwelle mit der externen Kalziumkonzentration steigt (Frankenhaeuser, 1957), eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration also auf jene Parameter, die die Membranpermea-

Gewebe	Sekret	Exozytose elektronen- mikroskop.+)	Exozytose bioche- misch	Ca-Bedarf	Verstärk. der Sekret. durch Na- Verarmung	(Ca ²⁺ -Mg ²⁺)- ATPase in den Vesikeln	ATPabhängige Ca-Aufnahme in die Mitochondrien	in die in die Mikrosomen
Nebennieren- mark	Katechol- amine	Diner, 67	Banks & Helle, 65; & Rubin, Schneider, 63; Smith & Douglas, Winkler, 74 67; Serck- Hanssen, 72	Douglas & Rubin, 63; Lastowecka & Trifaró, 74	Banks, 65	Polsner & Hava, 70	Polsner & Hava, 70	
Neurohypo- physe	Oxytocin Vaso- pressin	Nagasawa, Douglas & Schulz, 70.	Fawcett, Powell & Sachs, 68; 64 Nordmann Dreifuss & Legros, 71	Douglas & Polsner, 64	keine! (Vilhardt & Hope, 74)	Russel & Thorn, 75	Russel & Thorn, 75	
exokriner Pankreas	Verdau- ungs- enzyme	Ichikawa, 65	Keller & Cohen, 61	Hokin, 66 Matthews, Petersen & Williams, 73	Case & Clausen, 73			
neutrophile Leukozyten	lysosoma- le Enzyme		Woodin & Wieneke, 63	Woodin & Wieneke, 63	Woodin & Wieneke, 64			
Parotis- drüse	Amylase	Amsterdam, Ohad & Schramm, 69	Wallach & Schramm, 71	Selinger & Naim, 70		Selinger, Naim & Lasser, 70		
Mastzellen	Histamin	Horsfield, 65	Fillion, Slorach & Uvnäs, 70	Mongar & Schild, 58 Foreman & Mongar, 72				
Nerven- endigungen)	(c) Azetyl- cholin	(c) Hubbart & Kwanbun- bumpen, 68; (c) Nickel & Potter, 70	(c) Harvey & MacIntosh, 40; (c) Fatt & Katz, 52	(c) Harvey & MacIntosh, 40; (c) Fatt & Katz, 52	Germain & Proulx, 65; Kagota, Mo- ri & Imai- zumi, 67	(c) Alnaes & Rahamimoff, 75	Otsuka, Oht- suki & Eba- shi, 65; Yo- shida, Kado- ta & Fujisawa, 66	

1 23 1

Tabelle 12: Übersicht über die Gemeinsamkeiten einiger gut untersuchter sekretorischer Systeme.

+) Unter einem elektronenmikroskopischen Hinweis auf die Exozytose wird z.B. das Auftreten Omega-förmiger Strukturen an der Zellmembran verstanden, die fusionierten synaptischen Vesikeln gleichen. §) Hierbei handelt es sich in der Regel um Gehirnhomogenate. Rein cholinerge Systeme sind durch ein vorgesetztes (c) gekennzeichnet. *) vgl. Text. Bei der Angabe der Jahreszahl ist aus Platzgründen die 19 weggelassen worden.

bilität für Na^+ und K^+ kontrollieren, wie eine Depolarisierung wirkt (Frankenhaeuser & Hodgkin, 1957; Curtis, Perrin & Watkins, 1960), und - auf Messungen mit dem β^- -Strahler ^{45}Ca gestützt - daß Kalzium in die sekretierende Zelle einströmt (Hodgkin & Keynes, 1957; Douglas & Rubin, 1963).

Neuere Untersuchungen, z.B. an der Neurohypophyse (Douglas, Ishida & Poisner, 1965; Russel, Warberg & Thorn, 1974) und dem Pankreas (Case & Clausen, 1973) zeigen hingegen, daß auch intrazelluläre Quellen das erforderliche Kalzium liefern können. So wird in den Nervenendigungen (Alnaes & Rahamimoff, 1975) für die spontane Transmitterfreisetzung die Ruhekonzentration an freiem, intrazellulären Kalzium verantwortlich gemacht, während bei der reizabhängigen Transmitterfreisetzung das während des Aktionspotentials eingeströmte Kalzium die intrazelluläre Konzentration erhöht. Über die Natur der intrazellulären Kalziumquellen ist bisher aber noch wenig bekannt, da es kaum Untersuchungen über die quantitative Verteilung in der Zelle gibt (Tabelle 13). Carafoli & Rossi (1971) geben für die Mitochondrien verschiedener Gewebe Werte zwischen 10 und 90 nmol Ca/mg Protein an. Madeira & Antunes-Madeira (1973) nennen als gesamte Bindungskapazität der Synaptosomenfraktion (Schafhirn) 210 nmol/mg, Kamino et al. erwähnen Werte bis zu 165 nmol/mg (Cortex, Rattengehirn). Die hier untersuchte Membranfraktion (Tabelle 7, S. 98) enthält 301 nmol Ca/mg Protein. Ähnlich hohe Werte sind mir nur von der Plasmamembran (327) und der Membran der zymogenen Granula (395) im exokrinen Pankreas bekannt (Clemente & Meldolesi, 1975).

Gewebe	Nebennierenmark, Rind	exokriner Pankreas, Meerschw.	Großhirnrinde, Kaninchen	Parotisdrüse, Ratte	Nebennierenmark, Rind
Zitat	Serck-Hanssen & Christiansen, 1973	Clemente & Meldolesi, 1975	Hanig, Tachiki & Aprison, 1972	Wallach & Schramm 1971; Selinger, 75 (+)	Borowitz, Fuwa & Weiner, 1965
Homogenat	-	27	16	31	25
Mitochondrien	113	27	23	26	45
sekret.Vesikel	125	37	35	59	60
Mikrosomen	37	37	12	45	16
Überstand	-	14	8	27	35

Tabelle 13: Subzelluläre Kalziumkonzentrationen in nmol Ca/mg Protein. (+) Die Werte der beiden Autoren (vom selben Institut) unterscheiden sich um weniger als 5% (Mittelwerte).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Kalzium-haltigen Fixierungsmitteln beziehungsweise in Kombination mit der Röntgenspektralanalyse ergeben hohe Kalziumkonzentrationen in den synaptischen Vesikeln des Zitterrochens Narcine brasiliensis (Boyne, Bohan & Williams, 1974), der neuromuskulären Endplatte des Frosch-Sartorius-Muskels (Politoff, Rose & Pappas, 1974) und den Serotonin-Granula der Blutplättchen (Martin, Carson & Race, 1974), sowie besonders an der Innenseite der präsynaptischen Membranen und zum Teil in den Mitochondrien des Tintenfisch-Riesenaxons (Hillman & Llinás, 1974; Oschman et al., 1974). Alle diese Daten stehen mit der Deutung in Einklang, daß es

sich in meinen Untersuchungen bei den kalziumreichen Strukturen der Membranfraktion um die äußeren Membranen der Synaptosomen handelt, wie es auch durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen nahegelegt wird (Abb. 31c, S. 88). Auch ist von früheren Arbeiten (vgl. Whittaker & Barker, 1972) bekannt, daß sich Synaptosomen (bei 6×10^6 g.min) in der Grenzschicht von 0,8 und 1,2 molarer Saccharose ansammeln, während freie Mitochondrien bereits im P_{12} (der bei der Stimulation keine so markante Veränderung im Kalziumgehalt zeigt) sedimentieren. Wenn es gelänge, zu zeigen, daß die Membranfraktion frei von kontaminierenden Strukturen ist, wäre damit zum ersten Mal der quantitative und direkte Beweis erbracht, daß eine subzelluläre Struktur bei der Sekretion ihr Kalzium abgibt. Auf dieser Grundlage könnte dann zwischen zahlreichen spekulativen Modellen entschieden werden. Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, alle Modelle zu vergleichen, die für die Funktion des Kalziums in der Stimulus-Sekretions-Kopplung entworfen worden sind (vgl. Blaustein, 1974; Douglas, 1974; Mathews, Petersen & Williams, 1973; Rasmussen, 1970; Rubin, 1974 and Smith, 1971) und von denen sich viele der Wechselwirkung des Kalziums mit der Plasmamembran widmen (Aboud, 1966; Madeira & Antunes-Madeira, 1973; Manery, 1966; Nijjar & Pritchard, 1973; Papahadjopoulos, 1968; Poste & Allison, 1973; Triggle, 1972; Watanabe & Tasaki, 1971; Wilde, 1955 und Woodin & Wienecke, 1964), jedoch sollen jene Gesichtspunkte hervorgehoben werden, die ihnen zumeist gemeinsam sind:

In elektrisch erregbaren Geweben könnte das einlaufende Aktions-

potential die Permeabilität der Membran für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen erhöhen, indem das membrangebundene Kalzium, das dehydratisierend wirkt (Manery, 1966) und die Membranen steifer macht (Woodin & Wienecke, 1963; Poste & Allison, 1973), abgegeben (Abood, 1966) und somit die Membran hydrophiler wird (Watanabe & Tasaki, 1971; Madeira & Antunes-Madeira, 1973). Es ist nicht klar, ob diese Veränderungen der Membraneigenschaften auf Konformationsänderungen von Makromolekülen (Watanabe & Tasaki, 1971), eventuell Glykoproteinen (Madeira & Antunes-Madeira, 1973), oder Wechselwirkungen des Kalziums mit sauren Phospholipiden (Papahadjopoulos, 1968) beziehungsweise Peptiden (Urry et al., 1975) beruht. Obwohl über diese Ablösung des Kalziums von der Plasmamembran, die auch den von Frankenhaeuser & Hodgkin (1957) beschriebenen depolarisierenden Effekt verständlich machen würde (vgl. Triggle, 1972), viel spekuliert wird, ist sie niemals direkt nachgewiesen worden. Die hier am elektrischen Organ von Torpedo gemachten Beobachtungen könnten diese Lücke schließen helfen.

Depolarisierung und Permeabilitätsänderung führen zu einem dem Konzentrationsgradienten folgenden passiven Einstrom von Natrium- und Kalzium-Ionen (Baker, Hodgkin & Ridgway, 1971; Blaustein, 1971), und damit einer höheren intrazellulären Konzentration an freiem (Llinás, Blinks & Nicholson, 1972) Kalzium (Babel-Guérin, 1974). Dieses freie Kalzium scheint den eigentlichen Auslöser für die Sekretion darzustellen (Miledi, 1973; Case & Clausen, 1973; Alnaes & Rahamimoff, 1975), aber seine Wirkung ist unverstanden: Einerseits werden einfache

physikalische Modelle vorgeschlagen, die die Kalziumionen als eine Art positiven elektrischen Kitt zwischen den negativen Ladungen der Plasmamembran und der Vesikelmembran (Helle, 1973) ansehen, andererseits könnten spezifische Wechselwirkungen mit aktiven Zentren in der Plasmamembran, die eine höhere Affinität zu Magnesiumionen haben (Madeira & Antunes-Madeira, 1973), zu Konformationsänderungen führen, die die Sekretion ermöglichen. Die Unfähigkeit des Magnesiums, diese Konformationsänderungen einzuleiten (Madeira & Antunes-Madeira, 1973), würde zugleich den inhibitorischen Effekt dieses Metallions erklären. Andere Autoren weisen auf die Gegenwart von ATP in der Plasmamembran hin, und vermuten, daß die ATPasen in den Vesikelmembranen (vgl. Tabelle 12) über eine Spaltung des ATP's anorganische Phosphationen freisetzen, die um das Kalzium der Membranen kompetitieren und so die Voraussetzungen für eine Fusion schaffen (Woodin & Wieneke, 1964; Poste & Allison, 1973). Die großen Analogien zwischen der Stimulus-Sekretions-Kopplung und der 'Erregungs-Kontraktions-Kopplung' (Douglas & Rubin, 1963) sowohl in der Skelett- (z.B.: Martonosi & Feretos, 1964), als auch der Herz- (z.B.: Repke & Katz, 1972) und der glatten Muskulatur (z.B.: Batra, 1973) und die Entdeckung der Mikrotubuli und Mikrofilamente in den sekretorischen Geweben haben zu Modellen geführt, die eine Kontraktion des mikrotubulären-mikrofilamentösen Systems postulieren, die durch Kalziumionen hervorgerufen wird (Schmitt, 1968; Malaisse et al., 1971; Malaisse, 1972), oder auch eine vollständige Analogie zwischen den Molekülen Actin, Myosin und Actomyosin einerseits und den aus der Synaptosomenfraktion von Rinder- und Rattengehirnen isolierten Molekülen Neurin, Stenin und Neurostenin andererseits

aufstellen (Berl, Puszkin & Nicklas, 1973). Andere Autoren bringen Argumente für die Beteiligung von zyklischem AMP (Rasmussen, 1970; Nijjar & Pritchard, 1973).

