

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES
CALCIUMS BEI DER CHOLINERGEN
ERREGUNGSÜBERTRAGUNG IM
ELEKTRISCHEN ORGAN DES
ZITTERROCHENS
(TORPEDO MARMORATA)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rupert Schmidt
aus Groß-Hutbergen

Göttingen 1978

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in den Jahren 1975 bis 1978 in der Abteilung für Neurochemie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt. Die in den Kapiteln 3.2.2.5. und 3.2.2.6. beschriebenen Resultate wurden in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. F. Joó und Dr. H. Zimmermann erhalten. Alle anderen Versuche wurden selbständig und ohne technische Assistenz durchgeführt.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Zimmermann danke ich aufs herzlichste für die intensive Anleitung bei der Durchführung der Untersuchungen. Seine Hilfsbereitschaft und die täglichen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen haben den Fortgang der Arbeit wesentlich gefördert.

Herrn Dr. V.P. Whittaker danke ich für großzügige Unterstützung und sein stetes Interesse am Verlauf der Untersuchungen.

D 7

Referent: Doz. Dr. H. Zimmermann

Korreferent: Prof. Dr. G. Spiteller

Tag der Prüfung: 2. November 1978

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Zusammenfassung</u>	X
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Bedeutung der Calciumionen in erregbaren Geweben	1
1.1.1. Muskelgewebe: Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion	1
1.1.2. Sekretorische Gewebe: Kopplung zwischen Erregung und Sekretion	3
1.1.2.1. Gemeinsame Eigenschaften sekretorischer Zellen	3
1.1.2.2. Der Calciumeinstrom in die cholinergen Neurone	7
1.1.2.3. Das Postulat einer intra- zellulären Calciumquelle	10
1.2. Frühere Arbeiten zur Ionenverteilung im Nervengewebe	13
1.3. Das elektrische Organ von Torpedo als Modell- system für Untersuchungen an cholinergen Neuronen	16
1.4. Zielsetzung der Untersuchungen	21
<u>2. Methoden und Materialien</u>	24
2.1. Versuchstiere	24
2.2. Betäubung der Tiere	24
2.3. Reizung des elektrischen Organs	24
2.3.1. Elektrische Reizung in situ über die Lobi electrici	25
2.3.2. Elektrische Reizung in vitro über den zuführenden Nerven	26
2.4. Pharmakologische Methoden zur Beeinflussung der synaptischen Übertragung	28
2.5. Zellbiologische Methoden zur Isolierung sub- zellulärer Fraktionen aus dem elektrischen Organ von Torpedo	30
2.5.1. Allgemeine Maßnahmen beim Arbeiten mit subzellulären Fraktionen	30
2.5.2. Die Isolierung synaptischer Vesikel	31

	Seite
2.5.3. Die Isolierung von Mitochondrien	34
2.5.4. Die Isolierung von Nervenendigungen	37
2.5.5. Die Anreicherung präsynaptischer Nervenzellmembranen	37
2.5.6. Die Isolierung eines cytoplasmatischen Überstandes	40
2.6. Morphologische Methoden	40
2.6.1. Fixierung in Glutaraldehyd	40
2.6.1.1. Subzelluläre Fraktionen	40
2.6.1.2. Gewebelöcke	41
2.6.2. Fixierung in Calcium-haltigem Medium	41
2.7. Biochemische Bestimmungsmethoden	41
2.7.1. Bestimmung von Acetylcholin mit dem Blütegelmuskel	41
2.7.2. Bestimmung von Adenosin-5'-triphosphat	42
2.7.3. Bestimmung von Adenosin-5'-mono- und Adenosin-5'-diphosphat	43
2.7.4. Bestimmung der Cholinesteraseaktivität	44
2.7.5. Bestimmung der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität	44
2.7.6. Bestimmung der Fumaraseaktivität	45
2.7.7. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität	45
2.7.8. Bestimmung des Proteins nach Lowry et al.	45
2.7.9. Bestimmung des Proteins nach Schaffner und Weissmann	45
2.8. Anorganisch chemische Methoden	46
2.8.1. Millipore-Filtration	46
2.8.2. Aufschluß der Präparationsvorstufen und Millipore-Filter	47
2.8.3. Quantitative Analyse der Alkali- und Erdalkalimetalle durch Atomabsorptionsspektralphotometrie	48
2.8.3.1. Fehlerquellen bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie und ihre Beseitigung	48
2.8.3.2. Calciumbestimmung	52

	Seite
2.8.3.3. Kaliumbestimmung	52
2.8.3.4. Lithiumbestimmung	53
2.8.3.5. Magnesiumbestimmung	53
2.8.3.6. Natriumbestimmung	54
2.9. Mathematische Auswertungsmethoden	54
2.10. Chemikalien	55
3. <u>Ergebnisse</u>	57
3.1. Die Calciumverteilung im elektrischen Organ von Torpedo	57
3.1.1. Der Calciumgehalt des elektrischen Gewebes	57
3.1.2. Der Calciumgehalt in verschiedenen Körperflüssigkeiten	59
3.1.3. Der Calciumgehalt isolierter subzellulärer Organellen	59
3.1.3.1. Charakterisierung der Präparationsvorstufen	59
3.1.3.2. Der Metallionengehalt der Präparationsvorstufen	64
3.1.3.3. Beeinflussung der subzellulären Auftrennung durch Einfrieren des Gewebes	64
3.1.3.4. Der Calciumgehalt der Mitochondrien	66
3.1.3.5. Der Calciumgehalt der Nervenendigungen	67
3.1.3.6. Der Calciumgehalt einer mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion	69
3.1.3.7. Der Metallionengehalt der synaptischen Vesikel	72
3.1.3.8. Zur Stöchiometrie der synaptischen Vesikel	77
3.2. Stimulationsbedingte Veränderungen im Calciumgehalt der subzellulären Organellen	82
3.2.1. Veränderungen im Calciumgehalt der Präparationsvorstufen	82

	Seite		Seite
3.2.2. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien	87	4.2. Der Calciumgehalt im elektrischen Organ	118
3.2.2.1. Calciumfreisetzung bei repetitiver Reizung mit 5000 Impulsen	87	4.3. Die Calciumverteilung im elektrischen Gewebe	120
3.2.2.2. Beziehung zwischen Nervenaktivität und mitochondrialer Calciumfreisetzung	87	4.3.1. Vergleich mit anderen Metallen	120
3.2.2.3. Die Beteiligung postsynaptischer Mitochondrien	90	4.3.2. Übersicht über den Calciumgehalt der Zellorganellen	122
3.2.2.4. Die Beteiligung präsynaptischer Mitochondrien	90	4.3.3. Der Calciumgehalt der Mitochondrien	122
3.2.2.5. Morphologie prä- und postsynaptischer Mitochondrien	92	4.3.4. Abschätzung des Prozentsatzes an mitochondrial gebundenem Calcium	126
3.2.2.6. Morphologische Hinweise für die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der Nervenendigung	94	4.4. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien infolge elektrischer Reizung	128
3.2.2.7. Calciumfreisetzung durch Carbachol	97	4.5. Zum Calciumstoffwechsel der Elektroplaquezellen	129
3.2.3. Konstanz im Calciumgehalt der Nervenendigungen	99	4.6. Der Calciumstoffwechsel der Nervenendigungen	132
3.2.4. Konstanz im Calciumgehalt der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion	100	4.6.1. Mitochondrien	132
3.2.5. Metallionenaufnahme in die synaptischen Vesikel	102	4.6.1.1. Calciumausschüttung in Gegenwart von d-Tubocurarin	132
3.3. Veränderungen im Ionengehalt der subzellulären Organellen bei Inkubation in ionenreichen Medien	106	4.6.1.2. Interpretation der morphologischen Befunde	133
3.3.1. Calciumfreisetzung aus isolierten Mitochondrien durch Alkalimetallionen	108	4.6.1.3. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien und Kompartimentierung der Nervenendigung	137
3.3.2. Alkalimetallionenaustausch an isolierten synaptischen Vesikeln	110	4.6.1.4. Beziehung zu elektrophysiologischen Untersuchungen	139
3.3.3. Einfluß von Calciumionen auf die synaptischen Vesikel	113	4.6.2. Nervenzellmembranen	140
4. Diskussion	117	4.6.3. Synaptische Vesikel	142
4.1. Der Gegenstand der Untersuchungen	117	4.6.3.1. Metallionengehalt	144
		4.6.3.2. Vergleich mit anderen Mikrosomenfraktionen	148
		4.6.3.3. Metallionenaufnahme infolge Nervenaktivität	150
		4.7. Offene Fragen und Hypothesen zur Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung.- Ist Calcium ein "zweiter Überträgerstoff"?	152
		5. Literaturverzeichnis	157

Nomenklatur und Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden im Text verwendet:

ACH	Acetylcholin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ChE	Cholinesterase
Cyt c Oxyd.	Cytochrom-c-Oxydase
EC	Enzymkatalog nach den Richtlinien der Enzymkommission der International Union of Biology (Äthylendinitrilo)-tetraessigsäure
EDTA	(Äthylendinitrilo)-tetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-N,N,N',N'-tetraessigsäure
g	Einheiten der Erdbeschleunigung; mittlerer Abstand des Zentrifugenröhrchens vom Rotorzentrum
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
IU	International Units (Enzymaktivität in μmol Produkt, das pro Minute gebildet wird)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MG	Molekulargewicht
n	Größe der Stichprobe
NADH	β -Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Prot.	Protein
r	Korrelationskoeffizient
RSK	relative spezifische Konzentrierung, vgl. S. 61
S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwertes
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Zur Unterscheidung von den Fraktionen, die von Dichtegradienten gewonnen werden, werden die durch Differentialzentrifugation erhaltenen Fraktionen als Präparationsvorstufen bezeichnet. Die Bodensätze werden mit P, die Überstände mit S abgekürzt. Der Index 1 an dem betreffenden Symbol deutet an, daß die Fraktion bei einer Beschleunigung von ca. $10^1 \times 100 \text{ g}$ isoliert

wurde. Entsprechend stehen die Indizes 2 und 3 für Gravitationsfelder von etwa $10^2 \times 100 \text{ g}$ beziehungsweise $10^3 \times 100 \text{ g}$. Ein hochgestelltes Pluszeichen (z.B.: P_3^+) zeigt an, daß die Präparationsvorstufe einen weiteren Reinigungsschritt durchlaufen hat.

Verzeichnis der im Text genannten Enzyme mit ihren wissenschaftlichen Namen und der Katalognummer der Enzymkommission:

Acetylcholinesterase	Acetylcholin-Hydrolase, EC 3.1.1.7
Apyrase	eine Adenosin-5'-Triphosphatase und eine Adenosin-5'-Diphosphatase
Cholin-Acetyltransferase	Acetyl-Coenzym A:Cholin-O-Acetyltransferase, EC 2.3.1.6
Cytochrom-c-Oxydase	Cytochrom c: O_2 -Oxydoreduktase, EC 1.9.3.1
Fumarase	Fumarat-Hydratase, EC 4.2.1.2
Lactat-Dehydrogenase	L-Lactat: NAD^+ -Oxydoreduktase, EC 1.1.1.27
Luziferase	3'-Phosphoadenylyl:Luziferin-Sulfotransferase, EC 2.8.2.10
Myokinase	Adenosin-5'-triphosphat:Adenosin-5'-monophosphat-Phosphotransferase, EC 2.7.4.3
Pyruvatkinase	Adenosin-5'-triphosphat:Pyruvat-2-O-Phosphotransferase, EC 2.7.1.40

Zusammenfassung

Ebenso wie viele andere exocytotische Sekretionsprozesse ist die Acetylcholinausschüttung aus der Nervenendigung an die Gegenwart von Calciumionen gebunden. In der vorliegenden Arbeit wird der Calciumgehalt in subzellulären Fraktionen aus dem rein cholinerg innervierten elektrischen Organ von Torpedo mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrophotometrie untersucht. Nach elektrischer Reizung des Gewebes kann eine Abnahme im Calciumgehalt der Mitochondrien und eine Zunahme im Calciumgehalt der synaptischen Vesikel nachgewiesen werden:

1. Differentialzentrifugationen und Zentrifugationen auf Saccharose-Glycin Dichtegradienten erlauben die Isolierung verschiedener Organellen aus dem Zellhomogenat. Erstmals wird eine Präparation von Mitochondrien aus dem elektrischen Organ beschrieben. Die Mitochondrienfraktion weist mit 834 nmol Ca / mg Protein den höchsten spezifischen Calciumgehalt auf. Der Calciumgehalt in anderen subzellulären Fraktionen beträgt (in nmol Ca / mg Protein): Nervenzellmembran-reiche Fraktion - 617; Nervenendigungen - 262; synaptische Vesikel - 277; Cytoplasma-reicher Überstand - 191. Im Gegensatz zum Calcium sind die Metalle Natrium, Kalium und Magnesium in dem cytoplasmatischen Überstand angereichert.
2. Wenn das Gewebe elektrisch gereizt wird, sinkt der Calciumgehalt der Mitochondrien proportional zur Abnahme des Transmittergehaltes in der Fraktion der Nervenendigungen. Nach repetitiver Stimulierung bis zur Erschöpfung der Organantwort (5000 Impulse, 5 Hz) haben die Mitochondrien 77 % ihres Calciums verloren. Das freigesetzte Calcium wird im Cytoplasma-reichen Überstand wiedergefunden. Weder der Calciumgehalt der Nervenendigungen noch der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion ändern sich infolge elektrischer Reizung. Auch der Natrium-, Kalium- und Magnesiumgehalt der Mitochondrien bleibt unverändert.

3. Um zu entscheiden, ob das Calcium von den Mitochondrien der Nervenendigungen oder der muskelanalogen Elektroplaquezellen ausgeschüttet wird, wird das elektrische Gewebe mit d-Tubocurarin perfundiert, bis die Organantwort auf einzelne Testimpulse abgeklungen ist. Anschließend wird das Gewebe repetitiv gereizt. Die Transmitterausschüttung wird durch das Pharmakon nicht beeinträchtigt, aber die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien ist auf 20 bis 40 % vermindert. Es wird geschlossen, daß der überwiegende Anteil der Calciumfreisetzung aus den postsynaptischen Mitochondrien erfolgt. Die Calciumausschüttung in Gegenwart von Curare findet dagegen aus den Mitochondrien der Nervenendigungen in das terminale Cytoplasma statt.

4. Die Zuordnung der Calciumfreisetzung zu den beiden Mitochondrienpopulationen wird ultrastrukturell durch Fixierung in Gegenwart von Calciumionen bestätigt: Jeweils diejenige Mitochondrienpopulation, die - den biochemischen Befunden zufolge - ihr Calcium verloren hat, nimmt Calcium aus der Fixierungsflüssigkeit auf. Hierdurch kommt es zu markanten Ablagerungen in den Mitochondrien. Mit diesem Befund kann zugleich erstmals eine Erklärung für die schon früher beobachtete bevorzugte Ablagerung von Calcium in den Mitochondrien stimulierter Nervenendigungen gegeben werden. - Die Calciumausschüttung kann auch in vitro durch Inkubation isolierter Mitochondrien mit Alkalimetallen ausgelöst werden.

5. Der Calcium- und Magnesiumgehalt synaptischer Vesikel ist nach elektrischer Stimulierung erhöht, ihr Alkalimetallgehalt bleibt dagegen unverändert. Alkalimetalle zeigen aufgrund ihres kleineren Ionenpotentials eine geringere Festigkeit in ihrer Bindung an die Vesikel, insbesondere können Kalium- gegen Natriumionen ausgetauscht werden. Es wird angenommen, daß Metallkationen bei der Exocytose im Ionenaustausch gegen das ausgeschüttete

Acetylcholin von den synaptischen Vesikeln gebunden werden, daß sich die Alkalimetalle jedoch während der Isolierung der Zellorganellen teilweise wieder umverteilen.

Die beobachtete Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der cholinergen Nervenendigungen bietet sich an, mehrere bisher unverstandene biochemische, morphologische und auch elektrophysiologische Befunde zu erklären. Insbesondere könnte sie dazu dienen, bei tetanischer Reizung auch jene synaptischen Vesikel zu aktivieren, die sich nicht in unmittelbarer Nähe der aktiven Zonen der Transmitterausschüttung befinden, und deshalb nicht von den während des Aktionspotentials einströmenden Calciumionen erreicht werden. Eine anschließende Ionenaufnahme in die synaptischen Vesikel kann dazu dienen, den Ladungsverlust der Vesikel auszugleichen, der durch die Ausschüttung der elektrisch positiv geladenen Acetylcholinmolekel entsteht. Zugleich kann sie helfen, die während der Erregung der Zelle angestiegene cytoplasmatische Calciumkonzentration wieder zu senken. Die auffallenden Analogien zwischen den verschiedenen Systemen, in denen eine exocytotische Sekretion nachgewiesen worden ist, lassen vermuten, daß durch eine Übertragung der in dieser Studie verwendeten Untersuchungsmethoden auf andere Systeme vergleichbare Resultate erzielt werden können.

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Calciumionen in erregbaren Geweben

Calciumionen sind für alle erregbaren Gewebe von funktionaler Bedeutung. Während die Alkalimetallionen Na^+ und K^+ in verschiedenen Zelltypen dazu dienen, Potentialdifferenzen an biologischen Membranen einzustellen und den osmotischen Druck zu regeln, und Schwermetallionen (wie z.B. $-\text{Co}^+$, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Zn^{2+}) als Cofaktoren bestimmter Enzyme auftreten, schien eine ähnliche Generalisierung für die Funktion der Calciumionen zunächst nicht möglich. Im Laufe des letzten Jahrzehnts sind jedoch zahlreiche Nachweise dafür erbracht worden, daß Calciumionen immer dann anwesend sein müssen, wenn die Erregung der Zelloberfläche einem spezialisierten System im Zellinneren mitgeteilt werden soll (Konzept des zweiten Überträgerstoffes). Die notwendigen Einschränkungen dieser Verallgemeinerung werden in späteren Kapiteln besprochen werden. Zunächst soll die Rolle der Calciumionen an den beiden großen Klassen erregbarer Gewebe, den kontraktile und den sekretorischen Geweben, verdeutlicht werden.

1.1.1. Muskelgewebe: Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion

Einem Verständnis der Abläufe auf molekularer Ebene, in welche die Calciumionen eingreifen, sind wir bei den kontraktile Zellen am nächsten: Die Erregung der querstreiften Muskelzelle führt zu einer Depolarisation der transversalen Tubuli, extrazellulärer Kanäle, die durch tiefgreifende Invaginationen des Sarkolemm gebildet werden. Den transversalen Tubuli liegen die terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums gegenüber, die auf die Erregung mit einer stark erhöhten Membranpermeabilität für Calciumionen reagieren. Die in das

Sarkoplasma ausgeschütteten Calciumionen reagieren mit der TN-C Untereinheit des regulatorischen Proteins Troponin (Ebashi et al., 1968; Fuchs und Briggs, 1968). Durch eine Konformationsänderung des Troponinmoleküls (TN-I Untereinheit) wird das Myosin-Bindungs-zentrum des G-Aktin-Monomeren für die Wechselwirkung mit dem aktivierten Kopfstück des Myosinmoleküls freigelegt. Dies führt zur Ausbildung des Aktomyosinkomplexes mit dem anschließenden Gegeneinandergleiten der Aktin- und Myosin-filamente (sliding filament theory).

Während der Relaxation des Skelettmuskels werden die Calciumionen von einer Ca^{2+} -aktivierbaren Transport-ATPase wieder in das sarkoplasmatische Retikulum eingeschleust. Die Ca^{2+} -Konzentration im Sarkoplasma, die während der Erregung auf über 10 μM angestiegen war, wird hierdurch erneut auf weniger als 0.2 μM (Skelettmuskulatur) erniedrigt. Die ATPase-Aktivität des Myosins wird unter diesen Bedingungen (keine Assoziation mit Aktin, niedrige Ca^{2+} -Konzentration) durch anwesende Magnesiumionen gehemmt.

Während die Calciumionen in der weißen Muskulatur also von dem sarkoplasmatischen Retikulum aufgenommen und freigesetzt werden, spielen die Mitochondrien in der roten Muskulatur eine größere Rolle für die Speicherung und Ausschüttung des Calciums (Patriarca und Carafoli, 1969). Gewebe, für die eine Calciumspeicherung in den Mitochondrien gezeigt worden ist, schließen die Flugmuskulatur von Insekten (Carafoli und Sacktor, 1972), das Myometrium der Säuger (Batra, 1973) und die Herzmuskulatur der Vertebraten (Legato et al., 1968; Crompton et al., 1976a, 1978a; vgl. auch Scarpa und Graziotti, 1973) ein. Die Fähigkeit der Mitochondrien, Calcium über ein aktives Transportsystem aufzunehmen, ist für zahlreiche Gewebe nachgewiesen worden (vgl. folgende Übersichtsartikel: Lehninger, 1970; Carafoli und Lehninger, 1971; Carafoli und Rossi, 1971; Carafoli, 1974; Bygrave, 1978).

1.1.2. Sekretorische Gewebe: Kopplung zwischen Erregung und Sekretion

In der anderen großen Gruppe erregbarer Gewebe vermitteln die Calciumionen die Kopplung zwischen der Erregung der Zellmembran und dem Sekretionsprozeß. In diese Klasse gehören Nervenzellen, die chemische Überträgerstoffe (~~Transmitter~~) ausschütten, die neurosekretorischen Zellen des Nucleus paraventricularis und des Nucleus supra-opticus, deren Axone in den Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) ziehen, wo aus ihren Endigungen die Hormone Vasopressin und Ocytocin in die Blutbahn abgegeben werden, sowie endokrine und exokrine Drüsen. Obwohl viele dieser Systeme in den vergangenen zehn Jahren intensiv untersucht worden sind und auf die bestehenden Gemeinsamkeiten hingewiesen wurde (Smith, 1971a; Trifaró, 1977), sind wir von einem Verständnis der ablaufenden Prozesse auf molekularer Ebene noch weit entfernt.

1.1.2.1. Gemeinsame Eigenschaften sekretorischer Zellen

Verschiedene Zelltypen sekretorischer Gewebe ähneln sich ultrastrukturell durch ihren Gehalt an membranumgebenen Vesikeln (sekretorische Granula), in denen das Sekret (im weitesten Sinne des Wortes) gespeichert ist. Der Durchmesser dieser Speichergranula variiert zwischen 40 nm (synaptische Vesikel) und etwa 1 μm (zymogene Granula exokriner Drüsen). Als Ort ihrer Herkunft werden sowohl Abschnürung aus Membranschläuchen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates (Drüsenzellen) als auch axonaler Transport und eine endocytotische Einstülpung der Zellmembran (Nervenzellen) diskutiert (Holtzman, 1977).

Für mehrere sekretorische Gewebe ist gezeigt worden, daß das Sekret in den sekretorischen Vesikeln gemeinsam mit Nukleotiden, hauptsächlich ATP, gespeichert vorliegt: chromaffine Granula des Nebennierenmarks (Hillarp, 1958b),

elektronendichte Granula in sympathischen Nervenzellen (Schümann, 1958), serotonerge Granula der Blutplättchen (Da Prada und Pletscher, 1968), Peptidhormon-haltige Granula aus der Neurohypophyse (Poisner und Douglas, 1968a) und cholinerge Vesikel aus den elektrischen Organen von *Torpedo marmorata* (Dowdall et al., 1974) und *Electrophorus electricus* (Zimmermann und Denston, 1976).

Außerdem ist in der Fraktion isolierter Speichergranula von verschiedenen sekretorischen Zellen eine durch Ca^{2+} -Ionen aktivierbare ATPase nachgewiesen worden: neutrophile Leukocyten (Woodin und Wieneke, 1964), chromaffine Granula (Hillarp, 1958a; Banks, 1965; Apps und Glover, 1978), neurosekretorische Granula des Hypophysenhinterlappens (Poisner und Douglas, 1968b), synaptische Vesikel aus Gehirnhomogenaten (Germain und Proulx, 1965; Hosie, 1965; Kadota et al., 1967; Tanaka et al., 1976), adrenerge Vesikel des Milznerven (Klein und Lagercrantz, 1971), zymogene Granula des exokrinen Pankreas (Meldolesi et al., 1971) und cholinerge Vesikel aus dem elektrischen Organ von *Torpedo* (Breer et al., 1977; Schmidt und Zimmermann, 1978). Die ATPase-Aktivität sekretorischer Vesikel scheint sehr labil zu sein, da in mehreren Systemen auch negative Befunde erhoben worden sind: chromaffine Granula (Fortier et al., 1959; Hagen, 1962; Laduron et al., 1976), neurosekretorische Granula des Hypophysenhinterlappens (Vilhardt und Hope, 1974; Russel und Thorn, 1975), und cholinerge synaptische Vesikel (vgl. Nagy et al., 1976, Carpenter und Parsons, 1978). Breer et al. (1977) haben berichtet, daß die ATPase-Aktivität gereinigter cholinerges Vesikel in 24 h bei 2°C auf 30% der ursprünglichen Aktivität abgefallen war.

Gemeinsam ist den meisten sekretorischen Systemen ferner, daß das Sekret exocytotisch ausgeschüttet wird, indem sich die sekretorischen Vesikel entweder vorübergehend an die Zellmembran anlagern oder sogar vollständig mit ihr ver-

schmelzen. Für einige Sekretionsprozesse wird allerdings auch eine direkte Ausschleusung der zu sekretierenden Moleküle (z.B. Immunglobuline und Steroide, vgl. Novikoff und Holtzman, 1970) durch die Plasmamembran in Erwägung gezogen. Als morphologischer Hinweis auf die Exocytose wird das Auftreten omegaförmiger Strukturen gewertet, die durch Fusion der äußeren Vesikelmembran mit der Zellmembran entstehen. Sie sind u.a. bei chromaffinen Granula (Diner, 1967), neurosekretorischen Granula des Hypophysenhinterlappens (Nagasawa et al., 1970), zymogenen Granula des exokrinen Pankreas (Ichikawa, 1965), Amylasehaltigen Granula der Parotisdrüse (Amsterdam et al., 1969), Histaminhaltigen Vesikeln der Mastzellen (Horsfield, 1965; Kagayama und Douglas, 1974) und cholinergen synaptischen Vesikeln (Hubbart und Kwanbunbumpen, 1968; Nickel und Potter, 1970) beobachtet worden (weitere Beispiele sind bei Smith, 1971a, und Trifaró, 1977, angegeben).

Als biochemischer Nachweis wird gewertet, wenn bei Stimulierung mehrere verschiedene Inhaltstoffe der sekretorischen Bläschen gemeinsam (und im selben Mengenverhältnis, wie sie in den isolierten Vesikeln vorliegen) ausgeschüttet werden, ohne daß es gleichzeitig zu einer Freisetzung cytoplasmatischer Substanzen kommt. Zu den Geweben, an denen ein biochemischer Nachweis der exocytotischen Sekretion erbracht worden ist, gehören u.a. (weitere bei Smith, 1971a; Trifaró, 1977) das Nebennierenmark (Banks und Helle, 1965; Schneider et al., 1967; Serck-Hanssen, 1972), die Neurohypophyse (Fawcett et al., 1968; Nordmann et al., 1971), das exokrine Pankreas (Keller und Cohen, 1961), die Parotisdrüse (Wallach und Schramm, 1971) sowie die neutrophilen Leukocyten (Woodin und Wieneke, 1963) und die Mastzellen (Fillion et al., 1970). Auf den biochemischen Nachweis bei den cholinergen Vesikeln wird in einem späteren Kapitel (1.3.) ausführlicher eingegangen werden.

Bei einer so großen Vielzahl an Gemeinsamkeiten unter den sekretorischen Systemen lag es natürlich nahe, einen einheitlichen molekularen Sekretionsmechanismus zu vermuten. Die Suche nach den molekularen Vorgängen der Sekretion ergab eine weitere wichtige Gemeinsamkeit: In den Jahren von 1963 bis 1972 wurde für fast alle genannten Systeme in Gewebeexplantaten, in in vitro Präparaten oder an Gewebescheibchen gezeigt, daß eine Sekretion nur bei Anwesenheit von Calciumionen im Perfusions- oder Inkubationsmedium stattfinden kann. Magnesiumionen wirken in vielen Geweben hemmend auf den Sekretionsprozeß (z.B.: Nebennierenmark: Douglas und Rubin, 1963; Neurohypophyse: Normann, 1974; endokrines Pankreas: Grodsky und Bennett, 1966; Hales und Milner, 1968; Mastzellen: Foreman und Mongar, 1972; neurophile Leukozyten: Woodin und Wieneke, 1964; neuromuskuläre Endplatte: del Castillo und Engbaek, 1954), während Strontium und Barium zum Teil zu verstärkter Sekretion führen (Nebennierenmark: Douglas und Rubin, 1964; Neurohypophyse: Ishida, 1968; Buchs et al., 1972; Mastzellen: Foreman und Mongar, 1972; Großhirnscheibchen: Vargas et al., 1976; periphere adrenerge Neurone: Ito et al., 1978; neuromuskuläre Endplatte: vgl. Literaturangaben bei Silinsky, 1978). Zu den Geweben, in denen eine Beteiligung der Calciumionen am Sekretionsprozeß nachgewiesen worden ist, gehören das Nebennierenmark (Douglas und Rubin, 1961, 1963), die Neurohypophyse (Douglas, 1963; Douglas und Poisner, 1964; Dicker, 1966), die Adenohypophyse (Samli und Geschwind, 1968; Parsons, 1969; Kraicer et al., 1969; Hopkins, 1970; MacLeod und Fontham, 1970), das endokrine (Grodsky und Bennett, 1966) und exokrine Pankreas (Hokin, 1966), die Submaxillärdrüse (Douglas und Poisner, 1963), die Parotisdrüse (Selinger und Naim, 1970), die Mastzellen (Mongar und Schild, 1958; Foreman und Mongar, 1972), die noradrenergen Neurone (Smith, 1971b) und die cholinergen Neurone (s.u., Kap. 1.1.2.2.). Weitere Zitate finden sich bei Rasmussen (1970), Smith (1971), Smith und Winkler (1972),

Douglas (1974), Rubin (1974), Vickers (1976) und Trifaró (1977).

1.1.2.2. Der Calciumeinstrom in die cholinergen Neurone

Daß Calciumionen erforderlich sind, um die Funktionsfähigkeit von Nerv-Muskelpräparaten aufrechtzuerhalten, wurde bereits gegen Ende des vorigen Jahrhunderts erkannt (Ringer, 1883; Locke, 1894). 1940 zeigten Harvey und MacIntosh am perfundierten oberen Cervikalganglion der Katze, daß in Abwesenheit von Calciumionen die Transmitterfreisetzung unterbleibt. Daß die Calciumionen tatsächlich eine präsynaptische Wirkung ausüben, wurde in einer Serie von Untersuchungen durch Katz und Mitarbeiter an der neuromuskulären Endplatte erhärtet (vgl. Katz und Miledi, 1965; Katz, 1969). Insbesondere konnte bei sehr kleinen Calciumkonzentrationen (Fatt und Katz, 1950, 1952) oder hohen Magnesiumkonzentrationen (del Castillo und Engbaek, 1954; del Castillo und Katz, 1954) gezeigt werden, daß die induzierten postsynaptischen Potentialänderungen (Endplattenpotentiale) ganzzahlige Vielfache kleinster sogenannter Miniaturendplattenpotentiale sind. Die Weiterentwicklung der Elektronenmikroskopie führte zur Entdeckung der synaptischen Vesikel (Sjöstrand, 1953; Palay und Palade, 1954 und de Robertis und Bennett, 1955) und der Hypothese, daß in ihnen jene kleinsten Quanten an Transmitter abgepackt sind, welche nach ihrer Ausschüttung in den synaptischen Spalt die Miniaturendplattenpotentiale hervorrufen (del Castillo und Katz, 1956).

Erst ein Jahrzehnt später gelang die Isolierung der synaptischen Vesikel (de Robertis et al., 1963; Whittaker et al., 1964) aus dem Zentralnervensystem. Der Acetylcholingehalt der isolierten cholinergen Vesikel (Whittaker und Sheridan, 1965) entsprach Berechnungen über den Acetylcholingehalt eines Quantums, die auf der Grundlage elektrophysiologischer Untersuchungen durchgeführt wurden (Katz und Miledi, 1972; vgl. auch Kuffler und Yoshikami, 1975).

Hodgkin und Keynes zeigten 1957, daß die elektrische Reizung des Riesenaxons der Tintenschnecke (*Loligo*) zu einem verstärkten Einstrom von ^{45}Ca führt. Ähnliche Resultate wurden von Blaustein (1975) mit Synaptosomen bei elektrischer Reizung oder durch depolarisierende Kaliumkonzentrationen erzielt. Blaustein und Goldring (1975) fanden, daß Veratridin und Skorpiongift die Nervenendigungen depolarisieren und zu einem Einstrom von Calciumionen führen, der durch Tetrodotoxin blockiert wird. Hieraus konnte geschlossen werden, daß ein Calcium-einstrom durch Natriumkanäle stattfindet, die denjenigen der Axone gleichen. Dieser passive Ioneneinstrom folgt dem elektrochemischen Gradienten für die Natrium- und Calciumionen. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Aktionspotential bis in die Nervenendigung fortgeleitet wird.

Durch Experimente am Riesenaxon der Tintenschnecke mit dem Protein Aequorin, das in Anwesenheit von ionisiertem Calcium Licht emittiert, wurde in der späten Phase des Aktionspotentials eine weitere, sogenannte "späte Phase des Calciumeinstroms" gefunden (Baker et al., 1971). Dieser Calciumeinstrom ist gegen Tetrodotoxin und Tetraäthylammoniumionen unempfindlich, erfolgt also weder durch die Natrium- noch durch die Kaliumkanäle. Er wird hingegen durch Magnesium-, Mangan- und Kobaltionen, durch fortgesetzte Depolarisierung der Zellmembran und durch die Pharmaka D-600 und Iproveratril (Verapamil, α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenyl-acetonitril) gehemmt. Die Autoren schlossen hieraus auf die Existenz spezialisierter Calciumkanäle, die sich in der späten Phase des Aktionspotentials öffnen. Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakteristika des späten Calciumeinstroms ähneln denen der Calcium-abhängigen Mechanismen, welche die Transmitterfreisetzung einleiten (Baker et al., 1971; Baker, 1972; Blaustein, 1974).

Diese Schlußfolgerung basiert zur Zeit allein auf Unter-

suchungen mit Hilfe von Aequorin in Gegenwart unterschiedlicher extrazellulärer Calciumkonzentrationen. Hingegen ist wenig über die Ionenflüsse durch die Membran während der Tetrodotoxin-Blockierung bekannt. Baker et al. (1971) fanden auch bei starker Depolarisierung stets eine geringe Zunahme der Lichtemission und konnten kein wirkliches Gleichgewichtspotential ermitteln, bei dem sich die Reaktion des Aequorins vermindert hätte. Auch berichteten sie, daß der Calciumeinstrom nach Kalium-Depolarisierung nie vollständig auf die vor der Depolarisierung gemessenen Werte abfiel. Die Autoren postulieren daher (vgl. auch Baker, 1972), daß die Calciumkanäle nur unvollständig inaktiviert wurden, oder daß noch eine weitere Quelle des Calciumeinstroms oder der intrazellulären Calciumfreisetzung aktiviert wurde. Die Natur der "späten Phase des Calciumeinstroms" erscheint daher zur Zeit nur unvollständig geklärt.

1973 gelang es Miledi, durch Injektion von Calciumionen in die Nervenendigung eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran auszulösen. Mit diesem Ergebnis schien in den Jahren 1973 bis 1975 ein teilweises Verständnis der Vorgänge an der cholinergen Synapse erreicht zu sein: Das Aktionspotential trifft im synaptischen Endknopf ein, Calciumionen strömen durch die geöffneten Natriumkanäle in das Cytoplasma, spezialisierte Schleusen für Calciumionen werden in der Zellmembran geöffnet und die nun stark angehobene intraterminale Calciumkonzentration induziert eine Wechselwirkung zwischen den synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Zellmembran, die zur Ausschüttung des Vesikelinhaltes (über sich öffnende Poren oder eine Verschmelzung der Membranen) in den synaptischen Spalt führt. Ungeklärt erschien vor allem die Art der Wechselwirkung zwischen den synaptischen Vesikeln und den Calciumionen. Sowohl eine Aktivierung der vesikulären ATPase als auch eine Verminderung der vesikulären Oberflächenladung, durch die die Fusion mit der Zellmembran erleichtert

werden sollte, wurden vermutet. In der Diskussion wird näher auf diese Hypothesen eingegangen werden.

1.1.2.3. Das Postulat einer intrazellulären Calciumquelle

In den letzten fünf Jahren wurden mehrere Befunde erhoben, die verdeutlichen, daß unsere bisherigen Modelle des Sekretionsprozesses nur einen Teil der molekularen Abläufe berücksichtigen. Im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit sind vor allem jene Experimente von Interesse, die gezeigt haben, daß sekretorische Vorgänge auch in Abwesenheit extrazellulärer Calciumionen ablaufen können.

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, daß Pharmaka, wie z.B. Antimycin A, Rotenon und Cyanid, die mit der Atmungskettenphosphorylierung der Mitochondrien interferieren, oder auch Sauerstoffmangel zu einer Zunahme der spontanen Transmitterfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte (Zunahme der Miniaturendplattenpotentiale) führen (siehe z.B. Hubbard und Løyning, 1966; Glagoleva et al., 1970; Katz und Edwards, 1973). Diese Befunde veranlaßten Alnaes und Rahamimoff (1975), die Wirkung des Dicumarinderivates Warfarin (4-Hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2-H-chromen-2-on) und des Ruthenium-Rots an der neuromuskulären Endplatte des Frosches zu untersuchen. Ruthenium-Rot ist ein spezifischer Inhibitor für die passive und aktive Calciumaufnahme in die Mitochondrien (Moore, 1971; Vasington et al., 1972). Beide Substanzen erhöhten die Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale in Calcium-freier Lösung; Warfarin verstärkte außerdem die induzierte Acetylcholinausschüttung (Reizfrequenz 0.5 Hz) in Mg-reicher, Ca-armen Lösung. Aufgrund dieser Studie kann postuliert werden, daß die Mitochondrien der Nervendigungen bei der Transmitterfreisetzung als intrazelluläre Quelle für Calciumionen dienen können.

Kürzlich wurde die spontane Nervenaktivität an der neuromuskulären Endplatte des Frosches von Rahamimoff und Mit-

arbeitern unter Bedingungen untersucht, bei denen die extrazelluläre Calciumkonzentration in der Inkubationslösung niedriger war als die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration. Die elektrische Reizung des motorischen Nerven mit 0.09 bis 2 Hz führte zu einer Verminderung in der Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale (Erulkar et al., 1978). Aufgrund des umgekehrten elektrochemischen Gradienten für die Calciumionen war dieses Ergebnis bei einer Zunahme der Calciumleitfähigkeit der Zellmembranen zu erwarten gewesen. Bei tetanischer Reizung des Nerven (10 bis 100 Hz) kam es hingegen nach einer anfänglichen Verminderung zu einer den Tetanus überdauernden Zunahme in der Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale (Erulkar und Rahamimoff, 1978). Um diese Befunde zu erklären, muß neben dem Calciumeinstrom in die Nervenendigung eine zweite Möglichkeit zur Erhöhung der intraterminalen Calciumkonzentration gefordert werden. Da ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum in der Nervenendigung fehlt, sind die Mitochondrien und die präsynaptischen Zellmembranen die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine derartige Calciumquelle (vgl. auch Rahamimoff et al., 1976).

Ein indirekter Hinweis auf die Existenz einer intrazellulären Calciumquelle ergab sich auch aus Untersuchungen über den Einfluß der extrazellulären Natriumkonzentration auf die Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale an der neuromuskulären Endplatte des Frosches bei unterschiedlichen Temperaturen und niedriger extrazellulärer Calciumkonzentration. Nach Statham und Duncan (1977) kommt es bei Verminderung der extrazellulären Natriumkonzentration zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Nervenendigung. Während die Nervenendigung den Calciumeinstrom bei niedrigen Temperaturen (13°C) kompensieren kann, ist bei höheren Temperaturen (23°C) auch die Calciumfreisetzung aus nicht identifizierten intrazellulären Kompartimenten verstärkt, so daß die erhöhte Calciumkonzentration

im Cytoplasma die spontane Transmitterfreisetzung aktiviert.

Auch für mehrere andere Systeme existieren Studien, die verdeutlichen, daß eine Sekretion in Abwesenheit extrazellulärer Calciumionen erfolgen kann. Diese Experimente wurden zum Teil mit spezifischen Substanzen, die die Sekretion auslösen (neuronalen Transmitter, Pankreozymin etc.), zum Teil durch Verminderung der extrazellulären Natriumkonzentration, meist in Abwesenheit extrazellulärer Calciumionen, durchgeführt. Da es zahlreiche Befunde gibt, die auf ein Trägermolekül für den Austausch von Natrium- und Calciumionen in der Zellmembran hindeuten (vgl.

Baker, 1972; Blaustein, 1974), nimmt man an, daß eine Verarmung des Extrazellulärraums an Natriumionen zu einer Ansammlung der Calciumionen im Cytoplasma führt. In vielen dieser Experimente wurde das Gewebe zuvor mit ⁴⁵Ca perfundiert, so daß anschließend eine Calciumfreisetzung aus Zellorganellen auch in Gegenwart von extrazellulärem Calcium beobachtet werden konnte. Eine Identifizierung der intrazellulären Calciumquelle war mit diesem Ansatz jedoch nicht möglich. Derartige Untersuchungen wurden z.B. an der Nebenniere (Lastowecka und Trifaró, 1974), dem exokrinen Pankreas (Case und Clausen, 1973; Matthews et al., 1973; Kondo und Schulz, 1976), an Cortexscheiben (Vizi, 1972; Vizi et al., 1972; Vargas et al., 1976) und Mastzellen (Cochrane und Douglas, 1976) durchgeführt.

Umstrittener sind experimentelle Ansätze mit SH-Gruppen-Reagentien (Douglas et al., 1965; Russel et al., 1974) oder Ionophoren (Feinman und Detwiler, 1974; Vargas et al., 1976; Ito et al., 1978) in Abwesenheit von Calciumionen im Inkubationsmedium, da SH-Gruppen-Reagentien viele Angriffspunkte besitzen und die Selektivität der Ionophoren nur ungenügend geklärt ist (vgl. z.B.: Flatman und Lew, 1977). So kann z.B. der Ionophor X-537A auch Alkalimetalle transportieren, Catecholamine komplexieren und eine Depolarisation der Zellmembran hervorrufen (Literatur bei Ito et al., 1978).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es zahlreiche Untersuchungen gibt, die auf die Beteiligung einer intrazellulären Calciumquelle am Sekretionsprozeß hindeuten. In vitro kann Calcium aus den Mitochondrien verschiedener Gewebe (Skelettmuskulatur, Herz, Nebennierenrinde, Parotisdrüse und Gehirn) über ein Trägermolekül im Austausch gegen Lithium oder Natrium ausgeschüttet werden (Crompton et al., 1978b). Obwohl die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien für viele Gewebe gezeigt worden ist (vgl. Kap. 1.1.), konnte bisher kein direkter Nachweis einer Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien oder anderen Organellen sekretorischer Zellen in vivo erbracht werden.

1.2. Frühere Arbeiten zur Ionenverteilung im Nervengewebe

Für ein Verständnis der Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung ist die Kenntnis der Calciumkonzentrationen in den subzellulären Organellen der Neurone erforderlich. Bei Kenntnis der statischen Calciumverteilung könnte dann die Dynamik der Calciumflüsse bei Aktivität der Neurone untersucht werden.

Über die Verteilung von Metallionen im Nervengewebe ist nur sehr wenig bekannt. Untersuchungen beschränken sich meist auf Inkubationsexperimente mit ⁴⁵Ca, die zwar Rückschlüsse auf die Austauschbarkeit der Calciumionen ermöglichen, aber keine Aussagen über die Absolutmenge des Calciums in dem betrachteten Zellkompartiment oder über Netto-Ionenströme zulassen. Auch können Untersuchungen mit nur einem radioaktiven Metallisotop keinen Aufschluß über die Ionenspezifität des untersuchten Prozesses ergeben.

Quantitative Untersuchungen werden vor allem durch zwei Faktoren erschwert. Erstens ist es schwierig, die subzellulären Kompartimente von dem großen Überschuß an freigelösten cytoplasmatischen Ionen abzutrennen, ohne daß es zu einem unkontrollierten Verlust endogener Metallkationen

kommt. Zweitens sind die Ionenkonzentrationen in den Fraktionen der isolierten Zellorganellen so klein, daß nur die sehr empfindlichen Meßmethoden der Atomabsorptionsspektralphotometrie zuverlässige Bestimmungen ermöglichen.

In frühen Untersuchungen (Holland und Auditore, 1955; Ryall, 1962, 1964; Whittaker et al., 1964; Mangan und Whittaker, 1966) wurden Kaliumionen bei der subzellulären Fraktionierung als Leitsubstanz für das Cytoplasma des Nervengewebes benutzt. In neueren Arbeiten wird zu diesem Zweck jedoch meist die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität bestimmt. Untersuchungen liegen zum Ionengehalt der Synaptosomen aus Mäuse- (Na und K: Weinstein und Kuriyama, 1970), Schaf- (Mg und Ca: Madeira und Antunes-Madeira, 1973) und Rattengehirn (Ca, Na und K: Goddard und Robinson, 1976) und dem Kortex des Meerschweinchen- (Na und K: Marchbanks, 1975) und Rattengehirns (Ca: Kamino et al., 1974, 1975a, 1975b, 1976) vor. Nur Hanig et al. (1972) bestimmten systematisch den Na-, K-, Mg- und Ca-Gehalt verschiedener subzellulärer Fraktionen einschließlich einer Fraktion vorgereinigter synaptischer Vesikel aus Kaninchengehirn. Der Calciumgehalt der synaptischen Vesikel und Plasmamembran wurde auch von Ross (1977) gemessen. Der Calciumgehalt, beziehungsweise die Calciumbindungskapazität der Mitochondrienfraktion wurde für den Kortex des Meerschweinchengehirns (Stahl und Swanson, 1969; Vickers und Dowdall, 1976), das Gehirn des Kaninchens (Lazarewicz et al., 1974) und der Ratte (Lust und Robinson, 1970a) bestimmt.

In den veröffentlichten Untersuchungen zum Ionengehalt subzellulärer Fraktionen aus Nervengewebe sind mehrere Fehlerquellen zu berücksichtigen:

1. Nicht der Netto-Ionengehalt, sondern der Isotopenaustausch wurde bestimmt.
2. Ungenügend gereinigte subzelluläre Fraktionen wurden untersucht.

3. Hypotone Lösungen wurden zur Isolierung und Inkubation der Fraktionen verwendet.
4. Die Zellfraktionierung wurde in Gegenwart von Komplexbildnern wie EDTA durchgeführt.
5. Die zur Isolierung und Inkubation verwendeten Lösungen enthielten Metallionen, die mit den subzellulären Organellen in Wechselwirkung treten.
6. Als Ausgangsmaterial diente Gehirngewebe. Im Gehirn tritt jedoch eine Vielzahl von Neuronen auf, die sich sowohl in ihrer Form als auch hinsichtlich ihres Transmitters voneinander unterscheiden. Außerdem ist das Nervengewebe von vielen Gliazellen durchsetzt, deren subzelluläre Organellen gemeinsam mit den neuronalen Zellelementen isoliert werden.

Mit Ausnahme der Arbeiten von Lazarewicz et al. (1974) und Vickers und Dowdall (1976) wurden die genannten Fehlerquellen nur ungenügend beachtet. Hierauf wird in der Diskussion der Ergebnisse genauer eingegangen werden.

Die besondere Bedeutung der Calciumionen für erregbare Gewebe hat bereits früh zu Versuchen geführt, den Ort der Calciumwirkung und -speicherung im Herzmuskelgewebe mit ultrastrukturellen Methoden zu erfassen (Legato et al., 1968; Diculescu et al., 1971). Ein entscheidender methodischer Fortschritt wurde durch die Anwendung Calciumreicher Fixierungslösungen erzielt (Oschman und Wall, 1972). Die beobachtete "Anfärbung" der Membranen wurde damit erklärt, daß das Calcium-haltige Fixativ eine Ablösung des Erdalkalimetalls von den Zellstrukturen verhindern könnte. Auch Nervengewebe wurde mit dieser Methodik untersucht. Calciumablagerungen konnten an der Zellmembran (und den Mitochondrien) des Riesenaxons der Tintenschnecke (Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974) und den Mitochondrien des oberen Cervikalganglions der Katze (Parducz und Joó, 1976) beobachtet werden. Die letztgenannte Arbeit ist von besonderem Interesse, weil

die Calciumablagerungen in den Mitochondrien nur nach vorangegangener elektrischer Reizung gefunden wurden.

1.3. Das elektrische Organ von Torpedo als Modellsystem für Untersuchungen an cholinergen Neuronen

Zellfraktionierungen, die mit Gehirngewebe durchgeführt werden, ergeben heterogene Populationen subzellulärer Partikel, da die isolierten Organellen von Neuronen stammen, in denen verschiedene chemische Überträgerstoffe auftreten. Viele Untersuchungen sind deshalb an Modellsystemen durchgeführt worden, in denen nur ein Transmitter vorkommt: Die Drüsen des Nebennierenmarks, die sich aus hypertrophierten adrenergen Neuronen entwickelt haben, schütten bei Stimulierung Catecholamine aus. Die Speicherung dieser Hormone in den chromaffinen Granula, ihre Calcium-abhängige, exocytotische Sekretion sowie ihre Synthese durch eine Reihe regulativer Enzyme ähneln den Vorgängen an der adrenergen Synapse so sehr, daß dieses System zu einem fruchtbaren Modell für die adrenerge Transmitterfreisetzung geworden ist.

Zur Untersuchung der cholinergen Erregungsübertragung haben sich vor allem die präganglionären sympathischen Neurone der Wirbeltiere (besonders im oberen Cervikalganglion), die neuromuskulären Endplatten der Wirbeltier-Motoneurone und das elektrische Organ von Torpedo (Elasmobranchii) bewährt. Das letztgenannte System ist ausführlich beschrieben worden (Whittaker und Zimmermann, 1976; Dowdall, 1977), so daß hier nur die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtigsten erhobenen Befunde zusammengefaßt werden: Das elektrische Organ des Zitterrochenes leitet sich embryonal von der Branchialmuskulatur ab (Babuchin, 1876; Fritsch, 1890; Ogneff, 1897). Die einzelnen Elektroplaquezellen sind bei einem ausgewachsenen Fisch etwa 4 mm breit, aber nur 10 - 20 µm dick. Ihre Zellmembranen sind im Ruhezustand innen negativ polarisiert. Ca. 400 einzelne Zellen

sind säulenförmig nach der Art von Geldrollen übereinander angeordnet. In einem elektrischen Organ sind etwa 500 derartige Säulen in Bienenwabenart dicht aneinandergepackt. Die Elektroplaquezellen werden an ihrer ventralen Seite von den stark myelinisierten Elektromotoneuronen innerviert (Wagner, 1847), deren Zellkörper sich in den der Medulla oblongata aufliegenden Lobi electrici befinden. Von hier ziehen beidseitig je vier Nerven zwischen den Kiemenbögen hindurch zu den elektrischen Organen (Abb. 1). Wird einer der zuführenden Nerven gereizt, so wird die innervierte ventrale Seite der Elektroplaquezellen depolarisiert, und die Potentialdifferenzen an den dorsalen Zellmembranen addieren sich zu einem Spannungstoß von ca. 40 V (Bernstein, 1912).

Acetylcholin ist der einzige Überträgerstoff im elektrischen Organ von Torpedo (Feldberg et al., 1940; Feldberg und Fessard, 1942). Wegen der äußerst dichten Innervation liegt der Acetylcholingehalt des Gewebes besonders hoch (ca. 1 µmol/g Naßgewicht; das entspricht etwa dem 1000-fachen Acetylcholingehalt der neuromuskulären Endplatte, vgl. Whittaker et al., 1975). Wegen seiner reichen und ausschließlich cholinergen Innervation wurde das elektrische Organ von Whittaker und seinen Mitarbeitern als Modellsystem für biochemische Studien an cholinergen Synapsen eingeführt (Sheridan et al., 1966).

Die synaptischen Vesikel im elektrischen Organ sind größer als jene im Gehirn oder an der neuromuskulären Endplatte. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt 84 ± 4 nm (S.E.M., n = 57; Sheridan et al., 1966). Außer den synaptischen Vesikeln sind in den Nervenendigungen ultrastrukturell Mitochondrien, Mikrotubuli, Neurofilamente und zahlreiche elektronendichte Granula (Durchmesser ca. 30 nm) zu erkennen, die wahrscheinlich aus Glycogen bestehen (Sheridan, 1965).

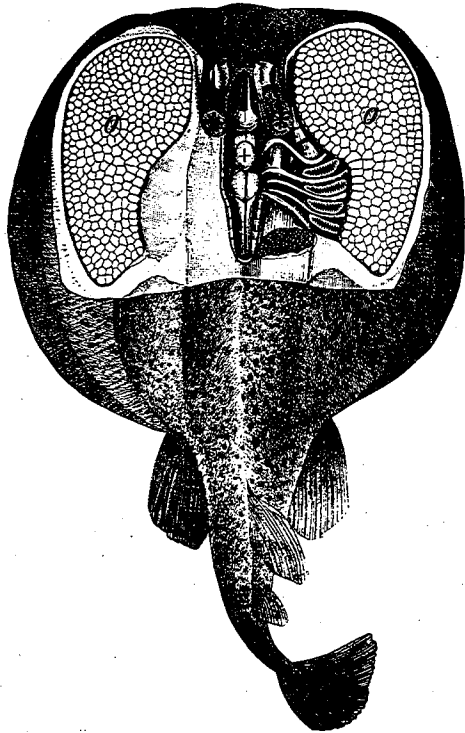


Abb. 1: Dorsalansicht von *Torpedo marmorata* (aus Fritsch, 1890). Die elektrischen Organe, O, das Gehirn und die zwischen den Kiemenbögen hindurch zum elektrischen Organ ziehenden Nerven (rechts) sind freigelegt. Das Kreuz in der Mitte des Gehirns markiert das Cerebellum. Caudal des Cerebellums erkennt man die großen paarigen Lobi electrici. Ein ausgewachsenes Versuchstier ist etwa 40 cm lang.

Durch die Arbeiten von Sheridan et al. (1966) und spätere methodische Verbesserungen (Israël et al., 1968, 1970; Whittaker et al., 1972) gelang die Isolierung der synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ. In den isolierten synaptischen Vesikeln ist nicht nur Acetylcholin, sondern auch ATP in einem molekularen Verhältnis von 5:1 gespeichert (Dowdall et al., 1974).

Die Entwicklung einer Stimulierungstechnik am intakten Fisch durch Zimmermann ermöglichte, die Dynamik der synaptischen Vesikel zu untersuchen. Eine kombinierte biochemische, elektrophysiologische und morphologische Untersuchung (Zimmermann und Whittaker, 1974a) zeigte bei anhaltender Stimulierung (5 Hz) einen deutlichen Abfall in der Amplitude der elektrischen Entladung, eine Zunahme der Fläche der präsynaptischen Zellmembran sowie eine Abnahme der Vesikeldurchmesser auf ca. 60 nm. Nach 5000 Impulsen war die Anzahl der Vesikel pro Flächeneinheit im elektronenmikroskopischen Bild auf die Hälfte gesunken. In der isolierten Vesikelfraktion war zugleich eine Verminderung des Acetylcholin- und ATP-Gehaltes um etwa 90% und eine deutliche Abnahme der Protein- und Nukleotidkonzentration zu beobachten.

Zimmermann und Whittaker (1974b) untersuchten auch die Erholungsphase des elektrischen Organs nach vorangegangener Reizung. Im Vergleich zur neuromuskulären Endplatte des Säugers (Ceccarelli et al., 1973) erholt sich das elektrische Organ sehr langsam, so daß eine zeitliche Auflösung der beteiligten Vorgänge möglich war: Während die elektrische Antwort auf einzelne Testimpulse schon nach 5 Stunden Werte wie vor der repetitiven Reizung erreicht, ist die Erschöpfbarkeit der Organantwort bei wiederholter Reizung noch groß. Das ultrastrukturelle Bild (Zahl der Vesikel, Größe der synaptischen Endknöpfe und Fläche der Zellmembran) erscheint nach 23 Stunden wieder als "normal". Aber die neu gebildeten Vesikel sind zunächst leer (und kleiner, s.o.), da der volle Acetylcholin- und ATP-Gehalt der Vesikelfraktion erst nach 3 Tagen erreicht wird. Damit stellt sich auch der ursprüngliche Verlauf des Amplitudenabfalls wieder ein.

Das bei Nervenerregung ausgeschüttete Acetylcholin wird durch Acetylcholinesterase zu Cholin und Acetat hydrolysiert. Ein Teil des Acetats und Cholins wird durch Zir-

kulation der Interstitialflüssigkeit wegtransportiert, ein Teil wird wieder in die Nervenendigung eingeschleust. Für das Cholin wurde ein spezifisches Aufnahmesystem hoher Affinität ($K_m \approx 2 \mu M$) nachgewiesen (Dowdall und Simon, 1973; Yamamura und Snyder, 1973; Haga und Noda, 1973; Dowdall, 1976a, 1976b; vgl. auch Dowdall, 1977). Im Cytoplasma wird aus Acetyl-Coenzym A und Cholin durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase Acetylcholin synthetisiert. Der Aufnahme-Mechanismus für das Acetylcholin in die synaptischen Vesikel ist unbekannt. Durch niederfrequente elektrische Reizung (0.1 Hz) von in vitro Präparaten konnte kürzlich ein Acetylcholinabfall im Gewebe nachgewiesen werden, ohne daß gleichzeitig die Zahl der synaptischen Vesikel in der Nervenendigung abnahm (Zimmermann und Denston, 1977a). Die Population synaptischer Vesikel, die nach der Stimulierung beobachtet wurde, besaß einen um 25% kleineren Durchmesser. Wenn Gewebelöcke mit Dextran-haltiger Salzlösung perfundiert wurden, konnte eine Aufnahme von Dextran-Molekülen (MG 10 000 bzw. 40 000) in Form elektronendichter Granula in den Vesikeln nachgewiesen werden. Das Lumen dieser Vesikel könnte mit dem synaptischen Spalt in Verbindung gestanden haben. Ferner gelang es, zwei Vesikelpopulationen auf Dichtegradienten voneinander abzutrennen. Die kleineren Vesikel, welche in den dichteren Regionen des Gradienten sedimentieren, enthielten die elektronendichten Dextrangranula. Diese Vesikel wiesen auch die höchste spezifische Radioaktivität auf, wenn die Gewebelöcke mit [3H]Acetat-haltiger Lösung perfundiert worden waren (Zimmermann und Denston, 1977b; Zimmermann und Whittaker, 1977) ([3H]Acetat wird im elektrischen Gewebe schnell zu radioaktiv markiertem Acetylcholin umgesetzt; vgl. Israël und Tuček, 1974). Es konnte gezeigt werden, daß zu diesen Vesikeln eine besonders aktive Subpopulation gehört, die mehrere Zyklen der Entladung und Wiederaufnahme von Acetylcholin durchläuft (Suszkiw et al., 1978). Auch [$2-^3H$]Adenosin wird vom Gewebe aufgenommen und kann als

markiertes ATP mit den dichteren Vesikeln wieder isoliert werden (Zimmermann, 1978).

Die direkte Beteiligung der synaptischen Vesikel an der Transmitterausschüttung (Exocytose) wurde durch Untersuchungen mit N-2-Hydroxyäthyl-N-[3H]methylpyrrolidinium erhärtet (Zimmermann und Dowdall, 1977). Diese Vorstufe zu einem "falschen" cholinergen Transmitter (vgl. Kopin, 1968) wird von den Nervenendigungen aufgenommen, acetyliert und gemeinsam mit Acetylcholin in synaptischen Vesikeln gespeichert. Bei elektrischer Reizung werden beide Substanzen in demselben Verhältnis in das Gewebeprefusat freigesetzt, in dem sie aus der Vesikelfraktion verschwinden.

Auch in anderen nervösen Geweben wurden bei elektrischer Reizung eine Abnahme der Vesikelzahl (Ceccarelli et al., 1972, 1973; Heuser und Reese, 1973; Boyne et al., 1975), eine Verkleinerung des Vesikeldurchmessers (Jones und Kwanbunbumpen, 1970; Korneliussen, 1972) sowie die Aufnahme extrazellulärer Markierungsstoffe in die synaptischen Vesikel (Holtzman et al., 1971; Ceccarelli et al., 1972, 1973; Heuser und Reese, 1973; Fried und Blaustein, 1976) beschrieben. Weitere Arbeiten werden bei Zimmermann (1976) und bei Zimmermann und Denston (1977a) diskutiert.

1.4. Zielsetzung der Untersuchungen

Obwohl die zentrale Rolle der Calciumionen bei der cholinergen Erregungsübertragung ebenso wie bei anderen sekretorischen Systemen schon früh erkannt wurde, fehlen noch immer zuverlässige Untersuchungen über die subzelluläre Verteilung dieses Erdalkalimetalles. Eine Kenntnis über den Calciumgehalt verschiedener Zellorganellen ist vor allem deshalb wünschenswert, weil wiederholt eine Beteiligung der intraterminalen Mitochondrien und auch der Zellmembran an der Regulation der cytoplasmatischen

Calciumkonzentration postuliert worden ist.

Das elektrische Organ von Torpedo hat sich aufgrund seiner reichen und ausschließlich cholinergen Innervation schon mehrfach zum Studium isolierter Zellorganellen, wie synaptischer Vesikel, Nervenendigungen und Perikaryen (Whittaker, 1974), bewährt. In der vorliegenden Arbeit wird angestrebt, Mitochondrien aus diesem Gewebe zu isolieren und eine Fraktion angereicherter Zellmembranen zu gewinnen. Der Calciumgehalt dieser und einiger weiterer Fraktionen (Nervenendigungen, cytoplasmatischer Überstand) soll mittels Atomabsorptionsspektralphotometrie quantitativ bestimmt werden.

Es wird angenommen, daß eine elektrische Reizung des Gewebes zu Veränderungen im Calciumgehalt der subzellulären Fraktionen führt, die Aufschluß über eine mögliche Beteiligung der Zellorganellen an der Regulation der cytoplasmatischen Calciumkonzentration (Abb. 2) geben. Die biochemischen Studien werden von ultrastrukturellen Kontrolluntersuchungen mit Calcium-haltigen Fixierungslösungen begleitet. Auch der Calciumgehalt der synaptischen Vesikel vor und nach elektrischer Stimulierung wird bestimmt. Da das Acetylcholinmolekül elektrisch positiv geladen ist, wäre es denkbar, daß die Transmitterfreisetzung im Ionenaustausch gegen Metallkationen aus dem synaptischen Spalt erfolgt. Die Fähigkeit cholinerges Vesikel, Calciumionen zu binden, wird daher mit ihrer Fähigkeit, andere Metallionen zu binden, verglichen.

Ferner wird die Spezifität der Ionenbindung an die Mitochondrien und an die synaptischen Vesikel durch Inkubationsversuche in ionenreichen Medien überprüft.

In einer vorangegangenen Untersuchung (Schmidt, 1975) wurde bereits eine qualitative Analyse der Metallkationen im elektrischen Organ von Torpedo durchgeführt. Das elektrische

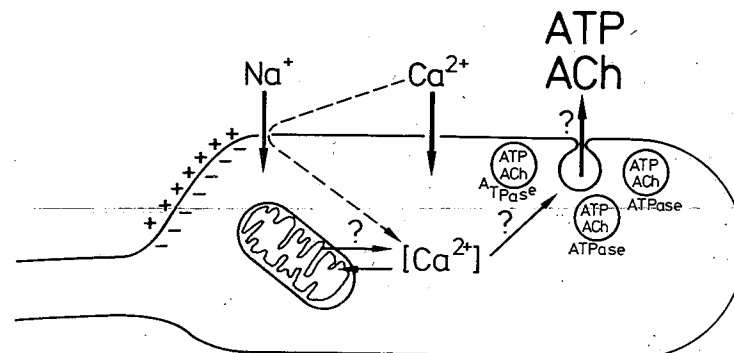


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vorgänge an der cholinergen Nervenendigung. Das einlaufende Aktionspotential führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, die mit einer vorübergehenden erhöhten Permeabilität für Natriumionen einhergeht. Calciumionen können durch diese Tetrodotoxin-empfindlichen Natriumkanäle einströmen (vgl. Llinás et al., 1972; Blaustein, 1975; Blaustein et al., 1977). Außerdem existieren unabhängige Calciumkanäle, die in der späten Phase des Aktionspotentials geöffnet werden. Es wird vermutet, daß Calciumionen auch aus intrazellulären Speichern (Mitochondrien ?) freigesetzt werden können. Die erhöhte cytoplasmatische Calciumkonzentration löst auf unbekannte Weise eine Wechselwirkung zwischen den synaptischen Vesikeln und der Zellmembran aus, die zur Freisetzung des Transmitters (und des Nukleotidgehaltes ?; vgl. Silinsky, 1975; Meunier, 1978) in den synaptischen Spalt führt.

Gewebe enthält Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium, sowie Spuren von Eisen und Zink. Es wurde auch gezeigt, daß die Atomabsorptionsspektralphotometrie zu einer genügend empfindlichen Methode ausgebaut werden kann, um die sehr kleinen Metallionenkonzentrationen in den isolierten subzellulären Fraktionen zu bestimmen. Diese Methodik soll in der vorliegenden Untersuchung angewendet werden, um quantitative Daten zur Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung zu gewinnen.

2. Methoden und Materialien

2.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an *Torpedo marmorata* (Elasmo-branchii) durchgeführt. Die Fische wurden von der Station Biologique d'Arcachon, Frankreich, per Luftfracht geliefert. Die Tiere wurden in Aquarien mit zirkulierendem Seewasser bei 16°C im Dunkeln gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden sie (bis zu 14 Tagen) nicht mehr gefüttert.

2.2. Betäubung der Tiere

Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere in einem kleinen Becken mit einer 0.05%igen Lösung von M.S.222 (Tricain-Methansulfonat, Methansulfonat des m-Aminobenzoesäure-äthylesters, Sigma, München) in Seewasser betäubt, bis die Atembewegungen der Spiracula aufhörten. Die Fische wurden dann in eine flache Sektionsschale übertragen, und das Kiemensystem wurde mit einer 0.01%igen Lösung von M.S.222 in gekühltem Seewasser durch das Maul überströmt. Die Dorsalseite des Rochens wurde mit nassem Zellstoffpapier feucht gehalten.

Versuche, in denen d-Tubocurarin in vivo appliziert wurde, wurden im Mai und Juni 1977 in einer Außenstelle des Labors am Institut de Biologie Marine in Arcachon durchgeführt, da diese Experimente eine ausreichende Versorgung mit besonders vitalen Versuchstieren erforderten (vgl. Kap. 2.4.).

2.3. Reizung des elektrischen Organs

Zwei Methoden wurden zur elektrischen Reizung der Organe angewendet:

1. in situ über die *Lobi electrici*,
2. in vitro über den zuführenden Nerven.

2.3.1. Elektrische Reizung in situ über die *Lobi electrici*

Die Ursprungskerne der zum elektrischen Organ führenden Nerven bilden die *Lobi electrici*, die dem Hirnstamm aufliegen. Um sie zugänglich zu machen, wurde die Schädelplatte des Fisches an jener Stelle entfernt, die ein gleichseitiges Dreieck mit den beiden Spritzlöchern bildet. Die aus Platin gefertigte Stimulationselektrode wurde mit einem Mikromanipulator vorsichtig auf die an ihrer gelben Farbe, der ovalen Form und den von rostral caudal vorbeiziehenden Blutgefäßen deutlich erkennbaren *Lobi electrici* aufgesetzt. In der Regel wurde mit 5000 Rechteckimpulsen von 1.5 ms Dauer und einer Frequenz von 5 Hz (Students Stimulator, C.F. Palmer Ltd., London) stimuliert. Die Reizamplitude wurde so gewählt (ca. 20 V), daß die Amplitude der Entladung des elektrischen Organs den maximalen Wert aufwies.

Um ein Kontrollorgan desselben Tieres zur Verfügung zu haben, wurden die vier Nervenstränge der Elektromotoneurone ca. 1 cm von jener Stelle entfernt, an der sie die Knorpelumhüllung des Gehirns verlassen, durchtrennt (vgl. Abb. 1). Dabei ist es wichtig, die in enger Nachbarschaft verlaufenden Blutgefäße nicht zu verletzen.

Die elektrische Antwort des innervierten Organs wurde über zwei Elektroden registriert, von denen eine der dorsalen Haut auflag, während die andere in das zirkulierende Seewasser tauchte (Abb. 3). Die elektrischen Entladungen wurden mit einem Voltmeter und einem Oszilloskop beobachtet. Die Ausgangsamplituden der Organentladung betrugen 25 - 60 V (Mittelwert 41.2 ± 1.8 S.E.M., $n = 33$). Nach 15 min repetitiver Reizung waren sie auf weniger als 1 V abgefallen.

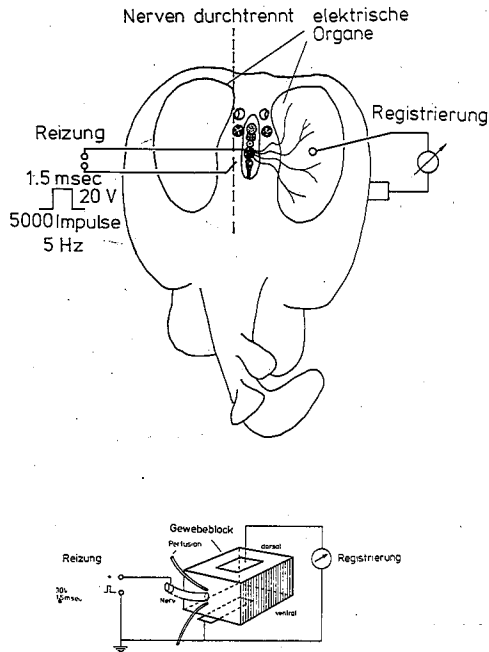


Abb. 3: Anordnung für die Reizung des elektrischen Organs über die *Lobi electrici* (oben) und der herauspräparierten Organblöcke (unten). In Experimenten am intakten Fisch erhält man ein unstimuliertes Kontrollorgan desselben Versuchstieres, wenn die zu einem Organ führenden Nerven vor Stimulationsbeginn durchtrennt werden.

2.3.2. Elektrische Reizung in vitro über den zuführenden Nerven

Die elektrischen Organe werden von je vier Nerven versorgt. Jeder Nerv wird von zwei venösen Blutgefäßen begleitet, deren Versorgungsgebiete mit denen der elektromotorischen

Nerven deckungsgleich sind. Durchtrennt man das elektrische Organ entsprechend diesen Bereichen und löst die zuführenden Nerven zwischen den Kiemenbögen heraus, so erhält man getrennte Gewebelöcke, die viele Stunden lang funktionsfähig gehalten werden können (Zimmermann und Denston, 1977). Die Gewebelöcke wurden mittels kleiner Teflonkanülen über die Blutgefäße penetriert und mit einer physiologischen Salzlösung (modifiziert nach Babel-Guérin, 1974) perfundiert. Sie enthielt bei einem pH von 7.4 in mmol/l: NaCl (208), KCl (5.6), CaCl₂ (4.4), MgCl₂ (1.2), NaHCO₃ (20), NaH₂PO₄ (3.5), Glucose (5.5), Saccharose (200) und Harnstoff (400). Das Perfusat wurde durch das Gewebe rezirkuliert (ca. 2 ml/g Gewebe). Die Gewebelöcke schwollen während der Perfusion um 70.5 ± 4.5 % ihres Ausgangsgewichtes an; die Ergebnisse wurden bezüglich dieser Gewichtszunahme korrigiert. Der Vorratsbehälter mit der Salzlösung wurde mit Eis gekühlt, während das Gewebe der Raumtemperatur ausgesetzt war. Während der mehrstündigen Rezirkulation der Salzlösung nahm ihre Wasserstoffionenaktivität kontinuierlich bis zum pH 8 ab, vermutlich indem CO₂ freigesetzt wurde. Hierdurch kann es zu lokalen Calciumanreicherungen kommen, wahrscheinlich durch präzipitierte Calciumphosphate. In derartigen Experimenten war der Calciumgehalt des Gewebes um einen Faktor 5 angereichert. Sie wurden nicht zur weiteren Auswertung herangezogen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde in späteren Experimenten eine etwas andere Salzlösung angewendet, bei der der pH auf 7.4 ± 0.2 gehalten wurde, indem die Perfusionslösung mit einer Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂ durchströmt wurde. Sie enthielt in mmol/l: NaCl (280), KCl (3.0), CaCl₂ (3.4), MgCl₂ (1.8), NaHCO₃ (1.2), NaH₂PO₄ (1.2), Glucose (5.5), Saccharose (100) und Harnstoff (300) (modifiziert nach Israël und Tuček, 1974). Unter diesen Bedingungen nahmen die Gewebelöcke 49.3 ± 5.8 % ihres Ausgangsgewichtes aus dem Perfusionspuffer auf.