Wenn auch beim heutigen Kenntnisstand zwischen diesen Modellen noch nicht entschieden werden kann, so steht doch fest, daß die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach erfolgter Sekretion wieder auf ihr ursprüngliches Niveau von etwa 10^{-6} M gesenkt werden muß. Hierfür kann die ATP-abhängige Aufnahme von Kalziumionen in Mikrosomen (Robinson & Lust, 1968; de Meis, Rubin-Altschul & Machado, 1970; vgl. auch Tabelle 12) und in Mitochondrien (Carafoli & Rossi, 1971; Carafoli, 1974; Lazarewicz, Haljamäe & Hamberger, 1974; vgl. auch Tabelle 12), sowie eine ATP-getriebene Ausschleusung über die Zellmembran verantwortlich sein (Schatzmann & Vincenzi, 1969). Ferner wird ein Natrium-Kalzium-Carrier beschrieben (Blaustein, 1974; Blaustein & Oborn, 1975), der in beiden Richtungen arbeitet und die Energie für die Kalziumausschleusung aus dem (dem Konzentrationsgradienten folgenden) Natriumeinstrom und einem Ladungstransport bezieht. Eine Verarmung des Inkubations- oder Perfusionsmediums an Natriumionen müßte dann zu einer verstärkten Sekretion führen, weil das intrazelluläre Kalzium nicht entfernt würde (vgl. Tabelle 12). Umgekehrt würden hohe Natriumkonzentrationen im Präparationsmedium von Synaptosomen zu einem starken Kalziumverlust führen. Hierdurch können die niedrigen Kalziumwerte der Natriumchloridpräparationen (vgl. Tabelle 7, S. 98) erklärt werden, beziehungsweise die Meßwerte legen nahe, daß der von Blaustein in den Nervenendigungen

des Tintenfisches beschriebene Carrier auch im elektrischen Organ von Torpedo auftreten könnte.

Es kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden, daß das Kalzium an postsynaptische Strukturen gebunden ist, zumal der Azetylcholinrezeptor eine hohe Affinität für Kalzium (allerdings auch für andere zweiwertige Metallionen) besitzt (Jenkinson, 1960; Schmidt & Raftery, 1974).

5.9. Ionenaustausch in den synaptischen Vesikeln als Folge der Transmitterfreisetzung

Die für die Sekretion hervorragende Bedeutung, die den Vesikeln einerseits und dem Kalzium andererseits zukommt, hat natürlich die Frage nach der Kalziumkonzentration der Vesikel (vgl. Tabelle 13) und ihrer eventuellen Änderung im Sekretionsprozeß provoziert, zumal außer einem hohen Kalziumgehalt der sekretorischen Granula des Nebennierenmarks (Borowitz, Fuwa & Weiner, 1965), der Parotisdrüse (Wallach & Schramm, 1971), der Neurohypophyse (Vilharadt & Thorn, 1975) und des exokrinen Pankreas (Clemente & Meldolesi, 1975) bald auch über eine Magnesium-aktivierte ATPase der isolierten chromaffinen Granula (Banks, 1965) und eine Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase der synaptischen Vesikel des Meerschweinchengehirns (Kadota, Mori & Imaizumi, 1967) berichtet wurde (vgl. Tabelle 12). Es wurde vermutet, daß eine Kalziumaufnahme in die Vesikel und die sich anschließende gemeinsame Ausschüttung mit dem Sekret dazu beitragen könnten, das bei der Stimulierung freigesetzte oder eingeströmte Erd-

alkalimetall zu entfernen und die zytoplasmatische Kalziumkonzentration auf ihr niedriges Ruheniveau zurückzuführen. Die postulierte reizabhängige Zunahme der Kalziumkonzentration wurde 1964 von Woodin & Wieneke für die Vesikel der neutrophilen Leukozyten und später bei extensiver Stimulierung auch für die Katecholaminfreisetzung des Nebennierenmarks (Serck-Hanssen & Christiansen, 1973) gezeigt, während eine Reihe anderer Autoren von geringen Veränderungen der Kalziumkonzentration (Borowitz, 1969; Poisner & Hava, 1970), einer geringen Austauschbarkeit des Kalziums in den Granula (Russel & Thorn, 1975; Clemente & Meldolesi, 1975) und dem Fehlen einer ATPase in den isolierten Granula der Neurohypophyse (Vilhardt & Hope, 1974) beziehungsweise eines Kalziumaufnahme-mechanismus' in den isolierten chromaffinen Granula (Winkler et al., 1975) berichten.

Zwei Gesichtspunkte werden dabei meist außer acht gelassen:

1. Die gleichzeitige Kalziumaufnahme und Gegenwart einer ATPase in den Vesikeln braucht nicht zu bedeuten, daß beide Phänomene in einem direkten Zusammenhang stehen.
2. Die Aufnahme von Kalzium in die Vesikel muß nicht spezifisch für dieses Ion sein. Es gibt eine Reihe von zytochemischen Arbeiten, die die Ausfällung von Schwermetallen oder auch ihre Bindung an intrazelluläre Strukturen beschreiben. So berichten Politoff, Rose & Pappas (1974) von der Ausfällung elektronendichter Niederschläge in den synaptischen Vesikeln der neuromuskulären Endplatte durch CaCl_2^- und durch CoCl_2^- haltige Fixierungsmittel, und Bloom & Barnett (1966)

erhalten Blei- und Kupferniederschläge in den synaptischen Vesikeln des Zitteraals (*Electrophorus electricus*).

Für die meisten sekretorischen Systeme gibt es Beweise oder zumindest starke Argumente dafür, daß die Sekretion exozytotisch erfolgt (vgl. Tabelle 12). Als elektronenmikroskopischer Hinweis wird dabei das Auftreten omegaförmiger Strukturen gewertet, die mit der Zellmembran fusionierten sekretorischen Vesikeln gleichen. Als biochemischer Beweis wird das reizabhängige gemeinsame Auftreten von Substanzen im Perfusat angesehen, die in der isolierten Vesikelfraktion im selben Verhältnis zueinander vorliegen, wobei zusätzlich gefordert wird, daß die Stimulierung keine Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme hervorruft. Es ist aber ungeklärt, ob sich die Vesikel nur vorübergehend an die Zellmembran anlagern, und dabei ihren Inhalt über eine Pore abgeben, oder ob sie vollständig mit ihr verschmelzen. Im letzteren Falle könnten die "frischen" Vesikel aus dem Perikaryon nachgeliefert werden, oder sie könnten sich durch Pinozytose aus der Zellmembran bilden (vgl. Smith, 1971; Douglas, 1974). Schließlich ist es möglich, daß mehrere dieser Prozesse nacheinander oder auch gleichzeitig ablaufen. Da ferner nicht auszuschließen ist, daß die einzelnen sekretorischen Systeme nach unterschiedlichen Mechanismen arbeiten, beschränkt sich die Diskussion im folgenden auf cholinerge Synapsen.

Es ist wahrscheinlich, daß eine pinozytotische Vesikelneubildung oder auch die Freisetzung des Transmitters über sich öffnende

Poren zu einer Aufnahme von Metallkationen aus dem synaptischen Spalt führt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Azetylcholinmolekül eine positive Ladung besitzt und in den synaptischen Vesikeln gemeinsam mit dem negativ geladenen ATP (Whittaker, Dowdall & Boyne, 1972; Whittaker, 1972; Dowdall, Boyne & Whittaker, 1974) und dem stark sauren Protein Vesikulin (Whittaker, 1971, 1972a; Whittaker, Dowe & Scotto, 1971; Whittaker et al., 1974) gespeichert ist. Diese negativen Ladungen tragen dazu bei, das ACh zu neutralisieren, und ermöglichen so die hohe Konzentration des Transmitters in den Vesikeln.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo reich an Natrium, Kalzium, Kalium, Zink, und Magnesium sind. Pro ACh-Molekül werden im Vesikelpeak der P_3^+ -Glycin-Kontroll-Präparationen (in derselben Reihenfolge, vgl. Tabelle 10, S. 110) 1,21, 1,15, 0,22, 0,15 und 0,13 Metallionen gefunden. Hinzu kommen pro ACh-Molekül 0,228 ATP-Moleküle. Die mit den logarithmischen Auftragungen für verschiedene Präparationsweisen überprüfte strenge Proportionalität in der ACh-, ATP- und Ionenverteilung schließt eine Verunreinigung der synaptischen Vesikel mit anderen ionenreichen Strukturen praktisch aus. Der mittlere Azetylcholingehalt in der Vesikelfraktion (Fraktion 3, Tab. 4, S. 86) der P_3^+ -beladenen Gradienten des Typs III beträgt 225 nmol ACh/mg Protein, der Wert der Typ II-Gradienten (Fraktion 4, Tab. 7, S. 98) 284 nmol/mg. Whittaker, Essman & Dowe (1972) fanden für im Zonalrotor aus dem S_{12} präparierte Vesikelfrak-

tionen einen mittleren Wert von 566 nmol ACh/mg Protein und errechneten daraus eine ACh-Konzentration von 0,36 M in den Vesikeln. Nimmt man - in einer freilich sehr groben Näherung - an, daß die hier präparierten Vesikel in etwa die gleiche Reinheit besitzen, so ergibt sich, daß die aufgeführten Metallionen zusammen mit dem ACh und ATP, neben anderen, hier nicht erfaßten Substanzen, 0,583 Osmol (Fraktion 3, Typ III-Gradienten) beziehungsweise 0,739 Osmol (Fraktion 4, Typ II-Gradienten) zur Osmolarität der Vesikel beitragen. Durch diese grobe Abschätzung soll gezeigt werden, daß die gefundenen Ionenkonzentrationen in einem vernünftigen Verhältnis zu den üblichen Annahmen für die Osmolarität der Körperflüssigkeiten von Rochen und Haien (ca. 0,8 - 1,1 Osmol) stehen (Gilbert, Mathewson & Rall, 1967; Hoar & Randall, 1969), die Metallionen also möglicherweise im Innern der Vesikel vorliegen können.

Neben der Osmolarität verlangt auch die elektrische Ladung der Vesikel eine Abschätzung: Whittaker et al. (1974) haben berichtet, daß das Vesikulin (Molekulargewicht ca. 10 000) etwa 36% des gesamten Vesikelproteins ausmacht, und daß jedes Vesikulinmolekül 23 saure und 9 basische Aminosäuren enthält. Zu jeder positiven Ladung eines Azetylcholinmoleküls kommen durch die Metallkationen $(1,21 + 2 \times 1,15 + 0,22 + 2 \times 0,15 + 2 \times 0,13 =) 4,15$ weitere hinzu (vgl. Tabelle 10, S. 110). Da ATP beim p_H 7,0 im Mittel etwa 3,75 negative Ladungen trägt (Lehninger, 1971), stehen bei einer ACh-Konzentration von 225 nmol/mg Protein den 5,15 positiven je $(0,228 \times 3,75 + ((10^{-3} \times 0,36 / 10\ 000) / 225 \times 10^{-9}) \times 14 =) 3,10$ negative

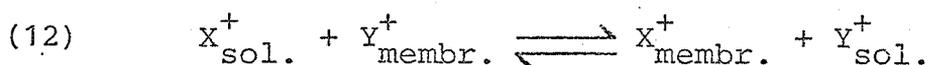
Ladungen gegenüber. Es ist gut möglich, daß die Bestandteile der Vesikelmembran die restlichen 40% der positiven Ladungen kompensieren, zumal ein Teil der Metallionen außen an den Vesikeln haften könnte. Auch weitere Anionen (z.B. Cl^-) können zum Ladungsgleichgewicht beitragen.