Die elektrische Reizung erfolgte über den zuführenden Nerven,

in der Regel mit 5000 Rechteckimpulsen von 1.5 ms Dauer bei einer Reizfrequenz von 5 Hz. Die Reizamplitude wurde so gewählt (ca. 30 V), daß die Amplitude der Organentladung den maximalen Wert erreichte.

In einer Versuchsserie wurde die Zahl der Reize von 625 bis zu 5000 Impulsen variiert, um zu untersuchen, ob sich eine quantitative Beziehung zwischen dem Ausmaß der Transmitterfreisetzung und dem Calciumgehalt subzellulärer Organellen aufstellen läßt. In zwei Experimenten wurden Gewebelöcke zu demselben Zweck mit einer reduzierten Reizamplitude stimuliert (3 - 4 V), so daß die elektrische Antwort des Organs auf alle Reize 4% der maximal möglichen Antwort betrug ($\frac{E_i}{E_o} = 0.04$).

2.4. Pharmakologische Methoden zur Beeinflussung der synaptischen Übertragung

Die Antwort postsynaptischer Zellen mit nicotinischen ACh-Rezeptoren kann mit d-Tubocurarin unterdrückt werden. In der vorliegenden Untersuchung sollte durch die Applikation von Curare überprüft werden, ob die beobachteten Veränderungen im Calcium-Gehalt der isolierten Organellen prä- oder postsynaptischen Zellelementen zuzuschreiben sind (s. Kap. 3.2.2.3. und 3.2.2.4.). Auch die Wirkung des depolarisierenden Parasympathikomimetikums Carbachol wurde überprüft.

In den Versuchen mit in vitro Gewebepreparaten wurden d-Tubocurarin (250 µmol/l; Sigma) oder Carbachol (150 µmol/l) über den Perfusionspuffer appliziert. Die elektrische Antwort der Gewebelöcke auf einzelne Testimpulse wurde alle 30 min überprüft. Sie betrug zu Beginn der Versuche 31.7 ± 1.4 V. (S.E.M., n = 31). Bei Applikation von Curare sank sie in 6 h auf $4.8 \pm 0.7\%$ (S.E.M., n = 25) des Ausgangswertes (Abb. 4). Längere Applikation oder höhere

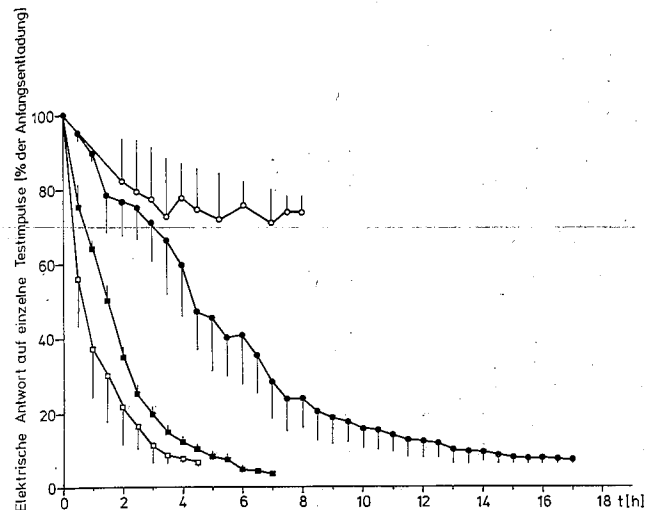


Abb. 4 : Abfall der Amplitude der Organantwort auf einzelne Testimpulse als Prozentsatz der Ausgangsamplitude. Die Mittelwerte aus n Versuchen sind mit ihren Standardabweichungen gegen die Zeit aufgetragen. Helle Kreise: Die Gewebelöcke wurden mit physiologischer Salzlösung perfundiert. Die Organantwort stabilisiert sich bei etwa 75% der Ausgangsamplitude (n = 3). Gefüllte Quadrate: Die Gewebelöcke wurden mit d-Tubocurarin (250 µM) perfundiert (n = 25). Die elektrische Antwort fällt wesentlich schneller ab als in Versuchen, in denen Curare in vivo appliziert wurde (gefüllte Kreise, n = 6). Helle Quadrate: Abfall der elektrischen Antwort von Gewebelöcken, die mit Carbachol (150 µM) perfundiert wurden (n = 4).

Dosen der Droge waren ohne weiteren Einfluß. Mit Carbachol wurde das endgültige Plateau bereits innerhalb von 4 h erreicht.

Bei Versuchen, in denen Curare in vivo appliziert wurde, wurden zwei Elektroden am Herz des Versuchstieres implantiert, und das "Elektrokardiogramm" wurde während

des gesamten Experimentes aufgezeichnet. Wenn Irregularitäten im Elektrokardiogramm beobachtet wurden, wurde der Versuch abgebrochen, da sich die elektrische Reizung in diesen Fällen als unwirksam erwies (kein Abfall im ACh-Gehalt der Fraktion synaptischer Vesikel).

In diesen Experimenten wurde d-Tubocurarin in physiologischer Salzlösung (Asta) in eine ventrale Vene injiziert, die vom Schwanz des Versuchstieres kommt (Krenz und Zimmermann, 1978). Hierbei besteht die Schwierigkeit, daß Curare einerseits sehr schnell abgebaut wird (Halbwertszeit im Plasma des Säugers: 13 min; Burgen und Mitchell, 1972) und daß es andererseits eine vasodilatatorische Wirkung besitzt, so daß zu hohe Dosen zum Versagen des Herzens führten. Für den Zitterrochen stellen 0.3 mg/30 min den optimalen Kompromiß dar. Die elektrische Antwort auf einzelne Testimpulse sank unter diesen Bedingungen innerhalb von 17 h auf $6.9 \pm 1.7\%$ des Ausgangswertes (S.E.M., $n = 6$, Abb. 4). Die zu einem der elektrischen Organe führenden Nerven wurden anschließend durchtrennt und das andere Organ über den Hirnstamm repetitiv gereizt (vgl. Kap. 2.3.1.).

2.5. Zellbiologische Methoden zur Isolierung subzellulärer Fraktionen aus dem elektrischen Organ von Torpedo

2.5.1. 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 Zellhomogenate zahlreiche Lysoenzyme, die in der lebenden Zelle in spezifischen Zellkompartimenten eingeschlossen sind, und somit nicht auf andere Zellstrukturen einwirken können. Subzelluläre Fraktionen wurden daher möglichst schnell in einem Kältelabor bei

0 - 4°C isoliert und weiterverarbeitet. In diesem Labor waren auch die kühlbaren Zentrifugen installiert.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten außer den enzymatischen Bestimmungen und den Ionenmessungen bei dieser Temperatur durchgeführt. Die bei der Präparation verwendeten Lösungen und Geräte, wie Rotoren, Mörser, Trichter, Meßzylinder, Pipetten etc., wurden vor den Experimenten über Nacht im Kältelabor vorgekühlt. Die Saccharoselösungen wurden für jedes Experiment frisch angesetzt, da sie bei Lagerung schnell verderben. Detergentien, Schwermetalle und andere Verunreinigungen wurden sorgfältig von den Präparaten ferngehalten. Es ist wichtig, daß alle Geräte nach dem Waschen mit Detergentien gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden.

2.5.2. Die Isolierung synaptischer Vesikel

Die dorsale Haut über den elektrischen Organen wurde abgezogen, die beiden Organe wurden entnommen, gewogen und in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff gefroren. Das Gewebe konnte so tagelang gelagert werden, ohne daß die Ausbeute an synaptischen Vesikeln beeinträchtigt wurde. Die elektrischen Organe wurden in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Porzellanmörser zu einem grobkörnigen weißlichen Pulver zerschlagen; hierbei zerbrechen die äußeren Zellmembranen. Falls das Gewebe aufzutauen begann, ehe es genügend zerkleinert war, wurde es mit einer kleinen Menge flüssigen Stickstoffs übergossen. Es wurde 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, die Zellmembranen aufzubrechen (Whittaker et al., 1972), ist der Homogenisation mit Scherkräften in Homogenisatoren oder mit sich drehenden Messern überlegen, bei denen zahlreiche artifizielle Membranvesikel gebildet werden. Das zerschlagene Gewebe wurde

mit eineinhalb Gewichtsäquivalenten einer 0.8-molaren Glycin-Lösung übergossen und zu einem homogenen Brei vermischt (Abb. 5). Die zugesetzte Lösung war dem elektrischen Gewebe isoosmolar (Israël et al., 1968), so daß die Vesikel keiner Veränderung des osmotischen Drucks ausgesetzt waren.

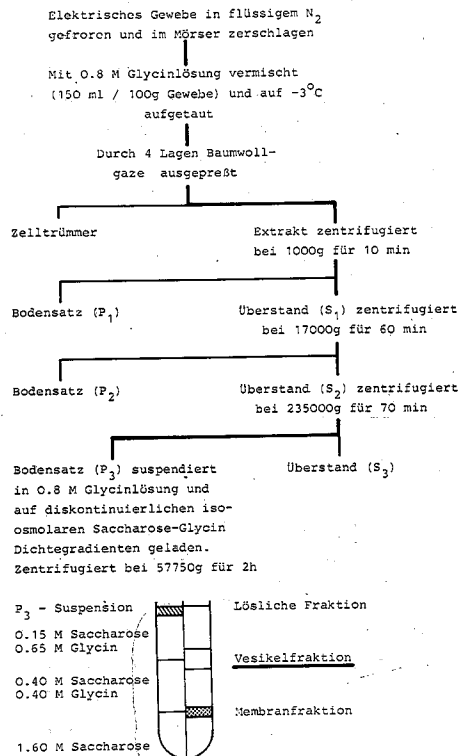


Abb. 5: Schematische Darstellung der Isolierung von synaptischen Vesikeln aus dem elektrischen Organ. Das Zellhomogenat wird mehreren Differentialzentrifugationen und einer Reinigung auf einem Saccharose-Glycin Dichtegradienten unterworfen.

Das erhaltene Homogenat wurde bei -3°C durch eine vierfache Schicht von Baumwollgaze gepreßt. Der Extrakt entsprach in seinem Gewicht etwa der eingesetzten Gewebemenge. Der Extraktionsrückstand wurde verworfen. Der Extrakt wurde 10 min lang einer Differentialzentrifugation bei 1000 g in einer Sorvall RC2-B-Zentrifuge unterworfen. Im Bodensatz, P₁, fanden sich vor allem Zelltrümmer und Zellkerne. Der Überstand, S₁, wurde einer weiteren Differentialzentrifugation (60 min bei 17 000 g) unterworfen, die Mitochondrien und Zellmembranen sedimentiert (P₂). Der verbliebene Überstand, S₂, enthielt die löslichen cytoplasmatischen Bestandteile, synaptische Vesikel, Mikrosomen, restliche Mitochondrien und Bruchstücke von Zellmembranen. Aus ihm konnte bei 235 000 g (70 min) eine vorgereinigte Vesikelfraktion, P₃, isoliert werden, während die cytoplasmatischen Bestandteile im Überstand, S₃, verblieben. Der Bodensatz wurde suspendiert, um die aneinanderhaftenden Partikel zu trennen: Er wurde mit ca. 10 ml 0.8-molarer Glycinlösung je 70 g Gewebe übergossen, durch eine Pipette angesaugt und wieder ausgeblasen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis eine homogene erscheinende Suspension erhalten wurde (ca. 10 mal). In einigen Experimenten wurde die P₃-Suspension direkt auf den Dichtegradienten geladen. Für genaue Ionenbestimmungen wurde sie jedoch zunächst ein weiteres Mal 70 min lang bei 235 000 g zentrifugiert. Die überständige Waschlösung, S₃⁺, wurde verworfen. Der gereinigte Bodensatz, P₃⁺, wurde in der gleichen Weise suspendiert, wie es oben beschrieben wurde, und auf einen Saccharose-Dichtegradienten geladen. Die Dichtegradienten wurden knapp eine Stunde vor dem Beladen mit der vesikelhaltigen Suspension angesetzt, damit sich lokale Inhomogenitäten im Gradienten ausgleichen konnten. Die mit Glycin auf 0.8 osmol/l gebrachten Saccharoselösungen abnehmender Dichte wurden vorsichtig gegen die Wandung eines Cellulosenitrat-Zentrifugenröhrchens (Beckman, Nr. 302237) von 38 ml Fassungsvermögen pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte in Beckman Schwenkbecherrotoren

(SW 27) für 125 min bei 57 750 g in den Ultrazentrifugen L5.50, L5.75 bzw. L2 65B. Die Fraktionen wurden mit Pasteurpipetten abgesaugt, deren Spitze rechtwinklig abgebogen war, so daß vertikale Strömungen im Zentrifugenröhrchen bei der Probeentnahme vermieden wurden. Die cholinergen Vesikel waren an der Grenzfläche zwischen 0.15 und 0.4-molarer Saccharose angereichert. Den Fraktionen wurden sofort kleine Probenmengen zur ACh- und ATP-Bestimmung entnommen. Wurde die Vesikelfraktion nicht unmittelbar weiterverarbeitet, so wurde sie bis zum Gebrauch im Tiefkühlfach bei -30°C aufbewahrt (z.B. zur Metallionenanalyse).

Im Vergleich zu anderen Standardmethoden der Vesikelpräparation (Whittaker et al., 1972) vertritt Glycin bei der hier beschriebenen Darstellungsmethode das NaCl. Dadurch wurde eine Bestimmung des Natriumgehaltes möglich. Ferner wurde eine Einwirkung der aus Mitochondrien durch NaCl freigesetzten Ca-Ionen auf die synaptischen Vesikel ausgeschaltet. Synaptische Vesikel und Zellmembranen wurden bei dieser Präparation nicht gemeinsam sedimentiert. Dadurch wurde eine mögliche Wechselwirkung zwischen diesen Zellorganellen vermieden. Die erhaltene vorgereinigte Vesikelfraktion, P_3 , erschien zwar noch leicht orange gefärbt, war aber vollkommen klar. Die im Gradienten erhaltene Vesikelfraktion zeigte sich erwartungsgemäß nicht als getrübbte Bande, da der Durchmesser synaptischer Vesikel mit der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes vergleichbar ist.

2.5.3. Die Isolierung von Mitochondrien

Mehrere Methoden zur Mitochondrienisolierung wurden verglichen. Das in Abbildung 6 zusammengefaßte Präparationschema lieferte die am besten reproduzierbaren Ergebnisse: 15 g tiefgefrorenes (-196°C) elektrisches Organ wurden auf ca. -3°C aufgetaut, mit einer Schere in kleine Stücken zerschnitten und mit 35 ml 0.8-molarer Glycinlösung

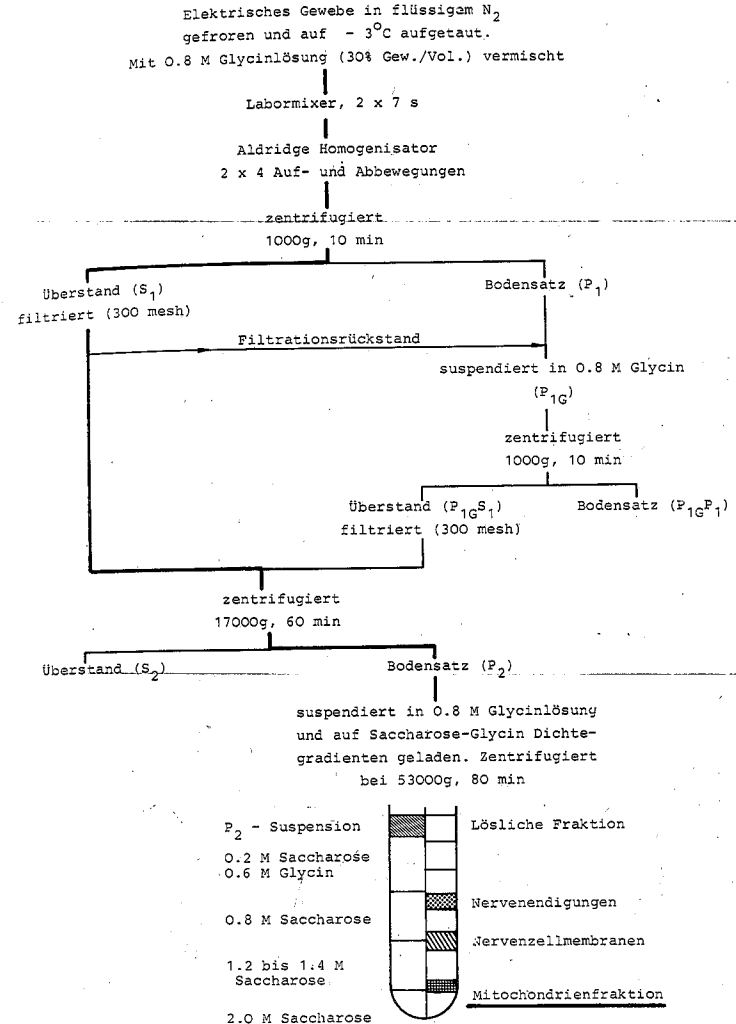


Abb. 6 : Schematische Darstellung der Isolierung von Mitochondrien. Die vorgereinigte Mitochondrienfraktion, P_2 , wird auf einem Dichtegradienten in Nervenendigungen, Membranfragmente und freie Mitochondrien aufgetrennt.

vermischt. Die Zerkleinerung des Gemisches wurde mit einem Labormixer (Modell 91-358, Dynamics Corporation, New Hartford, Connecticut, USA) zweimal für je 7 sec fortgesetzt. Die Mischung wurde dann durch 8 Auf- und Abbewegungen in einem Aldridge Homogenisator (Stempeldurchmesser 30 mm, Stempel-Becherabstand 0.25 mm, 840 Umdrehungen/min) homogenisiert. Man muß sorgfältig darauf achten, daß sich die Mischung nicht aufwärmt, und eine zweiminütige Unterbrechung zum Kühlen mit Eiswasser einschalten. Das Homogenat wurde 10 min lang bei 1 000 g in einem Sorvall SS-34 Schrägwinkelrotor sedimentiert. Der Überstand, S_1 , wurde dekantiert, über ein Nylonsieb (300 mesh, Beuteltuchfabrik AG, Zürich) gefiltert und für die weitere Fraktionierung verwahrt. Der Filtrationsrückstand wurde dem Bodensatz P_1 zugeschlagen. Um die Ausbeute an Mitochondrien zu erhöhen, wurde er in 25 ml 0.8-molarer Glycinlösung suspendiert (Fraktion P_{1G}), erneut durch 3 Auf- und Abbewegungen im Aldridge Homogenisator homogenisiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der gebildete weiße Bodensatz $P_{1G}P_1$ wurde verworfen, der Überstand $P_{1G}S_1$ gefiltert und mit dem Überstand S_1 vereinigt. Diese Mischung wurde im selben Rotor für eine Stunde bei 17 000 g zentrifugiert. Es resultierten der Überstand S_2 (verworfen) und die vorgereinigte Mitochondrienfraktion P_2 , welche neben Mitochondrien Synaptosomen und Membranbruchstücke enthielt. Der Bodensatz P_2 wurde in 8 ml 0.8-molarer Glycinlösung suspendiert. 3 ml wurden für analytische Zwecke zurückbehalten, die anderen 5 ml wurden auf einem Saccharose-Glycin Dichtegradienten aufgetrennt, der sowohl mehrere Dichtestufen als auch einen Bereich kontinuierlich ansteigender Dichte (entsprechend 1.2 bis 1.4-molarer Saccharoselösung) besaß. Die Dichtegradienten wurden 1 h vor dem Zentrifugieren in Beckman SW 27 Cellulosenitrat-Röhrchen mit Hilfe eines LKB Gradientenmischers (11300 Ultrograd^R gradient mixer, LKB, Bromma, Schweden) geschichtet und nach dem Beladen 80 min lang bei 53 000 g zentrifugiert. Die Fraktionen wurden

mit dem Beckman "System zur Fraktionsgewinnung" über einen Einstich in den Boden der Zentrifugenröhrchen entnommen, wobei die Mitochondrien an der Grenzfläche zwischen der 1.4 und der 2.0-molaren Saccharose erhalten wurden.

2.5.4. Die Isolierung von Nervenendigungen

Die synaptischen Endigungen cholinerg Axone wurden nach der von Dowdall und Zimmermann (1977) beschriebenen Methode isoliert. Das Gewebe wurde dazu denselben Homogenisations- und Differentialzentrifugationsschritten unterworfen wie bei der im folgenden Kapitel beschriebenen Isolierung präsynaptischer Nervenzellmembranen (vgl. Abbildung 7). Der erhaltene Bodensatz P_2 wurde in 0.8 M Glycin suspendiert und auf einem diskontinuierlichen Saccharose-Glycin Dichtegradienten bei 68 000 g während 2 h aufgetrennt. Die Osmolarität der 0.15 M Saccharoselösung des Gradienten war durch Zusatz von Glycin auf 0.8 osmol/l angehoben. Die Nervenendigungen reicherteten sich an der Grenzfläche zwischen 0.15 M und 0.8 M Saccharose an und wurden wie oben beschrieben entnommen. In einigen Versuchen wurden stattdessen 0.2 M und 0.5 M Saccharoselösungen verwendet, ohne daß ein Unterschied in den Ergebnissen beobachtet werden konnte. Sowohl frisch entnommene elektrische Organe, als auch Organe, die zuvor 24 h in flüssigem Stickstoff gefroren waren, wurden zur Auftrennung herangezogen und die so erhaltenen Ergebnisse verglichen. Auch in den zur Isolierung von Mitochondrien verwendeten Gradienten wurde an der Grenzfläche zwischen 0.2 und 0.8 M Saccharose eine Fraktion von Nervenendigungen erhalten.

2.5.5. Die Anreicherung präsynaptischer Nervenzellmembranen

15 g tiefgefrorenes elektrisches Gewebe wurden auf ca. -3°C aufgetaut, mit einer Schere und dann (unter Zusatz von 35 ml 0.8-molarer Glycinlösung) in einem Labormixer (zweimal für je 5 sec mit einer Pause von 2 min zum Kühlen)

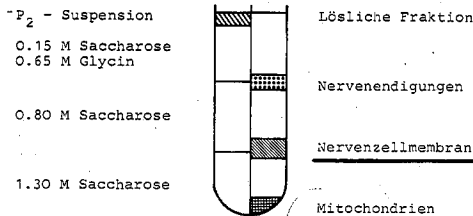
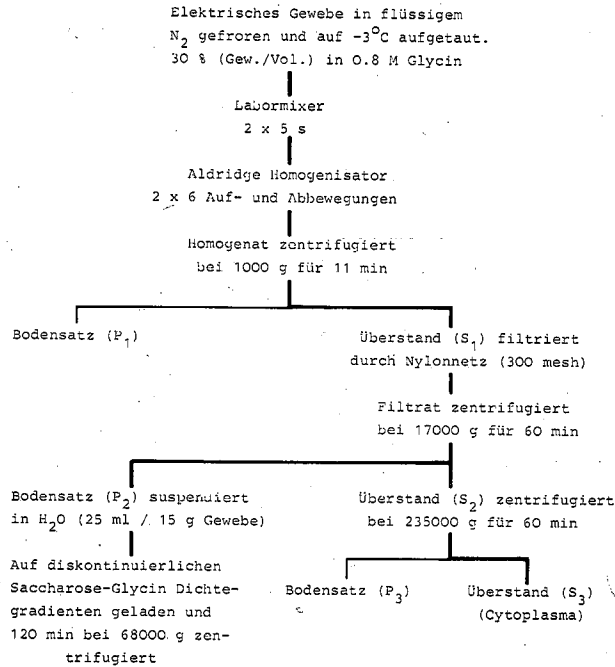
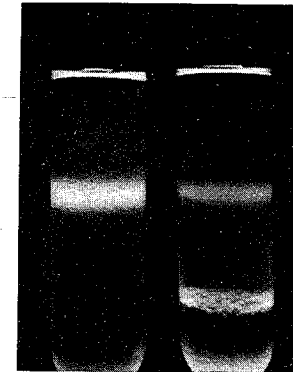


Abb. 7: Schematische Darstellung der Isolierung von Nervenzellmembranen und des cytoplasmatischen Überstandes. Die im Bodensatz P₂ enthaltenen membranumschlossenen Nervenendigungen werden mit Wasser zum Zerplatzen gebracht. Danach können die Membranfragmente auf einem Saccharose-Glycin Dichtegradienten isoliert werden (vgl. auch Abb. 8). Aus dem Überstand S₂ kann eine Mikrosomenfraktion, P₃, abzentrifugiert werden. Die löslichen cytoplasmatischen Zellbestandteile bleiben dabei im Überstand, S₃, zurück.

zerkleinert (Abb. 7). Die Mischung wurde anschließend in einem Aldridge Homogenisator (vgl. Kap. 2.5.3.) durch zweimal 6 Auf- und Abbewegungen mit einer 2-minütigen Pause zum Kühlen mit Eiswasser homogenisiert. Das Homogenat wurde 11 min lang bei 1 000 g in einem Sorvall SS-34 Schrägwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand, S₁, wurde durch ein Nyllonsieb (300 mesh) gefiltert und 1 h lang bei 17 000 g im selben Rotor sedimentiert. Der resultierende Überstand, S₂, wurde in einigen Versuchen zur Präparation eines cytoplasmatischen Überstandes herangezogen (vgl. folgendes Kapitel). Der Bodensatz P₂ wurde in Wasser suspendiert (25 ml pro 15 g Gewebe). Dabei zerplatzten die in der Fraktion enthaltenen Nervenendigungen. Nach 20 min wurden je 6 ml der Lösung auf einen Saccharose-Glycin Dichtegradienten aufgetragen, wie er auch zur Isolierung der intakten Nervenendigungen verwendet wurde (Abb. 8). Nach der Behandlung mit Wasser war die Bande



NTS
Membr.

Gly H₂O

Abb. 8: Aus dem Bodensatz P₂ kann eine Fraktion von Nervenendigungen (NTS, nerve terminal sacs) isoliert werden, wenn er in 0.8 M Glycinlösung (links) suspendiert wird (Dowdall und Zimmermann, 1977). Wird der Bodensatz P₂ hingegen in Wasser suspendiert, so zerplatzen die Nervenendigungen und ihre äußeren Membranen sedimentieren anschließend in einer dichteren Fraktion des Saccharosegradienten (rechts).

der Nervenendigungen im Gradienten deutlich schmaler, während eine neue Bande an der Grenzfläche zwischen 0.8 und 1.3-molarer Saccharose beobachtet wurde (Abb. 8), welche die Nervenzellmembranen enthielt.

2.5.6. Die Isolierung eines cytoplasmatischen Überstandes

Bei der Isolierung präsynaptischer Nervenzellmembranen fiel ein Überstand, S₂, an, aus dem eine Mikrosomenfraktion, P₃, durch Zentrifugieren bei 235 000 g für 70 min in einem Beckman Ti 75 Rotor entfernt werden konnte (Abb. 7). Der verbleibende partikelarme Überstand, S₃, enthielt die löslichen cytoplasmatischen Bestandteile des elektrischen Gewebes.

2.6. Morphologische Methoden

2.6.1. Fixierung in Glutaraldehyd

2.6.1.1. Subzelluläre Fraktionen

Suspensionen subzellulärer Partikel wurden mit eiskaltem gepufferten Glutaraldehyd (pH 7.4) versetzt, so daß die Endkonzentrationen von 1% Glutaraldehyd, 0.02 M Natriumphosphatpuffer, 0.175% NaCl und 0.85% Saccharose erreicht wurden. Nach 3 h bei 4°C wurden die fixierten Partikel bei 105 000 g in einem Beckman Schwenkbecherrotor (SW 39 bzw. SW 50) für 3 h sedimentiert. Der Bodensatz wurde mit einem Natriumphosphatpuffer, pH 7.4, der 1.4% NaCl und 3.4% Saccharose enthielt, gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte in 1% OsO₄, das in der Waschlösung angesetzt wurde, für 2 h bei 4°C. Nach Dehydrierung in Äthanol und Einbettung in Epon wurden mit einem LKB-Ultratome III Dünnschnitte hergestellt. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem JEM 100 B Elektronenmikroskop (JEOL) ausgewertet.

2.6.1.2. Gewebeblöcke

Gewebeblöcke von ca. 100 mg Masse wurden dem elektrischen Organ entnommen und durch Immersion in einer Lösung von 5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd nach Karnovsky (1965) 3 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie in 0.1 M Natriumkakyolat-Puffer, pH 7.4, für mehrere Stunden bei 4°C ausgewaschen und in 1.33%igem OsO₄ in einen 2,4,6-Collidin-Puffer für 2 h bei 4°C nachfixiert. Dehydrierung und Einbettung erfolgte wie bei den subzellulären Fraktionen.

2.6.2. Fixierung in Calcium-haltigem Medium

Ca. 1 mm³ große Blöcke des elektrischen Gewebes wurden mit einer Rasierklinge gründlich zerkleinert. Sie wurden dann durch zweistündige Immersion in 10%igem Paraformaldehyd (Winborn und Seelig, 1970) oder in 2.5%igem Glutaraldehyd (Oschman und Wall, 1972) fixiert. Die Fixierlösung war mit s-Collidin gepuffert und enthielt 5 mmol CaCl₂ je Liter. Die Nachfixierung erfolgte in mit s-Collidin gepuffertem 1.33%igem OsO₄, dem ebenfalls 5 mmol CaCl₂ je Liter zugesetzt worden waren. Die Proben wurden in Äthanol dehydriert und in Epon eingebettet. Die Dünnschnitte (Interferenzfarbe: silber) wurden mit einem Reichert OMU-2 Mikrotom angefertigt und in einem JEM 100 B Elektronenmikroskop ausgewertet.

2.7. Biochemische Bestimmungsmethoden

2.7.1. Bestimmung von Acetylcholin mit dem Blutegelmuskel

Acetylcholin wurde mit einem biologischen Test gemessen, der auf der Kontraktion präparierter Rückenmuskeln von Blutekeln (*Hirudo medicinalis*) bei künstlicher Zufuhr des Transmitters beruht (Szerb, 1961). Die wiederholt verbesserte Methode wurde in einem Mikrobäd (Gaddum und

Stephenson, 1958) durchgeführt und ist ausführlich von Whittaker und Barker (1972) beschrieben worden. Das Acetylcholin wurde bestimmt, indem die durch die Probelösungen hervorgerufenen Kontraktionen mit denen geeigneter Standardlösungen verglichen wurden. Die Abhängigkeit der Muskelkontraktion von der Acetylcholinosis ist sigmoid und konnte in dem mittleren Meßbereich näherungsweise als linear angenommen werden. Proben und Standardlösungen wurden so weit mit eserinhaltiger Lockelösung verdünnt, daß sie in den quasi-linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve fielen.

Das Acetylcholin wurde aus seinen Kompartimenten mit einer Extraktionsmethode in Freiheit gesetzt, die gleichzeitig die anwesenden Cholinesterasen zerstört (Hebb und Whittaker, 1958): Die Suspension der subzellulären Partikel wurde mit eiskalter, verdünnter HCl exakt auf den pH 4.0 eingestellt. Die saure Suspension wurde 7 min in einem siedenden Wasserbad gekocht und anschließend mit Eiswasser abgekühlt. Wurde die Messung nicht am selben Tag vorgenommen, so wurden die Proben tiefgefroren.

Um ACh im Gewebe zu bestimmen, wurde eine Gewebeprobe von ca. 100 mg in 1 ml eiskalter Trichloressigsäure zerkleinert und nach 1 h (bei 0°C) zentrifugiert. Der Bodensatz wurde erneut extrahiert und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit eiskaltem Diäthyläther überschichtet und geschüttelt. Der Diäthyläther wurde dann abgesaugt und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis der pH der Probelösung auf 4.0 angestiegen war. Der restliche Äther wurde im Wasserbad mit Preßluft ausgeblasen.

2.7.2. Bestimmung von Adenosin-5'-triphosphat

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) wurde mit der Luziferin-Luziferase-Methode (Luziferase: 3'-Phosphoadenyl: Luziferin Sulfotransferase EC 2.8.2.10) (Stanley und Williams,

1969), modifiziert gemäß Dowdall et al. (1974), bestimmt. Die Methode beruht auf dem ATP-abhängigen oxydativen Abbau des Luziferins, der über zur Lichtemission angeregte Zwischenprodukte verläuft (McElroy, 1969). 50 µl einer Suspension von 50 mg getrockneter Leuchtorgane von Leuchtkäfern (Lampyridae) in 5 ml eines Magnesiumsulfat (20 mM) - Kaliumarsenat (5 mM) - Puffers (pH 7.4), Sigma, wurden in ein Szintillationsgläschen gegeben, das 3 ml einer Pufferlösung (14.7 mM MgSO₄, 33 mM Na₂HAsO₄, 3.3 mM KH₂PO₄) vom pH 7.4 und 50 µl der Probelösung enthielt. Die Probelösung wurde zuvor mit 1/10 Volumen 0.25 M bzw. 0.7 M HClO₄ behandelt, um in Zellorganellen gebundenes ATP in Freiheit zu setzen. Nach 40 sec wurde das emittierte Licht 30 sec lang im Tritium-¹⁴C-Kanal eines Beckman LS 150 Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen. Die Werte wurden mit Standardmessungen bekannter ATP-Konzentrationen verglichen.

2.7.3. Bestimmung von Adenosin-5'-mono- und Adenosin-5'-diphosphat

Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) wurden zunächst zu ATP phosphoryliert (Imai et al., 1964) und dann mit der Luziferin-Luziferase-Methode (Kap. 2.7.2.) bestimmt. Die Probe wurde bei 0°C sorgfältig mit KOH neutralisiert und in drei Fraktionen geteilt. In der ersten wurde ATP direkt bestimmt. In der zweiten wurde ADP durch Pyruvatkinase (ATP:Pyruvat 2-O-Phosphotransferase, EC 2.7.1.40) mit Phosphoenolpyruvat zu ATP und Pyruvat umgesetzt. In der dritten Fraktion wurde AMP durch Myokinase (ATP:AMP Phosphotransferase, EC 2.7.4.3.) mit ATP in ADP übergeführt. Das entstehende ADP reagierte dann mit anwesender Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat zu ATP. Die Reaktionen wurden durch 30-minütige Inkubation in einem Glycinpuffer (pH 7.5, 25 mM Glycin, 7.5 mM MgSO₄, 75 mM KCl) durchgeführt, der auch das Phosphoenolpyruvat (4 mM) enthielt. Durch

Differenzbildung erhält man aus den drei Meßwerten (ATP, ATP + ADP, ATP + ADP + AMP) den Gehalt an ADP und AMP.

2.7.4. Bestimmung der Cholinesteraseaktivität

Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase, EC 3.1.1.7.) setzt aus Acetylthiocholin Thiocholin in Freiheit, das 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB) zum Thiol reduziert (Ellman et al., 1961). Die Extinktion des gebildeten Thiols wurde im Absorptionsmaximum bei 412 nm gemessen. Einige andere Esterasen, besonders die Butyrylcholinesterase, stören. Da jedoch das Pyrophosphorsäure-tetrakis-(monoisopropylamid) (iso-OMPA), das sonst als ein selektiver Inhibitor der Butyrylcholinesterase von Säugetieren angewendet wird, auch die Acetylcholinesterase von Torpedo zu hemmen scheint, während andererseits die Butyrylcholinesterase-Aktivität in Geweben von Torpedo gering ist (vgl. Davies et al., 1977), wurde in der vorliegenden Arbeit die Gesamtaktivität an unspezifischer Cholinesterase gemessen. Sie entspricht ungefähr der Acetylcholinesterase-Aktivität.

2.7.5. Bestimmung der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität

Cytochrom-c-Oxydase (Cytochrom c : O₂-Oxydoreduktase, EC 1.9.3.1.) wurde gemessen, indem die Oxydation von reduziertem Cytochrom c über den Abfall der Extinktion im Absorptionsmaximum bei 548 nm verfolgt wurde (Cooperstein und Lazarow, 1951). 40 mg Cytochrom c wurden in 1 ml eines 0.075 M Phosphatpuffers vom pH 7.5 gelöst und mit wenigen Kristallen Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) reduziert. Das reduzierte Cytochrom c wurde über eine Sephadex G-25 Säule von überschüssigem Dithionit abgetrennt und mit Pufferlösung auf 12 ml verdünnt. Zur Messung wurden 0.1 ml dieser Lösung mit 2.5 ml Pufferlösung und 0.2 ml der Probelösung versetzt.

2.7.6. Bestimmung der Fumaraseaktivität

Fumarase (Fumarat-Hydratase, EC 4.2.1.2.) wurde spektral-photometrisch bei 250 nm über die Ausbildung einer Doppelbindung bei der Umwandlung von L-Malat in Fumarat gemessen (Racker, 1950).

2.7.7. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Lactat-Dehydrogenase (LDH, L-Lactat:NAD⁺-Oxydoreduktase, EC 1.1.1.27.) wurde nach der von Johnson (1960) beschriebenen Methode bestimmt. Die mit der Reduktion von Pyruvat zu Lactat einhergehende Oxydation von NADH zu NAD⁺ wurde als Extinktionsabfall bei 340 nm gemessen. Um die gesamte LDH-Aktivität zu bestimmen, wurde die in Zellorganellen eingeschlossene LDH-Aktivität mit Triton X-100 freigesetzt (Endkonzentration 0.1%). Wird die Probelösung durch Zugabe von Saccharose der Körperflüssigkeit des Versuchstieres osmotisch angepaßt (800 mOsmol), so bleiben membranumschlossene Zellpartikel intakt, und nur die außerhalb dieser Partikel vorliegende LDH-Aktivität wird gemessen (freie LDH-Aktivität). Der Wert für gebundene (eingeschlossene) LDH-Aktivität ergibt sich als die Differenz zwischen Gesamtaktivität und Aktivität an freier LDH.

2.7.8. Bestimmung des Proteins nach Lowry et al.

Die phenolischen Hydroxylgruppen der Aminosäurereste wurden mit der Folin-Ciocalteu-Farbreaktion nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Standardlösungen wurden mit Albumin aus Rinderserum bereitet.

2.7.9. Bestimmung des Proteins nach Schaffner und Weissmann

Da Präparate mit hoher Glycinkonzentration bei der Proteinbestimmung nach Lowry et al. eine verminderte Farbentwicklung aufwiesen, wurde bei Glycin-haltigen Proben

der Proteingehalt nach der ebenso empfindlichen Methode von Schaffner und Weissmann (1973) bestimmt. Die Probe wurde mit Trichloressigsäure und Dodecylhydrogensulfat (Na-Salz) bei Raumtemperatur inkubiert. Das denaturierte Protein wurde dann durch Membranfilter (HAWP O2500, Millipore GmbH, Neu-Isenburg) im Vakuum abfiltriert. Das an den Filtern angetrocknete Protein wurde in einer Amidoschwarzlösung angefärbt, und anhaftende Farblösung abgewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Farbe mit einer EDTA-haltigen äthanolischen NaOH-Lösung eluiert und bei 630 nm vermessen. Rinderserumalbumin diente als Standard. Die Eichkurve war bis zu ca. 150 µg Protein linear.

2.8. Anorganisch chemische Methoden

2.8.1. Millipore-Filtration

Durch Vakuumfiltration mit Millipore^R-Filtern (Millipore GmbH, Neu-Isenburg) wurden die partikulären Bestandteile der subzellulären Fraktionen von den löslichen getrennt. Anschließend sollten der Ionengehalt im Filtrat und die mit den Partikeln auf dem Filter zurückgehaltenen Ionen bestimmt werden. Hierbei ergab sich jedoch die Schwierigkeit, daß die Filter selbst einen im Vergleich zur Ionenkonzentration subzellulärer Fraktionen beträchtlichen Ionengehalt aufwiesen, der außerdem stark von Filter zu Filter schwankte. Die Filter (HAWP O2500) wurden deshalb vor Gebrauch 12 h mit hochreiner 0.1 M HCl (Suprapur^R, Merck, Darmstadt) behandelt, mehrfach gründlich mit H₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Calciumgehalt der Filter wurde durch diese Behandlung in einem typischen Experiment von 62.7 ± 18.1 nmol Ca (S.E.M., n = 4) auf 29.8 ± 1.6 nmol Ca (n = 5) erniedrigt. Von 27 gewaschenen Filtern wurde als mittlerer Blindwert 33.8 ± 1.9 nmol Ca (S.E.M.) bestimmt. Dieser Mittelwert wurde vom Calciumgehalt der Filter mit biologischem Probematerial abgezogen.

Für die anderen Metallionen wurde analog verfahren. Wie aus den Werten zu erkennen ist, lag der Hauptvorteil des Säurewaschens nicht im geringeren Ionengehalt der Filter, sondern in der kleineren Varianz der Meßwerte. Wenn Lösungen mit erhöhtem Ionengehalt filtriert wurden, so wurden die Blindwerte von Filtern bestimmt, durch die entsprechende ionenreiche Lösungen ohne biologisches Material filtriert worden waren. Durch die Behandlung mit Salzsäure veränderte sich offenbar auch die Oberfläche der Filter, denn sie vermochten anschließend mehr als 99.7% des vesikulären ATPs zurückzuhalten (Vesikeldurchmesser: 80 nm, Zimmermann und Whittaker, 1974), obwohl der mittlere Porendurchmesser der unbehandelten Filter vom Hersteller mit 450 nm angegeben wird.

2.8.2. Aufschluß der Präparationsvorstufen und Millipore-Filter

Um den Ionengehalt der partikulären Präparationsvorstufen und die auf Millipore^R-Filtern zurückgehaltenen Ionen durch Atomabsorptionsspektralphotometrie bestimmen zu können, mußten die Proben zunächst in eine lösliche Form übergeführt werden. Dazu wurde ein nasser Aufschluß mit Salpetersäure unter Druck in Teflongefäßen durchgeführt (Kotz et al., 1972). Eine Probemenge von ca. 500 mg (bzw. der Filter) wurde in einen Teflonzylinder eingewogen und mit 0.5 ml 65%iger HNO₃ (Suprapur^R, Merck) versetzt. Das Gefäß wurde in einen Stahlzylinder eingesetzt und mit einem Teflondeckel verschlossen, der durch eine Feder fest aufgepreßt wurde (Aufschlußapparat, komplett, Berghof GmbH, Tübingen). Der Autoklav wurde in einen elektrisch heizbaren Aluminiumblock 105 min auf 185°C erhitzt. Anschließend wurde der doppelwandige Heizblock mit Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die klare Aufschlußlösung wurde abgegossen, und das Teflongefäß zweimal mit je 1 ml H₂O gespült.

Der in der Literatur vielfach beschriebene Weg der Trocken-

veraschung (z.B.: Hanig und Aprison, 1965) bereitete hingegen Schwierigkeiten, da sich die erhaltenen Metall-oxidrückstände nur sehr schwer in konzentrierten Säuren lösten (vgl.: Tower, 1968) und sich in der Hitze teilweise mit dem SiO_2 der Quarzriegel zu milchigen, unlöslichen Gläsern umsetzten.

2.8.3. Quantitative Analyse der Alkali- und Erdalkalimetalle durch Atomabsorptionsspektralphotometrie

Alkali- und Erdalkalimetalle wurden mit einem 2-Strahl-4-Kanal-Atomabsorptionsspektralphotometer (Beckman, Modell 1248) gemessen. Die durch Dissoziationskontinua und Lichtstreuung verursachte sogenannte unspezifische Lichtabsorption wurde bei Wellenlängen unterhalb von 350 nm kompensiert. Dazu wurde die unspezifische Extinktion des Lichtes einer Deuteriumlampe beiderseits der Resonanzwellenlänge des zu bestimmenden Elementes gemessen und elektronisch von der bei der Resonanzwellenlänge registrierten Summe aus spezifischen und unspezifischen Lichtverlusten subtrahiert. Da die Hohlkathodenlampe und die Deuteriumlampe mit unterschiedlicher Frequenz gepulst werden, konnten beide Signale von demselben Photodetektor registriert und mit verschiedenen Wechselstromverstärkern getrennt verstärkt werden. Diese Korrektur der Meßwerte war vor allem dann erforderlich, wenn mit der Anwesenheit größerer Partikel (Membranbruchstücke) zu rechnen war und bei kleinen Wellenlängen, λ , gemessen wurde (die durch Lichtstreuung bedingte Extinktion ist proportional zu λ^{-4}).

2.8.3.1. Fehlerquellen bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie und ihre Beseitigung

Eine 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. 9). 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 konnte dadurch erreicht werden, daß der Probelösung eine leicht ionisierbare Verbindung zugesetzt wurde. Lithiumchlorid hat sich besonders bewährt.

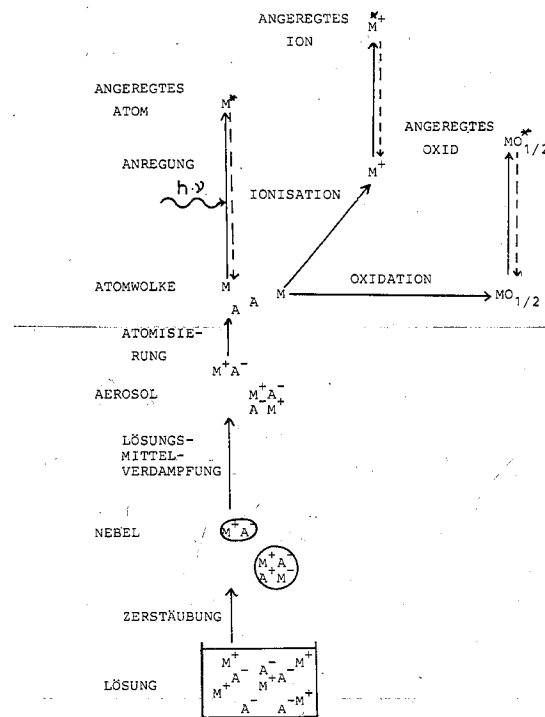


Abb. 9: Übersicht über die physikalischen und chemischen Prozesse bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie. Die Metallatome (M) können durch Ionisation oder Verbindungsbildung (z.B. Oxydation) der Bestimmung entgehen.

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 Konzentration der anionischen Verbindungspartner durch Zusatz solcher Elemente zur Probelösung vermindert wurde, die besonders stabile Verbindungen mit den genannten Anionen eingehen. Lanthanverbindungen erfüllen diese Voraussetzung.

Es ist selbstverständlich, daß die zugesetzten Chemikalien den Standardlösungen in gleicher Konzentration zugesetzt werden mußten, um einen etwaigen Gehalt an dem zu untersuchenden Metall zu berücksichtigen. Da verhältnismäßig große Mengen dieser Stoffe zugesetzt werden mußten, konnten nur Chemikalien höchster Reinheitsgrade verwendet werden. Obwohl solche Chemikalien von zahlreichen Firmen angeboten werden, werden die gegebenen Reinheitsgarantien fast nie eingehalten (vgl. Schmidt, 1975).

Jene Probelösungen, die durch Aufschluß mit Salpetersäure gewonnen worden waren, wurden mit Standardlösungen verglichen, denen ebenfalls eine gleiche Menge HNO_3 zugesetzt worden war, weil Salpetersäure die Extinktion durch Calciumatome um 60% senkt. Vermutlich erniedrigt die Salpetersäure die Flammentemperatur, indem sie endotherm in kleinere Molekeln gespalten wird; andererseits ist gerade die Atomisierung von Calciumverbindungen an hohe Temperaturen gebunden. Deshalb werden für Calciumbestimmungen häufig $\text{C}_2\text{H}_2 - \text{N}_2\text{O}$ Gasgemische benutzt. Bei der Verwendung von Lachgas kann aber kein gekühlter Brennerkopf (siehe unten) eingesetzt werden, so daß dieses Gasgemisch ausscheiden mußte.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Lösungen vermessen, die von Dichtegradienten gewonnen wurden und

einen Saccharosegehalt bis zu 2 mol/l besaßen. Um Störungen durch unterschiedliche, viskositätsbedingte Ansauggeschwindigkeiten zu vermeiden, wurden die Proben vor der Messung auf das 10-fache Volumen verdünnt. Trotzdem blieb die Störung durch den Saccharose- und Proteingehalt der Probematrix erheblich: Die Lösungen konzentrierten sich an der heißen Schneide des Brennerkopfes zu karamelartigen Produkten, die nicht nur den Brenner verstopften sondern auch Metallsalze zurückhielten. Abhilfe wurde dadurch geschaffen, daß der Brennerkopf gegen einen anderen ausgetauscht wurde, der mit einem eingebohrten Kanalsystem versehen war. Er wurde mit gekühltem Wasser durchströmt.

Die chemische Bestimmung so kleiner Metallionenkonzentrationen, wie sie in den untersuchten subzellulären Fraktionen gegeben sind, erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen. Metallionen sind im Staub ebenso vorhanden, wie in den Detergenzien, die zur Reinigung der Laborgeräte benutzt werden. Aus Glasgeräten werden von neutralen Lösungen pro Tag bis zu 1 mg Ca/l herausgelöst. Die genannten Kontaminationen wurden durch den ausschließlichen Gebrauch von Polyäthylen- und Polystyrolgefäßen eingeschränkt, welche gründlich mit 0.5 M HCl gewaschen wurden. Auch die zur Präparation benutzten Chemikalien enthalten Metallionen: Insbesondere die für die Dichtegradienten verwendete Saccharose wird industriell unter Zusatz überschüssiger Calciumhydroxidmengen zum Rübensirup hergestellt, um giftige Pflanzensäuren auszufällen (z.B. Oxalsäure). Auch hochreine Saccharose enthält noch beträchtliche Mengen Calcium. Der Calciumgehalt der 2 M Saccharoselösungen konnte um ca. 50% (von 3.3 auf 1.6 mg/l) gesenkt werden, indem sie durch eine Ionenaustauschersäule aus Chelex 100 geschickt wurden. Der Ionenaustauscher wurde zuvor mit 0.1 M HCl in seine saure Form übergeführt und gewaschen. Auch die verwendeten Glycinlösungen wurden mit Chelex 100 gereinigt. Die ver-

bliebenen Verunreinigungen wurden in Rechnung gestellt, indem jede Präparation von einem Dichtegradienten ohne biologisches Material begleitet wurde, dessen Blindwerte von den jeweiligen Meßwerten subtrahiert wurden.

2.8.3.2. Calciumbestimmung

Obwohl die Resonanzwellenlänge bei 422.67 nm sowohl von anderen Linien des Calciumspektrums als auch Emissionslinien des Hohlkathodenfüllgases Neon gut abgetrennt ist, bereitet die genaue Bestimmung des Calciums Schwierigkeiten, da es stark zur Verbindungsbildung in der Flamme neigt. Lanthanzusätze verschieben das Gleichgewicht zugunsten der freien Atome. Auch die Verwendung der heißeren N₂O-Acetylen-Flamme ist vorteilhaft, jedoch sind bisher keine kühlbaren Brennerköpfe für N₂O-Acetylen-Flammen verfügbar.

Standardreihe: 0.01 - 10 mg/l mit je 0.85% La, 1% HCl

Gasdrucke: C₂H₂ : 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

2.8.3.3. Kaliumbestimmung

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 war das Rauschen des verwendeten Sekundärelektronenvervielfachers im langwelligen Bereich stärker. Trotzdem wurde wegen der hohen Empfindlichkeit bei dieser Wellenlänge gemessen.

standardreihe: 0.02 - 10 mg/l mit je 0.5% LiCl
(als Ionisationspuffer)

Gasdrucke: C₂H₂ : 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

2.8.3.4. Lithiumbestimmung

Die Analyse des Lithiums bei 670.78 nm bereitete keine Schwierigkeiten. Die Resonanzwellenlänge konnte gut von anderen Linien der Argon-gefüllten Hohlkathodenlampe abgetrennt werden, die erhaltene Eichkurve war linear.

Standardreihe: 0.02 - 1.00 mg/l mit je 0.85% La, 1% HCl

Gasdrucke: C₂H₂ : 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

2.8.3.5. Magnesiumbestimmung

Die Resonanzwellenlänge bei 285.21 nm besitzt eine sehr hohe Oszillatorenstärke und wird weder durch Begleitlinien des Elementes noch durch Linien des Füllgasspektrums (Argon) gestört. Unspezifische Lichtverluste wurden mit Hilfe einer Deuteriumlampe kompensiert (siehe oben).

Standardreihe: 0.02 - 5 mg/l mit je 0.85% La, 1% HCl
 Gasdrucke: C₂H₂: 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

2.8.3.6. Natriumbestimmung

Natrium konnte 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 wurde. Es wurde eine Neon-gefüllte Hohlkathodenlampe verwendet.

Standardreihe: 0.02 - 10 mg/l mit je 0.5% LiCl (als Ionisationspuffer)
 Gasdrucke: C₂H₂: 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

2.9. Mathematische Auswertungsmethoden

Die Auswertung der Daten erfolgte, je nach der Komplexität der Rechenaufgabe, mit einem Corvus 500 Taschenrechner, mit einem Tischrechner (9825 A, Hewlett-Packard, Frankfurt), mit einem PDP 11/40 Prozeßrechner (Digital, Maynard,

Massachusetts, USA) oder einem UNIVAC 1100 Großcomputer. Für die beiden letzten Maschinen wurde BASIC, beziehungsweise deren UNIVAC-Version, UBASIC, als Programmiersprache verwendet.

Mit dem Ausreißertest nach Nalimov (vgl. Kaiser und Gottschalk, 1972) wurde überprüft, ob ausreißerverdächtige Meßwerte überzufällig fehlerhaft ausgefallen waren. Die Absolutwerte von Standardabweichungen zweier in sich homogener, d.h. ausreißerfreier, Datengruppen wurden mit dem F-Test, und die Mittelwerte der Datengruppen mit dem t-Test verglichen. Wenn sich weder die Varianzen noch die Mittelwerte unterschieden, wurden die beiden Datengruppen zusammengefaßt. Unterschieden sich die Mittelwerte mit einer Aussagesicherheit von 99% (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$), so werden sie als signifikant verschieden bezeichnet. Bei einer Aussagesicherheit von 99.9% ($p < 0.001$) wird das Ergebnis hochsignifikant genannt. Wenn paarweise zusammengehörige Meßwerte anfielen, wurde der t-Test für Paardifferenzen angewendet. Die Mittelwerte werden in der Regel zusammen mit der Standardabweichung der Mittelwerte (S.E.M., standard error of the mean) und der Zahl der Meßwerte, n, angegeben.

2.10. Chemikalien

Acetylcholinchlorid, Merck, Darmstadt
 Acetylthiocholinjodid, Merck, Darmstadt
 Adenosin-5'-diphosphat, Natriumsalz, Sigma, München
 Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz, Boehringer, Mannheim
 Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz, aus Pferdemuskel, Sigma, München
 Adenosin-5'-triphosphat, Magnesiumsalz, aus Pferdemuskel, Sigma, München
 Albumin, aus Rinderserum, kristallin, reinst, Serva, Heidelberg
 Amidoschwarz 10 B, Merck, Darmstadt

- Apyrase, aus Kartoffeln, Sigma, München
- Chelex 100, 100-200 mesh, Natriumform, Bio-Rad Laboratories, München
- Cytochrom c, aus Pferdeherz, Boehringer, Mannheim
- 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure, DTNB, Merck, Darmstadt
- Dodecylhydrogensulfat, Natriumsalz, Merck, Darmstadt
- Eserinsulfat, Physostigminsulfat, Sigma, München
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Merck, Darmstadt
- Glycin, Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid, Suprapur, Merck, Darmstadt
- Lanthan-III-oxid, max. 0.0005% Ca, für die Atomabsorptionsspektroskopie, Merck, Darmstadt (soweit analysiert, ist dies die reinste zur Zeit auf dem Markt erhältliche Lanthanverbindung)
- Lithiumchlorid, Suprapur, Merck, Darmstadt
- Luziferin-Luziferase-Gemisch, Rohextrakt aus den Leuchtorganen von Leuchtkäfern, Sigma, München
- Myokinase, aus Kaninchenmuskel, Sigma, München
- Natriumchlorid, Suprapur, Merck, Darmstadt
- Nicotinsäureamid-adenindinucleotid, NADH₂, Sigma, München
- Phosphoenolpyruvat, Trinatriumsalz, Sigma, München
- Pyruvatkinase, aus Kaninchenmuskel, Sigma, München
- Saccharose für die Dichtegradientenzentrifugation, Merck, Darmstadt
- Salpetersäure, Suprapur, Merck, Darmstadt
- Salzsäure, Suprapur, Merck, Darmstadt
- Sephadex G-25, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden
- Tricain-Methansulfonat, M.S.222, Sigma, München
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Sigma, München
- Triton X-100, Baker, Gross-Gerau
- d-Tubocurarin, in physiologischer Salzlösung, Asta, Bielefeld
- d-Tubocurarinchlorid, Hydrat, Sigma, München

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

3. Ergebnisse

3.1. Die Calciumverteilung im elektrischen Organ von Torpedo

3.1.1. Der Calciumgehalt des elektrischen Gewebes

Der Calciumgehalt des elektrischen Gewebes wurde routinemäßig bestimmt, um die Population der Versuchstiere auf Homogenität zu prüfen. In 113 Messungen wurde ein Mittelwert von $2.67 \pm 0.06 \mu\text{mol Ca/g Naßgewicht}$ gefunden. Keiner der Fische enthielt weniger als $1.8 \mu\text{mol Ca/g Naßgewicht}$ und keiner mehr als $5 \mu\text{mol Ca/g Naßgewicht}$. 70.8% der Werte fielen zwischen 2 und $3 \mu\text{mol Ca/g Naßgewicht}$. Die relative Häufigkeitsverteilung der gemessenen Werte ist in Abb. 10 in Form eines Histogramms dargestellt.

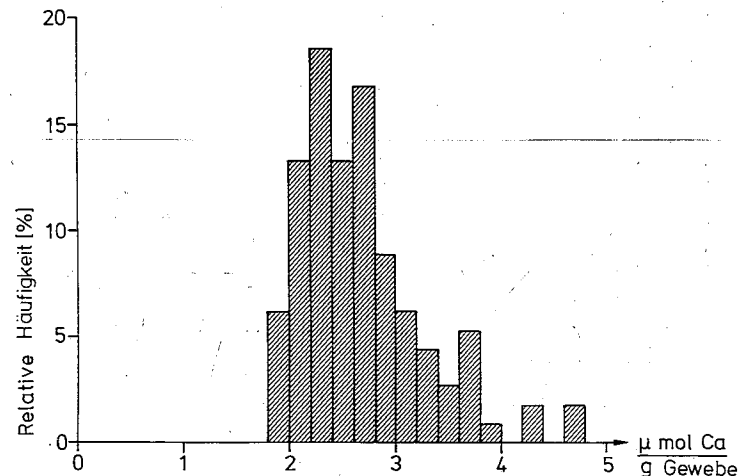


Abb. 10: Der Calciumgehalt des elektrischen Gewebes wurde routinemäßig bestimmt, um die Population der Versuchstiere auf Homogenität zu prüfen. Die Meßwerte sind im Histogramm zu Klassen relativer Häufigkeit zusammengefaßt. Alle Versuchstiere gehörten zu einer einheitlichen Population, in der ein Mindestgehalt von $1.8 \mu\text{mol Ca/g Gewebe}$ nicht unterschritten wurde. Die Häufigkeitsverteilung ist rechtsschief zu höheren Werten geneigt.

Es wurden keinerlei jahreszeitliche Schwankungen im Calciumgehalt der elektrischen Organe beobachtet (Tabelle 1). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Befunden von Babel-Guérin (1974), die über einen wesentlich höheren Calciumgehalt der im Sommer im Vergleich zu den im Winter untersuchten Tieren berichtete. Auch konnten

Tabelle 1: Jahreszeitliche Invarianz des Calciumgehaltes im elektrischen Organ

Monat	$\mu\text{mol Ca} / \text{g Naßgewicht}$
Januar*	-----
Februar	3.23 ± 0.58 (3)
März	3.17 ± 0.41 (8)
April	2.59 ± 0.11 (8)
Mai	2.63 ± 0.14 (14)
Juni	2.48 ± 0.13 (12)
Juli	2.98 ± 0.19 (9)
August	2.70 ± 0.07 (2)
September	2.52 ± 0.18 (12)
Oktober	2.45 ± 0.12 (11)
November	2.66 ± 0.15 (12)
Dezember	2.70 ± 0.14 (12)
Fische in Arcachon	2.51 ± 0.15 (10)
Gesamtpopulation	2.67 ± 0.06 (113)

Der Calciumgehalt im elektrischen Gewebe wurde routinemäßig bestimmt, um die Homogenität der Versuchstiere zu überprüfen. Es wurden keine signifikanten jahreszeitlichen Veränderungen beobachtet. Eine Subpopulation von Versuchstieren wurde im Mai und Juni 1977 in Arcachon untersucht.

* Während der Jahre 1974 bis 1978 waren im Januar keine Versuchstiere verfügbar.

wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den in Göttingen analysierten Tieren und einer Gruppe von Versuchstieren feststellen, die im Mai und Juni 1977 in Arcachon, Frankreich, in großen Seewasseraquarien gehalten wurden. Die Population der Versuchstiere weist also in Bezug auf ihren Calciumgehalt keine Inhomogenität auf.

3.1.2. Der Calciumgehalt in verschiedenen Körperflüssigkeiten

Die Calciumkonzentration im Blutplasma von *Torpedo marmorata* betrug 2.67 ± 0.37 mmol / l (S.E.M., n = 3). Die Calciumkonzentration der Uterusflüssigkeit war 2.41 ± 0.07 mmol / l (S.E.M., n = 5). Das Gehirn von *Torpedo* wird von mehreren Meningen umhüllt (vgl. Bargmann, 1954), die Flüssigkeiten unterschiedlicher Zusammensetzung einschließen. Sie wurden gemeinsam nach dem Aufschneiden der Knorpelhülle über dem Gehirn entnommen. Die mittlere Calciumkonzentration dieser Cerebrospinalflüssigkeit betrug 3.70 ± 0.19 mmol / l (S.E.M., n = 4).

3.1.3. Der Calciumgehalt isolierter subzellulärer Organellen

3.1.3.1. Charakterisierung der Präparationsvorstufen

Die Analyse von Leitsubstanzen erlaubt, die Zusammensetzung der Präparationsstufen zu charakterisieren, die durch Differentialzentrifugation erhalten wurden (Tabelle 2). Man erkennt, daß die Mitochondrien (Leitenzym: Cytochrom-c-Oxydase) hauptsächlich in den Bodensätzen P₁ und P₂ wiedergefunden wurden (der hohe Cytochrom-c-Oxydasegehalt der Fraktion S₁ wird ja auf die Fraktion P₂, S₂ usw. aufgetrennt). Die Auftrennung der Mitochondrien erkennt man gleichermaßen auch anhand des mitochondrialen Enzyms Fumarase. Allerdings sind die nach dem Verfahren von Racker (1950) gemessenen Fumaraseaktivitäten in Gewebefractionen des

Tabelle 2: Verteilung der Leitsubstanzen und der Metalle auf die Präparationsvorstufen

	Ca [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}}$]	Protein [$\frac{\mu\text{g}}{\text{g Gewebe}}$]	Cyt c Oxyd. [$\frac{\mu\text{mol}/\text{min}}{\text{g Gewebe}}$]	LDH (gesamt) [$\frac{\mu\text{mol}/\text{min}}{\text{g Gewebe}}$]	LDH (frei) [$\frac{\% \text{ von LDH (gesamt)}}{\text{LDH (gesamt)}}$]
Ge	2.67±0.06 (113)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Ho	2.91±0.08 (81)	10168±334 (86)	268±26 (65)	12.22±1.47 (7)	77.4±2.0 (7)
P ₁	0.79±0.13 (14)	4151±386 (14)	117±19 (8)	2.16±0.45 (5)	55.7±8.4 (5)
S ₁	1.86±0.14 (14)	6811±401 (28)	161±31 (15)	7.72±1.37 (7)	94.7±17.6 (7)
P ₂	1.08±0.07 (24)	2263±107 (73)	96±5 (61)	0.87±0.09 (7)	48.4±8.5 (7)
S ₂	0.85±0.11 (24)	6138±438 (38)	38±4 (17)	7.57±1.36 (7)	97.5±18.0 (7)
P ₃	0.25±0.04 (12)	562±74 (14)	7±3 (2)	0.41±0.08 (6)	92.0±18.8 (6)
S ₃	0.73±0.15 (6)	3830±230 (16)	0±0 (2)	6.32±0.96 (6)	98.4±15.3 (6)
Ausbeute: P ₁ +P ₂ +P ₃ +S ₃ als % des Ho	97.9	106.3	82.1	79.8	86.9

	Mg [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}}$]	Na [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}}$]	K [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}}$]	ACh [$\frac{\text{nmol}}{\text{g Gewebe}}$]	ChE [$\frac{\mu\text{mol}/\text{min}}{\text{g Gewebe}}$]
Ge	3.04±0.27 (10)	206.84±4.88 (14)	22.39±0.88 (14)	1256±70 (18)	n.b.
Ho	3.38±0.33 (9)	n.b.	n.b.	898 (1)	342.7±48.3 (13)
P ₁	n.b.	n.b.	n.b.	356 (1)	152.0±23.5 (8)
S ₁	n.b.	n.b.	n.b.	358±137 (2)	157.1±16.1 (16)
P ₂	0.20±0.01 (11)	7.88±0.75 (5)	0.77±0.06 (5)	247±46 (13)	106.0±16.8 (14)
S ₂	2.72±0.34 (6)	n.b.	n.b.	306±10 (7)	71.3±9.7 (17)
P ₃	0.07±0.01 (7)	0.18±0.02 (5)	0.03±0.01 (6)	106±29 (8)	28.8±4.8 (8)
S ₃	2.06±0.17 (11)	118.57±8.08 (14)	10.26±0.70 (14)	5±1 (4)	21.9±3.0 (9)
Ausbeute: P ₁ +P ₂ +P ₃ +S ₃ als % des Ho	n.b.	n.b.	n.b.	79.5	90.1

Angegeben sind die Mittelwerte aus n (in Klammern) Versuchen mit ihren Standardabweichungen. Abkürzungen: Ge, Gewebe; Ho, Zellhomogenat; P₁, S₁, P₂, S₂, P₃ und S₃ sind Präparationsvorstufen, die durch subzelluläre Fraktionierung gewonnen wurden. Die Ausbeute errechnet sich aus der Summe der Meßwerte in den Endstufen der Differentialzentrifugationen als Prozentsatz des Meßwertes für das Homogenat, n.b.: nicht bestimmt.

elektrischen Organs gering, so daß zuverlässigere Ergebnisse durch Messung der Cytochrom-c-Oxydase erwartet wurden, und auf eine systematische Fumarasebestimmung in allen Fraktionen verzichtet wurde. Da die Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität in den isolierten Fraktionen sehr schnell absinkt, wurde das Enzym unmittelbar nach der Auftrennung gemessen.

Anhand der LDH-Aktivitäten kann die Aufteilung cytoplasmatischer Bestandteile verfolgt werden (Spalten 4 und 5 der Tabelle 2). Sowohl der Bodensatz P₁ (weniger der Bodensatz P₂) als auch der Überstand S₃ waren reich an LDH-Aktivität. Während jedoch ein beträchtlicher Teil der LDH-Aktivität in der Fraktion P₁ von Membranstrukturen eingeschlossen war, fand sich im Überstand S₃ fast nur freie LDH-Aktivität. Die Ausbeute an LDH-Aktivität lag bei 80%.

ACh, die Leitsubstanz für die synaptischen Vesikel, fand sich in allen Bodensatzfraktionen. Die Verteilung der Cholinesteraseaktivität deutet an, daß Membranbruchstücke hauptsächlich in den Bodensätzen P₁ und P₂ wiedergefunden wurden.

Die Anreicherung einer Komponente in einer bestimmten Fraktion kann besonders gut beurteilt werden, wenn die sogenannte relative spezifische Konzentrierung (RSK) der betreffenden Komponente berechnet wird. Dazu wird das Verhältnis der prozentualen Anteile der Komponenten gebildet, die in der jeweiligen Fraktion wiedergewonnen wurden. In der Regel bezieht man auf Protein, 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. Trägt man den RSK-Wert für die jeweilige Komponente gegen den prozentualen Anteil an wiedergefundenem Protein auf

(de Duve et al., 1955), so wird die relative Anreicherung durch die Höhe der erhaltenen Säulen und die Menge an wiedergewonnener Komponente durch ihre Flächen zum Ausdruck gebracht (Abb. 11). Die Anreicherung der Cytochrom-c-Oxydase- und Cholinesteraseaktivitäten in der Fraktion P₂ ist ebenso zu erkennen wie die Anreicherung des AChs im Bodensatz P₃. Eingeschlossene LDH-Aktivität verbleibt in den schweren partikulären Fraktionen, während die freie LDH-Aktivität fast vollständig im Überstand S₃ wiedergewonnen wird. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die Zellorganellen wie folgt auf jene Präparationsstufen verteilen, die am Ende der Differentialzentrifugationen erhalten werden:

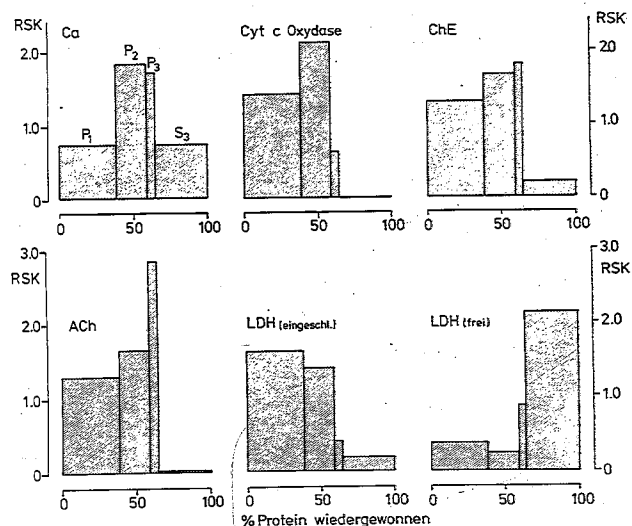


Abb. 11: Relative spezifische Konzentrierung (RSK) des Calciums und der Leitsubstanzen in den Präparationsvorstufen in der Darstellungsweise nach de Duve. Der RSK-Wert (d.i. der prozentuale Anteil der Substanz, der in der betrachteten Fraktion wiedergefunden wurde, geteilt durch den prozentualen Anteil des in der Fraktion wiedergefundenen Proteins) ist gegen den prozentualen Anteil an Protein aufgetragen, der in der Fraktion wiedergefunden wurde. Calcium wird ähnlich angereichert wie die Cytochrom-c-Oxydase- und Cholinesteraseaktivitäten.

- P₁ - Zellfragmente, Mitochondrien
- P₂ - Mitochondrien, synaptosomenartige Strukturen mit eingeschlossenem Cytoplasma und synaptischen Vesikeln sowie Membranen verschiedenen Ursprungs. Die Heterogenität dieser Fraktion wird auch durch ultrastrukturelle Beobachtungen bestätigt (Abb. 12)
- P₃ - synaptische Vesikel
- S₃ - Cytoplasma.

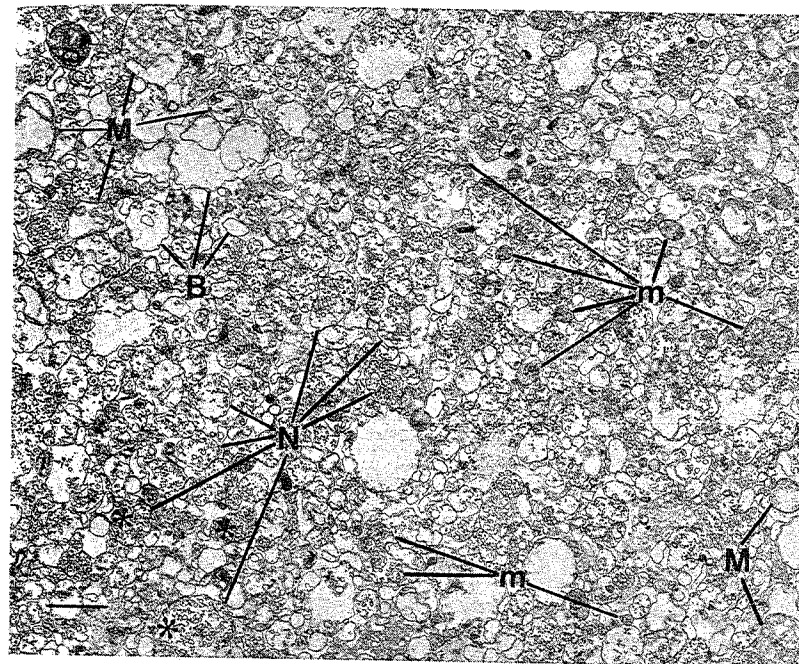


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bodensatzes P₂. Die Fraktion enthält Mitochondrien der Nervenendigungen (m) und der Elektroplaquezellen (M), Nervenendigungen (N) mit synaptischen Vesikeln und den charakteristischen Granula (*), die vermutlich aus Glycogen bestehen (Sheridan, 1965). Daneben finden sich zahlreiche Membranbruchstücke (B). Die prä-synaptischen Mitochondrien sind zum Teil noch in den Nervenendigungen eingeschlossen. Balken: 1 µm.