Infolge der elektrischen Stimulation mit 5000 Impulsen verliert die Vesikelfraktion 91,8% des ACh's und 92,3% des ATP's. Ähnliche Werte wurden bereits früher von Zimmermann & Whittaker (1974, 1974a) gefunden. Außerdem berichten sie von einer Abnahme des Membran- und Kernproteins (Vesikulin) und des gesamten Nukleotidgehaltes um je 50% (vgl. Whittaker & Zimmermann, 1974; Zimmermann, 1975; Whittaker, Zimmermann & Dowdall, 1975) und im Einklang damit von einer Abnahme der ultrastrukturell überprüften Vesikelzahl in den Nervenendigungen von 50% bei gleichzeitiger Flächenzunahme der präsynaptischen Membran. Offensichtlich ist die Hälfte der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran verschmolzen, während die nach der Reizung gefundenen Vesikel weniger Transmitter enthalten. Diesen Befunden ist jetzt hinzuzufügen, daß der Metallionengehalt der Vesikelfraktion bei der elektrischen Reizung um weniger als 40% abnimmt, die aus dem stimulierten Gewebe isolierten Vesikel also reicher an Metallionen sind als jene der Kontrollorgane. Dieser Befund überrascht nicht, da die synaptischen Vesikel ja positive Ladungen des Azetylcholins verlieren (es sind sogar Modelle entworfen worden, die einen solchen Ionenaustausch als die eigentlich treibende Kraft bei der Transmitterfreisetzung ansehen, z.B. Uvnäs, 1973). Trotzdem ist es schwierig, die genaue Ladungsverteilung für die Vesikel anzu-

geben, da unklar ist, was mit dem ATP bei der Stimulation geschieht. Es sei an dieser Stelle eine spekulative Interpretation versucht: Nach der Stimulation bleiben 8,2% ACh zurück. Bezogen auf denjenigen Bruchteil eines synaptischen Vesikels, der vor der Stimulation 5,15 positive Ladungen trug, sind (laut Tabelle 10, S. 110) nach der Stimulation noch $(8,2/100 \times (1 + 8,347 + 1,187 + 2 \times 1,702 + 2 \times 7,365 + 2 \times 0,496) =)$ 2,432 positive Ladungen vorhanden, erwartungsgemäß also fast genau halb so viele wie zuvor! Diesen stehen gegenüber: $(0,240 \times (8,2/100) \times 3,75 =)$ 0,075 negative Ladungen des noch verbliebenen ATP's, $(0,5 \times ((10^{-3} \times 0,36/10\ 000) / 225 \times 10^{-9}) \times 14 =)$ 1,123 negative Ladungen des noch verbliebenen Vesikulins und - unter der gleichen Annahme, wie für die unstimulierten Organe, daß ein entsprechender Anteil positiver Ladungen durch die Vesikelmembran kompensiert wird, - $(0,5 \times (5,15 - 3,10) =)$ 1,025 negative Ladungen der noch verbliebenen Vesikelmembranen. Nehmen wir an, daß die in den Vesikeln verbleibenden Spaltprodukte des ATP's je Molekül Y negative Ladungen tragen, so müssen ihre $(Y \times 0,5 \times (92,3/100) \times 0,228 =)$ 0,105 Y negativen Ladungen $(2,432 - 1,123 - 0,075 - 1,025 =)$ 0,209 positive Ladungen kompensieren. Für Y ergibt sich hieraus exakt der Wert 2, der für die negative Ladung des AMP's zutrifft. Bei der Rechnung wird angenommen, daß kein anorganisches Phosphat in den Vesikeln verbleibt. Dieses Ergebnis steht mit dem Befund in Einklang, daß außer ATP AMP als einziges Nukleotid in den Vesikeln gefunden wird (Dowdall, 1974, persönliche Mitteilung).

Obwohl somit die spezifischen Ionenkonzentrationen deutlich zugunsten eines Ionenaustausches an den negativen Ladungen

des Vesikulins und der Vesikelmembran sprechen, wird die Aussagekraft dieser Relationen durch die großen Streuungen der Absolutwerte beeinträchtigt. Kräftigere Argumente für den Ionenaustausch ergeben sich aus der inneren Stimmigkeit der verschiedenen Konzentrationsänderungen: wie z.B. der analogen Verteilung des ACh's vor und der Metallionen nach der Stimulation (vgl. Abb. 32, Fraktionen 3 und 4, sowie S. 96) und der linearen Abhängigkeit des Quotienten der RSK-Werte (unstimuliert : stimuliert) in der Vesikelfraktion vom Ionenpotential (vgl. S. 93, Tabelle 6 und Abb. 35). Diese lineare Beziehung soll jedoch nicht als mathematisch exakte Gesetzmäßigkeit, sondern lediglich als heuristisches Prinzip verstanden werden. Eine quantitative Behandlung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ionen und Membranen einerseits und Ionen und Wasser andererseits ist von Eisenman auf der Grundlage Coulombscher Kräfte durchgeführt worden (vgl. Diamond & Wright, 1969; Triggle, 1972): So ergibt sich für das Gleichgewicht



eine freie Bindungsenergie

$$(13) \quad F_{X,Y}^{\circ} = (\bar{F}_X - \bar{F}_Y)_{\text{el.}} - (\bar{F}_X - \bar{F}_Y)_{\text{hydr.}}$$

Hierin sind X^+ und Y^+ die konkurrierenden Ionen, sol. und membr. Indizes für 'gelöst' bzw. 'membrangebunden' und el. und hydr. Symbole für die elektrostatische und die Hydratationswechselwirkung. Auf dieser Grundlage kann Eisenman z.B. von den

$5! = 120$ denkbaren Kombinationen für die Affinität der 5 Alkalimetalle die 11 tatsächlich auftretenden Affinitätssequenzen zu Membranen (u.ä.) voraussagen. Für den Spezialfall sehr hoher Ladungsdichten wird der erste Term der Gleichung gegenüber den Hydratationsenergien dominieren, und das Ion mit dem größten Ionenpotential die stärkste elektrostatische Anziehung verspüren. Der dem Ionenpotential folgende Kationenaustausch an den Vesikeln zeigt also, daß in ihnen eine sehr hohe negative Ladungsdichte vorliegt.

Obwohl sich für das Kalzium die drastischen Konzentrationserniedrigungen in der Membranfraktion und deren Auswascheffekte in andere Fraktionen überlagern, kann auch für dieses Ion die Aufnahme in die synaptischen Vesikel gezeigt werden: Außer der Proportionalität der Ca- und ACh-Verteilung nach der Stimulation (Abb. 39, S. 101) fällt auf (Tabelle 4, S. 86), daß die Vesikelfraktion der elektrisch stimulierten Organe wesentlich mehr Kalzium enthält als diejenige der in NaCl-Lösung präparierten Organe (41,8 : 16,4), während sich die Konzentrationen der beiden Nachbarfraktionen jeweils gleichen (16,3 : 14,4 und 11,3 : 10,9).

5.10. Zur Vesikelheterogenität

Der im vorangegangenen Kapitel diskutierte Befund, daß die Vesikelzahl bei elektrischer Reizung auf die Hälfte, der Azetylcholin- und ATP-Gehalt der Vesikelfraktion dagegen auf 10% zurückgehen, macht deutlich, daß an der synaptischen

Erregungsübertragung verschiedenartige Vesikel, beziehungsweise Vesikel in unterschiedlichen Reifezuständen beteiligt sind. Darüber hinaus wurde gezeigt (Zimmermann & Whittaker, 1974), daß die bei der Stimulation 'neu' erscheinende Vesikelpopulation einen um 20% kleineren Durchmesser besitzt (der allerdings den ACh- und ATP-Abfall nicht erklärt, Whittaker, 1973) und daß sich das ACh : ATP-Verhältnis schon nach wenigen Impulsen deutlich erniedrigt (Dowdall & Zimmermann, 1974; vgl. auch Dowdall, 1974). Die in den zitierten Arbeiten ausgesprochene Vermutung, daß eine besonders azetylcholinreiche Subpopulation der Vesikel ihren Transmittergehalt zuerst freisetzt, wird durch Studien der Erholungsphase des elektrischen Organs (Zimmermann & Whittaker, 1974a) weiter gestützt, die zeigen, daß die Spannungsschübe auf einzelne Impulse bald ihre normale Stärke wiedererreichen, während der ACh-Gehalt des Organs noch klein und seine Erschöpfbarkeit noch groß ist. Schließlich spricht der zeitliche Abfall der elektrischen Entladungen, bei der auf ein anfangs sehr starkes Absinken eine erst nach mehreren tausend Impulsen abklingende Plateauphase folgt, für ein Modell, nach dem günstig plazierte synaptische Vesikel viele Zyklen der Entladung und Wiederaufladung durchlaufen, ehe sie vollständig mit der Zellmembran verschmelzen. Zwar ist die bevorzugte Freisetzung von neu synthetisiertem Transmitter schon lange bekannt (z.B. Collier, 1969), und die Heterogenität des 'gebundenen' Azetylcholins zum Teil auch anders interpretiert worden (vgl. z.B. Marchbanks & Israëel, 1972), aber in letzter Zeit mehren sich doch die Ergebnisse (Boyne, Bohan & Williams, 1974, und insbesondere die

eleganten Arbeiten von Ceccarelli, Hurlbut & Mauro, 1973 und von Heuser & Reese, 1973), die zu Gunsten des oben dargelegten Schemas sprechen.

Die Entdeckung, daß die Vesikel bei der hier, statt der sonst üblichen NaCl-Präparation, durchgeführten Glycin-Präparation über ein breiteres Dichtespektrum verteilt sind, in dem der Konzentrationspeak für ACh an der Grenze zwischen 0,15 und 0,2 M (statt 0,2 und 0,4) Saccharoselösung liegt, und der relativ hohe Gehalt an Synaptosomen führten zur Entwicklung der Gradienten vom Typ II, mit denen versucht wurde, die heterogenen synaptischen Vesikel voneinander abzutrennen (S. 100 - 107). Es erweist sich, daß die dichteren Vesikel ACh-reicher sind. Nach der Stimulation ist dieser besonders ACh-reiche 'pool' (Fraktion 6 und 7) verschwunden, während das Azetylcholin : ATP-Verhältnis der in Synaptosomen eingeschlossenen Vesikel der Membranfraktion (8) unverändert hoch ist. Möglicherweise handelt es sich bei den letztgenannten (membrangebundenen? - vgl. Boyne, Bohan & Williams, 1974) Vesikeln um jene, günstig plazierte Subpopulation, die bevorzugt mit Transmitter be- und entladen wird. Ebenfalls im Einklang mit den oben zitierten Ergebnissen verschiebt sich der Vesikelpeak bei der Stimulation zu leichteren Saccharoselösungen, und diese Vesikel haben einen kleineren Durchmesser. Eine weitere Verbesserung des Gradienten könnte die Grundlage für eine Abtrennung der synaptischen Vesikel je nach ihrem physiologischen Zustand liefern.

Serck-Hanssen & Helle (1972) haben außer von einer Abnahme des

Durchmessers und der Schwebedichte auch von einer (gegenüber ATP) bevorzugten Katecholaminfreisetzung aus den chromaffinen Granula der Rindernebenniere berichtet, aber ihre Daten hierfür (Tabelle 2, S. 20) erwecken eher den Eindruck von Perfusionsergebnissen.

5.11. Über die Beteiligung einer Magnesium-ATPase

In den Abbildungen 36 und 43 (S. 97 und 105) ist die verblüffende Kovarianz zwischen der stimulationsbedingten Magnesiumzunahme und dem ACh : ATP-Verhältnis nach der Stimulation eingezeichnet. Obwohl es sich hierbei um einen Zufall handeln kann, sei auf die Tatsache hingewiesen, daß von einigen Autoren in den Vesikeln verschiedener sekretorischer Systeme eine Magnesium-aktivierte ATPase angenommen wird (vgl. Tabelle 12, S. 123), während andere Autoren eine Verunreinigung der Vesikelfraktion mit diesem Enzym vermuten (Nagy et al., 1975). Es gibt sehr viele Spekulationen über eine Beteiligung der ATPasen an der Sekretspeicherung, aber fast keine Daten dazu. Besonders interessant erscheint jedoch, daß Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen das scheinbare mittlere Molekulargewicht von ATP-Aggregationen mit biogenen Aminen erhöhen (Berneis, Pletscher & Da Prada, 1969), und daß Komplexe dieser Erdalkalimetalle mit ATP oder GTP biogene Amine inkorporieren (Berneis, Da Prada & Pletscher, 1971). Es könnte also ein passiver Aufnahmemechanismus in das Innere der Speicherbläschen angenommen werden. Das hohe Molekulargewicht der Aggregationen würde zugleich den osmotischen Druck im Innern der Vesikel senken und ein Hinausdiffundieren des Sekretes erschweren. Auch hier könnten weitere Untersuchungen neue Gemeinsamkeiten zwischen den chromaffinen Granula und den cholinergen synaptischen Vesikeln ergeben.