3.1.3.2. Der Metallionengehalt der Präparationsvorstufen

In Tabelle 2 und Abbildung 11 ist auch die Calciumverteilung auf die Präparationsvorstufen wiedergegeben. Ca verteilte sich ähnlich wie die Cytochrom-c-Oxydase- und Cholinesteraseaktivitäten. Allerdings war auch im Überstand S₃ frei gelöstes Ca vorhanden. Die Hauptmenge des Calciums befand sich in der vorgereinigten Mitochondrienfraktion P₂.

Wenn der Bodensatz P₁ erneut homogenisiert wurde und den gleichen Zentrifugationsbedingungen unterworfen wurde wie das ursprüngliche Gewebe, so wurde erneut der größte Teil des Calciums im Bodensatz P₂ wiedergefunden. Es muß also angenommen werden, daß nach einfachem Homogenisieren in den Strukturen des Bodensatzes P₁ noch Partikel eingeschlossen waren, die bei vollständiger Auftrennung in die verschiedenen Zellorganellen in der Fraktion P₂ sedimentieren würden.

Wenn die Ca-haltigen Partikel der Fraktion P₃ auf Dichtegradienten aufgetrennt wurden, wurden 40 bis 50% des Calciums an der Grenzfläche zwischen 0.6 und 1.6 M Saccharose wiedergewonnen, einer Fraktion, die besonders reich an Leitsubstanzen für Membranen und Mitochondrien war.

Magnesium, Natrium und Kalium verteilen sich ganz anders auf die Präparationsvorstufen als Calcium (Tabelle 2). Das ähnliche Verhalten des Magnesiums, Natriums und Kaliums im Gegensatz zum Calcium wird besonders deutlich, wenn der Prozentsatz der Metalle verglichen wird, der in den Fraktionen P₂, P₃ und S₃ wiedergewonnen wurde (Tabelle 3).

3.1.3.3. Beeinflussung der subzellulären Auftrennung durch Einfrieren des Gewebes

Die stimulationsbedingte Veränderung im Calciumgehalt der Mitochondrien, über die im Kap. 3.2.2. berichtet werden

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der Metalle auf die Präparationsvorstufen

	Ca	Mg	Na	K
P ₂	40.5	6.6	3.8	3.4
P ₃	9.4	2.3	0.1	0.1
S ₃	27.3	67.8	57.3	45.8

Es ist jeweils derjenige mittlere Prozentsatz des Metallgehaltes im gesamten Gewebe angegeben, der in der betreffenden Fraktion wiedergewonnen wurde.

wird, war weniger deutlich zu erkennen, wenn Gewebeproben zur Auftrennung verwendet wurden, die zuvor nicht eingefroren gewesen waren. Es wäre denkbar, daß eine veränderte Calciumverteilung durch Einfrieren des Gewebes unmittelbar nach der elektrischen Stimulierung fixiert wird. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, daß die Aufteilung der verschiedenen Zellorganellen auf die Fraktionen der Differentialzentrifugationen durch das Gefrieren des Gewebes verändert wird. Durch Vergleich der Calciumgehalte der Fraktionen P₁ und P₂ von gefrorenem und ungefrorenem Gewebe wird deutlich, daß die zweite Hypothese zutrifft (Tabelle 4). Ebenso, wie der Calciumgehalt der Fraktion P₂ durch das Gefrieren um 192% zunahm, stieg auch der Proteingehalt dieser Fraktion um 195% an. Das mitochondriale Leitenzym Cytochrom-c-Oxydase war um 78% angereichert (Tabelle 4), während sich der Gehalt an anderen Leitsubstanzen durch den Gefrierschritt kaum änderte (ACH: + 37%; ChE: + 7%; LDH(gesamt): - 8%; LDH (eingeschlossen): + 20%). Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß die Ausbeute sowohl an Calcium als auch an Mitochondrien in der Fraktion P₂ erhöht war, wenn mit gefrorenem Gewebe gearbeitet wurde. Allerdings erhöhte sich die Ausbeute an Mitochondrien in der Fraktion P₂

Tabelle 4: Beeinflussung der subzellulären Auftrennung durch Einfrieren des Gewebes

Komponente	ungefrorenes Gewebe		gefrorenes Gewebe	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
Ca [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}}$]	1.33 ± 0.08 (8)	0.37 ± 0.04 (8)	0.79 ± 0.13 (14)	1.08 ± 0.07 (24)
Protein [$\frac{\mu\text{g}}{\text{g Gewebe}}$]	5611 ± 334 (6)	765 ± 58 (16)	4151 ± 386 (14)	2263 ± 107 (73)
Cyt c Oxyd. [$\frac{\text{nmol/min}}{\text{g Gewebe}}$]	194 ± 16 (8)	54 ± 3 (8)	117 ± 19 (8)	96 ± 5 (61)

Ein Vergleich der Ca- und Proteingehalte und der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivitäten (Cyt c Oxyd.) in den Fraktionen P₁ und P₂ von ungefrorenem und gefrorenem Gewebe zeigt, daß das Einfrieren des Gewebes zu einer Umverteilung der Mitochondrien aus dem Bodensatz P₁ (ungefrorenes Gewebe) in den Bodensatz P₂ (gefrorenes Gewebe) führt. Während die Umverteilung für das Protein quantitativ war (+ 0.1%), wurde von gefrorenem Gewebe etwas mehr Calcium (+ 10%) und weniger Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität (- 14%) wiedergewonnen. Vermutlich wurde ein Teil der Enzymaktivität durch das Gefrieren des Gewebes zerstört, so daß 35 Aktivitätseinheiten weniger erhalten wurden.

weniger stark als diejenige an Calcium und Protein, vermutlich, weil ein Teil der Enzymaktivität durch das Einfrieren und wieder Auftauen des Gewebes zerstört wurde. Wahrscheinlich wurden die Zellmembranen durch das Gefrieren brüchiger, so daß mehr Mitochondrien freigesetzt wurden, die sonst im Innern von Zellfragmenten eingeschlossen blieben und mit ihnen im Bodensatz P₁ sedimentierten.

3.1.3.4. Der Calciumgehalt der Mitochondrien

Bei der weiteren Auftrennung der vorgereinigten Mitochondrienfraktion P₂ auf einem Saccharose-Glycin Dichtegradienten (Methode s. Kap. 2.5.3.) wurden zwei partikuläre

Fraktionen erhalten: Eine bläuliche Bande, welche die Nervenendigungen enthielt (s. Kap. 3.1.3.5.), und eine gelbe Fraktion, die sehr reich an Mitochondrien war. Man erkennt in Abb. 13, daß sich das Ca ebenso über den Dichtegradienten verteilte wie die Cytochrom-c-Oxydaseaktivität. Der größte Anteil der Mitochondrien wurde an der Grenzschicht zwischen 1.4 und 2.0 molarer Saccharose wiedergewonnen. Diese Fraktion war besonders reich an Ca. Sie enthielt 834 ± 88 (S.E.M., n = 17) nmol Ca / mg Protein. Das entsprach einem mittleren Verhältnis von 12.8 ± 1.4 (S.E.M., n = 17) $\mu\text{mol Ca je } \mu\text{mol Cytochrom c}$, das in 1 Minute oxydiert wurde. Biochemisch ist diese Fraktion wie folgt charakterisiert (Mittelwerte \pm S.E.M.): 850 \pm 94 $\mu\text{g Protein / g Ausgangsgewebe}$ (n = 28); Cytochrom-c-Oxydase, 0.067 \pm 0.006 IU / mg Protein (n = 28); LDH (eingeschlossen), 0.021 \pm 0.005 IU / mg Protein (n = 7); LDH (frei), 0.014 \pm 0.002 IU / mg Protein (n = 7); Cholinesterase, 6.3 \pm 1.1 IU / mg Protein (n = 13); ACh, 8.6 \pm 3.1 nmol / mg Protein (n = 10).

3.1.3.5. Der Calciumgehalt der Nervenendigungen

Die Fraktion isolierter Nervenendigungen von ungefrorenem Gewebe (Präparationsmethode, s. Kap. 2.5.4.) enthielt 195 \pm 40 (Streubereich, n = 2) $\mu\text{g Protein / g Gewebe}$ und LDH-Aktivitäten von 0.85 \pm 0.32 (eingeschlossene LDH) bzw. 0.14 \pm 0.04 (freie LDH) IU / mg Protein (S.E.M., n = 4); diese Werte entsprechen denen, die für isolierte Nervenendigungen von juvenilen Versuchstieren gefunden wurden (Dowdall und Zimmermann, 1977). Die Cholinesteraseaktivität in dieser Fraktion betrug 27 \pm 9 IU / mg Protein (S.E.M., n = 4), und sie enthielt 86 \pm 3 nmol ACh / mg Protein (S.E.M., n = 3); beide Werte sind etwa 6 mal höher als jene von juvenilen Versuchstieren. Wenn gefrorenes Gewebe für die Präparation benutzt wurde, war der ACh-Gehalt noch höher (122 \pm 32 nmol ACh / mg Protein, n = 4), während der Gehalt an anderen Leitsubstanzen keine Veränderung erfuhr.

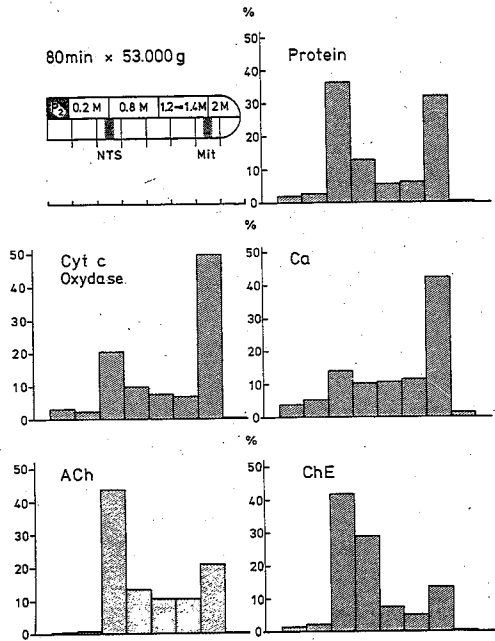


Abb. 13: Verteilung der Leitsubstanzen und des Calciums auf die Fraktionen eines Dichtegradienten (oben links), auf den die vorgereinigte Mitochondrienfraktion, P₂, aufgetragen wurde. Der größte Teil des Proteins wird in zwei Gipfeln wiedergewonnen, die sich auch als getrübbte Banden in dem Dichtegradienten erkennen lassen. Der Hauptanteil des Acetylcholins und der Cholinesteraseaktivität sind mit dem ersten Proteingipfel assoziiert (unten), während sich die Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität überwiegend im zweiten Proteingipfel der Mitochondrien (Mit) wiederfindet. Ein Teil der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität ist aber auch mit den Nervenendigungen (NTS, nerve terminal sacs) der ersten Bande assoziiert. Das Calcium folgt in seiner Verteilung dem mitochondrialen Leitenzym. Im Mittel wurden in 6 Gradienten wiedergefunden (als Prozentsatz der vorgereinigten Mitochondrienfraktion ± S.E.M.): Protein, 93 ± 11; Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität, 93 ± 14; Ca, 112 ± 4; ACh, 104 ± 18; Cholinesteraseaktivität: 86 ± 4.

Eine Fraktion mit gleichen Eigenschaften wurde an der Grenzfläche zwischen 0.2 und 0.8-molarer Saccharose jener Dichtegradienten erhalten, die zur Mitochondrienisolierung verwendet wurden. Sie enthielt 144 ± 14 nmol ACh / mg Protein (S.E.M., n = 24) und eine Cholinesteraseaktivität von 37 ± 6 IU / mg Protein (S.E.M., n = 4). Die Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität betrug in beiden Präparationen 0.021 ± 0.001 IU / mg Protein (S.E.M., n = 54); das entsprach etwa 20% der gesamten nach der Dichtegradientenzentrifugation wiedergewonnenen Enzymaktivität. Da sich keine biochemischen Unterschiede feststellen ließen, wurden die Calciumgehalte, die in beiden Typen von Gradienten gemessen wurden, zur Mittelwertbildung herangezogen (nur von gefrorenem Gewebe).

Der Calciumgehalt in der Fraktion der Nervenendigungen betrug 262 ± 24 nmol Ca / mg Protein (S.E.M., n = 27). Das entsprach einem mittleren Verhältnis von 12.3 ± 2.0 (S.E.M., n = 27) $\mu\text{mol Ca je } \mu\text{mol Cytochrom c}$, das pro Minute oxydiert wurde. Der Ca-Gehalt je Milligramm Protein war in der Fraktion isolierter Nervenendigungen wesentlich niedriger als in der Mitochondrienfraktion. Da jedoch der auf das mitochondriale Leitenzym bezogene Ca-Gehalt in beiden Fraktionen identisch war, könnte man vermuten, daß der größte Teil des Calciums in der Fraktion der Nervenendigungen von Mitochondrien beige-steuert wurde. Es könnte sich dabei um Mitochondrien gehandelt haben, die in den isolierten Nervenendigungen eingeschlossen waren, oder um freie Mitochondrien, welche in die Fraktion der Nervenendigungen eingeschleppt wurden. Im Kap. 3.2.3. wird zwischen diesen Möglichkeiten entschieden werden.

3.1.3.6. Der Calciumgehalt einer mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion

Nervenzellmembranen können an der Grenzfläche zwischen 0.8 und 1.3-molarer Saccharoselösung angereichert werden, wenn ein mit Wasser geschockter Bodensatz P₂ auf Dichtegradienten

aufgetragen wird (Methode, s. Kap. 2.5.5.). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten in dieser Fraktion zahlreiche leere Nervenendigungen, von denen viele zusammengefallen waren (Abb. 14). Sie enthielt 182 ± 14 (S.E.M., $n = 6$) μg Protein je g Ausgangsgewebe und war biochemisch

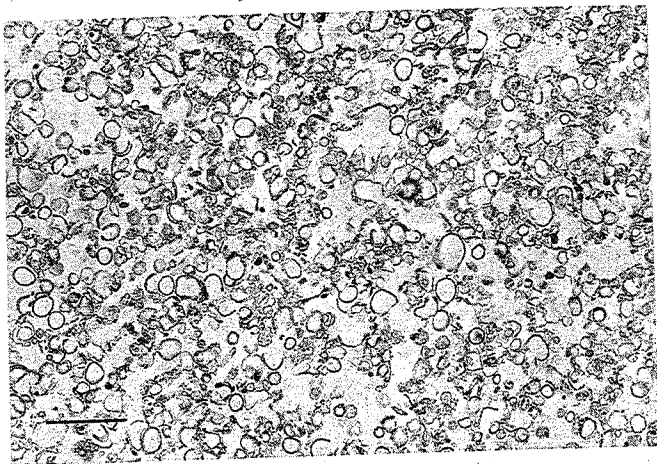


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Membranfraktion. Man erkennt zahlreiche leere Nervenendigungen ("ghosts"), die großenteils aufgeplatzt und zusammengefallen sind. Balken: 1 μm .

durch ihren hohen Gehalt an Cholinesteraseaktivität (80.2 ± 39.1 IU / mg Protein; S.E.M., $n = 5$) charakterisiert. Daneben fanden sich in der Fraktion geringe Mengen an LDH- und Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität (LDH: 0.18 ± 0.04 IU / mg Protein, S.E.M., $n = 3$; Cytochrom-c-Oxydase: 0.010 ± 0.003 IU / mg Protein; S.E.M., $n = 4$) sowie Spuren von ACh (4.7 ± 2.1 nmol ACh / mg Protein, S.E.M., $n = 5$). In der Abbildung 15 ist die Verteilung der Cholinesterase- und Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität auf die Fraktionen des Dichtegradienten wiedergegeben (Darstellung nach de Duve).

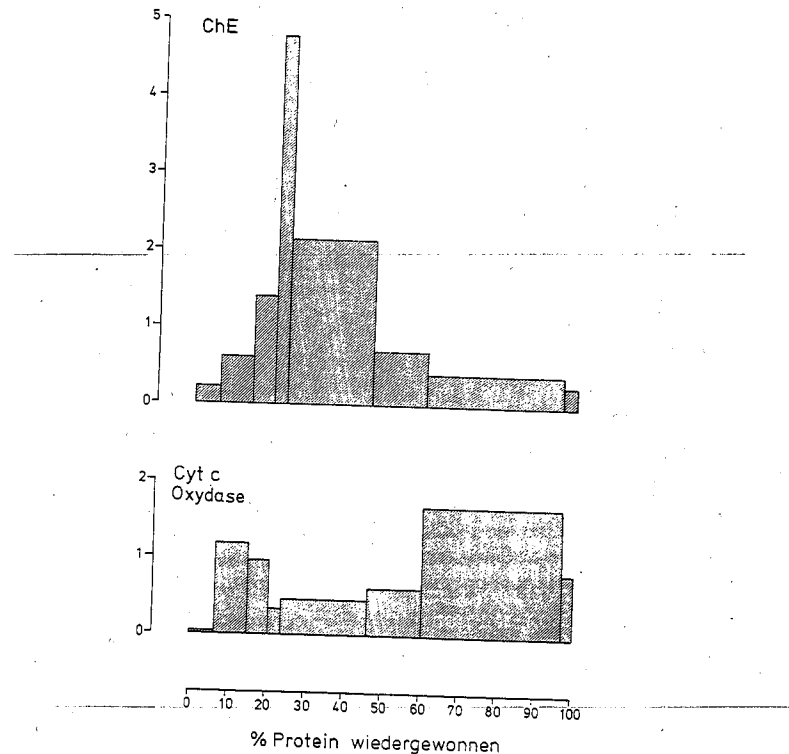


Abb. 15: Verteilung der Cholinesteraseaktivität und der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität auf die Fraktionen eines Dichtegradienten für die Anreicherung präsynaptischer Zellmembranen. Der Bodensatz P_2 war vor dem Auftragen auf den Gradienten mit Wasser geschockt worden. Darstellung der relativen spezifischen Konzentrierung nach de Duve.

Der Calciumgehalt der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion war mit 617 ± 185 nmol Ca / mg Protein relativ hoch (S.E.M., $n = 6$). Die genaue Zusammensetzung dieser Fraktion kann jedoch nicht angegeben werden, da auch andere subzelluläre Partikel außer den präsynaptischen Zellmembranen Cholinesteraseaktivität aufweisen; durch solche

Zellorganellen könnte Calcium in die Membranfraktion eingeschleppt worden sein. Lediglich der Calciumbeitrag durch verunreinigende Mitochondrien kann rechnerisch korrigiert werden. Nach Abzug der Mitochondrienverunreinigung beträgt der mittlere Calciumgehalt der Fraktion 574 nmol Ca/mg Protein. Die Rechnung wurde wie folgt durchgeführt: Aufgrund der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität in der Nervenzellmembran-reichen Fraktion (0.01 IU / mg Protein) kann mit Hilfe des Ca : Cytochrom-c-Oxydase-Verhältnisses der Mitochondrienfraktion (12.8 µmol Ca / IU Cytochrom-c-Oxydase) berechnet werden, daß $12.8 \times 0.01 \times 0.182 = 0.0233$ µmol Ca der gesamten $0.617 \times 0.182 = 0.1123$ µmol Ca je g Ausgangsgewebe auf verunreinigende Mitochondrien zurückzuführen waren. Entsprechend ergibt sich durch Vergleich der spezifischen Cytochrom-c-Oxydase-Aktivitäten (0.067 IU / mg Protein in der Mitochondrienfraktion und 0.010 IU / mg Protein in der Membranfraktion), daß $(0.010 / 0.067) \times 0.182 = 0.027$ der gesamten 0.182 mg Protein je g Ausgangsgewebe den enthaltenen Mitochondrien zuzuschreiben sind. Der mittlere Calciumgehalt der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion beträgt also nach Abzug der Mitochondrienverunreinigung $(112.3 - 23.3) / (0.182 - 0.027) = 574$ nmol Ca / mg Protein.

3.1.3.7. Der Metallionengehalt der synaptischen Vesikel

Wegen der zentralen Bedeutung der synaptischen Vesikel für die cholinerge Erregungsübertragung wurde nicht nur ihr Calciumgehalt, sondern auch der Gehalt an Magnesium, Kalium und Natrium gemessen. Die Metallionenbestimmung in der Fraktion der synaptischen Vesikel ist besonders schwierig, da die Ionenkonzentrationen extrem niedrig sind. Die Bestimmungen mußten am Rande der Nachweisgrenze durchgeführt werden, so daß durch das ungünstige Signal : Rausch-Verhältnis hohe Streuungen der Meßwerte unvermeidlich waren. Fehlerquellen wie das Einschleppen von Spuren an Metallionen durch zugesetzte Chemikalien, das Herauslösen von Metallionen aus dem Material der zur Isolierung verwendeten Gefäße und die Adsorption von Ionen an aktiven

Oberflächen gewinnen unter diesen Bedingungen besondere Bedeutung. Einer Konzentrierung synaptischer Vesikel durch Zentrifugationsmethoden sind andererseits durch die Labilität isolierter Zellorganellen während langwieriger Präparationsverfahren Schranken gesetzt. Auch die Möglichkeit, isolierte Vesikel auf Milliporefiltern^R zu konzentrieren, ist begrenzt, da die Filter schnell verstopfen.

Mit Hilfe von Zonalrotoren können auf kontinuierlichen Dichtegradienten hochreine synaptische Vesikel isoliert werden (Whittaker et al., 1972). Es zeigte sich jedoch, daß in den so gewonnenen Fraktionen die Nachweisgrenzen der Atomabsorptionsspektralphotometrie unterschritten wurden, wenn die Gradienten mit einer vorgereinigten Vesikelfraktion, P₃, beladen wurden. Ein Beladen der Gradienten mit dem ersten Überstand der Differentialzentrifugationen scheidet andererseits aus, da dann der Überschuß an frei gelösten (z.B. cytoplasmatischen) Metallionen den Vesikelgipfel vollständig überlagern würde. Deshalb wurden in der vorliegenden Untersuchung diskontinuierliche Saccharose-Glycin Dichtegradienten in Ausschwingrotoren verwendet. Auf die Gradienten wurde eine vorgereinigte und gewaschene Vesikelfraktion, P₃⁺, aufgetragen (vgl. Kap. 2.5.2.). Durch den Waschvorgang konnte die Verunreinigung mit frei gelösten Ionen stark reduziert werden.

Die Verteilung der Leitsubstanzen auf die Fraktionen eines solchen Gradienten ist in der Abbildung 16 in der Darstellungsweise nach de Duve wiedergegeben. ACh und ATP dienten als Leitsubstanzen für die synaptischen Vesikel. Sie waren an der Grenzschicht zwischen 0.15 und 0.4-molarer Saccharose angereichert. Die Leitenzyme Cytochrom-c-Oxydase und Fumarase verdeutlichen, daß die Mitochondrien in dichteren Fraktionen des Gradienten wiedergewonnen wurden. Die Vesikelfraktion (Fraktionsnummer 3) war auch frei von

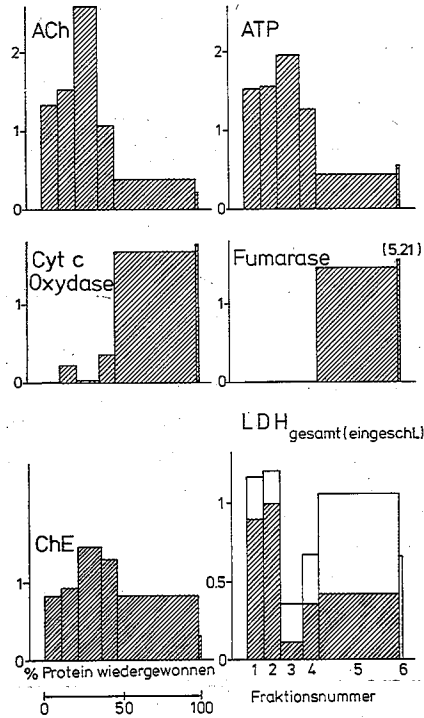


Abb. 16: Verteilung der Leitsubstanzen auf die Fraktionen eines Saccharose-Glycin Dichtegradienten für die Isolierung synaptischer Vesikel. Acetylcholin und ATP dienen als Leitsubstanzen für die cholinergen synaptischen Vesikel. Die Cytochrom-c-Oxydase- und Fumaraseaktivitäten verdeutlichen die Position der Mitochondrien auf dem Gradienten. Die Cholinesterasen markieren verschiedene Membranbruchstücke und die Lactat-Dehydrogenase-Aktivität zeigt die Verteilung cytoplasmatischer Bestandteile an. Die in membranumgebenen Partikeln eingeschlossene LDH-Aktivität ist als Anteil der gesamten LDH-Aktivität eingetragen.

eingeschlossenem oder freiem Cytoplasma, wie man anhand der Lactat-Dehydrogenase-Aktivitäten erkennt. Jedoch wies sie noch eine deutliche Cholinesteraseaktivität auf, die

frei vorliegendes ACh gespalten hätte. Im Mittel enthielt die Vesikelfraktion $1.35 \pm 0.10 \mu\text{mol ACh} / \text{mg Protein}$ (S.E.M., $n = 4$). Das entspricht der Reinheit jener Vesikel, wie sie nach einfacher Zonalzentrifugation gewonnen werden ($0.29 - 2.31 \mu\text{mol ACh} / \text{mg Protein}$; vgl. Tabelle 2 in Ohsawa et al., 1978). Das mittlere ACh : ATP-Verhältnis in der Vesikelfraktion betrug 4.76 ± 0.43 (S.E.M., $n = 10$).

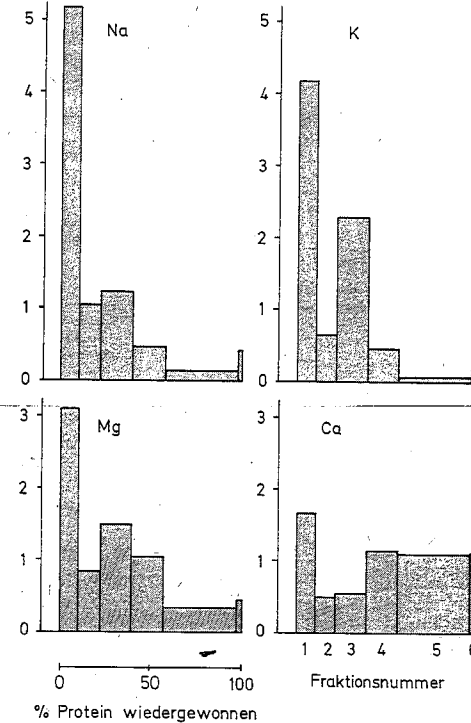


Abb. 17: Verteilung der Alkali- und Erdalkalimetalle auf die Fraktionen eines Dichtegradienten für die Isolierung synaptischer Vesikel (vgl. Abb. 5 und 16). Während für Kalium und Magnesium eine gute Abtrennung von den frei gelöst vorliegenden Ionen erreicht wird, zeigen sich die Natriumionen der Vesikel nur als Schulter am Gipfel der löslichen Bestandteile. Calciumionen treten vor allem in der mitochondrienhaltigen Fraktion, sowie frei gelöst auf.

In Abbildung 17 ist die relative spezifische Konzentrierung der Metallionen veranschaulicht (Darstellung nach de Duve). Man erkennt, daß für Kalium und Magnesium eine zufriedenstellende Abtrennung der Vesikelfraktion von der Fraktion der frei gelösten Bestandteile (Fraktionsnummer 1) erreicht wurde. Der Natriumgehalt der synaptischen Vesikel zeigte sich hingegen nur als Schulter am Gipfel der löslichen Bestandteile, der die Vesikelfraktion überlagerte. Dieses Ergebnis ist angesichts des ausgeprägten Natriumüberschusses im gesamten elektrischen Gewebe verständlich (vgl. Tabelle 2). Der Calciumgehalt der wenigen in den dichtesten Fraktionen des Gradienten wiedergewonnenen Mitochondrien war im Vergleich zum Calciumgehalt der synaptischen Vesikel sehr groß (vgl. auch Kap. 3.1.3.4.). Da sich weder in der Vesikelfraktion noch in der Fraktion löslicher Bestandteile mitochondriale Leitenzyme nachweisen ließen, kann der Calciumgehalt in diesen Fraktionen nicht auf eine Verunreinigung mit Mitochondrien zurückgeführt werden. Es erscheint jedoch als möglich, daß während dem Suspendieren der vorge-reinigten und gewaschenen Vesikelfraktion P_3^+ und während dem Zentrifugieren ein Teil des Calciums aus den Mitochondrien herausgelöst wurde. Diese Calciumionen würden dann nach der Zentrifugation in den Fraktionen 1 und 4 frei gelöst vorgelegen haben, und sie hätten die Calciummeßwerte der Vesikelfraktion verfälscht. Im Kap. 3.3.1. wird erläutert werden, daß es jedoch möglich war, den Calciumgehalt der Mitochondrien um ca. 80% zu erniedrigen, wenn eine 0.4-molare Kochsalzlösung als Präparationsmedium benutzt wurde. Bei der Isolierung von synaptischen Vesikeln in NaCl-Lösungen brauchte daher nicht befürchtet zu werden, daß signifikante Mengen an Calciumionen während der Dichtegradientenzentrifugation aus den Mitochondrien freigesetzt werden würden.

Die Absolutwerte der Metallionengehalte (in nmol/g Ausgangsgewebe) und des Proteins (in µg/g Gewebe) in den Fraktionen der Dichtegradienten sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Ionenkonzentrationen in den Fraktionen aus Dichtegradienten zur Isolierung synaptischer Vesikel

Fraktionsnummer	Protein		Na		K		Mg		Ca	
	µg	g Gewebe	nmol	g Gewebe	nmol	g Gewebe	nmol	g Gewebe	nmol	g Gewebe
1a	13.2±	0.3	81.8±	13.2	8.31±	1.76	3.50±	0.58	57.9±	16.6
1b	21.9±	1.6	42.5±	10.4	4.42±	1.10	3.62±	1.19	37.3±	8.1
2	41.0±	9.1	29.2±	5.3	2.33±	0.97	2.22±	0.41	33.3±	5.9
3	59.3±	3.4	49.5±	8.5	11.84±	7.29	5.76±	1.56	53.1±	7.0
4a	21.8±	2.8	7.4±	2.4	1.33±	0.43	1.85±	0.78	34.9±	6.7
4b	24.6±	3.3	5.7±	2.0	0.69±	0.36	1.28±	0.66	47.8±	4.2
4c	17.4±	2.6	6.8±	2.6	0.59±	0.31	1.23±	0.58	38.7±	9.8
5	139.8±	16.2	12.7±	2.3	0.69±	0.46	3.08±	1.11	248.6±	27.0
6	9.7±	3.3	2.8±	1.8	0.15±	0.10	0.29±	0.21	17.7±	1.9
3 NaCl	n.b.		n.b.		13.71±	3.67	3.98±	0.75	16.4±	3.2

Die Dichtegradienten aus Mischungen von Saccharose und Glycinlösungen (Kap. 2.5.2.) wurden mit einer gewaschenen vorgereinigten Vesikelfraktion, P_3^+ , beladen und 125 min bei 57-750 g (in der Mitte des Zentrifugenröhrchens) zentrifugiert. Auf jeden Gradienten wurde ein Volumenäquivalent von ca. 30 g Ausgangsgewebe aufgetragen. Die Werte der Tabelle sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen mit ihren Standardabweichungen. Für die Darstellung der Ionenverteilung nach de Duve (Abb. 17) wurden die Fraktionen 1a und 1b bzw. 4a bis 4c aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit zusammengefaßt. (Dadurch wird der Vergleich mit Abb. 16 erleichtert, in der Dichtegradienten wiedergegeben sind, die analog hergestellt, aber etwas anders fraktioniert wurden.) In der letzten Zeile der Tabelle ist angegeben, welche Ionenkonzentrationen in der Vesikelfraktion gemessen wurden, wenn eine 0.4 M NaCl-Lösung (statt der 0.8 M Glycinlösung) zur Präparation verwendet wurde. n.b.: nicht bestimmt.

3.1.3.8. Zur Stöchiometrie der synaptischen Vesikel

Der Ionengehalt der synaptischen Vesikel kann am besten durch Vergleich mit dem Transmittergehalt verdeutlicht werden. Pro Molekül ACh waren in der Fraktion folgende Mengen an Metallionen vorhanden (Mittelwerte ± S.E.M., n = 4):

ACh	Na	K	Mg	Ca	Ca (NaCl)	ATP
1	0.47	0.10	0.07	0.60	0.28	0.22
± 0	± 0.05	± 0.05	± 0.02	± 0.07	± 0.05	± 0.02

Es wurde bereits im vorangehenden Abschnitt erläutert, daß der Calciumgehalt der synaptischen Vesikel besser abgeschätzt werden kann, wenn die subzellulären Organellen in NaCl-Lösungen präpariert werden. Für Natriumionen konnte keine vollständige Abtrennung von den in großem Überschuß frei gelöst vorliegenden Ionen erreicht werden. Deshalb wurde die Menge an eingeschleppten Natriumionen approximiert, indem der Mittelwert der Natriumkonzentrationen in den beiden Nachbarfraktionen (2 und 4a in Tabelle 5) berechnet und von der Natriumkonzentration in der Vesikelfraktion subtrahiert wurde: Das Na^+ : ACh-Verhältnis der Vesikel erniedrigt sich dadurch auf 0.30. Dementsprechend lagen insgesamt mit den Vesikeln je Mol ACh (einschließlich des Acetylcholins) $(1 + 0.30 + 0.10 + 0.07 + 0.28 + 0.22) = 1.97$ Mol osmotisch aktiver Substanzen vor. Da für das Vesikelinnere eine ACh-Konzentration von etwa 0.55 M angenommen werden kann (vgl. Breer et al., 1978; Ohsawa et al., 1978), würde sich hieraus eine Osmolarität von 1.08 Osmol ergeben. Dieser Wert ist durchaus mit Abschätzungen für die Osmolarität der Körperflüssigkeiten von Haien und Rochen vergleichbar (0.8 bis 1.1 Osmol: Burger, 1967; Gilbert et al., 1967; Hoar und Randall, 1969). Die gemessenen Metallionen können also im Inneren der Vesikel vorliegen, zumal die einzelnen Molekeln wahrscheinlich zum Teil untereinander chemische Verbindungen bilden (z.B. MgATP^{2-}), wodurch sich der osmotische Druck erniedrigt.

Andererseits wurde berichtet, daß die Membran synaptischer Vesikel an ihrer äußeren Oberfläche negative Ladungen trägt (Bittiger und Heid, 1977; Rattengehirn; vgl. aber auch Carpenter und Parsons, 1978; Torpedo californica). Es erscheint daher denkbar, daß ein Teil der Metallionen

an die Oberfläche der Vesikel gebunden war und so in die Vesikelfraktion hineingetragen wurde. Eine experimentelle Entscheidung zwischen diesen Alternativen fällt schwer. - In zwei Experimenten wurde dem ersten Überstand der Differentialzentrifugationen 1 ml einer 0.4-molaren LiCl-Lösung zugesetzt. Lithium kommt im elektrischen Gewebe natürlicherweise nicht vor (Schmidt, 1975). $0.96^{\circ}/_{\infty}$ des Lithiums wurden in der Vesikelfraktion wiedergefunden. Von den anderen Alkalimetallen wurden vergleichbare Anteile aus dem ersten Überstand in der Vesikelfraktion gemessen (Na: $0.60^{\circ}/_{\infty}$, K: $0.86^{\circ}/_{\infty}$). Im Gegensatz dazu stehen die Meßwerte für die Erdalkalimetalle (Mg: $2.73^{\circ}/_{\infty}$; Ca: $30.61^{\circ}/_{\infty}$). Hieraus könnte geschlossen werden, daß die Erdalkalimetalle spezifisch im Innern der synaptischen Vesikel gebunden vorliegen, während die Alkalimetalle nur unspezifisch an der Oberfläche der Zellorganellen haften. Es muß aber auch erwogen werden, daß die Lithiumionen in das innere Lumen der Vesikel aufgenommen worden sein könnten. Auf die Möglichkeit des Ionenaustauschs zwischen den synaptischen Vesikeln und dem umgebenden Medium wird in einem späteren Kapitel eingegangen (Kap. 3.3.2.).