6. Zusammenfassung

Das ausschließlich cholinerg innervierte elektrische Organ von *Torpedo marmorata* dient als Modellsystem für die Untersuchung der Azetylcholinfreisetzung aus den cholinergen Nervenendigungen. Die durch eine Depolarisierung der Zellmembran unter Einstrom von Natrium- und Kalziumionen und Ausstrom von Kaliumionen hervorgerufene Transmitterfreisetzung erfolgt nur in Anwesenheit von Kalziumionen. Nachforschungen über die Rolle der Metallionen führen zu folgenden Ergebnissen:

1. Das elektrische Organ von *Torpedo marmorata* enthält Kalium, Kalzium, Magnesium, Natrium und Zink.
2. Die Atomabsorptionsspektralphotometrie kann zu einer geeigneten Methode für die quantitative Bestimmung der sehr kleinen Metallkonzentrationen in den hier betrachteten subzellulären Strukturen ausgebaut werden.
3. Eine weitgehend kontaminationsfreie Isolierungsmethode für die synaptischen Vesikel wird beschrieben.
4. Natrium, Kalium und Magnesium liegen überwiegend als freigelöste Ionen vor.
5. Kalzium ist an schwere Membranen, wahrscheinlich die präsynaptischen Membranen, gebunden.
6. Alle genannten Metallionen werden unspezifisch von den synaptischen Vesikeln gebunden.
7. Eine Reizung des elektrischen Organs über Elektroden am Lobus electricus führt zu einem hochsignifikanten Kalziumverlust der Membranfraktion um 85%. Ein ebenso starker Abfall der Kalziumkonzentration kann hervorgerufen werden, wenn die

subzellulären Fraktionen in NaCl-Lösung präpariert werden. Die physiologische Relevanz dieser Veränderungen wird diskutiert, wobei das Schwergewicht auf die hervortretenden Analogien zu anderen sekretorischen Systemen gelegt wird.

8. Der Metallionengehalt der synaptischen Vesikel, die nach elektrischer Stimulation isoliert werden, ist größer als jener der Vesikel aus dem unstimulierten Kontrollorgan. Die unspezifische Aufnahme der Metallkationen in die Vesikel und die Berechnung der Konzentrationsverhältnisse stehen mit der Interpretation in Einklang, daß die Aufnahme der Metallionen im Ionenaustausch erfolgt.
9. Ein Vergleich der Fraktionen der Dichtegradienten ergibt Anzeichen für eine Heterogenität der synaptischen Vesikel und eine Kovarianz der Magnesiumzunahme mit dem ACh/ATP-Verhältnis nach Stimulation.
10. Alle Befunde stehen in Einklang mit einem hypothetischen Modell, das folgende Stadien umfaßt: Das einlaufende Aktionspotential führt zu einer Ablösung des Kalziums von der präsynaptischen Membran in das Zellinnere. Die ansteigende intrazelluläre Konzentration an freiem Kalzium löst die Anlagerung der synaptischen Vesikel an die Zellmembran aus. Der Transmitter wird in den synaptischen Spalt freigesetzt, gleichzeitig wird das in den Vesikeln vorhandene ATP zu AMP gespalten. Der aufgetretene Ladungsverlust wird durch Metallkationen ausgeglichen. Einige Vesikel laden sich erneut mit Azetylcholin auf und durchlaufen mehrmals den genannten Zyklus, bis sie schließlich mit der Zellmembran verschmelzen.

Anhang 1: Datenverarbeitung

Zur rechnerischen Behandlung der Dichtegradienten (vgl. Kap. 3.12., S. 65) werden die Meßwerte im Demand-Betrieb mit dem Programm "LESEN" auf das File "DATEN" gelesen. Von dort werden sie anschließend für jeden Versuch in ein bestimmtes Element ("SOO1", "SOO2" usw.) des Files "RSADATEN" kopiert und so gespeichert.

Zur Auswertung wird mit Hilfe von Steuerkarten aus den Fileelementen ("RSADATEN.SOO1", "RSADATEN.SOO2" usw.) der zu behandelnden Experimente ein neues File "DATEN" erstellt. Dann wird das Programm "AUSWERTEN" aufgerufen, das wahlweise Informationen von den Lochkarten (z.B. zur Normierung der Dichtegradienten) oder vom File "DATEN" einliest.

"AUSWERTEN" besteht aus einem kurzen Hauptprogramm (Statement 55 bis 520) zum Einlesen der Daten, das eine Subroutine 1. Ordnung (Statement 1000 bis 2010) anspricht, die, je nach der gerade behandelten Komponente, die Meßwerte zur Berechnung in die verschiedenen Subroutines 2. Ordnung dirigiert. Durch einfache Umstellungen in der Subroutine 1. Ordnung und das Einfügen einiger Druckbefehle in die Subroutines 2. Ordnung können somit beliebige Relationen zwischen den gemessenen Komponenten berechnet und statistisch überprüft werden. In der hier wiedergegebenen Form werden die RSK-Werte berechnet.

PROGRAMM "LESEN"

```
70 OPEN DATEN FOR OUTPUT AS FILE 1
74 LET PO$='NACL.UN'
75 LET P1$='GLY.UN'
76 LET P2$='NACL.KO.P3'
77 LET P3$='GLY.KO.P3'
78 LET P4$='NACL.ST.P3'
79 LET P5$='GLY.ST.P3'
80 LET P6$='NACL.KO.P4'
81 LET P7$='GLY.KO.P4'
82 LET P8$='NACL.ST.P4'
83 LET P9$='GLY.ST.P4'
84 PRINT ON1:PO$
85 PRINT ON1:P1$
86 PRINT ON1:P2$
87 PRINT ON1:P3$
88 PRINT ON1:P4$
89 PRINT ON1:P5$
90 PRINT ON1:P6$
91 PRINT ON1:P7$
92 PRINT ON1:P8$
93 PRINT ON1:P9$
96 LET MO$='CA'
97 LET M1$='MG'
98 LET M2$='K'
99 LET M3$='NA'
100 LET M3$='ZN'
101 LET M5$='LI'
102 LET M6$='ACH'
103 LET M7$='ATP'
104 LET M8$='TOTAL ESTERASE'
105 LET M9$='PROTEIN'
106 LET NO$='VOLUMEN'
107 LET N1$='DICHTE'
116 PRINT ON1:MO$
117 PRINT ON1:M1$
118 PRINT ON1:M2$
```

```
119 PRINT ON1:M3$
120 PRINT ON1:M4$
121 PRINT ON1:M5$
122 PRINT ON1:M6$
123 PRINT ON1:M7$
124 PRINT ON1:M8$
125 PRINT ON1:M9$
126 PRINT ON1:NO$
127 PRINT ON1:N1$
178 DIM D(10)
180 DIM M(4,13)
190 PRINT 'ART DES EXPERIMENTES?'
200 INPUT S$
210 PRINT ON1:S$
220 INPUT S1$
230 PRINT ON1:S1$
232 INPUT S2$
234 PRINT ON1:S2$
240 PRINT 'EXPERIMENT ';S$;' ZAHL DER PRAEPARATIONSWEISEN?'
242 INPUT P
244 PRINT ON1:P
246 FOR P1=1 TO P
248 PRINT 'PRAEPARATIONSWEISE'; P1
250 INPUT P$
252 PRINT ON1:P$
272 PRINT 'WIEVIEL GEWEBE GELADEN';
274 INPUT Q
276 PRINT ON1:Q
280 PRINT 'PRAEPARATIONSWEISE ';P1;' ZAHL DER GEMESSENEN KOMPONEN-
290 INPUT M
300 PRINT ON1:M
310 FOR M1=1 TO M
312 PRINT 'KOMPONENTE'; M1
314 INPUT M$
316 PRINT ON1:M$
320 PRINT 'KOMPONENTE';M$;' ZAHL DER GRADIENTEN?'
330 INPUT G
340 PRINT ON1:G
```

```
342 PRINT 'PRAEPARATIONSWEISE: ';P$
344 PRINT 'KOMPONENTE: ';M$;' AUSGANGSMENGE?'
346 INPUT M(P1,M1)
348 PRINT ON1:M(P1,M1)
350 FOR G1=1 TO G
360 PRINT 'GRADIENT ';G1;' ZAHL DER FRAKTIONEN? '
370 INPUT F
380 PRINT ON1:F
390 FOR F1=1 TO F
400 PRINT 'D(';F1;')?'
410 INPUT D(F1)
420 PRINT ON1:D(F1)
430 NEXT F1
440 NEXT G1
450 NEXT M1
460 NEXT P1
469 PRINT
470 PRINT 'ALLE WERTE EINGELESEN FUER'
480 PRINT S$
490 CLOSE 1
999 STOP
6500 END
```

PROGRAMM "AUSWERTEN"

```
55 GOTO 55000
60 PRINT 'FILENAME ' ;
61 LET Z9=1
62 LET Z8=Z8+1
65 INPUT F$
66 PRINT 'VERGLEICH?      JA = 1      NEIN = 0'
67 INPUT V1
68 IF VO=1 THEN 71
70 OPEN DATEN FOR INPUT AS FILE 1
71 GOSUB 41080
72 LET Z9=2
74 INPUT FROM 1: PO$
75 INPUT FROM 1: P1$
76 INPUT FROM 1: P2$
77 INPUT FROM 1: P3$
78 INPUT FROM 1: P4$
79 INPUT FROM 1: P5$
80 INPUT FROM 1: P6$
81 INPUT FROM 1: P7$
82 INPUT FROM 1: P8$
83 INPUT FROM 1: P9$
96 INPUT FROM 1: MO$
97 INPUT FROM 1: M1$
98 INPUT FROM 1: M2$
99 INPUT FROM 1: M3$
100 INPUT FROM 1: M4$
101 INPUT FROM 1: M5$
102 INPUT FROM 1: M6$
103 INPUT FROM 1: M7$
104 INPUT FROM 1: M8$
105 INPUT FROM 1: M9$
106 INPUT FROM 1: NO$
107 INPUT FROM 1: N1$
110 IF Z8>1 THEN 200
138 DIM O(10)
139 DIM G(10)
140 DIM Q(13)
```

```
142 DIM A(10)
143 DIM R(10)
145 DIM X(10,13)
150 DIM B(9)
151 DIM C(13,10)
152 DIM D(10)
153 DIM E(10)
154 DIM F(9,9,10)
155 DIM H(9,9,10)
156 DIM I(13,10)
157 DIM K(13,10)
158 DIM J(13,10)
159 DIM L(13,10)
160 DIM M(4,13)
161 DIM P(4,10)
162 DIM S(9,9,10)
163 DIM U(9,10)
164 DIM V(4,10)
165 DIM W(9,10)
166 DIM Z(15,4,4,10)
167 DIM T(9,9,10)
200 INPUT FROM 1: S$
220 INPUT FROM 1: S1$
232 INPUT FROM 1: S2$
242 INPUT FROM 1: P
246 FOR P1=1 TO P
248 LET A2=0
250 INPUT FROM 1: P$
280 INPUT FROM 1: Q
290 INPUT FROM 1: M
310 FOR M1=1 TO M
314 INPUT FROM 1: M$
315 GOSUB 51000
316 PRINT 'M$ = ';M$
330 INPUT FROM 1: G
346 INPUT FROM 1: M(P1,M1)
350 FOR G1=1 TO G
355 PRINT 'G1= ';G1
360 LET A1=0
```

```
370 INPUT FROM 1: F
390 FOR F1=1 TO F
410 INPUT FROM 1: D(F1)
425 GOSUB 1000
430 NEXT F1
440 NEXT G1
445 LET X(X,N1)=B(X)
450 NEXT M1
460 NEXT P1
470 PRINT 'BIN FERTIG MIT ';S$
490 PRINT 'WAS NUN?      WEITER = 1      ENDE = 0'
500 INPUT VO
510 IF VO=0 THEN 50000
1000 REM AUFRUFEN DER SUBROUTINES, JE NACH DER BEHANDELTEN KOMPO-
1100 IF M$= NO$ THEN 1120                                NENTE
1102 LET A=F1
1103 IF M$=N1$ THEN 1107
1104 GO TO 1190
1107 RETURN
1120 IF F1=F THEN 1140
1130 RETURN
1140 GOSUB 15000
1190 REM ZUORDNUNG DES MOLEKULARGEWICHTES
1200 IF M$=MO$ THEN M2=40.08
1201 IF M$=MO$ THEN 1245
1202 IF M$=M1$ THEN M2=24.312
1203 IF M$=M1$ THEN 1245
1204 IF M$=M2$ THEN M2=39.102
1205 IF M$=M2$ THEN 1245
1206 IF M$=M3$ THEN M2=22.9898
1207 IF M$=M3$ THEN 1245
1208 IF M$=M4$ THEN M2=65.37
1209 IF M$=M4$ THEN 1245
1210 IF M$=M5$ THEN M2=6.939
1211 IF M$=M5$ THEN 1245
1220 LET E(F1)=D(F1)
1227 IF F1=F THEN 1231
1229 RETURN
```

```
1231 GOSUB 14000
1233 GOSUB 16000
1235 GOSUB 17000
1237 GOSUB 18000
1239 IF M9=M9 THEN 1243
1240 GOSUB 20000
1241 GOSUB 30050
1242 RETURN
1243 GOSUB 19000
1244 RETURN
1245 GOSUB 41000
1250 IF P9=PO THEN 1270
1260 IF P9=P1 THEN 1270
1265 GO TO 1505
1270 IF F1=F THEN 1280
1275 RETURN
1280 IF Q(M1)=0 THEN 1285
1283 GOSUB 12100
1284 RETURN
1285 GOSUB 11000
1390 RETURN
1505 IF F1=F THEN 1520
1510 RETURN
1520 GOSUB 13000
1530 GOSUB 10000
1550 GOSUB 21100
1600 GOSUB 14000
1700 GOSUB 16000
1800 GOSUB 17000
1900 GOSUB 18000
2000 GOSUB 20000
2005 GOSUB 30050
2010 RETURN
10000 REM SUBROUTINE ZUM NORMIEREN DES NULLWERTES
10080 FOR F1=1 TO F
10090 IF A1>0 THEN 10110
10100 LET D1=0
10110 IF E(F1)<D1 THEN 10120
```

```
10115 GO TO 10130
10120 LET D1=E(F1)
10130 LET A1=A1+1
10138 NEXT F1
10140 IF F1=F THEN 10160
10150 RETURN
10160 FOR A=1 TO F
10170 LET E(A)=E(A)-D1
10180 NEXT A
10190 RETURN
11000 REM SUBROUTINE ZUM SPEICHERN DER BLINDWERTE
11090 LET Q(M1)=Q(M1)+1
11100 FOR A=1 TO F
11110 LET C(M1,A)=D(A)
11120 NEXT A
11190 RETURN
12000 REM SUBROUTINE ZUM MITTELN DER BLINDWERTE
12100 FOR A=1 TO F
12110 LET C(M1,A)=(C(M1,A)+D(A))/(Q(M1)+1)
12120 NEXT A
12190 RETURN
13000 REM SUBROUTINE ZUM SUBTRAHIEREN DER BLINDWERTE
13090 FOR A=1 TO F
13100 IF S$='SOO5' THEN 13114
13101 IF S$='SOO6' THEN 13114
13102 IF S$='SOO7' THEN 13114
13103 IF S$='SOO8' THEN 13114
13113 GO TO 13116
13114 LET O2=0
13115 GO TO 13118
13116 LET O2=1
13118 LET E(A)=D(A)-C(M1-O2,A)
13120 NEXT A
13190 RETURN
14000 REM SUBROUTINE ZUR NORMIERUNG AUF 1 GRAMM GEWEBE
14100 FOR A=1 TO F
14110 LET E(A)=E(A)/Q
```

```
14120 NEXT A
14190 RETURN
15000 REM SUBROUTINE ZUM SPEICHERN DER VOLUMINA
15100 FOR A=1 TO F
15105 IF A=1 THEN 15107
15106 GO TO 15110
15107 LET V=0
15110 LET V(G1,A)=D(A)
15118 LET V=V+V(G1,A)
15120 NEXT A
15130 LET V=(100*V)/M(P1,M1)
16000 REM SUBROUTINE ZUM BERECHNEN DER ABSOLUTMENGE
16100 FOR A=1 TO F
16110 LET E(A)=E(A)*V(G1,A)
16120 NEXT A
16190 RETURN
17000 REM SUBROUTINE ZUM BERECHNEN DER AUSBEUTE
17090 LET S=0
17100 FOR A=1 TO F
17110 LET S=S+E(A)
17120 NEXT A
17123 IF M8=M8§ THEN 17132
17124 IF M9=M9§ THEN 17132
17130 LET R=(100*S)/(1.00000E+06*M(P1,M1))
17132 LET R=(100*S)/M(P1,M1)
17190 RETURN
18000 REM SUBROUTINE ZUM BERECHNEN DER RELATIVEN VERTEILUNG
18100 FOR A=1 TO F
18110 LET E(A)=(100*E(A))/S
18120 NEXT A
18190 RETURN
19000 REM SUBROUTINE ZUM SPEICHERN DER RELATIVEN PROTEINVERTEILUNG
19100 FOR A=1 TO F
19110 LET P(G1,A)=E(A)
19115 GOSUB 62500
19120 NEXT A
19190 RETURN
20000 REM SUBROUTINE ZUM BERECHNEN DER RSK-WERTE
```

```
20100 PRINT 'RSK-WERT'  
20102 IF P(G1,A)=D THEN 20106  
20104 GO TO 20109  
20106 PRINT 'KENNE KEIN PROTEIN'  
20108 RETURN  
20109 FOR A=1 TO F  
20110 LET E(A)=E(A)/P(G1,A)  
20112 PRINT E(A)  
20120 NEXT A  
20190 RETURN  
21100 FOR A=1 TO F  
21110 LET E(A)=(1000*E(A))/M2  
21140 NEXT A  
21150 RETURN  
30050 REM SUBROUTINE ZUR MITTELWERTBILDUNG UND ZUM STATISTISCHEN  
VERGLEICH DER GRADIENTEN  
30098 FOR A=1 TO F  
30099 LET B5=D  
30100 LET G(A)=E(A)  
30101 LET E(A)=E(A)-Z(Z8,P1,G1,A)*E(A)  
30102 IF -Z(Z8,P1,G1,A)=1 THEN 30111  
30104 FOR Q9=1 TO 6  
30105 IF (A-Q9)<1 THEN 30111  
30106 LET E(A)=E(A)+Z(Z8,P1,G1,A-Q9)*G(A-Q9)  
30107 GO TO 62000  
30108 GO TO 30111  
30109 NEXT Q9  
30111 LET E(A)=E(A)/(B5+1)  
30120 NEXT A  
30200 LET O5=D  
30220 FOR A=1 TO F  
30260 IF A-1<1 THEN 30400  
30280 IF Z(Z8,P1,G1,A-1)=1 THEN O5=O5+1  
30400 LET O(A-O5)=E(A)  
30420 NEXT A  
30500 FOR A=1 TO F  
30520 LET E(A)=O(A)  
30540 NEXT A  
31600 IF V1=1 THEN GO TO 31605 ELSE GO TO 31700
```

```

31605 FOR A=1 TO F
31607 IF X=9 THEN GO TO 31610 ELSE GO TO 31640
31610 IF G1=1 THEN GO TO 31615 ELSE GO TO 31620
31615 LET I(N1,A)=E(A)
31617 GO TO 31625
31620 LET I(N1,A)=I(N1,A)+E(A)
31625 IF G1=G THEN GO TO 31630 ELSE GO TO 31698
31630 LET I(N1,A)=I(N1,A)/G
31632 IF A>1 THEN 31640
31635 LET A(N1)=A(N1)+1
31640 IF X=7 THEN GO TO 31645 ELSE GO TO 31698
31645 IF G1=1 THEN GO TO 31650 ELSE GO TO 31655
31650 LET J(N1,A)=E(A)
31652 GO TO 31660
31655 LET J(J1,A)=J(N1,A)+E(A)
31660 IF G1=G THEN GO TO 31665 ELSE GO TO 31698
31665 LET J(N1,A)=J(N1,A)/G
31668 IF A>1 THEN 31 672
31670 LET R(N1)=R(N1)+1
31672 LET K(N1,A)=J(N1,A)-I(N1,A)
31675 LET V43(A(N1)+R(N1))/2
31676 LET L(N1,A)=K(N1,A)Δ2
31678 LET U(N1,A)=U(N1,A)+K(N1,A)
31680 LET W(N1,A)=W(N1,A)+L(N1,A)
31682 IF V4>2 THEN GO TO 31684 ELSE GO TO 31698
31684 LET V5=U(N1,A)/V4
31688 PRINT 'MITTLERE DIFFERENZ ( ';A;' ) = ';
31690 PRINT V5;' ( ';V4;' ) ';
31692 LET T=(W(N1,A)-((U(N1,A))Δ2/V4))/(V4-1)
31694 LET T=V5/(SQR(T)/SQR(V4))
31696 PRINT 'T-WERT = ';T;'      ';(V4-1);' FREIHEITSGRADE'
31698 NEXT A
31700 FOR A=1 TO F
31702 LET F(X,N1,A)=F(X,N1,A)+E(A)
31705 LET H(X,N1,A)=H(X,N1,A)+(E(A))Δ2
31708 NEXT A
31710 IF A=F THEN 33200
31715 RETURN

```

```

33200 LET B(X)=B(X)+1
33203 IF B(X)>1 THEN GO TO 33205 ELSE GO TO 33295
33205 PRINT P$
33206 FOR A=1 TO F
33210 LET S(X,N1,A)=(SQR((H(X,N1,A)-((F(X,N1,A))Δ2)/B(X))/(B(X)
-1)))/SQR(B(X))
33220 PRINT 'MITTELWERT ' ;M$; ' ' ;A; ' = ' ;
33230 PRINT (F(X,N1,A))/B(X); ' ' ;
33240 PRINT 'S.E.M. ' ;
33250 PRINT S(X,N1,A); ' (' ;B(X); ' ) '
33260 LET E(A)=(F(X,N1,A))/B(X)
33290 NEXT A
33295 LET E(A)=(F(X,N1,A))/B(X)
33300 RETURN
41000 REM SUBROUTINE FÜR NEUEN BLINDWERT-GRADIENTEN
41010 IF P$=PO$ THEN 41040
41020 IF P$=P1$ THEN 41040
41030 RETURN
41040 IF P1>1 THEN 41060
41050 RETURN
41060 IF W=0 THEN 41080
41070 RETURN
41080 FOR M3=1 TO M
41090 LET Q(M3)=0
41100 FOR A=1 TO F
41110 LET C(M3,A)=0
41120 NEXT A
41130 NEXT M3
41135 IF Z9=1 THEN 41150
41140 LET W=1
41150 RETURN
50000 REM SUBROUTINE FÜR DEN UNGEPAARTEN T-TEST
50010 PRINT 'UNPAIRED T-TEST'
50080 FOR N1=D TO 9
50090 PRINT 'N1 = ' ;N1
50100 FOR X=2 TO 9
50110 FOR Y=2 TO (X-1)
50115 FOR A=1 TO F

```

```

50119 IF X(X,N1)<=0 THEN 50310
50120 LET S(X,N1,A)=H(X,N1,A)-(F(X,N1,A) $\Delta$ 2)/X(X,N1)
50129 IF X(Y,N1)<=0 THEN 50300
50130 LET S(Y,N1,A)=H(Y,N1,A)-(F(Y,N1,A) $\Delta$ 2)/X(Y,N1)
50139 IF (X(X,N1)+X(Y,N1))<=2 THEN 50300
50140 LET S(X,N1,A)=(S(X,N1,A)+S(Y,N1,A))
50141 LET S(X,N1,A)=S(X,N1,A)/(X(X,N1)+X(Y,N1)-2)
50150 LET S(X,N1,A)=SQR(S(X,N1,A))
50160 LET S(X,N1,A)=S(X,N1,A)*SQR(1/X(X,N1)+1/X(Y,N1))
50162 LET T(X,N1,A)=(F(X,N1,A)/X(X,N1)-F(Y,N1,A)/X(Y,N1))
50164 LET T(X,N1,A)=T(X,N1,A)/S(X,N1,A)
50175 PRINT 'VERGLICHEN ' ; X ; ' ' ; Y ; ' ' ;
50178 PRINT 'FRAKTION ' ; A
50179 PRINT 'DIFFERENZ DER MITTELWERTE = ' ;
50180 PRINT (F(X,N1,A)/X(X,N1)-F(Y,N1,A)/X(Y,N1)) ; ' ' ;
50190 PRINT 'T-WERT = ' ; T(X,N1,A) ;
50200 PRINT ' ' ; (X(X,N1)+X(Y,N1)-2) ; ' FREIHEITSGRADE'
50280 NEXT A
50300 NEXT Y
50310 NEXT X
50320 NEXT N1
50330 GO TO 64998
51000 GOSUB 60000
51001 REM SUBROUTINE ORDNET DER KOMPONENTE EINEN WERT N1 ZU
51002 IF M $\S$ =M0 $\S$  THEN N1=0
51010 IF M $\S$ =M1 $\S$  THEN N1=0
51020 IF M $\S$ =M2 $\S$  THEN N1=2
51030 IF M $\S$ =M3 $\S$  THEN N1=3
51040 IF M $\S$ =M4 $\S$  THEN N1=4
51050 IF M $\S$ =M5 $\S$  THEN N1=5
51060 IF M $\S$ =M6 $\S$  THEN N1=6
51070 IF M $\S$ =M7 $\S$  THEN N1=7
51080 IF M $\S$ =M8 $\S$  THEN N1=8
51090 IF M $\S$ =M9 $\S$  THEN N1=9
51200 LET B(X)=X(X,N1)
51210 RETURN
55000 REM SUBROUTINE ZUR DICHTENORMIERUNG
55010 PRINT 'ZAHL DER EXPERIMENTE'