Die Filtration durch säuregewaschene Millipore^R-Filter (Kap. 2.8.1.) bietet einen anderen methodischen Ansatz, um zwischen stabil gebundenen und ablösbaren Metallkationen in der Fraktion der synaptischen Vesikel zu unterscheiden. In der Tabelle 6 ist wiedergegeben, welche Absolutmengen an Metallionen bei der Filtration von Vesikeln zurückgehalten wurden. Sie sind den von ungefilterten Vesikeln gewonnenen Werten gegenübergestellt. Man erkennt, daß ein wesentlich größerer Prozentsatz der Erdalkalimetalle im Vergleich zu den Alkalimetallen zurückgehalten wurde. Die Aussagefähigkeit dieses Ergebnisses wird allerdings durch die großen Streuungen der Meßwerte eingeschränkt. Die hohen Varianzen der Meßwerte sind einerseits durch die extrem niedrigen Konzentrationen der Ionen und andererseits

Tabelle 6: Millipore^R-Filtration der Vesikelfraktion

		Na	K	Mg	Ca
1	A) Ionengehalt auf dem Filter [nmol/g Gewebe]	10.4±4.9	2.54±1.03	5.52±3.06	10.8±6.8
2	B) Ionengehalt der Vesikel [nmol/g Gewebe]	31.2 a)	11.84	5.76	16.4 b)
3	A als Prozent von B	33.4±15.7	21.5±8.7	95.8±53.1	66.0±41.6
4	A als Prozent von B nach osmotischem Schocken mit H ₂ O	28.7±8.3	6.1±2.2	97.3±17.3	17.0±4.3
5	Ionenpotential [pC/m]	16.35	12.05	41.08	30.23
6	Ionenradius [nm]	9.8	13.3	7.8	10.6

Die Werte in Zeile 1, 2 und 4 sind die Mittelwerte aus n Messungen mit ihren Standardabweichungen. In Zeile 1 (A) ist die auf den Filtern zurückgehaltene Ionenmenge bei Filtration der Vesikelfraktion wiedergegeben (n = 6). Zeile 2 (B) gibt den Ionengehalt der synaptischen Vesikel, wie er auch für die Berechnung der stöchiometrischen Verhältnisse zugrundegelegt wurde (vgl. S. 78). In Zeile 3 ist der Prozentsatz der vesikulären Ionen angegeben, der von den Filtern zurückgehalten wurde. Die Zeile 4 gibt an, welcher Prozentsatz der Ionen zurückgehalten wurde, wenn die synaptischen Vesikel zuvor durch Suspension in Wasser zum Zerplatzen gebracht worden waren (n = 7). Zeile 5 gibt die Ionenpotentiale der Metalle wieder. Die Ionenpotentiale wurden mit Hilfe der von Goldschmidt empirisch ermittelten Ionenradien (bei einer Koordinationszahl KZ = 6) errechnet (vgl. Hiller, 1952), die in Zeile 6 der Tabelle wiedergegeben sind.

- a) Der Anteil an eingeschleppten frei gelösten Natriumionen wurde wie im Text beschrieben korrigiert.
b) Für die Calciumionen wurde der Ionengehalt der in NaCl-Lösungen isolierten Vesikelfraktion zugrundegelegt, um eine Verunreinigung durch mitochondriales Calcium weitgehend auszuschließen.

durch die Schwierigkeit bedingt, die Filter reproduzierbar vorzubereiten, die mit erheblichen Produktions-bedingten Schwankungen behaftet waren (vgl. Kap. 2.8.1.). Eine weitere Schwierigkeit ergab sich für die Wahl geeigneter

Blindwerte. Es wurde angenommen, daß die zuverlässigsten Blindwerte durch Filter geliefert würden, durch die eine Probelösung gleicher ionaler Zusammensetzung wie die der Vesikelfraktion, aber ohne biologisches Material (also auch ohne Protein und Lipid), filtriert worden war. Alle Filter wurden vor dem Trocknen zweimal mit je 5 ml 0.8 M Glycinlösung gewaschen.

Trotz der erwähnten Problematik für die Zuverlässigkeit dieser Meßwerte, wurde in Abbildung 18 der Prozentsatz der abfiltrierten Ionen gegen das jeweilige Ionenpotential (d.i. der Quotient aus elektrischer Ladung und Ionenradius) aufgetragen. Die Werte legen eine lineare Abhängigkeit der Bindungsstärke der Metalle vom Ionenpotential nahe.

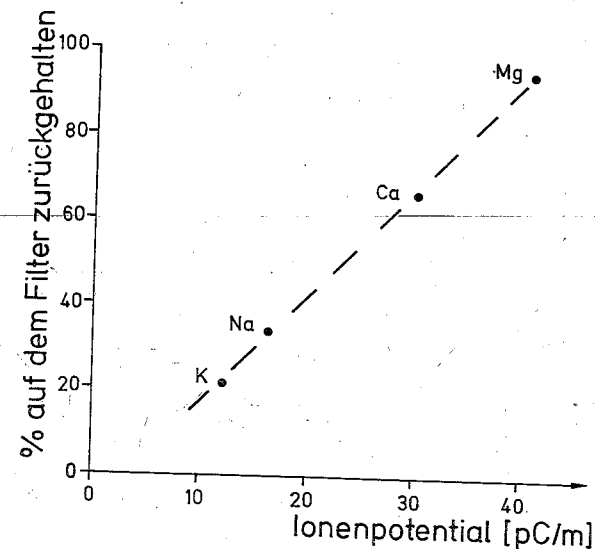


Abb. 18: Beziehung zwischen dem Metallionengehalt der gefilterten Vesikelfraktion und dem Ionenpotential. Wenn die Vesikelfraktion durch vorbehandelte Millipore-Filter filtriert wird, bleibt nur ein Teil der Metallionen auf den Filtern zurück. Der Prozentsatz der vesikulären Metallionen, der von den Filtern zurückgehalten wurde, ist gegen das Ionenpotential aufgetragen (d.i. die elektrische Ladung der Ionen geteilt durch den Ionenradius, vgl. Tab. 6). Mittelwerte aus 7 Meßreihen.

Eine Abhängigkeit der Metallbindung vom Ionenpotential wird später noch in einem weiteren Zusammenhang besprochen werden (Kap. 3.2.5.).

In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurden die synaptischen Vesikel zum Zerplatzen gebracht, indem die Vesikelfraktion mit dem zehnfachen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt wurde. Nach 1 h Inkubation (bei 4°C) wurden die Lösungen filtriert. Die auf den Filtern zurückgehaltenen Ionenmengen sind in Zeile 4 der Tabelle 6 angegeben. Man erkennt, daß die Behandlung mit H₂O ohne Einfluß auf das Magnesium war. Es blieb nach wie vor fest an die Strukturen gebunden, die von den Filtern zurückgehalten wurden. Die anderen Ionen wurden nach dem "Wasserschok" in stärkerem Maße freigesetzt (vgl. Zeile 3, 4 in Tab. 6), besonders das Kalium, das ein sehr niedriges Ionenpotential besitzt. Calciumionen wurden als Folge der Wasserbehandlung in stärkerem Maße abgelöst, als es aufgrund ihres Ionenpotentials erwartet werden konnte. Hierin kann man einen Hinweis dafür sehen, daß Calciumionen im Innern der Vesikel vorliegen.

3.2. Stimulationsbedingte Veränderungen im Calciumgehalt der subzellulären Organellen

Der Calciumgehalt der verschiedenen Gewebefractionen wurde bestimmt, nachdem eines der paarigen elektrischen Organe des Versuchstieres über die Lobi electrici gereizt worden war. Das andere Organ diente als Kontrolle. Sofern nichts anderes mitgeteilt wird, wurde mit 5000 Impulsen bei 5 Hz gereizt (vgl. Kap. 2.3.).

3.2.1. Veränderungen im Calciumgehalt der Präparationsvorstufen

Der Calciumgehalt des gesamten elektrischen Gewebes blieb von der Reizung unbeeinflusst (Tabelle 7). Dieses Ergebnis

Tabelle 7: Veränderungen im Calciumgehalt der Präparationsvorstufen nach elektrischer Reizung des Gewebes

Fraktion	Zentrifugationsbedingungen	Calciumgehalt in unstimuliertes Gewebe	Calciumgehalt in $\mu\text{mol/g}$ Naßgewicht stimuliertes Gewebe	Differenz		Signifikanz
				absolut	relativ	
Gewebe						
P ₁	1000 g; 10 min	2.65 ± 0.19 (15)	2.47 ± 0.15 (15)	- 0.18	- 6.79%	n.s.
S ₁		0.79 ± 0.13 (14)	0.79 ± 0.06 (10)	± 0.00	± 0.00%	n.s.
P ₂	17000 g; 60 min	1.80 ± 0.14 (11)	1.72 ± 0.14 (11)	- 0.08	- 4.44%	n.s.
S ₂		1.08 ± 0.07 (24)	0.24 ± 0.01 (16)	- 0.84	-77.78%	p << 10 ⁻⁴
P ₃	235000 g; 70 min	0.65 ± 0.08 (18)	1.23 ± 0.09 (16)	+ 0.58	+89.23%	p << 10 ⁻⁴
S ₃		0.17 ± 0.01 (3)	0.08 ± 0.01 (3)	- 0.09	-52.94%	p < 0.05
		0.70 ± 0.19 (3)	1.27 ± 0.08 (3)	+ 0.57	+81.43%	p < 0.05
Ausbeute: P ₁ +P ₂ +P ₃ +S ₃ als % des Calciumgehaltes im Gewebe		103.40 %	96.36 %			

Angegeben sind die Mittelwerte aus n (in Klammern) Versuchen mit ihren Standardabweichungen. Die Signifikanz der Veränderung wurde mit dem t-test überprüft.

steht im Gegensatz zu Befunden von Babel-Guérin (1974), die über eine Zunahme des Calciumgehaltes im elektrischen Organ nach repetitiver Reizung berichtet hat. Auch die Calciummengen in der Bodensatzfraktion P₁ und dem Überstand S₁ änderten sich nicht. Die vorgereinigte Mitochondrienfraktion P₂ besaß den höchsten Ca-Gehalt aller durch Differentialzentrifugation erhaltenen Präparationsvorstufen (P₁, P₂, P₃ und S₃). Der stimulationsbedingte Ca-Verlust war in dieser Fraktion sowohl absolut als auch relativ größer als in jeder anderen dichteren oder weniger dichten Präparationsvorstufe (Tabelle 7).

Das von den Partikeln der vorgereinigten Mitochondrienfraktion bei Reizung freigesetzte Ca wurde in dem entsprechenden Überstand S₂ (und bei weiterer Auftrennung im cytoplasmareichen Überstand S₃) wiedergefunden (Tab. 7).

Es wäre denkbar, daß die elektrische Reizung des Organs lediglich zu einer Umverteilung der Ca-haltigen Partikel aus der Fraktion P₂ in den Überstand führt, so wie es im Kap. 3.1.3.3. für die Umverteilung der Mitochondrien aus dem Bodensatz P₁ in die Fraktion P₂ bei Verwendung von gefrorenem Gewebe beschrieben wurde. Es wurde deshalb überprüft, ob mit dem Abfall im Calciumgehalt irgendeine weitere biochemische Veränderung in der Fraktion P₂ festzustellen war. Aus der Tabelle 8 ist zu ersehen, daß sich durch die Stimulation weder die Ausbeute an Protein noch an irgendeinem Leitenzym änderte. Lediglich der Transmittergehalt der in der Fraktion enthaltenen Nervenendigungen war erwartungsgemäß vermindert.

Die Tabelle 8 verdeutlicht außerdem, daß sich die Konzentrationen der anderen Erdalkali- und Alkalimetalle in der Fraktion P₂ durch die elektrische Reizung nicht änderten.

Der Calciumgehalt des Bodensatzes P₂ ist mit der Cytochrom-

Tabelle 8: Veränderungen in der vorgereinigten Mitochondrienfraktion (P₂) bei elektrischer Reizung des Gewebes

Komponente	unstimuliertes Gewebe	stimuliertes Gewebe	Differenz	Signifikanz
Ca $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}} \right]$	1.08 ± 0.07 (24)	0.24 ± 0.01 (16)	-77.8 %	p<0.0001
Protein $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g Gewebe}} \right]$	2263 ± 107 (73)	2291 ± 179 (28)	+ 1.2 %	n.s.
Cyt. c Oxyd. $\left[\frac{\text{nmol/min}}{\text{g Gewebe}} \right]$	96 ± 5 (61)	92 ± 7 (35)	- 4.5 %	n.s.
LDH(gesamt) $\left[\frac{\mu\text{mol/min}}{\text{g Gewebe}} \right]$	0.87 ± 0.09 (7)	0.94 ± 0.14 (3)	+ 7.6 %	n.s.
LDH(frei) $\left[\frac{\mu\text{mol/min}}{\text{g Gewebe}} \right]$	0.42 ± 0.07 (7)	0.44 ± 0.18 (3)	+ 4.0 %	n.s.
ChE $\left[\frac{\mu\text{mol/min}}{\text{g Gewebe}} \right]$	106 ± 17 (14)	105 ± 26 (6)	- 0.9 %	n.s.
ACh $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{g Gewebe}} \right]$	247 ± 46 (13)	114 ± 30 (10)	-53.9 %	p<0.01
Mg $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}} \right]$	0.20 ± 0.01 (11)	0.19 ± 0.01 (9)	- 3.0 %	n.s.
Na $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}} \right]$	7.88 ± 0.75 (5)	7.52 ± 0.85 (4)	- 0.9 %	n.s.
K $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Gewebe}} \right]$	0.77 ± 0.06 (5)	0.80 ± 0.07 (4)	+ 3.7 %	n.s.

Angegeben sind die Mittelwerte aus n (in Klammern) Versuchen mit ihren Standardabweichungen. Die Signifikanz der Veränderung wurde mit Student's t-Test überprüft. Nur der Calcium- und Acetylcholingehalt der Fraktion nehmen bei repetitiver Reizung ab.

c-Oxydase-Aktivität in dieser Fraktion korreliert. Eine derartige Korrelation wurde sowohl für unstimuliertes Kontrollgewebe als auch für stimulierte Proben nachge-

wiesen (Abb. 19). Die beiden Korrelationen sind hochsignifikant verschieden ($p < 0.0001$).

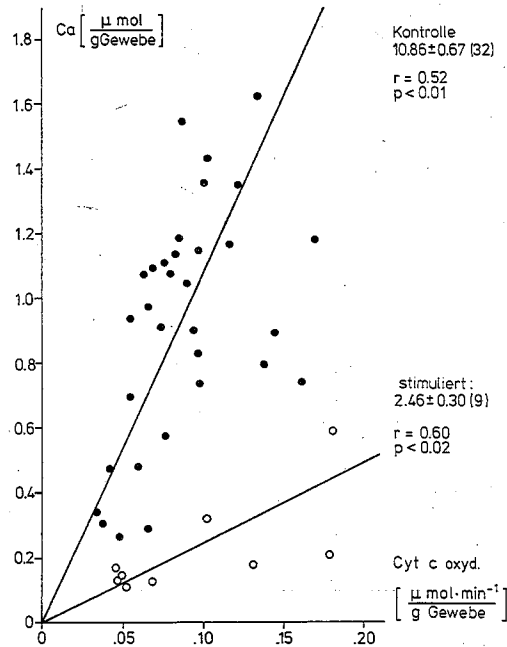


Abb. 19: Korrelation zwischen dem Calciumgehalt und der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität in der vorgereinigten Mitochondrienfraktion, P₂. Der einem g Gewebe entsprechende Calciumgehalt der Fraktion ist gegen ihre Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität (in μmol Cytochrom c, die pro g Ausgangsgewebe und min oxydiert wurden) aufgetragen. Dunkle Punkte beziehen sich auf Kontrollgewebe, helle Punkte auf vorgereinigte Mitochondrienfraktionen, die aus stimuliertem Gewebe isoliert wurden. Die Korrelationskoeffizienten (r) und die Verhältnisse der Calciumkonzentrationen zu den Cytochrom-c-Oxydase-Aktivitäten (in μmol Ca/μmol Cytochrom c, die pro min oxydiert wurden) sind in die Abbildung eingezeichnet. Die beiden Korrelationen sind hochsignifikant verschieden ($p < 0.0001$, t-Test).

Aus den in diesem Abschnitt zusammengefaßten Daten muß geschlossen werden, daß Calcium bei Reizung des Gewebes aus einer Zellorganelle freigesetzt wurde, die in der vorgereinigten Mitochondrienfraktion sedimentiert. Die Alternativ-Hypothese, daß die elektrische Reizung eine Umverteilung der Ca-reichen Zellorganellen aus der Fraktion P₂ in den Zentrifugationsüberstand verursacht, steht mit den erhobenen Daten nicht in Einklang, da weder die Ausbeute an Mitochondrien noch die Ausbeute an Nervenendigungen vermindert war.

3.2.2. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien

3.2.2.1. Calciumfreisetzung bei repetitiver Reizung mit 5000 Impulsen

Der Bodensatz P₂ kann auf Dichtegradienten in eine Fraktion von Nervenendigungen und eine Mitochondrienfraktion aufgetrennt werden (Kap. 3.1.3.4.). Bei Reizung mit 5000 Impulsen (5 Hz) sank der Calciumgehalt der Mitochondrienfraktion um 76.7% auf eine Konzentration von 194 ± 26 nmol Ca / mg Protein (S.E.M., n = 7). Dieser Abfall im Ca-Gehalt ist hochsignifikant ($p < 0.001$, t-Test). Die Aktivität des mitochondrialen Leitenzyms Cytochrom-c-Oxydase änderte sich nicht infolge Stimulierung. Der Ca-Gehalt je Enzymeinheit erniedrigte sich folglich in demselben Ausmaß (-82.8%) wie die auf Protein bezogene Ca-Menge in der Fraktion (Tabelle 9, S. 98; auch der Proteingehalt der Fraktion blieb der gleiche). Die Verminderung im Ca-Gehalt der Mitochondrienfraktion kann also nicht auf eine Umverteilung der Mitochondrien zurückgeführt werden. Die Daten zeigen, daß Ca aus den Mitochondrien freigesetzt wurde.

3.2.2.2. Beziehung zwischen Nervenaktivität und mitochondrialer Calciumfreisetzung

In einer Versuchsserie wurden die elektrischen Organe mit

unterschiedlich vielen Impulsen (650 - 5000) oder mit reduzierter Reizamplitude stimuliert. Bei Stimulierung mit reduzierter Reizamplitude wurde der Stimulus so eingestellt, daß die Antwort des elektrischen Organs auf alle Impulse (E_i) nur 4% der maximal möglichen elektrischen Antwort (E_o) betrug ($\frac{E_i}{E_o} = 0.04$). Durch diese Versuchsserie sollte überprüft werden, ob ein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Ca-Freisetzung aus den Mitochondrien und der Nervenaktivität besteht.

In Abbildung 20 ist der auf Protein bezogene prozentuale Abfall im Ca-Gehalt der Mitochondrienfraktion (Ordinate) gegen die relative Abnahme der elektrischen Antwort (obere Abszisse) aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde der durchschnittliche zeitliche Verlauf des Abfalls der elektrischen Antwort in allen Experimenten ermittelt, in denen die Reizung bis zur völligen Erschöpfung der Organantwort fortgesetzt worden war. Die relative Abnahme wurde dann als das Verhältnis der aufsummierten elektrischen Antwort nach einer gegebenen Anzahl von Reizen (n) zu der gesamten möglichen elektrischen Antwort ermittelt, die bei Extrapolation zu völliger Erschöpfung der Organantwort erhalten worden wäre

$$\left(\frac{\sum_{i=1}^n n_i \frac{E_i}{E_o}}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i \frac{E_i}{E_o}} \text{ in Abb. 20} \right).$$

Zwischen der Ca-Freisetzung aus den Mitochondrien und der relativen Abnahme der elektrischen Antwort besteht eine lineare Abhängigkeit. Der Korrelationskoeffizient ist sehr hoch ($r = 0.99$).

In dieselbe Abbildung (20) ist auch der Prozentsatz der ACh-Freisetzung aus der Fraktion der Nervenendigungen eingetragen (untere Abszisse). Auch hier besteht ein linearer Zusammenhang mit der Ca-Freisetzung aus den Mitochondrien. Der Korrelationskoeffizient ist ebenfalls sehr hoch ($r = 0.97$). Die proportionale Veränderung der beiden biochemischen Parameter in verschiedenen, voneinander separierten Zellorganellen läßt es als wahrscheinlich

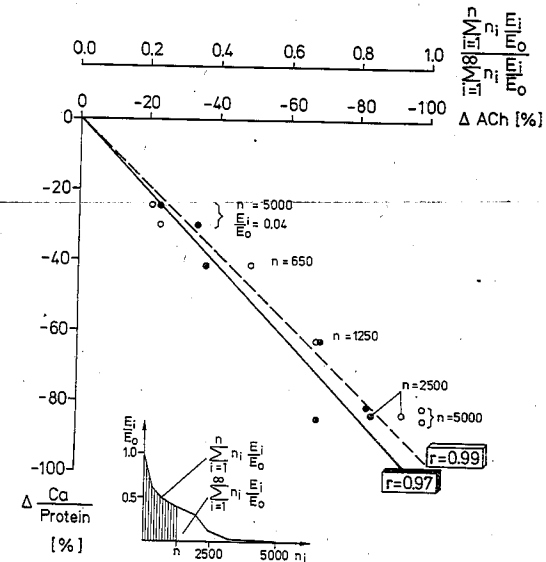


Abb. 20: Korrelationen des Calciumabfalls in der Mitochondrienfraktion mit der relativen Abnahme der Organantwort und der Transmitterfreisetzung. Die hellen Symbole (gestrichelte Korrelationsgerade, untere Abszisse) beziehen sich auf den Acetylcholinabfall in der Fraktion der isolierten Nervenendigungen. Die dunklen Symbole (durchgezogene Korrelationsgerade und obere Abszisse) auf die relative Abnahme der Organantwort. Das Gewebe wurde mit einer unterschiedlichen Zahl von Impulsen (n) oder mit einer reduzierten Reizamplitude stimuliert, so daß die elektrische Antwort 4% der maximal möglichen Antwort betrug ($\frac{E_i}{E_o} = 0.04$). Aus diesen Werten wurde die relative Abnahme der Organantwort gemäß der eingesetzten Schemazeichnung berechnet: Die durchschnittliche Form der Kurven für den Abfall der Organantwort wurde in individuellen Experimenten benutzt, um den Anteil der aufsummierten elektrischen Antwort nach n Impulsen von der gesamten möglichen elektrischen Antwort zu berechnen, die erhalten worden wäre, wenn die Reizung bis zur völligen Erschöpfung der Organantwort fortgesetzt worden wäre. E_o , maximal mögliche Organantwort; E_i , Organantwort auf den i -ten Impuls; n , Zahl der applizierten Reize; r , Korrelationskoeffizient.

erscheinen, daß die Calciumfreisetzung und die Transmitterfreisetzung in einem direkten funktionalen Zusammenhang stehen.

3.2.2.3. Die Beteiligung postsynaptischer Mitochondrien

Um zu untersuchen, ob das Ca aus den Mitochondrien der Nervenendigung, den Mitochondrien der Elektroplaquezellen oder aus beiden Mitochondrienpopulationen freigesetzt wird, wurde die postsynaptische Antwort mit d-Tubocurarin blockiert, ehe mit der repetitiven Reizung begonnen wurde. In den Experimenten, in denen Curare in vivo appliziert wurde, diente ein nicht stimuliertes Organ desselben Versuchstieres als Kontrolle. Bei den in vitro Experimenten wurden für die Kontrollwerte Geweblöcke perfundiert, aber nicht repetitiv gereizt.

In der Abbildung 21 sind die Ergebnisse, die bei Perfusion mit Curare erhalten wurden, jenen Werten gegenübergestellt, die in Abwesenheit von Curare gemessen wurden. Durch d-Tubocurarin wurde die Ca-Freisetzung aus den Mitochondrien von -76.6% auf -39.9% (in situ) beziehungsweise von -69.0% auf -23.8% (in vitro) erniedrigt. Die ACh-Freisetzung aus der Fraktion der Nervenendigungen wurde hingegen durch Curare nicht beeinträchtigt (-63%, Tabelle 9, S. 98).

Die Verringerung der Ca-Freisetzung durch Curare zeigt, daß postsynaptische Mitochondrien an ihr beteiligt sind. Andererseits konnte die Ca-Freisetzung aus der Mitochondrienfraktion durch Curare nicht vollständig aufgehoben werden.

3.2.2.4. Die Beteiligung präsynaptischer Mitochondrien

Die elektrische Antwort des Organs war unter Einwirkung von d-Tubocurarin zu 93.1% (in situ) beziehungsweise zu 95.2% (in vitro) unterdrückt. Unter diesen Bedingungen

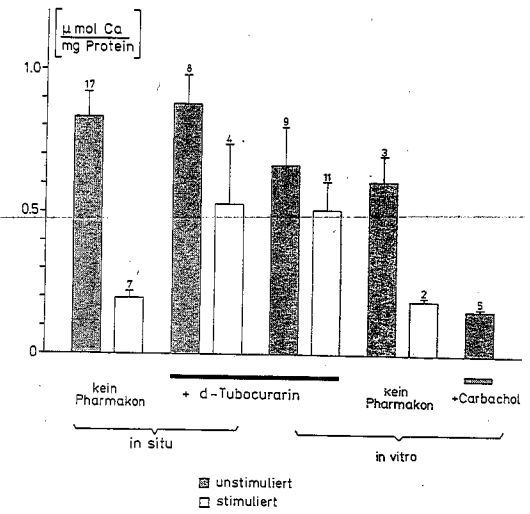


Abb. 21: Veränderungen im Calciumgehalt der Mitochondrienfraktion bei elektrischer Reizung mit 5000 Impulsen (5 Hz) und Beeinflussung der Calciumfreisetzung durch Pharmaka. Die Applikation von d-Tubocurarin führt sowohl in situ (links) als auch in vitro (rechts) zu einer Verminderung der Calciumfreisetzung als Folge der elektrischen Reizung, ohne sie jedoch vollständig aufzuheben. Bei Perfusion der Geweblöcke mit Carbachol (150 µM) kommt es in jedem Fall zu einer drastischen Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien, einerlei ob das Gewebe elektrisch stimuliert wird oder nicht. Die kleinen Balken geben die Standardabweichungen der Mittelwerte mit der Anzahl der Experimente wieder.

war die Ca-Freisetzung aus der Mitochondrienfraktion um $47.9\% (= 1 - \frac{39.9}{76.6})$ beziehungsweise $65.5\% (= 1 - \frac{23.8}{69.0})$ vermindert. Da die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der relativen Abnahme der Organantwort proportional ist (Kap. 3.2.2.2.), könnten bis zu 6.9% beziehungsweise 4.8% des Ca-Abfalls in der Mitochondrienfraktion aus curariniertem Gewebe durch Mitochondrien aus unvollständig blockierten Elektroplaquezellen bedingt gewesen sein. Es ist wahrscheinlich, daß die verbleibenden $43.1\% (= \frac{39.9 - 6.9}{76.6})$

beziehungsweise 27.5% ($= \frac{23.8 - 4.8}{69.0}$) der Ca-Freisetzung, die auch in Gegenwart von Curare beobachtet wurden und nicht durch Mitochondrien unblockierter Elektroplaquezellen erklärt werden konnten, auf präsynaptische Mitochondrien zurückzuführen sind, die gemeinsam mit den postsynaptischen Mitochondrien sedimentierten. Der Ca-Gehalt in der Mitochondrienfraktion von curarinierten, stimulierten Gewebeproben zeigte eine größere experimentelle Varianz als der Ca-Gehalt anderer Gewebeproben. Diese Varianz könnte durch Schwankungen in der relativen Zusammensetzung der Fraktion aus prä- und postsynaptischen Mitochondrien begründet sein.

3.2.2.5. Morphologie prä- und postsynaptischer Mitochondrien

Die Feinstruktur des elektrischen Gewebes wurde bereits von mehreren Autoren ausführlich untersucht (vgl. Whittaker und Zimmermann, 1976). Die Elektroplaquezellen werden an ihrer ventralen Seite von zahlreichen Verzweigungen der cholinergen Axone innerviert (s. Abb. 22). Pro angeschnittener Nervenendigung wurden ca. 1 bis 3 Querschnitte durch Mitochondrien beobachtet. Der mittlere Querschnitt der präsynaptischen Mitochondrien betrug (unkorrigiert für die Schnittdicke) $0.267 \pm 0.005 \mu\text{m}$ (S.E.M., $n = 100$). Die Interpretation der Dünnschnitte legt eine Hufeisenform der präsynaptischen Mitochondrien nahe (vgl. auch Chan und Bunt, 1978), so daß oft dasselbe Mitochondrium zweifach angeschnitten wurde. Der mittlere Querschnitt der Mitochondrien der Elektroplaquezellen war hingegen mit $0.553 \pm 0.013 \mu\text{m}$ (S.E.M., $n = 100$) deutlich größer. Je postsynaptisches Mitochondrium waren im Mittel 1.77 ± 0.35 (S.E.M., in 19 untersuchten Schnitten) präsynaptische Mitochondrien angeschnitten.

Um den relativen Beitrag der beiden Mitochondrienpopulationen zum gesamten Volumen der Mitochondrien abzuschätzen, wurden 19 elektronenmikroskopische Aufnahmen geringer Vergrößerung (7000-fach) ausgewertet. Die nachgezeichneten

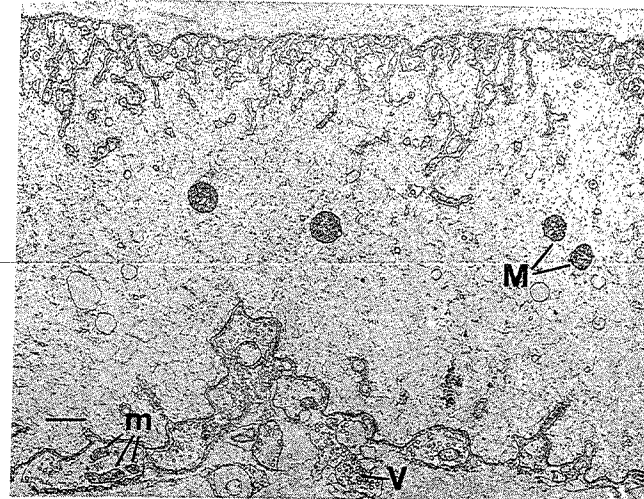


Abb. 22: Querschnitt durch eine Elektroplaquezelle. Vier postsynaptische Mitochondrien (M) sind angeschnitten. Die Zelle wird an ihrer ventralen Seite von zahlreichen cholinergen Nervenendigungen innerviert, in denen synaptische Vesikel (V) und Mitochondrien (m) enthalten sind. Die Dorsalseite der Elektroplaquezelle zeigt ein tief eindringendes System von Invaginationen. Balken: 1 μm . Fixierung nach Karnovsky (Methode: Kap. 2.6.1.2.).

Profile der Mitochondrien wurden ausgeschnitten und gewogen. Das Gewicht der präsynaptischen Profile wurde durch das Gesamtgewicht aller Mitochondrienprofile geteilt. Die Rechnung ergibt, daß die präsynaptischen Mitochondrien $32.2 \pm 3.8 \%$ zum gesamten mitochondrialen Volumen beitragen. Eine andere Abschätzung ist möglich, wenn man die prä- und postsynaptischen Mitochondrien in einer freilich sehr groben Näherung durch Zylinder gleicher Länge approximiert. Mit den oben genannten Durchmesser der Zylinder und der relativen Anzahl der angeschnittenen Mitochondrien ergibt sich, daß die Mitochondrien der Nervenendigungen 29.2% zum Gesamtvolumen der Mitochondrien beitragen. Insgesamt stehen diese Werte mit dem biochemischen Befund in Einklang, demzufolge sich die mitochondriale

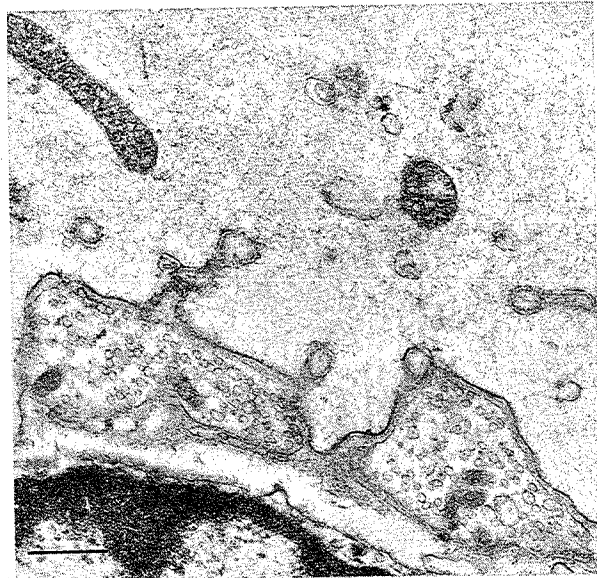


Abb. 23: Schnitt durch zwei Nervenendigungen mit mehreren Mitochondrien und zahlreichen synaptischen Vesikeln. Auch zwei Mitochondrien der Elektroplaquezelle sind angeschnitten. Fixierung in Calcium-haltigem mit Collidin gepuffertem Fixativ (Oschman- & Wall Technik, Methode s. Kap. 2.6.2.). Weder die präsynaptischen noch die postsynaptischen Mitochondrien zeigen elektronendichte Ablagerungen. In vielen synaptischen Vesikeln ist ein "Calciumgranulum" zu erkennen. Balken: 0.5 μ m.

Calciumfreisetzung durch Blockieren der Elektroplaquezellen mit Curare auf 20 bis 40 % verminderte.

3.2.2.6. Morphologische Hinweise für die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der Nervenendigung

Bei Verwendung eines Calcium-haltigen (5 mM), mit s-Collidin gepufferten Fixativs (Oschman & Wall Technik, vgl. Kap. 2.6.2.) wurde im wesentlichen das gleiche ultrastrukturelle Bild erhalten (Abb. 23), allerdings waren Einzelheiten der Feinstruktur bei dieser Fixierungstechnik schlechter zu erkennen. Sowohl die prä- als auch die postsynaptischen

Mitochondrien waren frei von elektronendichten Ablagerungen. Viele synaptische Vesikel enthielten ein elektronendichtes Granulum, das charakteristischerweise an der inneren Vesikelmembran angelagert war und in seinem Erscheinungsbild den bereits früher von Boyne et al. (1974) beschriebenen "calcium spots" glich. Perfundierte Gewebelöcke (mit oder ohne Curare in der Perfusionsflüssigkeit) zeigten das gleiche ultrastrukturelle Bild wie unbehandelte Kontrollen.

Wurde das Gewebe hingegen repetitiv stimuliert, so konnten in den Mitochondrien massive elektronendichte Ablagerungen beobachtet werden. Es ist bereits früher gezeigt worden, daß diese Ablagerungen aus Calciumphosphaten bestehen (Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974). Nach Reizung in Gegenwart von d-Tubocurarin im Perfusat fanden sich die Ca-Ablagerungen ausschließlich in den präsynaptischen Mitochondrien. In der Abbildung 24 ist ein Beispiel für die typische Erscheinungsform der elektronendichten Ablagerungen in präsynaptischen Mitochondrien wiedergegeben. Die Ablagerungen waren kreisförmig (mittlerer Durchmesser: 66 ± 2 nm; S.E.M., n = 35) und befanden sich in der Mitte des Mitochondrienquerschnitts.

Auch in den stimulierten Axonen wurden solche Ca-Ablagerungen beobachtet. Das Axon der Abbildung 25 befindet sich zwischen Elektroplaquezellen und hat bereits seine Myelinscheide verloren. Es ist aber noch von einer Glia-scheide umhüllt. Neben zahlreichen Mikrotubuli und Neurofilamenten zeigt der Querschnitt auch ein Mitochondrium. Die elektronendichten Ablagerungen in dem axonalen Mitochondrium sind mit denen der Nervenendigungen identisch.