```

```
55020 INPUT U9
55030 OPEN DATEN FOR INPUT AS FILE 1
55035 FOR U7=1 TO U9
55037 PRINT U7
55040 FOR U8=1 TO 25
55050 INPUT FROM 1: U$
55055 NEXT U8
55060 INPUT FROM 1: P
55070 FOR P1=1 TO P
55080 INPUT FROM 1: P$
55085 PRINT P$
55090 INPUT FROM 1: U8
55100 INPUT FROM 1: M
55110 FOR M1=1 TO M
55120 INPUT FROM 1: M$
55140 INPUT FROM 1: G
55150 INPUT FROM 1: M(P1,M1)
55160 FOR G1=1 TO G
55170 INPUT FROM 1: F
55180 FOR F1=1 TO F
55190 INPUT FROM 1: D(F1)
55200 GOSUB 56000
55210 NEXT F1
55220 NEXT G1
55230 NEXT M1
55240 NEXT P1
55250 NEXT U7
55260 CLOSE 1
55300 GO TO 60
56000 IF M$='DICHTE' THEN 58000
56040 RETURN
58000 REM KONSTRUKTION EINES FIKTIVEN DICHTEGRADIENTEN
58100 IF F1=F THEN 58104
58102 GO TO 56040
58104 IF P1=P THEN 58120
58110 GO TO 56040
58120 IF G1=G THEN 58140
58130 GO TO 56040
```

```
58140 PRINT 'Z-WERT'  
58150 FOR F1=1 TO F  
58160 INPUT O3  
58170 FOR P1=1 TO P  
58180 FOR G1=1 TO 4  
58190 LET Z(U7,P1,G1,F1)=O3  
58200 NEXT G1  
58210 NEXT P1  
58220 NEXT F1  
58230 GO TO 56040  
60000 REM SUBROUTINE ORDNET DER PRÄPARATIONSWEISE EINEN WERT X ZU  
61000 IF P$=P0$ THEN X=0  
61001 IF P$=P1$ THEN X=1  
61002 IF P$=P2$ THEN X=2  
61003 IF P$=P3$ THEN X=3  
61004 IF P$=P4$ THEN X=4  
61005 IF P$=P5$ THEN X=5  
61006 IF P$=P6$ THEN X=6  
61007 IF P$=P7$ THEN X=7  
61008 IF P$=P8$ THEN X=8  
61009 IF P$=P9$ THEN X=9  
61020 RETURN  
62000 LET B5=B5+Z(Z8,P1,G1,A-Q9)  
62010 IF Z(Z8,P1,A-Q9)=1 THEN 30109  
62020 GO TO 30108  
62500 IF S$='SO10' THEN 62530  
62510 IF S$='SO11' THEN 62530  
62520 GO TO 62700  
62530 FOR A9=1 TO G  
62540 LET P(A9,A)=P(1,A)  
62550 NEXT A9  
62700 RETURN  
64998 CLOSE 1  
64999 STOP  
65000 END
```

Anhang 2: Literaturverzeichnis

- Abood, L.G. (1966): Interrelationships between phosphates and calcium in bioelectric phenomena. *Int. Rev. Neurobiol.*, 9, 223-261.
- Alnaes, E. and Rahamimoff, R. (1975): On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J. Physiol.*, 248, 285-306.
- Amsterdam, A., Ohad, I. and Schramm, M. (1969): Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. *J. Cell Biol.*, 41, 753-773.
- Babel-Guérin, E. (1974): Metabolisme du calcium et liberation de l'acetylcholine dans l'organe électrique de la torpille. *J. Neurochem.*, 23, 525-532.
- Babuchin, A. (1876): Übersicht der neuen Untersuchungen über Entwicklung, Bau und physiologische Verhältnisse der elektrischen und pseudoelektrischen Organe. *Arch. Anat. Phys.*, 18, 501-542.
- Baker, P.F., Hodgkin, A.L. and Ridgway, E.B. (1971): Depolarization and calcium entry in squid axons. *J. Physiol.*, 218, 709-755.
- Banks, P. (1965): The adenosine-triphosphatase activity of adrenal chromaffin granules. *Biochem. J.*, 95, 490-496.
- Banks, P. and Helle, K. (1965): The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.*, 97, 40-41C.
- Bargmann, W. (1954): Über die Endomeninx der Fische. (Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Turbanorgane.) *Z. Zellforsch.*, 40, 88-100.
- Batra, S. (1973): The role of mitochondrial calcium uptake in contraction and relaxation of the human myometrium. *Biochim. Biophys. Acta*, 305, 428-432.
- Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C. and Florey, E. (1957): Isolation of Factor 1. *J. Neurochem.*, 1, 334-339.
- Berl, S., Puszkin, S. and Nicklas, W.J. (1973): Actomyosin-like protein in brain. Actomyosin-like protein may function in the release of transmitter material at synaptic endings. *Science*, 179, 441-446.
- Berneis, K.H., Da Prada, M. and Pletscher, A. (1970): Metal-dependent aggregation of nucleotides with formation of biphasic liquid systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 215, 547-549.

- Berneis, K.H., Da Prada, M. and Pletscher, A. (1971): A possible mechanism for uptake of biogenic amines by storage organelles: incorporation into nucleotide-metal aggregates. *Experientia*, 27, 917-918.
- Berneis, K.H., Pletscher, A. and Da Prada, M. (1969): Metal-dependent aggregation of biogenic amines: a hypothesis for their storage and release. *Nature*, 224, 281-283.
- Bernstein, J. (1912): *Elektrobiologie*. Fr. Vieweg, Braunschweig.
- Birks, R.I. and Cohen, M.W. (1965): Effects of sodium on transmitter release from frog motor nerve terminals. In: *Muscle*, hrsg. von Paul, W.M., Daniel, E.E., Kay, C.M., und Monkton, G. London, Pergamon Press, S. 403-420.
- Blaustein, M.P. (1971): Preganglionic stimulation increases calcium uptake by sympathetic ganglia. *Science*, 172, 391-393.
- Blaustein, M.P. (1974): The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 70, 33-82.
- Blaustein, M.P. and Oborn, C.J. (1975): The influence of sodium on calcium fluxes in pinched-off nerve terminals in vitro. *J. Physiol.*, 247, 657-686.
- Bloom, F. and Barnett (1966): Fine structural localization of acetylcholinesterase in electroplaque of the electric eel. *J. Cell Biol.*, 29, 475-495.
- Bock, E. and Jørgensen, O.S.: Rat brain synaptic vesicles and synaptic plasma membranes compared by crossed immunoelectrophoresis. *FEBS Letters*, im Druck.
- Borowitz, J.L. (1969): Effect of acetylcholine on the subcellular distribution of ⁴⁵Ca in bovine adrenal medulla. *Biochem. Pharmacol.*, 18, 715-723.
- Borowitz, J.L., Fuwa, K. and Weiner, N. (1965): Distribution of metals and catecholamines in bovine adrenal medulla sub-cellular fractions. *Nature*, 205, 42-43.
- Boyne, A.F., Bohan, T.P. and Williams, T.H. (1974): Effects of calcium-containing fixation solutions on cholinergic synaptic vesicles. *J. Cell Biol.*, 63, 780-795.
- Burger, W. (1967): Problems in the electrolyte economy of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. In: *Sharks, skates, and rays*, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson, and D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.
- Carafoli, E. (1974): Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. *Biochem. Soc. Symp.*, 39, 89-109.

- Carafoli, E. and Rossi, C.S. (1971): Calcium transport in mitochondria. *Advances in Cytopharmacology*, 1, 209-227.
- Case, R.M. and Clausen, T. (1973): The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. *J. Physiol.*, 235, 75-102.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. and Mauro, A. (1973): Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 57, 499-524.
- Clemente, F. and Meldolesi, J. (1975): Calcium and pancreatic secretion. *J. Cell Biol.*, 65, 88-102.
- Collier, B. (1969): The preferential release of newly synthesized transmitter by a sympathetic ganglion. *J. Physiol.*, 205, 341-352.
- Curtis, D.R., Perrin, D.D. and Watkins, J.C. (1960): The excitation of spinal neurones by the ionophoretic application of agents which chelate calcium. *J. Neurochem.*, 6, 1-20.
- Dale, H.H., Feldberg, W. and Vogt, M. (1936): Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.*, 86, 353-380.
- del Castillo, J. and Engbaek, L. (1954): The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol.*, 124, 370-384.
- del Castillo, J. and Katz, B. (1954): Quantal components of the endplate potential. *J. Physiol. (Lond.)*, 124, 560-573.
- del Castillo, J. and Katz, B. (1956): Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Prog. Biophys. biophys. Chem.*, 6, 121-170.
- de Meis, L., Rubin-Altschul, B.M. and Machado, R.D. (1970): Comparative data of Ca^{2+} transport in brain and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 245, 1883-1889.
- de Robertis, E.D.P. and Bennett, H.S. (1955): Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1, 47-58.
- de Robertis, E. and Rodriguez de Lores Arnaiz, G. (1969): Structural components of the synaptic region. In *Handbook of Neurochemistry*, herausgegeben von A. Lajtha, 2, 365-392, Plenum Press, New York.
- de Robertis, E., de Iraldi, A.P., Rodriguez and Gomez, J. (1961): On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 9, 229-235.

- de Robertis, E., Rodriguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino de Iraldi, A. and Zieher, L.M. (1963): Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.*, 10, 225-235.
- Diamond, J.M. and Wright, E.M. (1969): Biological membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Ann. Rev. Physiol.*, 31, 581-646.
- Diner, O. (1967): L'expulsion des granules de la médullo-surrénale chez le Hamster. *C.R. Acad. Sc. Paris*, D 265, 616-619.
- Douglas, W.W. (1974): Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence. *Biochem. Soc. Symp.*, 39, 1-28.
- Douglas, W.W. and Poisner, A.M. (1964): Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis. *J. Physiol.*, 172, 1-18.
- Douglas, W.W. and Rubin, R.P. (1963): The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.*, 167, 288-310.
- Douglas, W.W., Ishida, A. and Poisner, A.M. (1965): The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from the isolated neurohypophysis. *J. Physiol.*, 181, 753-759.
- Dowdall, M.J. and Simon, E.J. (1973): Comparative studies on synaptosomes: uptake of N-Me-³H choline by synaptosomes from squid optic lobes. *J. Neurochem.*, 21, 969-982.
- Dowdall, M.J. and Zimmermann, H. (1974): Evidence for heterogeneous pools of acetylcholine in isolated cholinergic synaptic vesicles. *Brain Research*, 71, 160-166.
- Dowdall, M.J., Boyne, A.F. and Whittaker, V.P. (1974): Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.*, 140, 1-12.
- Dujmovic, M., Adrian, P. and Knözinger, E. (1974): Eine neuartige Methode der Kompensation unspezifischer Lichtverluste in der Atom-Absorptions-Spektroskopie, Beckman Report, 1 u. 2 / 1974, S. 36-39.
- Eccles, J.C. (1964): *The Physiology of Synapses*. Springer-Verlag, Berlin.
- Elliott, T.R. (1914): The Sidney Ringer memorial lecture on the adrenal glands. *Brit. Med. J.*, 1914, S. 1393-1397.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88.
- Euler, von, C. (1962): On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In: *Physiologie de l'hippocampe. Colloques internationaux du Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1962*, S. 135-145.
- Falck, B., Häggendal, J. and Owman, C. (1963): The localisation of adrenalin in adrenergic nerves in the frog. *Q. J. Exp. Physiol.*, 48, 253-257.
- Fatt, P. and Katz, B. (1952): Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.*, 117, 109-128.
- Fawcett, D.W., Powell, A.E. and Sachs, H. (1968): Biosynthesis and release of neurophysin. *Endocrinology* 83, 1299.
- Feldberg, W., Fessard, A. (1942): The cholinergic nature of the nerves of the electric organ of the Torpedo (Torpedo marmorata). *J. Physiol.*, 101, 200-216.
- Fillion, G.M.B., Slorach, S.A. and Uvnäs, B. (1970): The release of histamine, heparin and granule protein from rat mast cells treated with compound 48/80 in vitro. *Acta physiol. scand.*, 78, 547-560.
- Foreman, J.C. and Mongar, J.L. (1972): The role of the alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion. *J. Physiol.*, 224, 753-769.
- Frankenhaeuser, B. (1957): The effect of calcium on the myelinated nerve fibre. *J. Physiol.*, 137, 245-260.
- Frankenhaeuser, B. and Hodgkin, A.L. (1957): The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.*, 137, 218-244.
- Fritsch, G. (1890): *Die elektrischen Fische. Zweite Abteilung. Die Torpedineen*, von Veit, Leipzig.
- Gaddum, J.H. and Stephenson, R.P. (1958): A microbath. *Brit. J. Pharmacol.*, 13, 493-497.
- Germain, M. and Proulx, P. (1965): Adenosinetriphosphatase activity in synaptic vesicles of rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 14, 1815-1819.
- Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. and Rall, D.P. (1967): *Sharks, skates, and rays*. The John Hopkins Press. Baltimore.
- Haga, T. and Noda, H. (1973): Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 291, 564-575.

- Hanig, R.C. and Aprison, M.H. (1965): Determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in rabbit caudate nuclei by atomic absorption spectrophotometry. *Life Sciences*, 4, 945-948.
- Hanig, R.C. and Aprison, M.H. (1967): Determination of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium, zinc and chloride concentrations in several brain areas. *Anal. Biochem.*, 21, 169-177.
- Hanig, R.C., Tachiki, K.H. and Aprison, M.H. (1972): Subcellular distribution of potassium, sodium, magnesium, calcium and chloride in cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 19, 1501-1507.
- Harvey, A.M. and MacIntosh, F.C. (1940): Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. *J. Physiol.*, 97, 408-416.
- Hebb, C.O. and Krnjević, K. (1962): The physiological significance of acetylcholine. In: *Neurochemistry*, herausgegeben von K.A.C. Elliott, I.H. Page and J.H. Quastel, Thomas, Springfield.
- Hebb, C.O. and Whittaker, V.P. (1958): Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J. Physiol.*, 142, 187-196.
- Helle, K.B. (1973): Storage and release of neurotransmitters. *Abstr. 9th Int. Congr. Biochem.*, Stockholm, 1973, S. 440.
- Heuser, J.E. and Reese, T.S. (1973): Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 57, 315-344.
- Hillman, D.E. and Llinás, R. (1974): Calcium-containing electron-dense structures in the axons of the squid giant synapse. *J. Cell Biol.*, 61, 146-155.
- Hoar, W.S. and Randall, D.J. (1969): *Fish Physiology*, Band 1, Excretion, Ionic Regulation, and Metabolism, Academic Press, New York and London.
- Hodgkin, A.L. (1958): The Croonian Lecture: Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres. *Proc. Roy Soc., Ser., B.*, 148, 1-37.
- Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D. (1955): Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*, 128, 28-60.
- Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D. (1957): Movements of labelled calcium in squid giant axons. *J. Physiol.*, 138, 253-281.

- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952a): Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*, 116, 449-472.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952b): The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*, 116, 473-496.
- Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952c): The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)*, 116, 497-506.
- Hokin, L.E. (1966): Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slice. *Biochim. Biophys. Acta*, 115, 219.
- Holland, W.C. and Auditore, G.V. (1955): Distribution of potassium in liver, kidney and brain of the rat and guinea pig. *Am. J. Physiol.*, 1955, 309-313.
- Horsfield, G.I. (1965): The effect of compound 48/80 on the rat mast cell. *J. Path. Bact.*, 90, 599-605.
- Hosie, R.J.A. (1965): The localization of adenosine triphosphatase in morphologically characterized fractions of guinea pig brain. *Biochem. J.*, 96, 404.
- Hubbard, J.I. (1970): Mechanism of transmitter release, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 21, 33-124.
- Hubbard, J.I. and Kwanbunbumpen, S. (1968): Evidence for the vesicle hypothesis. *J. Physiol.*, 194, 407-420.
- Ibata, Y. and Otsuka, N. (1968): Electronmicroscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 171-175.
- Ichikawa, A. (1965): Fine structural changes in response to hormonal stimulation of the perfused canine pancreas. *J. Cell Biol.*, 24, 369-385.
- Israël, M., Gautron, J. and Lesbats, B. (1968): Isolement des vésicules synaptiques de l'organe électrique de la Torpille et localisation de l'acétylcholine à leur niveau. *Acad. Sci., Paris*, 266, 273-275.
- Israël, M., Gautron, J. and Lesbats, B. (1970): Fractionnement de L'Organe Electrique de La Torpille: Localisation Sub-cellulaire de L'Acetylcholine. *J. Neurochem.*, 17, 1441-1450.
- Iversen, L.L. (1967): *The Uptake and Storage of Noradrenalin in Sympathetic Nerves*. Cambridge, University Press.
- Jander, G. and Blasius, B. (1967): *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, Hirzel, Stuttgart.

- Jenkinson, D.H. (1960): The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. *J. Physiol.*, 152, 309-323.
- Kadota, K., Mori, S. and Imaizumi, R. (1967): The properties of ATPase of synaptic vesicle fraction. *J. Biochem.*, 61, 424-432.
- Kamino, K., Uyesaka, N., Ogawa, M. and Inouye, A. (1975): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. II. Inhibitory effects of magnesium ions and some other cations. *J. Membrane Biol.*, 21, 113-124.
- Katz, B. (1969): *The Release of Neuronal Transmitter Substances*. University Press, Liverpool.
- Katz, B. and Miledi, R. (1965): The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond.*, B 161, 496.
- Kawamura, H., Tanaka, G. and Ohyagi, Y. (1973): The rapid determination of barium in bone by atomic absorption spectrophotometry. *Spectrochim. Acta*, B 28, 309-318.
- Keller, P.J. and Cohen, E. (1961): Enzymic composition of some cell fractions of bovine pancreas. *J. biol. Chem.*, 236, 1407-1413.
- Klein, R.L. and Thureson-Klein, Å. (1971): An electron microscopic study of noradrenaline storage vesicles isolated from bovine splenic nerve trunk. *J. Ultrastructure Research*, 34, 473-491.
- Kotz, L., Kaiser, G., Tschöpel, P. und Tölg, G. (1972): Aufschluß biologischer Matrices für die Bestimmung sehr niedriger Spurenelementgehalte bei begrenzter Einwaage mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefäß. *Z. Anal. Chem.*, 260, 207-209.
- Lagercrantz, H. and Stajärne, L. (1974): Evidence that most noradrenaline is stored without ATP in sympathetic large dense core nerve vesicles. *Nature*, 249, 843-844.
- Lastowecka, A. and Trifaró, J.M. (1974): The effect of sodium and calcium ions on the release of catecholamines from the adrenal medulla: sodium deprivation induces release by exocytosis in the absence of extracellular calcium. *J. Physiol.*, 236, 681-705.
- Lazarewicz, J.W., Haljamäe, H. and Hamberger, A. (1974): Calcium metabolism in isolated brain cells and subcellular fractions. *J. Neurochem.*, 22, 33-46.
- Lehninger, A.L. (1971): *Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 5. Aufl., 1971, S. 289.

- Liley, A.W. (1956): The quantal components of the mammalian end-plate potential. *J. Physiol.*, 133, 571-587.
- Llinás, R., Blinks, J.R. and Nicholson, C. (1972): Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. *Science*, 176, 1127-1129.
- Locke, F.S. (1894): Notiz über den Einfluß physiologischer Kochsalzlösung auf die elektrische Erregbarkeit von Muskel und Nerv. *Zentralbl. Physiol.*, 8, 166.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265-275.
- L'vov, B.V. (1970): Atomic Absorption Spectrochemical Analysis, Adam Hilger, London.
- Madeira, V. and Antunes-Madeira, M.C. (1973): Interaction of Ca^{2+} and Mg^{2+} with synaptic plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 396-407.
- Malaisse, W.J. (1972): Role of calcium in insulin secretion *Israel J. Med. Sci.*, 8, 244.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O. and Lacy, P.E. (1971): The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system, *Diabetes*, 20, 257.
- Manery, J.F. (1966): Effects of Ca ions on membranes. *Fed. Proc.*, 25, 1804-1810.
- Marchbanks, R.M. and Israël, M. (1972): The heterogeneity of bound acetylcholine and synaptic vesicles. *Biochem. J.*, 129, 1049-1061.
- Maren, T.H. (1967): Special body fluids of the elasmobranch. In: *Sharks, skates, and rays*, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson und D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.
- Martin, J.H., Carson, F.L. and Race, G.J. (1974): Calcium-containing platelet granules. *J. Cell Biol.*, 60, 775-777.
- Martonosi, A. and Feretos, R. (1964): Sarcoplasmic reticulum. I. The uptake of Ca^{++} by sarcoplasmic reticulum fragments. *J. biol. Chem.*, 239, 648-658.
- Massmann, H. (1973): Colloquium Spectroscopicum Intern. XVII, Florenz 16-22 Sep., 51.
- Mathewson, R.F., Wachtel, A. and Grundfest, H. (1959): In: *Bioelectrogenesis*, herausgegeben von C. Chagas und A. Paes de Carvalho, S. 25-33. Elsevier, Amsterdam.

- Matthews, E.K., Petersen, O.H. and Williams, J.A. (1973): Pancreatic acinar cells: Acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. *J. Physiol.*, 234, 689-701.
- McElroy, W.D. (1969): Biolumineszenz - Chemie und biologische Bedeutung. *Umschau*, 69, 472-474.
- Miledi, R. (1973): Transmitter release induced by injection of calcium into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B. Biol. Sci.* 183, 421.
- Mongar, J.L. and Schild, H.O. (1958): The effect of calcium and pH on the anaphylactic reaction. *J. Physiol.*, 140, 272-284.
- Murdaugh, H.V. and Robin, E.D. (1967): Acid-base metabolism in the dogfish shark. In: *Sharks, skates, and rays*, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson und D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.
- Nagasawa, J., Douglas, W.W. and Schulz, R.A. (1970): Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of 'synaptic vesicle' formation in posterior pituitary glands. *Nature, Lond.*, 227, 407-409.
- Nagy, A., Baker, R.R., Morris, S.J. and Whittaker, V.P. (1975): The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Research*, in press.
- Nickel, E. and Potter, L.T. (1970): Synaptic vesicles in freeze etched electric tissue of *Torpedo*. *Brain Res.*, 23, 95.
- Nijjar, M.S. and Pritchard, E.T. (1973): Calcium binding by a plasma membrane fraction isolated from rat submandibular glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 391-395.
- Nordmann, J.J., Dreifuss, J.J. and Legros, J.J. (1971): A correlation of release of polypeptide hormones and of immunoreactive neurophysin from isolated rat neurohypophyses. *Experientia*, 27, 1344-1345.
- Ogneff, J. (1897): Über die Entwicklung des elektrischen Organs bei *Torpedo*. *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt.* 270-304.
- Okamoto, K. and Kawanishi, H. (1966): Submicroscopic histochemical demonstration of intracellular reactive zinc in cells of pancreatic islet. *Endocrinol. Jap.*, 13, 305.
- Oschman, J.L., Hall, T.A., Peters, P.D. and Wall, B.J. (1974): Association of calcium with membranes of squid giant axon. Ultrastructure and microprobe analysis. *J. Cell Biol.*, 61, 156-165.
- Otsuka, M., Ohtsuki, I. and Ebashi, S. (1965): ATP-dependent Ca binding of brain microsomes. *J. Biochem.*, 58, 188-190.

- Palay, S.L. and Palade, G.E. (1954): Electron microscope study of the cytoplasm of neurones. *Anat. Rec.*, 118, 336.
- Papahadjopoulos, D. (1968): Surface properties of acidic phospholipids: Interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bi-valent metal ions. *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 240-254.
- Pfenninger, K.H. and Rovainen, C.M. (1974): Stimulation- and calcium-dependence of vesicle attachment sites in the presynaptic membrane; a freeze-cleave study on the lamprey spinal cord. *Brain Res.*, 72, 1-23.
- Pihl, E. and Falkmer, S. (1967): Trials to modify the sulfide-silver method for ultrastructural tissue localization of heavy metals. *Acta Histochem. (Jena)*, 27, 34.
- Pletscher, A., Da Prada, M., Steffen, H., Lütold, B. and Berneis, K.H. (1973): Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. *Brain Res.*, 62, 317-326.
- Poisner, A.M. and Hava, M. (1970): The role of adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the release of catecholamines from the adrenal medulla. IV. Adenosine triphosphate-activated uptake of calcium by microsomes and mitochondria. *Mol. Pharmacol.*, 6, 407-415.
- Politoff, A.L., Rose, S. and Pappas, G.D. (1974): The calcium binding sites of the frog sartorius neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 61, 818-823.
- Poste, G. and Allison, A.C. (1973): Membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 421-465.
- Ramírez Muñoz, J. (1968): Atomic Absorption Spectroscopy, Elsevier, Publishing Comp. Amsterdam.
- Randolph, M.L. and Ryan, R.R. (1950): A slicer for sampling liquids. *Science*, 112, 528.
- Rasmussen, H. (1970): Cell communication, calcium ion, and cyclic AMP. *Science*, 170, 404-412.
- Repke, D.I. and Katz, A.M. (1972): Calcium-binding and calcium-uptake by cardiac microsomes: A kinetic analysis. *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 4, 401-416.
- Ringer, S. (1883): A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.*, 4, 29-42.
- Robbins, J. (1959): The excitation and inhibition of crustacean muscle by amino acids. *J. Physiol.*, 148, 39-50.