Nach elektrischer Reizung in Abwesenheit von Curare können elektronendichte Ca-Ablagerungen auch in den Mitochondrien der Elektroplaquezellen beobachtet werden (Abb. 26). Im Vergleich zu den Ablagerungen in präsynaptischen Mitochondrien

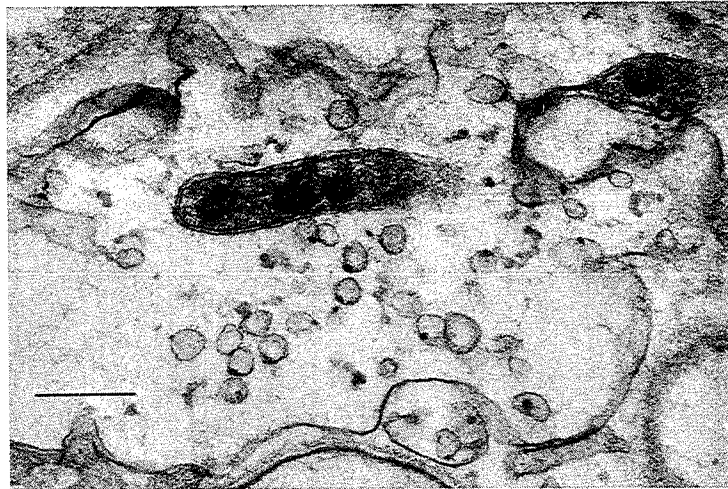


Abb. 24: Elektronendichte Ablagerungen in den Mitochondrien der Nervenendigung nach repetitiver Reizung (5000 Impulse, 5 Hz). Fixierung gemäß Oschman und Wall. Der Gewebelock war 7 h lang mit 250 μ M d-Tubocurarin perfundiert worden, ehe mit der repetitiven Reizung begonnen wurde. Balken: 0.2 μ m.

waren sie kleiner im Durchmesser und wirkten weniger intensiv. Sie konnten auch nicht in allen Mitochondrienquerschnitten beobachtet werden. In curarinisiertem Gewebe waren die Mitochondrien der Elektroplaquezellen immer frei von Calciumablagerungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die elektronendichten Ca-Ablagerungen stets in jenen Mitochondrien beobachtet wurden, die - den biochemischen Untersuchungen zufolge - ihr Calcium bei der Stimulierung verloren hatten. Vermutlich gleichen die Mitochondrien ihr Calcium-Defizit durch Aufnahme des Erdalkalimetalls aus dem Fixierungsmittel aus.



Abb. 25: Angeschnittenes Axon mit einem Mitochondrium. Fixierung nach Oschman und Wall. Auch das Mitochondrium des Axons zeigt nach repetitiver Reizung elektronendichte Granula. Balken: 0.2 μ m.

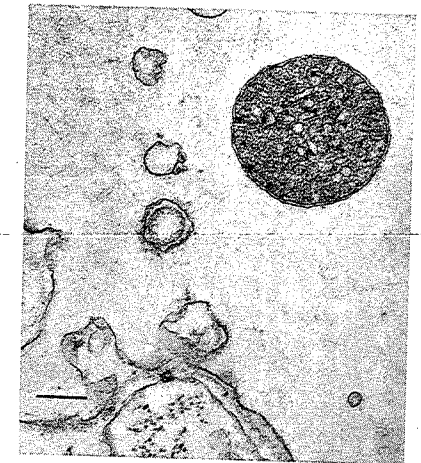


Abb. 26: Mitochondrium aus einer Elektroplaquezelle nach repetitiver Reizung (ohne Curare). Die elektronendichten Ablagerungen sind kleiner als in den präsynaptischen Mitochondrien. Fixierung nach Oschman und Wall. Balken: 0.2 μ m.

3.2.2.7. Calciumfreisetzung durch Carbachol

In einer Versuchsserie wurden Gewebelöcke mit Carbachol (150 μ M) perfundiert. Der Ca-Gehalt der Mitochondrienfraktion war nach Perfusion mit Carbachol auf 166 ± 8 nmol Ca/mg Protein erniedrigt (S.E.M., n = 5), unabhängig davon, ob die Gewebelöcke stimuliert wurden (n = 2) oder nicht (n = 3). Verglichen mit Gewebelöcken, die ohne Pharmakon perfundiert wurden, entspricht das einem mittleren Abfall im Ca-Gehalt der Mitochondrienfraktion um 72.9 % (Abb. 21). Der ACh-Gehalt der isolierten Nervenendigungen erniedrigte sich in Gegenwart von Carbachol trotz Reizung mit 5000 Impulsen (5 Hz) nur um 34 % (Tabelle 9, S. 98).

Tabelle 9: Veränderungen in der Zusammensetzung der Fraktion der Nervenendigungen und der Mitochondrienfraktion bei elektrischer Reizung (5000 Impulse, 5 Hz)

Komponente	Pharmakon	Nervenendigungsfraction unstimuliert	stimuliert	Differenz	Mitochondrienfraktion unstimuliert	stimuliert	Differenz
$\frac{\text{nmol Ca}}{\text{mg Protein}}$	---	262 ± 24 (27)	250 ± 20 (24)	-4.6 %	834 ± 88 (17)	194 ± 26 (7)	-76.7%*
$\frac{\mu\text{mol Ca}}{\mu\text{mol Cyt c oxyd.}}$	---	12.3 ± 2.0 (27)	12.7 ± 1.6 (24)	+3.3 %	12.8 ± 1.4 (17)	2.2 ± 0.4 (7)	-82.8%*
$\frac{\text{nmol ACh}}{\text{mg Protein}}$	---	147 ± 33 (7)	52 ± 23 (4)	-64.8%*			
$\frac{\text{nmol ACh}}{\text{mg Protein}}$	Curare	194 ± 27 (13)	71 ± 10 (13)	-63.3%*			
$\frac{\text{nmol ACh}}{\text{mg Protein}}$	Carbachol	235 ± 67 (3)	154 ± 59 (2)	-34.4%			

Angegeben sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen und der Anzahl (in Klammern) der Experimente.

* hochsignifikant verschieden, $p < 0.001$, t-Test

3.2.3. Konstanz im Calciumgehalt der Nervenendigungen

Bei repetitiver Reizung mit 5000 Impulsen (5 Hz) sank der Transmittergehalt in der Fraktion isolierter Nervenendigungen um 65% auf einen Wert von 52 ± 23 nmol/mg Protein (S.E.M., $n = 4$) (Tabelle 9). Diese ACh-Freisetzung aus den Nervenendigungen war geringer, als die ACh-Freisetzung aus einer Fraktion isolierter synaptischer Vesikel unter identischen Reizbedingungen (-90%: Zimmermann und Whittaker, 1974; Schmidt, 1975; vgl. auch Kap. 3.2.5.).

Die Fraktion isolierter Nervenendigungen zeigte nach elektrischer Reizung des Gewebes keine Veränderung in ihrem Ca-Gehalt: 250 ± 20 nmol Ca/mg Protein (S.E.M., $n = 24$) (Abb. 27). Da es durch die Stimulierung zu keiner Veränderung in den untersuchten biochemischen Parametern der Fraktion kam (konstanter Proteingehalt und Konstanz in den Aktivitäten der Leitenzyme), blieb auch der auf die Cytochrom-c-Oxydase bezogene Ca-Gehalt in der Fraktion unverändert. Je μmol Cytochrom c, das pro-min oxydiert wurde, wurden 12.7 ± 1.6 μmol Ca gemessen ($n = 24$) (Tab. 9). Da sich andererseits das Verhältnis des Ca-Gehalts zur Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion infolge der elektrischen Reizung drastisch erniedrigte (vgl. Tab. 9), kann der Ca- und Cytochrom-c-Oxydase-Gehalt in der Fraktion der Nervenendigungen nicht durch eine Verunreinigung mit freien Mitochondrien bedingt sein, die normalerweise an der Grenzfläche zwischen 1.4- und 2.0-molarer Saccharose sedimentieren würden. Vielmehr muß gefolgert werden, daß die Mitochondrien der Nervenendigung ihr Ca in das terminale Cytoplasma abgeben, ohne daß es zu einer Veränderung im gesamten Ca-Gehalt der Nervenendigung kommt. Es wäre theoretisch auch möglich, daß die Ca-Freisetzung aus den intraterminalen Mitochondrien gerade durch eine (im Austausch erfolgte) Ca-Aufnahme aus dem Extrazellulärraum kompensiert wurde.

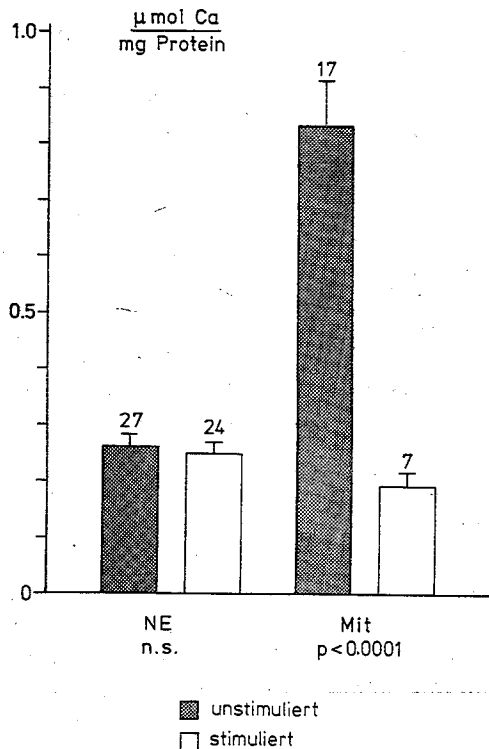


Abb. 27: Calciumgehalt in den Fraktionen der Nervenendigungen (NE) und der Mitochondrien (Mit) je mg Protein (Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen und der Anzahl der Experimente). Während der Calciumgehalt der Mitochondrienfraktion infolge der elektrischen Reizung des Gewebes (5000 Impulse, 5 Hz) hochsignifikant abnimmt, bleibt der Calciumgehalt der Nervenendigungen unverändert.

3.2.4. Konstanz im Calciumgehalt der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion

Der Calciumgehalt in der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion war nach erschöpfender Reizung gegenüber

dem Kontrollwert (617 nmol Ca / mg Protein) um 25.9% auf 457 ± 235 nmol Ca / mg Protein (S.E.M., n = 10) erniedrigt. Während sich die spezifische Cholinesteraseaktivität durch die Stimulierung nicht änderte, war die Proteinausbeute leicht erhöht (im Mittel um 19.2% auf 217 ± 68 µg Protein / g Ausgangsgewebe). Allerdings sind die Mittelwerte für stimuliertes und unstimuliertes Gewebe nur bedingt zu vergleichen, da die einzelnen zur Mittelwertbildung herangezogenen Meßwerte in der Regel nicht paarweise von demselben Versuchstier stammen. (Im Unterschied zu den Meßwertpaaren für die Mitochondrien und Nervenendigungen.) In zwei Experimenten, in denen je ein Meßwert für die Membranfraktion des stimulierten und des unstimulierten Organs aus demselben Tier bestimmt wurde, betrug die Zunahme im Proteingehalt der Fraktion 26.8% bzw. 24.0%, während der Ca-Gehalt pro mg Protein unverändert war. Es wird vermutet, daß sich die eingangs erwähnte geringfügige Abnahme des spezifischen Ca-Gehaltes der Membranfraktion infolge elektrischer Reizung (-25.9%) durch eine Zunahme der Menge an isolierbarer präsynaptischer Membran erklärt (möglicherweise als Folge einer Flächenzunahme der präsynaptischen Membran durch Verschmelzen mit synaptischen Vesikeln; siehe Diskussion). Diese Interpretation wird auch dadurch gestützt, daß der (nicht auf Protein bezogene) Ca-Gehalt der Membranfraktion im Mittel um nur 11.7% auf 99.1 nmol Ca je g Ausgangsgewebe abnahm.

Da die bereits im Kap. 3.1.3.6. angesprochene leichte Kontamination der Membranfraktion durch Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität auch nach elektrischer Reizung zu beobachten war, kann der Ca-Gehalt der Membranen analog dem Verfahren in Kap. 3.1.3.6. für eine Verunreinigung durch Mitochondrien korrigiert werden. Nach dieser Korrektur ergibt sich ein mittlerer Calciumgehalt der Membranfraktion von 511 nmol Ca / mg Protein.

Die Rechnung wurde wie folgt durchgeführt: Mit der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität von 0.010 IU / mg Protein und dem Verhältnis des Ca-Gehalts zur Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion (2.2 μ mol Ca / IU Cytochrom-c-Oxydase, vgl. Tabelle 9, S. 98) ergibt sich, daß $2.2 \times 0.01 \times 0.217 = 0.0048 \mu$ mol Ca der gesamten $0.457 \times 0.217 = 0.0991 \mu$ mol Ca je g Ausgangsgewebe auf verunreinigende Mitochondrien zurückzuführen waren. Entsprechend ergibt sich, daß $(0.010 / 0.067) \times 0.217 = 0.032$ mg der gesamten 0.217 mg Protein je g Ausgangsgewebe den Mitochondrien zuzuschreiben sind. Der mittlere Calciumgehalt der Membranen beträgt also nach Abzug der mitochondrialen Verunreinigung $(91.4 - 4.8) / (0.217 - 0.032) = 511$ nmol Ca / mg Protein (entsprechend korrigierter Wert für das unstimulierte Gewebe: 574 nmol Ca / mg Protein).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß der Ca-Gehalt der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion bei erschöpfender Reizung um nicht mehr als 12% abnahm.

3.2.5. Metallionenaufnahme in die synaptischen Vesikel

Der Acetylcholingehalt der Vesikelfraktion war nach der elektrischen Reizung (5000 Impulse, 5 Hz) ebenso vermindert (-96 %) wie der ATP-Gehalt (-94 %). Dieser Befund steht mit früheren Ergebnissen von Zimmermann und Whittaker (1974) in Einklang. Wenn die exocytotische Freisetzung des Transmitters unter vollständiger Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran erfolgt, könnte man einen etwa gleich großen Abfall im Metallionengehalt der Vesikelfraktion erwarten. Ein geringerer Abfall im Metallionengehalt wäre zu erwarten, wenn nur ein Teil der Vesikel mit der Zellmembran verschmilzt. Sollte die Ausschüttung der Acetylcholkationen aus den Vesikeln hingegen durch sich öffnende Poren im Ionenaustausch gegen andere Kationen erfolgen, so müßte

eine Zunahme im Metallionengehalt der Vesikelfraktion nachweisbar sein.

Synaptische Vesikel, die aus stimuliertem Gewebe isoliert wurden, hatten eine andere Metallionenzusammensetzung als diejenigen der unstimulierten Kontrollen (Tabelle 10). Das auffälligste Ergebnis war, daß der Gehalt an Erdalkalimetallen, besonders an Calcium, stark zunahm. Der Anstieg des Calciumgehaltes hätte ohne Zuhilfenahme der NaCl-Lösungen für die Isolierung der Vesikel nicht festgestellt werden können. Der Natriumgehalt der synaptischen Vesikel änderte sich durch die Stimulierung nicht. Die Kaliumkonzentration der Vesikelfraktion war zwar relativ erniedrigt (Tabelle 10), aber diese Veränderung macht sich wegen der kleinen Kaliumgehalte absolut kaum bemerkbar. Die Umverteilung wird besonders deutlich, wenn die Stöchiometrie der Kationenladungen als Blockdiagramm wiedergegeben wird (Abb. 28): Der Acetylcholinfreisetzung durch die elektrische Reizung steht die Zunahme der Erdalkalimetalle gegenüber. Der Alkalimetallgehalt erscheint unverändert. Aus diesem Ergebnis darf jedoch nicht geschlossen werden, daß bei der Transmitterfreisetzung ausschließlich Erdalkalimetalle in die cholinergen Vesikel aufgenommen werden. Es ist bereits in einem früheren Kapitel (3.1.3.8.) darauf hingewiesen worden, daß die Alkalimetalle weniger fest an die synaptischen Vesikel gebunden sind als die Erdalkalimetalle. Daher ist es durchaus denkbar, daß auch Alkalimetalle unspezifisch im Ionenaustausch für das ausgeschüttete Acetylcholin in die Vesikel aufgenommen wurden, aber während der Isolierung der Zellorganellen wieder hinausdiffundierten.

Die Bindungsstärke der Metallkationen an negative Ladungszentren ist durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ladungen und durch die konkurrierende Solvationswechselwirkung mit dem Lösungsmittel bestimmt.

Tabelle 10: Aufnahme von Erdalkalimetallen in die synaptischen Vesikel bei elektrischer Reizung des Gewebes

Komponente	A	B	B als % von A
	unstimuliert [nmol/g Gewebe]	stimuliert [nmol/g Gewebe]	
ACh	78.9 ± 6.1	4.60 ± 1.17	5.8 %
Na (unkorrigiert)	49.5 ± 8.5	44.7 ± 10.7	90.3 %
Na (korrigiert)	31.2 ± 5.4	30.8 ± 7.4	98.7 %
K	11.84 ± 7.29	6.31 ± 1.27	53.3 %
Mg	5.76 ± 1.56	8.88 ± 1.43	154.2 %
Ca (unkorrigiert)	53.1 ± 7.0	41.8 ± 7.7	78.7 %
Ca (korrigiert)	16.4 ± 3.2	41.8 ± 7.7	254.9 %
Summe [nmol/g Gewebe]	144.10	92.39	64.1 %
Summe [nval/g Gewebe]	166.26	143.07	86.0 %

Angegeben sind die Mittelwerte von 4 Experimenten mit ihren Standardabweichungen. Für das Natrium sind auch die Meßwerte nach Abzug der eingeschleppten frei gelösten Ionen angegeben (vgl. Kap. 3.1.3.8.). Für das Calcium ist auch der Meßwert von Vesikelfractionen angegeben, die mit NaCl-Lösungen isoliert wurden (Korrektur für Calciumionen, die während dem Zentrifugieren aus den Mitochondrien freigesetzt werden, vgl. Kap. 3.1.3.7.). Für die Vesikel aus stimuliertem Gewebe ist eine derartige Korrektur nicht erforderlich, weil die Mitochondrien ihr Calcium bereits bei der Stimulation verloren haben. - Während der Alkalimetallgehalt der synaptischen Vesikel von der elektrischen Reizung unbeeinflusst bleibt (Na) oder leicht abnimmt (K), nimmt der Gehalt an Erdalkalimetallen zu.

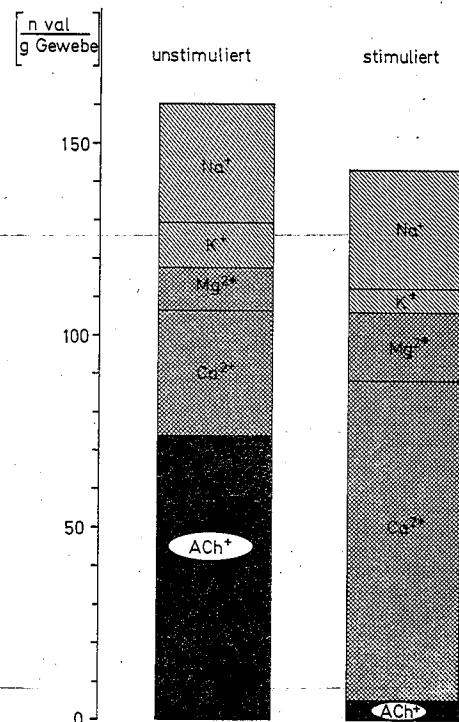


Abb. 28: Kationenzusammensetzung der synaptischen Vesikel in Nanogrammäquivalenten je Gramm Gewebe (Mittelwerte, korrigiert für eingeschleppte Na⁺- und Ca²⁺-Ionen). Der Acetylcholingehalt nimmt bei der Stimulation ab und der Erdalkalimetallgehalt zu. Der Alkalimetallgehalt in den isolierten Vesikeln erscheint unverändert.

(Eine quantitative Behandlung der Wechselwirkungen zwischen Ionen und Membranen einerseits und Ionen und Wasser andererseits ist von Eisenman auf der Grundlage Coulombscher Kräfte durchgeführt worden, vgl. Diamond und Wright, 1969; Triggle, 1972.) Bei hoher Ladungsdichte dominiert der elektrostatische Energiegewinn, der vom Ionenpotential abhängt, über die Solvatationsenergie.

Wenn nach der Ausschüttung des elektrisch positiv geladenen Transmittermoleküls eine größere negative Ladungsdichte zur Bindung von Metallkationen zur Verfügung steht, so müßte sie vor allem zur stärkeren Bindung der Metalle mit hohem Ionenpotential führen. Andererseits würde die Menge der gebundenen Metallionen natürlich auch durch die (unbekannten) Ionenkonzentrationen beeinflusst, denen die negative Ladung ausgesetzt ist. Die höhere negative Ladungsdichte der Vesikel aus stimulierten Nervenendigungen würde aber auch noch nach der Abtrennung der Vesikel aus der natürlichen Ionenumgebung wirksam bleiben (suspendierte vorgereinigte Vesikelfraktion, P_3). Synaptische Vesikel aus stimulierten Organen müßten deshalb die Metalle stärker binden und - dem Ionenpotential folgend - weniger Metallkationen in die zum Suspendieren benutzte Glycinlösung abgeben. Dieses Phänomen konnte mit den relativen spezifischen Konzentrierungen der Metallionen im Suspensionsmedium nachgewiesen werden (Abb. 29).

3.3. Veränderungen im Ionengehalt der subzellulären Organellen bei Inkubation in ionenreichen Medien

Eine grundsätzliche Schwierigkeit beim Arbeiten mit subzellulären Fraktionen besteht darin, daß die Stabilität der Zellorganellen abnimmt, sobald sie aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt werden. Insbesondere kann es durch ungünstige Wahl der zur Isolierung verwendeten Lösungen zu artifiziellen Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Partikel kommen. Durch Inkubation der isolierten Zellorganellen in Medien verschiedener Zusammensetzung kann überprüft werden, welche Veränderungen während der langwierigen Isolierungsverfahren stattgefunden haben könnten. Darüber hinaus geben derartige in vitro Untersuchungen Anhaltspunkte dafür, welche chemischen Prozesse an den Organellen in situ ablaufen könnten, wenn sich die ionale Zusammensetzung des Cytoplasmas ändert.

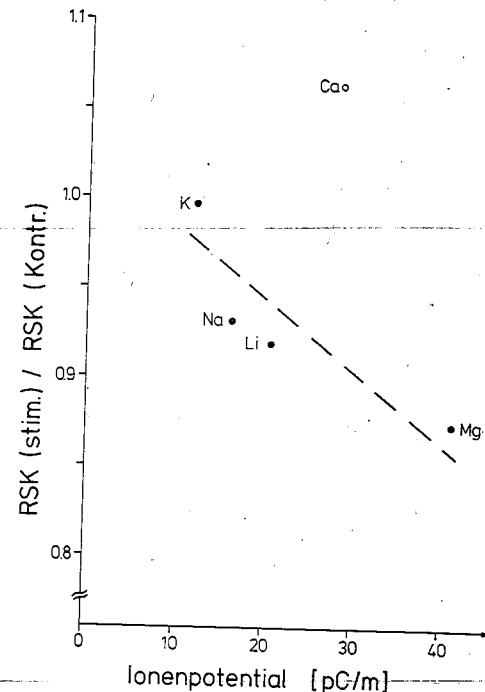


Abb. 29: Zusammenhang zwischen dem Ionenpotential (Ionenladung geteilt durch den Ionenradius) und der Bindungsstärke der Metallionen an die vorgereinigte Vesikelfraktion. Die relative spezifische Konzentrierung, RSK, der Metalle in der Waschlösung der vorgereinigten Vesikelfraktion, S_3^+ (vgl. Kap. 2.5.2.) / gibt ein Maß für die Ablösbarkeit der Metallionen von den Strukturen der vorgereinigten Vesikelfraktion. Sie nimmt durch die Stimulation entsprechend dem Ionenpotential der Metalle ab ($RSK(stim.) / RSK(Kontrolle)$), da sich negative Ladungen mit einer hohen Felddichte an den Vesikeln ausbilden. Das Verhältnis der RSK-Werte für das Calcium gehorcht dieser Beziehung nicht, da seine Ablösbarkeit von den synaptischen Vesikeln durch die Freisetzung aus den Mitochondrien mengenmäßig überlagert wird. Auch das Verhältnis der RSK-Werte der zugesetzten Lithiumionen (vgl. Kap. 3.1.3.8.) ist eingezeichnet.

3.3.1. Calciumfreisetzung aus isolierten Mitochondrien durch Alkalimetallionen

Die subzelluläre Fraktionierung wurde in einigen Experimenten mit Hilfe 0.4-molarer NaCl-Lösungen statt der sonst benutzten 0.8-molaren Glycinlösungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war der Ca-Gehalt der Mitochondrienfraktion um 75 bis 80 % vermindert, wie es sonst für die mit 5000 Impulsen stimulierten Versuchstiere typisch war. Das gleiche Phänomen wurde beobachtet, wenn 0.4-molare KCl-Lösungen angewendet wurden. Es wurde deshalb untersucht, ob sich der Ca-Gehalt isolierter Mitochondrien durch Inkubation mit Alkalimetallionen beeinflussen läßt.

Die von Dichtegradienten gewonnenen Mitochondrienfraktionen wurden mit 1.5 M Saccharoselösung auf das 3-fache Volumen verdünnt. Je 1 ml dieser Lösung wurde mit 1 ml einer Alkalichloridlösung versetzt, deren Osmolarität durch Zusatz von Saccharose auf 1.5 Osmol angehoben worden war. Die Konzentration des Alkalimetallions in der Inkubationslösung wurde von 10 mM bis 300 mM variiert. Nach 20 min bei 4°C wurde die Inkubation durch Millipore^R-Filtration abgebrochen. Die Filter wurden zweimal mit 4 ml 1.5 M Saccharoselösung gewaschen, an der Luft getrocknet und mit Salpetersäure aufgeschlossen (Kap. 2.8.2.). Obwohl Chemikalien höchster Reinheit benutzt wurden (Merck, Suprapur^R), wurde doch stets etwas Ca mit dem hohen Überschuß an Alkalimetall eingeschleppt. Um diese Verunreinigung zu berücksichtigen, wurde der Li-, Na- bzw. K-Gehalt der Filterrückstände bestimmt. Es wurde angenommen, daß freie Ca²⁺- und freie Alkalimetallionen im Verhältnis ihrer Konzentration in der Inkubationslösung an die Filter binden würden. Die ursprünglichen Meßwerte wurden hierdurch um 0 - 6 % korrigiert.

In der Abbildung 30 ist wiedergegeben, welcher Prozentsatz

des mitochondrialen Calciums nach der Inkubation noch an Organellen gebunden vorlag und somit durch die Filter zurückgehalten wurde. Man erkennt, daß alle drei Alkalimetalle erhebliche Ca-Mengen freizusetzen vermochten, sogar dann, wenn sie in verhältnismäßig niedriger Konzentration (30 mM) angewendet wurden. In niedrigen Konzentrationen waren Li⁺-Ionen anscheinend am wirkungsvollsten, während K⁺-Ionen bei Anwendung höherer Konzentrationen effektiver zu sein schienen. Jedoch waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Alkalimetallen gering und nicht signifikant.

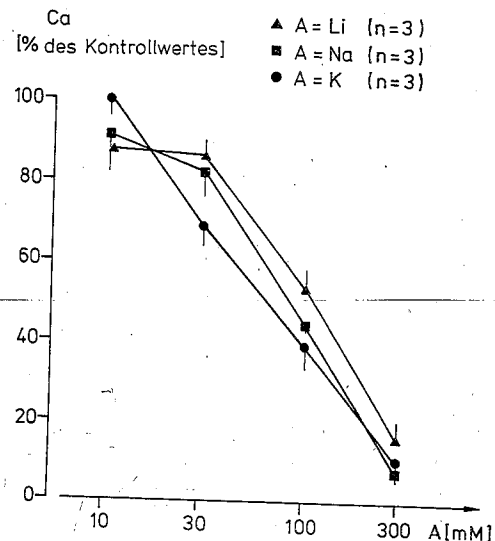


Abb. 30: Calciumfreisetzung aus den isolierten Mitochondrien durch Alkalimetallionen. Die in Saccharose-Glycin-Gemischen isolierten Mitochondrien wurden 20 min bei 4°C mit den Alkalimetallchloriden inkubiert und durch Millipore^R-Filter von der Inkubationslösung abgetrennt. Der Calciumgehalt ist als Prozentsatz des Kontrollwertes (inkubierte Mitochondrien ohne Alkalimetallzusatz) gegen die Konzentration des jeweils verwendeten Alkalimetalls (A) aufgetragen. Mittelwerte aus je 3 Experimenten mit ihren Standardabweichungen.

3.3.2. Alkalimetallionenaustausch an isolierten synaptischen Vesikeln

Isolierte synaptische Vesikel wurden unterschiedlich lange Zeit bei 4°C mit NaCl- oder CaCl₂-Lösungen verschiedener Konzentration inkubiert. Die Osmolarität der Lösungen war stets mit Glycin auf 0.8 Osmol angehoben worden, um ein Zerplatzen der Vesikel zu verhindern. Anschließend wurden die Lösungen durch Millipore^R-Filter filtriert. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml 0.8 M Glycinlösung gewaschen, nach dem Trocknen mit HNO₃ aufgeschlossen und ihr Metallionengehalt durch Atomabsorptionsspektroskopie analysiert. Filter, durch die entsprechende NaCl- beziehungsweise CaCl₂-Lösungen filtriert worden waren (aber ohne synaptische Vesikel) dienten als Blindwerte (Abb. 31). Der Metallgehalt der Vesikel, die

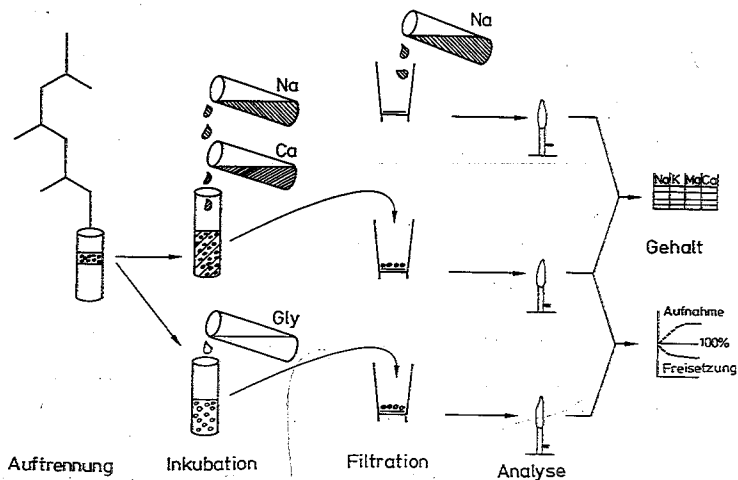


Abb. 31: Schematische Darstellung der Experimente zum Ionen-austausch an isolierten synaptischen Vesikeln. Im Anschluß an die Auftrennung werden die Vesikel mit NaCl- bzw. CaCl₂-Lösungen oder Glycinlösung (Kontrollen) inkubiert. Nach dem Filtrieren der Lösungen wird der Metallgehalt der Filter bestimmt. Filter, durch die reine Metallsalzlösungen filtriert wurden, dienen als Blindwerte.

in Lösungen mit erhöhter Ionenkonzentration inkubiert waren, wurde mit dem von Vesikeln verglichen, die unter sonst gleichen Bedingungen in Glycinlösungen ohne Metall-ionenzusatz inkubiert worden waren (Abb. 31).

Um die Zeitabhängigkeit der Ionenbindung an die synaptischen Vesikel zu verfolgen, wurden diese in 300 mM NaCl- beziehungsweise 5 mM CaCl₂-Lösung inkubiert. Das chemische Gleichgewicht hatte sich spätestens nach 30 min eingestellt (Abb. 32).

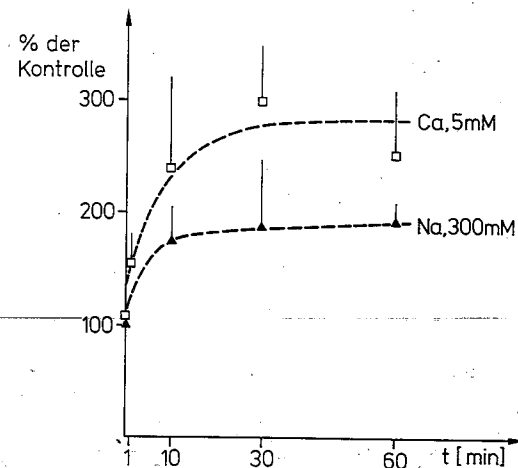


Abb. 32: Zeitabhängigkeit der Metallionenbindung an die synaptischen Vesikel. Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen mit ihren Standardabweichungen.

Die verwendeten Metallionenkonzentrationen (300 mM Na⁺, 5 mM Ca²⁺) waren etwa 2 bis 3 mal so hoch wie diejenigen des Zellhomogenates: 105 ± 8 mM Na und 2.37 ± 0.11 mM Ca (S.E.M., n = 13). Die im Zellhomogenat tatsächlich freigelöst vorliegenden Na⁺- und Ca²⁺-Ionenmengen dürften jedoch deutlich niedriger gewesen sein. Eine Abschätzung ist mit Hilfe der Werte aus Tabelle 3 möglich, wenn man

annimmt, daß die im cytoplasmatischen Überstand S_3 wiedergewonnenen Metallionen bereits im Zellhomogenat freigelöst vorgelegen haben. Durch diese Annahme wird der Gehalt an freien Ionen noch immer überschätzt, da ein Teil der Ionen erst während der Isolierungsverfahren aus den Zellpartikeln hinausdiffundiert sein dürfte und ein weiterer Teil der Metallionen durch lösliche Proteine und Anionen maskiert wurde. Mit den Werten der Tabelle 3 ergibt sich, daß die synaptischen Vesikel maximal einer Konzentration von $(105 \times 0.573 =) 60.4$ mmol freien Na^+ -Ionen pro l und einer Konzentration von $(2.37 \times 0.273 =) 0.647$ mmol freien Ca^{2+} -Ionen pro l ausgesetzt gewesen sein können.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung mit den Natriumionen im Inkubationsmedium ist in Abb. 33 dargestellt.

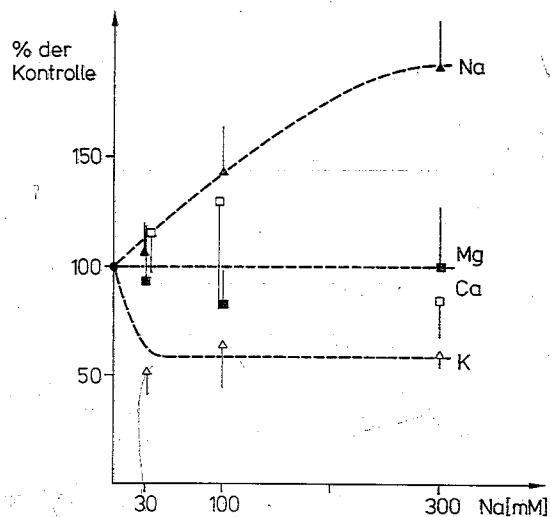


Abb. 33: Ionenaustausch an den synaptischen Vesikeln bei Inkubation mit NaCl (1 h, 4°C). Kaliumionen werden gegen die Natriumionen ausgetauscht. Der Erdalkalimetallgehalt ändert sich hingegen nicht. Mittelwerte aus 4 Experimenten mit ihren Standardabweichungen. Helle Quadrate: Ca; dunkle Quadrate: Mg; helle Dreiecke: K; dunkle Dreiecke: Na.

Man erkennt, daß die Natriumchloridlösungen ohne Einfluß auf den Erdalkalimetallgehalt der synaptischen Vesikel waren. Der Kaliumgehalt der Vesikel wurde jedoch um ca. 40% erniedrigt, auch durch eine Natriumkonzentration, die derjenigen des Zellhomogenates entspricht. Bei einer externen Natriumkonzentration von ca. 60 mM kann der Natriumgehalt der Vesikel um etwa 30% ansteigen. Veränderungen im Alkalimetallgehalt der synaptischen Vesikel ($Na \leftrightarrow K$) können also im Ionenaustausch erfolgen. Auch bei Anwendung eines großen Natriumüberschusses konnte jedoch nicht die Gesamtmenge an vesikulärem Kalium freigesetzt werden. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß ein Teil der Kaliumionen ebenso wie die Erdalkalimetalle für einen Ionenaustausch mit Ionen des umgebenden Mediums nicht zugänglich ist. Möglicherweise liegt dieser Anteil der Ionen im inneren Lumen der Vesikel vor, während der Ionenaustausch an der Oberfläche der Vesikelmembran stattfindet.