- Robinson, J.D. and Lust, W.D. (1968): Adenosine triphosphate-dependent calcium accumulation by brain microsomes. *Arch. Biochem.*, 125, 286-294.
- Rubin, R.P. (1974): Calcium and the Secretory Process. Plenum Press, New York and London.
- Russel, J.T. and Thorn, N.A. (1975): Adenosine triphosphate dependent calcium uptake by subcellular fractions from bovine neurohypophyses. *Acta physiol. scand.*, 93, 364-377.
- Russel, J.T., Warberg, J. and Thorn, N.A. (1974): Calcium and stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis. IV. Effect of N-ethylmaleimide on 45-Ca^{2+} transport and vasopressin release by isolated rat neurohypophyses. *Acta endocr. (Kbh.)*. 77, 691-698.
- Ryall, R.W. (1962): Sub-cellular distribution of pharmacologically active substances in guinea pig brain. *Nature*, 196, 680-681.
- Ryall, R.W. (1964): The subcellular distributions of acetylcholine, substance P, 5-hydroxytryptamine, γ -aminobutyric acid and glutamic acid in brain homogenates. *J. Neurochem.*, 11, 131-145.
- Schatzmann, H.J. and Vincenzi, F.F. (1969): Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.*, 201, 369-395.
- Schmidt, J. and Raftery, M.A. (1974): The cation sensitivity of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J. Neurochem.*, 23, 617-623.
- Schmitt, F.O. (1968): Fibrous proteins - neuronal organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60, 1092.
- Schneider, F.H., Smith, A.D. and Winkler, H. (1967): Secretion from the adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 31, 94-104.
- Selinger, Z. (1975): Three functions of calcium in the rat parotid gland. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.
- Selinger, Z., and Naim, E. (1970): The effect of calcium on amylase secretion by rat parotid slices. *Biochim. biophys. Acta*, 203, 335-337.
- Selinger, Z., Naim, E. and Lasser, M. (1970): ATP-dependent calcium uptake by microsomal preparations from rat parotid and submaxillary glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 203, 326.
- Serck-Hanssen, G. (1972): The release of protein in the course of catecholamine secretion from bovine adrenals perfused in vitro. *Acta physiol. scand.*, 86, 289-298.

- Serck-Hanssen, G. and Christiansen, E.N. (1973): Uptake of calcium in chromaffin granules of bovine adrenal medulla stimulated *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 404-414.
- Serck-Hanssen, G. and Helle, K. (1972): Biochemical and morphological characterization of chromaffin granules accumulating during *in vitro* secretion from perfused adrenal glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 273, 199-207.
- Sheridan, M.N., Whittaker, V.P. and Israël, M. (1966): The subcellular fractionation of the electric organ of *Torpedo*. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 74, 291-307.
- Sjöstrand, F.S. (1953): The ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye. *J. appl. Physics*, 214, 1422.
- Skou, J.C. (1960): Further investigations on a $Mg^{++} + Na^{+}$ -activated adenosine triphosphatase possibly related to the active-linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 6-23.
- Slavin, W. (1968): Atomic Absorption Spectroscopy. Interscience Publishers, New York, London, Sydney.
- Smith, A.D. (1971): Summing up: some implications of the neuron as a secreting cell. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, B 261, 423-437.
- Stanley, P.E. and Williams, S.G. (1969): Use of liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Analyt. Biochem.*, 29, 381-392.
- Szerb, J.C. (1961): The estimation of acetylcholine, using leech muscle in a microbath. *J. Physiol. (Lond.)*, 158, 8-9P.
- Tamir, H., Rapport, M.M. and Roizin, L. (1974): Preparation of synaptosomes and vesicles with sodium diatrizoate. *J. Neurochem.* 23, 943-949.
- Tan, A.T. (1975): Mobilization of synaptic membrane-bound calcium by acidic amino acids. *J. Neurochem.* 24, 127-134.
- Thorson, T.B. (1967): Osmoregulation in fresh-water elasmobranchs. In: *Sharks, skates, and rays*, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson, and D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.
- Triggle, D.J. (1972): Effects of calcium on excitable membranes and neurotransmitter action. *Prog. Surf. Memb. Sci.*, 5, 267-331.

- Tsuji, S., Rieger, G. and Peltre, G. (1973): In: La Transmission cholinergique de l'excitation, herausgegeben von INSERM, S. 129-130, Paris.
- Urry, D.W., Long, M.M., Ohnishi, T., Jacobs, M. and Mitchell, L.W. (1975): Binding affinities, ion selectivities and conformation of calcium complexes. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.
- Usherwood, P.N.R. and Grundfest, H. (1964): Inhibitory post-synaptic potentials in grasshopper muscle. *Science, N.Y.*, 143, 817-818.
- Usherwood, P.N.R. and Grundfest, H. (1965): Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects. *J. Neurophysiol.*, 28, 497-518.
- Uttenthal, L.O., Livett, B.G. and Hope, D.B. (1971): Release of neurophysin together with vasopressin by a Ca^{2+} -dependent mechanism. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, B 261, 379.
- Uvnäs, B. (1973): An attempt to explain nervous transmitter release as due to nerve impulse-induced cation exchange. *Acta physiol. scand.*, 87, 168-175.
- Vilharadt, H. and Hope, D.B. (1974): Adenosine triphosphatase activity in the neural lobe of the bovine pituitary gland. *Biochem. J.*, 143, 181-190.
- Vilharadt, H. and Thorn, N.A., unveröffentlicht, zitiert nach Russel and Thorn, 1975.
- Viveros, O.H., Arqueros, L. and Kirshner, N. (1971): Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VII. Effect of insulin administration on the buoyant density, dopamine-hydroxylase, and catecholamine content of adrenal storage vesicles. *Mol. Pharmacol.*, 7, 444-454.
- Wagner, R. (1847): Über den feineren Bau des elektrischen Organs im Zitterrochen. In der Dieterich'schen Buchhandlung Göttingen.
- Wallach, D. and Schramm, M. (1971): Calcium and the exportable protein in rat parotid gland. *Eur. J. Biochem.*, 21, 433-437.
- Watanabe, A. and Tasaki, I. (1971): The bionic action potential and indispensability of divalent cations in the external medium for nerve excitation. Aus: Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis. Hrsg. Nichols, G. Jr. and Wasserman, R.H., Academic Press.
- Weinstein, H. and Kuriyama, K. (1970): Retention and exchange of potassium in a synaptosomal fraction of mouse brain. *J. Neurochem.*, 17, 493-501.

- Whittaker, V.P. (1959): The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from brain. *Biochem. J.*, 72, 694-706.
- Whittaker, V.P. (1965): The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain junction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 15, 39-91.
- Whittaker, V.P. (1969): The Synaptosome. In: *Handbook of Neurochemistry*, herausgegeben von A. Lajtha, 2, 327-364, Plenum Press, New York.
- Whittaker, V.P. (1971): Origin and function of synaptic vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 183, 21-32.
- Whittaker, V.P. (1972): The storage and release of acetylcholine. *Biochem. J.*, 128, 73-74P.
- Whittaker, V.P. (1972a): La vesicule cholinergique. In: *La Système Cholinergique en Anesthésiologie et en Réanimation*, herausgegeben von G.G. Nahas, J.C. Salamagne, P. Viars und G. Vourc'h. Seite 45. Librairie Arnette, Paris.
- Whittaker, V.P. (1973a): The structural and chemical properties of synaptic vesicles. In: *Proteins in the Nervous System*, herausgegeben von D. Schneider, R.H. Angeletti, A. Bradshaw, A. Grasso and B.W. Moore, Raven Press, New York, Seite 155-169.
- Whittaker, V.P. (1973b): The biochemistry of synaptic transmission. *Naturwissenschaften*, 60, 281-289.
- Whittaker, V.P. and Barker, L.A. (1972): The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. In: *Meth. Neurochem.*, 2, 1-52.
- Whittaker, V.P., Dowdall, M.J. (1972): La Transmission Cholinergique de l'Excitation, *Proc. Symp. de l'INSERM*, S. 101 - 117. INSERM, Paris.
- Whittaker, V.P. and Dowdall, M.J. (1975): Current state of research on cholinergic synapses. In: *Cholinergic Mechanisms*, Hrsg. Walser P.G., Raven Press, New York.
- Whittaker, V.P. and Zimmermann, H. (1974): Biochemical Studies on Cholinergic Synaptic Vesicles. In: *Synaptic Transmission and Neuronal Interaction*, herausgegeben von M.V.L. Bennett, Raven, Press, New York.
- Whittaker, V.P., Dowdall, M.J. and Boyne, A.F. (1972): The storage and release of acetylcholine by cholinergic nerve terminals: Recent results with non-mammalian preparations. *Biochem. Soc. Symp.*, 36, 49-68.

- Whittaker, V.P., Dowe, G.H.C. and Scotto, J. (1971): Vesiculin: a possible counter-ion for acetylcholine in the cholinergic synaptic vesicle. In J. Domonkos, A.F. Fonyó, I. Huszák and J. Szentágothai, Abstr. Commun. 3rd. Int. Meet. Int. Soc. Neurochem., Budapest, Akadémiai Kiadó, Budapest, Seite 266.
- Whittaker, V.P., Essman, W.B. and Dowe, G.H.C. (1972): The isolation of pure synaptic vesicles from the electric organs of elasmobranch fish of the family Torpedinidae. *Biochem. J.*, 128, 833-846.
- Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. and Kirkland, R.J.A. (1964): The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem. J.*, 90, 293-303.
- Whittaker, V.P., Zimmermann, H. and Dowdall, M.J. (1975): The biochemistry of cholinergic synapses as exemplified by the electric organ of Torpedo. *J. Neural Transmission, Suppl. XII*, 39-60.
- Whittaker, V.P., Dowdall, M.J., Dowe, G.H.C., Facino, R.M. and Scotto, J. (1974): Proteins of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo: Characterization of a low molecular weight acidic protein. *Brain Res.*, 75, 115-131.
- Wilde, W.S. (1955): Transport through biological membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 17, 17-36.
- Winkler, H., Peer, L., Geissler, D. and Kostron, H. (1975): A new role of calcium for catecholamine-storing vesicles. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.
- Wood, M.J. and Burnstock, G. (1967): Innervation of the lungs of the toad (Bufo marinus) I. Physiology and pharmacology. *Comp. Biochem. Physiol.*, 22, 755-766.
- Woodin, A.M. and Wieneke, A.A. (1963): The accumulation of calcium by the polymorphonuclear leucocyte treated with staphylococcal leucocidin and its significance in the extrusion of Protein. *Biochem. J.*, 87, 487-495.
- Woodin, A.M. and Wieneke, A.A. (1964): The participation of calcium, adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the extrusion of the granule proteins from the polymorphonuclear leucocyte. *Biochem. J.*, 90, 498-509.
- Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1973): Affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J. Neurochem.* 21, 1355-1375.
- Yoshida, H., Kadota, K. and Fujisawa, H. (1966): Adenosine triphosphate dependent calcium binding of microsomes and nerve endings. *Nature*, 212, 291-292.

- Zimmermann, H. (1975): Dynamics of synaptic transmission in the cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo. In: Cholinergic Mechanisms, herausgegeben von Walser, P.G., Raven Press, New York.
- Zimmermann, H., Whittaker, V.P. (1973): The effect of stimulation on the composition and yield of cholinergic synaptic vesicles. Abstr. Commun. 4th Int. Meet. Int. Soc. Neurochem., Tokyo, Seite 321.
- Zimmermann, H. and Whittaker, V.P. (1974): Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo: A combined biochemical, electrophysiological and morphological study. J. Neurochem., 22, 435-450.
- Zimmermann, H. and Whittaker, V.P. (1974a): Different recovery rates of the electrophysiological, biochemical and morphological parameters in the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ after stimulation. J. Neurochem., 22, 1109-1114.