3.3.3. Einfluß von Calciumionen auf die synaptischen Vesikel

Bei der Inkubation mit $CaCl_2$ -Lösungen (Abb. 34) wurde keine Freisetzung von Metallen aus den synaptischen Vesikeln beobachtet (auch nicht von Kaliumionen). Bei unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen (≥ 2 mM) kam es jedoch zu einer unspezifischen Aufnahme von Metallionen durch die synaptischen Vesikel. Eine Fusion von synaptischen Vesikeln unter Aufnahme von Metallionen erscheint denkbar.

Es wurde auch überprüft, ob das vesikuläre Acetylcholin oder ATP durch Inkubation mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen (bis 10 mM) freigesetzt werden kann. Nach einminütiger Inkubationsdauer (bei 4°C) konnte weder eine Veränderung im Acetylcholin- (Abb. 35) noch im ATP-Gehalt (Abb. 36) der Vesikel festgestellt werden. Auch der Zusatz

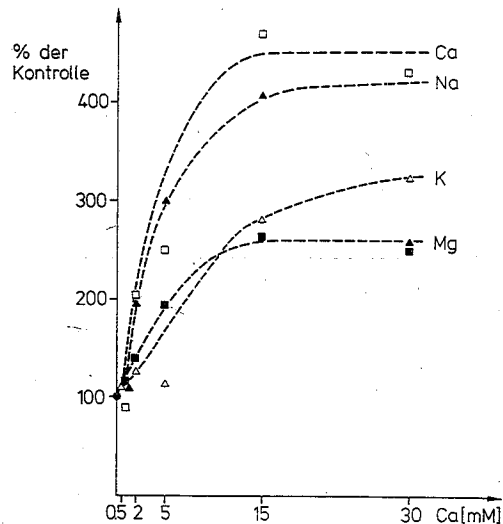


Abb. 34: Wechselwirkung von synaptischen Vesikeln mit Calciumionen. Erst bei unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen kommt es zu einer unspezifischen Ionenaufnahme in die Vesikel. Mittelwerte aus 4 Versuchen. Der Übersichtlichkeit wegen sind die Standardabweichungen der Mittelwerte nicht eingetragen. Sie liegen in derselben Größenordnung wie die der Abbildungen 32 und 33. Helle Quadrate: Ca; dunkle Quadrate: Mg; helle Dreiecke: K; dunkle Dreiecke: Na.

eines Äquivalentes (bezogen auf g Ausgangsgewebe) der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion war unter diesen Bedingungen ohne Einfluß auf die vesikulären Bestandteile. Es ist wichtig, den ATP-Gehalt in diesen Versuchen unmittelbar nach der Inkubation zu bestimmen, oder die Probe auf einen Perchlorsäuregehalt von mindestens 50 mM anzusäuern, da weder die ATPasen der Membranfraktion noch die vesikuläre ATPase in 25 mM HClO_4 vollständig inaktiviert werden. Nichtbeachten dieser Vorsichtsmaßnahme würde wegen der starken Calciumabhängigkeit der Vesikel-ATPase eine Calcium-abhängige ATP-Freisetzung aus den synaptischen Vesikeln vortäuschen.

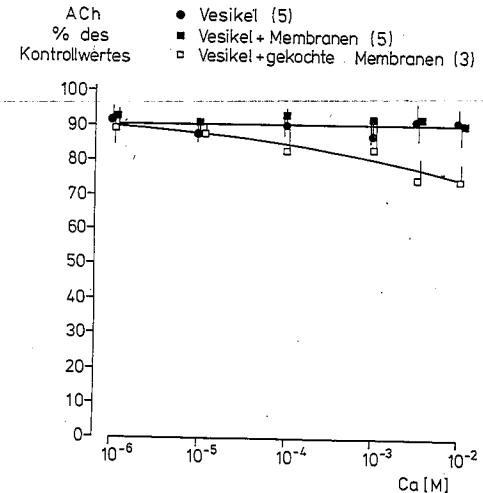


Abb. 35: Einfluß des Calciumzusatzes (Abszisse) zum Inkubationsmedium auf den Acetylcholingehalt der synaptischen Vesikel. Die Inkubation wurde nach 1 min bei 4°C durch Ansäuern mit HCl abgebrochen. Angegeben sind die Mittelwerte aus n (in Klammern) Messreihen mit ihren Standardabweichungen. Calciumionen führen weder allein, noch in Gegenwart von Nervenzellmembranen zu einer signifikanten Veränderung im Acetylcholingehalt der synaptischen Vesikel.

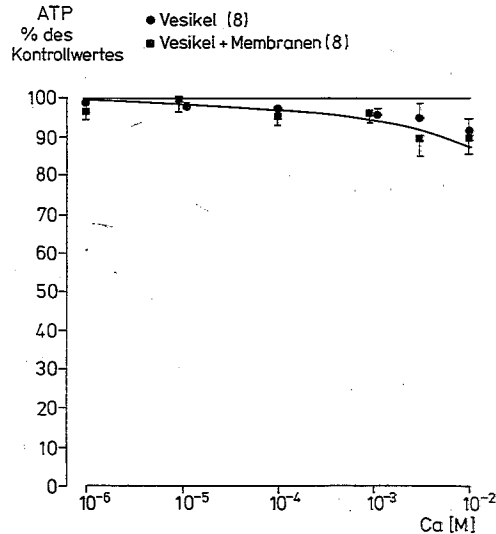


Abb. 36: Einfluß des Calciumzusatzes zum Inkubationsmedium auf den ATP-Gehalt der synaptischen Vesikel. Die Inkubation wurde nach 1 min bei 4°C durch Ansäuern mit HClO₄ (50 mM) abgebrochen. Der ATP-Gehalt wurde binnen 10 min nach der Inkubation bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus n (in Klammern) Messreihen mit ihren Standardabweichungen. Calciumionen führen weder allein, noch in Gegenwart von Nervenzellmembranen zu einer signifikanten Veränderung im ATP-Gehalt der synaptischen Vesikel.

4. Diskussion

4.1. Der Gegenstand der Untersuchungen

Die zentrale funktionale Bedeutung der Calciumionen für die erregbaren Gewebe, insbesondere für Muskelgewebe und jene sekretorischen Gewebe, in denen das Sekret exocytotisch aus kleinen Speichergranula ausgeschüttet wird, ist in zahlreichen Veröffentlichungen betont worden, von denen einige in der Einleitung zu dieser Untersuchung zusammengestellt sind. Während die Vorgänge bei der Muskelkontraktion zum Teil bis zur molekularen Ebene hinab analysiert worden sind, sind die molekularen Mechanismen der Sekretion weitgehend unverstanden. Fast alle Untersuchungen zur Rolle des Calciums wurden mit dem β^- -Strahler ⁴⁵Ca durchgeführt, während quantitative Analysen zum Metallionengehalt subzellulärer Fraktionen fast vollständig fehlen. Dies ist zum Teil durch die mangelnde Empfindlichkeit herkömmlicher analytischer Verfahren und die Schwierigkeit bedingt, subzelluläre Partikel in genügender Ausbeute von interstitiellen und cytoplasmatischen Ionen abzutrennen, ohne daß dabei ihr Gehalt an Metallkationen hinausdiffundiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren zur Isolierung verschiedener subzellulärer Organellen aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata* beschrieben. Insbesondere wurden Methoden zur Isolierung von Mitochondrien und zur Anreicherung von Nervenzellmembranen entwickelt, da für diese Zellorganellen eine Beteiligung an der Regulation der cytoplasmatischen Calciumkonzentration postuliert worden ist. Der Calciumgehalt der isolierten Fraktionen wurde durch Atomabsorptionsspektrophotometrie quantitativ bestimmt.

In Zellfraktionen, die nach elektrischer Reizung isoliert

wurden, konnten signifikante Veränderungen im Calciumgehalt der subzellulären Organellen festgestellt werden. Die Ionenspezifität dieser Veränderungen wurde durch die quantitative Analyse anderer Metallionen untersucht. Besonderes Gewicht wurde darauf gelegt, den Calciumabfall in der Mitochondrienfraktion mit pharmakologischen und ultrastrukturellen Methoden den muskelanalogen Elektroplaquezellen und den cholinergen Neuronen zuzuordnen. Schließlich wurde die Austauschbarkeit der Metallkationen subzellulärer Fraktionen durch Inkubation in ionenreichen Medien untersucht.

In den folgenden Kapiteln sollen die Ergebnisse vor dem Hintergrund anderer Veröffentlichungen diskutiert werden.

4.2. Der Calciumgehalt im elektrischen Organ

Der Calciumgehalt im elektrischen Organ von Torpedo beträgt 2.67 mmol / kg Naßgewicht (Kap. 3.1.1.) und ist damit der Calciumkonzentration im Blutplasma, der Cerebrospinalflüssigkeit und der Uterusflüssigkeit des Versuchstieres (Kap. 3.1.2.) ähnlich. Vergleichbare Meßwerte liegen für die Körperflüssigkeiten verschiedener Arten der Elasmobranchii vor (Tabelle XIV und XV in Holmes und Donaldson, 1969; Babel-Guérin, 1974; Burger, 1967; Maren, 1967; Murdaugh und Robin, 1967; Pereira und Sawaya, 1957; Thorson, 1967). Von wenigen Ausnahmen abgesehen variieren alle Meßwerte zwischen 2 und 5 mM. Babel-Guérin (1974) gibt für das elektrische Organ von Torpedo marmorata einen Mittelwert von 2.4 mmol / kg Naßgewicht an und fügt hinzu, daß die Mehrzahl ihrer Meßwerte (wie viele?) "im Winter" bestimmt wurden. Sie betont, daß die Versuchstiere im Sommer einen wesentlich höheren Calciumgehalt aufweisen, leider ohne einen einzigen Meßwert anzugeben.

Eine derartige jahreszeitliche Schwankung im Calciumgehalt würde natürlich eine erhebliche Fehlerquelle für

die Interpretation der Meßergebnisse darstellen. In der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb der Calciumgehalt im elektrischen Organ in allen Versuchstieren bestimmt. Es konnte jedoch keinerlei jahreszeitliche Schwankung in der Calciumkonzentration festgestellt werden (Tabelle 1, S. 58). Lediglich in einigen Versuchen zur Perfusion von Gewebelöcken wurden lokale Calciumanreicherungen - vermutlich präzipitierte Calciumphosphate - beobachtet, wenn der pH der Perfusionsflüssigkeit nicht bei 7.4 gehalten wurde (diese Versuche wurden nicht zur Auswertung herangezogen).

Babel-Guérin berichtet auch über einen Calciumeinstrom in das elektrische Gewebe bei elektrischer Reizung in vivo und Feldstimulation von in vitro Präparaten (10 Hz, 6000 Impulse), der zu einer "40 bis 70"-prozentigen Erhöhung des "zellulären Calciums" (nach der Nomenklatur der Autorin dasjenige Calcium, das nach dem Waschen des Gewebes in Calcium-freier Lösung übrig bleibt) führen soll (Babel-Guérin und Dunant, 1972a, 1972b; Babel-Guérin, 1974). Tatsächlich zeigen ihre Meßwerte (Tab. 1 in Babel-Guérin, 1974) bei Stimulierung in vivo ("A") und in Gegenwart physiologischer Calciumkonzentrationen (4.4 mM) im Inkubationsmedium ("C", "I'" und "I") eine Zunahme des "zellulären Calciums" zwischen 12.5 (I') und 75 % (A), aber die entsprechenden Meßwerte für das unstimulierte Gewebe selbst variieren zwischen 0.40 und 1.20 µmol / g Gewebe, also um 200 %. Entsprechend ihren Abschätzungen zur Calciumverteilung auf den Zellulärraum und Extrazellulärraum folgt für den Meßwert von 0.40 µmol "zelluläres Ca" / g Gewebe ein Gesamtgehalt von 0.8 µmol Ca / g Gewebe, ein Wert der als ungewöhnlich niedrig erscheint (ebenso wie die Organantwort von 11 V). Es handelt sich offenbar um den einen der beiden (!) in vivo stimulierten Fische (Februar 1972). Der zweite Versuch wurde von Babel-Guérin im Juni 1973 durchgeführt (vgl. ihre Fig. 2). In ihm nahm der Calciumgehalt bei Stimulierung

nur um 8 % zu. Fernerhin betrug die Calciumzunahme in Gegenwart von Curare 40 % (I), in Abwesenheit von Curare aber nur 13 % (I', d.h. Probe vom selben Versuchstier!). Aus diesem Experiment wurde dazu noch die These abgeleitet, daß der Calciumeinstrom in präsynaptische Zellelemente erfolge. Babel-Guérin kommt selbst zu dem Schluß, daß diese Meßwerte (nach dem Waschen des Gewebes mit einer Lösung von Saccharose und Harnstoff) "n'ont pas été constamment reproductibles".

In der vorliegenden Untersuchung wurde nie eine Zunahme des Calciumgehaltes im elektrischen Gewebe als Folge der Stimulierung (weder in vivo noch in vitro, in Gegenwart oder Abwesenheit von Curare) gemessen. Die Beobachtung einer erhöhten Austauschbarkeit des Calciums gegen ⁴⁵Ca nach elektrischer Reizung (Babel-Guérin, 1974; Babel-Guérin et al., 1977) bleibt von dieser Kritik natürlich unberührt. Die besprochene Arbeit verdeutlicht jedoch, wie irreführend es sein kann, wenn aus Experimenten mit Radioisotopen, die nur durch wenige quantitative Bestimmungen des Metallgehaltes begleitet werden, auf Nettoveränderungen und Ionenflüsse geschlossen wird.

4.3. Die Calciumverteilung im elektrischen Gewebe

4.3.1. Vergleich mit anderen Metallen

Im elektrischen Organ von Torpedo treten Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium, sowie Spuren von Eisen und Zink auf (Schmidt, 1975). Der geringe Eisengehalt ist wahrscheinlich hauptsächlich auf anwesendes Hämoglobin zurückzuführen. Der Zinkgehalt des Gewebes (1/3000-stel des Natriumgehaltes) ist so klein, daß eine quantitative Bestimmung in den Zellfraktionen Schwierigkeiten bereitet.

Während Natrium, Kalium und Magnesium überwiegend als frei gelöste Ionen vorliegen und in dem Cytoplasma-reichen

Überstand S₃ wiedergefunden werden, folgt das Calcium in seiner Verteilung bei den Differentialzentrifugationen den Leitenzymen Cytochrom-c-Oxydase und Cholinesterase (Tabelle 2, S. 60 und Tabelle 3, S. 65).

Ähnliche Auftrennungen sind nur für anderes Untersuchungsmaterial bekannt. Obwohl ein Vergleich durch die unterschiedlichen Präparationsschemata der einzelnen Autoren erschwert ist, stimmen die Werte doch darin überein, daß Kalium in der "löslichen Fraktion" ($\hat{=} S_3$) angereichert wird (Gehirn-, Leber- und Nierengewebe von Meerschweinchen und Ratten, Holland und Auditore, 1955; Meerschweinchen- und Rattengehirn, Ryall, 1962, 1964; Großhirnkortex des Kaninchens, Hanig et al., 1972), daß Magnesium vor allem in Mikrosomen und der löslichen Fraktion auftritt (Rinder-Nebennierenmark, Borowitz et al., 1965; exokrines Pankreas des Meerschweinchens, Clemente und Meldolesi, 1975) und daß Calcium mit den schweren Zellpartikeln der vorgereinigten Mitochondrienfraktion assoziiert ist (Rinder-Nebennierenmark, Borowitz et al., 1965; Großhirnkortex des Kaninchens, Hanig et al., 1972; exokrines Pankreas des Meerschweinchens, Clemente und Meldolesi, 1975).

Das Zink verteilt sich ungefähr wie das Magnesium auf die subzellulären Fraktionen aus dem elektrischen Gewebe (vgl. Schmidt, 1975), ohne daß es zu einer spezifischen Anreicherung dieses Metalls in irgendeiner Fraktion kommt (eine unspezifische Verteilung geringer Mengen an Zink wurde auch von Borowitz et al. (1965) im Rinder-Nebennierenmark beschrieben). Außerdem wurde Zink auch im Nervengewebe (von Euler, 1962; Hanig und Aprison, 1967; Ibata und Otsuka, 1968) und in den sekretorischen β -Zellen des Pankreas (Okamoto und Kawanishi, 1966; Pihl und Falkmer, 1967) nachgewiesen.

Im Vergleich zu den anderen Metallen fällt also für das

elektrische ebenso wie für andere Gewebe generell die Anreicherung des Calciums mit den Zellstrukturen der vorgereinigten Mitochondrienfraktion, P₂, auf. Erst die weitere Auftrennung dieser Fraktion auf Dichtegradienten zeigte, daß das Calcium etwa proportional zur mitochondrialen Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität und nicht zur Cholinesteraseaktivität verteilt ist (Kap. 3.1.3.4. und Abb. 13, S. 68).

4.3.2. Übersicht über den Calciumgehalt der Zellorganellen

Die folgende Aufstellung soll den Überblick über den Calciumgehalt der verschiedenen subzellulären Fraktionen erleichtern. Die einzelnen Meßwerte werden in späteren Kapiteln getrennt diskutiert.

Fraktion:	nmol Ca / mg Protein
Zellhomogenat	286
Zelltrümmer und -kerne (P ₁)	190
vorgereinigte Mitochondrien (P ₂)	477
vorgereinigte synapt. Vesikel (P ₃)	445
Cytoplasma-reicher Überstand (S ₃)	191
Mitochondrienfraktion	834
Fraktion der Nervenendigungen	262
Nervenzellmembran-reiche Fraktion	574
Fraktion der synaptischen Vesikel	277

4.3.3. Der Calciumgehalt der Mitochondrien

Der Calciumgehalt der isolierten Mitochondrienfraktion ist mit 834 nmol Ca / mg Protein besonders hoch, sowohl im Vergleich zu anderen subzellulären Fraktionen aus dem elektrischen Organ als auch im Vergleich zu Mitochondrienfraktionen, die aus einigen anderen Geweben isoliert wurden: 40 bzw. 113 nmol Ca / mg Protein im Rinder-Nebenmark (Borowitz et al., 1965; bzw. Serck-Hanssen und Christiansen, 1973), 27 nmol Ca / mg Protein im exokrinen

Pankreas des Meerschweinchens (Clemente und Meldolesi, 1975). Carafoli und Rossi (1971) zitieren für verschiedene Gewebe Werte zwischen 10 und 90 nmol Ca / mg Protein, erwähnen aber auch, daß bei gleichzeitiger Aufnahme von Phosphat Werte bis zu 2600 nmol Ca / mg Protein erreicht werden können. Versuche zur Aufnahme großer Mengen an Calcium ("massive-loading") wurden zuerst von Vasington und Murphy (1961, 1962) an isolierten Mitochondrien der Rattenniere in aeroben Medien durchgeführt, die Mg²⁺, ATP oder ADP, freies Phosphat und ein Substrat der Atmungskette enthielten (vgl. auch Lehninger et al., 1967).

Hohe Werte wurden für die Calciumbindungskapazität der isolierten Mitochondrien aus dem Gehirnkortex von Meerschweinchen (680 nmol Ca / mg Protein, Vickers und Dowdall, 1976) und dem Gehirn des Kaninchens (670 nmol Ca / mg Protein, Lazarewicz et al., 1974) genannt, während sich in der älteren Literatur auch niedrigere Werte für die Mitochondrien aus Rattengehirn (ca. 150 nmol Ca / mg Protein, Lust und Robinson, 1970a) und dem Gehirnkortex des Meerschweinchens (270 nmol Ca / mg Protein in Gegenwart von Ouabain, Stahl und Swanson, 1969) sowie den Calciumgehalt von Mitochondrien aus dem Großhirnkortex von Kaninchen (23 nmol Ca / mg Protein, Hanig et al., 1972) finden. Mehrere Möglichkeiten bieten sich zur Erklärung der großen Unterschiede in den Meßwerten der einzelnen Arbeitsgruppen an.

1. Zunächst erscheint es als wahrscheinlich, daß die Mitochondrien von verschiedenen Versuchstieren und Gehirnarealen tatsächlich unterschiedliche Calciummengen enthalten, zumal die Form der Nervenzellen, ihre Transmitterspezifität und die Verflechtung mit Gliazellen, deren Mitochondrien mit denjenigen der Neurone wohl zum Teil gemeinsam isoliert wurden, im Zentralnervensystem von Gebiet zu Gebiet verschieden sind. In einigen Arbeiten (z.B. Stahl und Swanson, 1969; Lust und Robinson, 1970a) wurde der Isotopenaustausch zur Berechnung der absoluten

Calciummengen benutzt, so daß wahrscheinlich zu niedrige Werte erhalten wurden.

2. Bei den gebräuchlichen Verfahren zur Isolierung von Mitochondrien aus Nervenendigungen (vgl. Whittaker und Barker, 1972) werden die subzellulären Organellen durch osmotischen Schock aus den Nervenendigungen freigesetzt. Es ist möglich, daß die Fähigkeit der Mitochondrien, Calcium zu binden, durch die hypotonen Suspensionsmedien und die anschließende Zentrifugation in Dichtegradienten höherer Osmolarität beeinträchtigt wird. Bei dem Verfahren zur Isolierung von Mitochondrien in isoosmolaren Medien nach Ozawa et al. (1966) wurde meist unter Zusatz von 0.1 mM EDTA gearbeitet (vgl. z.B.: Lust und Robinson, 1970a; Lazarewicz et al., 1974); es erscheint denkbar, daß EDTA den Calciumgehalt der Mitochondrien durch Komplexierung des herausdiffundierenden Erdalkalimetalls (Verschiebung des chemischen Gleichgewichts zwischen freiem und mitochondrialem Calcium) erniedrigt (vgl. Stahl und Swanson, 1969). In der vorliegenden Untersuchung wurden deshalb hypotone und EDTA-haltige Medien bei der Isolierung der Mitochondrien vermieden.

3. Schließlich zeigt diese Untersuchung (Kap. 3.2. und 3.3.1.), daß Mitochondrien in verschiedenen funktionalen Zuständen vorliegen können, die sich morphologisch und biochemisch durch ihren Calciumgehalt unterscheiden lassen. Besonders wichtig erscheint der Befund, daß die Anwesenheit von Alkalimetallionen zur Freisetzung des Calciums aus den isolierten Mitochondrien führt, da in vielen Untersuchungen Alaklimetall-haltige Lösungen zur Isolierung und, bei Studien zur Calciumaufnahme, zur Inkubation verwendet wurden. Der hohe Calciumgehalt der Mitochondrien aus dem elektrischen Organ von Torpedo konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, weil die Alkalimetallkonzentration des (Natrium-reichen) Gewebes schon vor dem ersten Homogenisieren durch Zusatz iso-

osmolarer Glycinlösungen herabgesetzt wurde (Kap. 2.5.3.).

Es wird vermutet, daß der Calciumgehalt der Mitochondrien in vielen Veröffentlichungen unterschätzt wurde und daß durch Untersuchungen zur "Calcium-Aufnahme" mit ^{45}Ca im wesentlichen ein Isotopenaustausch mit überlagerter Nettoaufnahme, je nach der Vorbehandlung der Mitochondrien, gemessen wurde (vgl. Clemente und Meldolesi, 1975, als Beispiel für eine gründlichere Untersuchung zur Unterscheidung zwischen Ca-Gehalten und -Austauschphänomenen). So berichten z.B. Lust und Robinson (1970a), daß die nach der Methode von Ozawa et al. (1966), nicht aber die nach der Methode von Gray und Whittaker (1962) isolierten Mitochondrien aus Rattengehirn die Fähigkeit zur Aufnahme von ^{45}Ca zeigten, obwohl die nach der letzteren Methode isolierten Mitochondrien doppelt so hohe Gehalte an mitochondrialen Leitenzymen und ultrastrukturell besser erhaltene Membranen aufwiesen. Sie vermuten einen zerstörerischen Einfluß der hypertonen Saccharoselösungen auf die Fähigkeit der Mitochondrienmembranen zum Calciumtransport, ohne zu diskutieren, daß die nach der Methode von Gray und Whittaker (1962) isolierten Mitochondrien vielleicht gerade wegen ihrer gut erhaltenen Membranen weniger Calcium austauschen und weniger ^{45}Ca aufnehmen, weil sie einen größeren Anteil ihres endogenen Calciumgehaltes während der Präparation behalten.

Die alternative Möglichkeit, daß die in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen Mitochondrien ihren hohen Calciumgehalt erst während der Präparation durch Calciumaufnahme erworben haben, erscheint unwahrscheinlich, weil sie eine spezifische Wirkung des Glycins auf die Mitochondrien der unstimulierten Organe erfordern würden, die durch Carbachol verhindert wird: Denn der Calciumgehalt in der die Mitochondrien umgebenden Lösung (S_2) von stimuliertem Gewebe war ja sogar höher als derjenige von Kontrollpräparationen. Auch die Möglichkeit, daß die

Mitochondrien von stimulierten Organen während der Isolierung weniger Calcium hätten aufnehmen können, weil das Homogenisationsmedium infolge der elektrischen Reizung an ATP verarmt war, kann ausgeschieden werden, weil das Verhältnis von ATP zu ADP im Inkubationsmedium keinen Einfluß auf die Calciumaufnahme von Mitochondrien hat (Lazarewicz et al., 1974; vgl. auch Lehninger et al., 1967).

4.3.4. Abschätzung des Prozentsatzes an mitochondrial gebundenem Calcium

Im folgenden soll abgeschätzt werden, welcher Prozentsatz des Calciumgehaltes im elektrischen Gewebe an Mitochondrien gebunden ist. Das Verhältnis von Calciumgehalt zu Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität ist in den Fraktionen der Mitochondrien und Nervenendigungen etwa gleich (12.8 bzw. 12.3 $\mu\text{mol Ca} / \text{IU}$; 1 IU = 1 μmol Cytochrom c, das pro min oxydiert wird; vgl. Tab. 9, S. 98). Eine Kontamination der Fraktion der Nervenendigungen mit freien Mitochondrien scheidet aus, da sich der Calciumgehalt der Fraktion der Nervenendigungen, anders als der der Mitochondrienfraktion durch die elektrische Stimulierung nicht ändert. Man kann aber vermuten, daß der größte Teil des Calciums der Nervenendigungen in den terminalen Mitochondrien lokalisiert ist. Da der Calciumgehalt des neuronalen Cytoplasmas vernachlässigbar gering ist (10^{-6} M, vgl. Blaustein, 1974), kann der Beitrag der Mitochondrien zum Calciumgehalt der Nervenendigungen näherungsweise abgeschätzt werden, wenn man annimmt, daß das gesamte Calcium der Nervenendigungen entweder in Mitochondrien oder an die Partikel der Nervenzellmembran-reichen Fraktion (Kap. 3.1.3.6.) gebunden vorliegt. Diese Annahme erscheint insofern gerechtfertigt, als in der Nervenendigung als weitere Zellorganellen (neben filamentösen Strukturen) nur die synaptischen Vesikel auftreten, deren Membran unter

den gegebenen Versuchsbedingungen (Kap. 2.5.5.) ebenfalls zum Zerplatzen gebracht und wahrscheinlich gemeinsam mit den Zellmembranen isoliert wurde (Schmidt und Tashiro, unveröffentlichte Ergebnisse).

Da nach dem Schocken mit Wasser im Mittel 14.8 % des Proteingehaltes der Fraktion der Nervenendigungen in der mit Zellmembranen angereicherten Fraktion (abzüglich der Verunreinigung durch Mitochondrien, vgl. Kap. 3.1.3.6.) wiedergewonnen wurden, entsprechen die in ihr gemessenen 574 nmol Ca / mg Membranprotein ($0.148 \times 574 =$) 85 nmol Ca / mg Protein der Nervenendigungen. Von den 262 nmol Ca / mg Protein in der Fraktion der Nervenendigungen (Kap. 3.1.3.5.) sind also 68 % ($= \frac{262 - 85}{262}$) den Mitochondrien zuzuordnen. Dieser Wert entspricht einem mitochondrialen Calciumgehalt von 8.4 $\mu\text{mol} / \text{IU}$ Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität (Mitochondrienfraktion: 12.8). Da sich die Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität der Präparationsvorstufe P_2 im Verhältnis 2 zu 5 auf die Fraktionen der Nervenendigungen und der Mitochondrien verteilt (vgl. Abb. 13, S. 68), kann für den Bodensatz P_2 ein mittlerer auf das Leitenzym bezogener Gehalt von $((2 \times 8.4 + 5 \times 12.8) / 7 =)$ 11.5 μmol mitochondriales Ca / IU Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität berechnet werden. Nimmt man - in einer notwendigerweise groben - Näherung an, daß die Mitochondrien in allen anderen Präparationsvorstufen den gleichen durchschnittlichen Calciumgehalt aufweisen, dann kann mit Hilfe der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivitäten in der Tabelle 2 (S. 60) die Gesamtmenge des mitochondrialen Calciums abgeschätzt werden (dabei wird die Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität der Fraktion $P_{1G}P_1$, die aus methodischen Gründen schwierig zu bestimmen ist, durch die Enzymaktivität der Fraktion P_1 approximiert). Die Rechnung ergibt, daß in den Fraktionen P_1 , P_2 , P_3 und S_3 zusammen 2.53 μmol mitochondriales Calcium je g Gewebe vorliegen. Das sind 94.8 % des gesamten Calciumgehaltes im elektrischen Organ. Wegen der notwendigen Ab-

schätzungen kann dieser Wert nur als grobe Näherung betrachtet werden. Er vermittelt jedoch einen Eindruck von der Bedeutung der Mitochondrien im Calciumstoffwechsel des elektrischen Gewebes.

Insgesamt wurden nach der subzellulären Fraktionierung 82 % der Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität wiedergefunden, 33 % in der vorgereinigten Mitochondrienfraktion, P_2 , und 16 % der gesamten Aktivität in der Mitochondrienfraktion der Dichtegradienten (vgl. Tab. 2, S. 60 und Abb. 13, S. 68). Die entsprechenden Ausbeuten für das Calcium betragen 98 %, 40 % und 17 % (die etwas höheren Ausbeuten für das Erdalkalimetall erklären sich durch die Labilität des mitochondrialen Leitenzyms und, in der Fraktion P_2 , durch die Anwesenheit von Calcium-haltigen Membranen). Die Ausbeute und Verteilung der Cytochrom-c-Oxydase und die Ausbeute des Calciums änderten sich nicht durch die elektrische Stimulierung des Gewebes.

4.4. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien infolge elektrischer Reizung

Bei elektrischer Reizung des Gewebes mit 5000 Impulsen (5 Hz) werden 77 % des mitochondrialen Calciums freigesetzt. Das ausgeschüttete Calcium konnte in den Cytoplasma-reichen Fraktionen der Differentialzentrifugationen wiedergewonnen werden. Durch Reizung mit unterschiedlich vielen Stimuli wurde gezeigt, daß das Ausmaß der Calciumausschüttung aus den Mitochondrien sowohl der relativen Abnahme der Organantwort als auch dem Abfall des Acetylcholin gehaltes in der Fraktion der isolierten Nervenendigungen proportional ist. Die kovariante Veränderung des elektrophysiologischen Parameters und der beiden biochemischen Meßgrößen in zwei verschiedenen subzellulären Fraktionen weist darauf hin, daß die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien und die cholinerge

Erregungsübertragung miteinander in engem Zusammenhang stehen.

Die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien war weniger deutlich ausgeprägt, wenn ungefrorenes Gewebe zur Präparation verwendet wurde, weil unter diesen Bedingungen nur ein Bruchteil der Mitochondrien in der sogenannten vorgereinigten Mitochondrienfraktion (crude mitochondrial fraction, P_2) angereichert war. Ähnlich wie für andere subzelluläre Organellen (synaptische Vesikel) scheint auch für die Mitochondrien das Einfrieren des elektrischen Gewebes die Methode der Wahl zu sein, um die Zellmembranen aufzubrechen.

Die beobachtete Calciumfreisetzung kann nicht durch eine artifizielle Umverteilung der Mitochondrien infolge der Stimulierung erklärt werden, da sich der Calciumgehalt nicht nur absolut, sondern auch relativ zum Proteingehalt und zur Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität im selben Ausmaß verminderte. Auch war die Calciumausschüttung spezifisch für dieses Erdalkalimetall, denn der Magnesium-, Kalium- und Natriumgehalt der vorgereinigten Mitochondrienfraktion änderten sich bei der elektrischen Reizung nicht (Tabelle 8, S. 85).

4.5. Zum Calciumstoffwechsel der Elektroplaquezellen

Die Elektroplaquezellen stammen embryonal von der Branchialmuskulatur ab. Abgesehen von ihren markanten Mitochondrien, erscheinen sie elektronenoptisch als leer. Ein endoplasmatisches Retikulum ist in diesen Zellen kaum entwickelt (Abb. 22, S. 93; vgl. auch Whittaker und Zimmermann, 1976). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß das Calcium der Elektroplaquezellen in Mitochondrien gespeichert wird.

Die biochemische Analyse der Leitenzyme allein erlaubt

nicht, zu entscheiden, ob in der Mitochondrienfraktion der Dichtegradienten die prä- oder postsynaptischen Mitochondrien isoliert wurden, oder ob beide Mitochondrienpopulationen in der Fraktion enthalten waren. Auch eine Zuordnung der Calciumfreisetzung zu den Mitochondrien der Nervenendigungen oder/und der Elektroplaquezellen ist daher nicht direkt möglich.

Um zwischen den Alternativen zu unterscheiden, wurde das elektrische Gewebe mit d-Tubocurarin perfundiert, bis die Organantwort auf einzelne Testimpulse auf 4 % (in vitro) bzw. 7 % (in situ) der Ausgangsamplitude abgefallen war. Anschließend wurde das Gewebe mit 5000 Impulsen (5 Hz) repetitiv gereizt. Bei Applikation von Curare war der Abfall im Calciumgehalt der Mitochondrienfraktion von 77 % auf 40 % (in situ) beziehungsweise von 69 % auf 24 % (in vitro) erniedrigt. Da die Transmitterfreisetzung durch das Pharmakon nicht beeinträchtigt war, zeigt die Verminderung der Calciumfreisetzung an, daß etwa die Hälfte bis zwei Drittel der isolierten Mitochondrien postsynaptischen Ursprungs sind.

Ob der Calciumfreisetzung aus den postsynaptischen Mitochondrien eine spezifische Funktion im elektrischen Gewebe zukommt, bleibt unbekannt. Chang und Neumann (1976) haben über einen hohen Calciumgehalt des isolierten Acetylcholin-Rezeptors von *Torpedo californica* und *Electrophorus electricus* berichtet. Die Acetylcholinbindung an den isolierten Rezeptor führt zur teilweisen Ablösung des Calciums, und sie wird durch Calcium gehemmt. Es liegt jedoch keine einfache kompetitive Hemmung durch Bindung an ein einziges aktives Bindungszentrum vor, da α -Bungarotoxin, das die Acetylcholinbindung an den Rezeptor hemmt, nicht ebenfalls zur Hemmung der Calciumbindung führt, sondern vielmehr eine Wiederaufnahme des durch Acetylcholin verdrängten Calciums induziert. Es ist möglich, daß das aus den Mitochondrien

ausgeschüttete Calcium einen regulatorischen Effekt ausübt, indem es eine bestimmte Konformation des Acetylcholin-Rezeptors stabilisiert, und damit das Ausmaß der Acetylcholinbindung einschränkt (vgl. Schmidt und Raftery, 1974). Eine Beeinflussung der Aktivierbarkeit des Acetylcholin-Rezeptors durch Calcium und andere mehrwertige Metallkationen wurde auch an der neuro-muskulären Endplatte nachgewiesen (vgl. Jenkinson, 1960; Lambert und Parsons, 1970).

Eine weitere Möglichkeit ist, daß das postsynaptisch ausgeschüttete Calcium die Elektroplaquezelle verläßt und als trophischer Faktor auf die Nervenendigung rückwirkt. Der erhöhte Calciumeinstrom in den synaptischen Endknopf könnte so die Transmitterfreisetzung verstärken. Wegen der relativ großen Diffusionswege kommt dieser Reaktionsmechanismus nur für mittel- und langfristige Wirkungen in Frage. Ein retrograder Calcium-Transfer von den postsynaptischen in die präsynaptischen Axone der Riesensynapse von *Loligo* wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen im Anschluß an die iontophoretische Injektion von Calciumionen in das postsynaptische Axon nahegelegt (Martin und Miledi, 1978).

Schließlich ist es denkbar, daß es sich bei der Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der Elektroplaquezellen um eine reine Reminiszenz des Muskelgewebes handelt. Sowohl für die Skelett- und Herzmuskulatur (vgl. Kap. 1.1.1.) als auch für die glatte Muskulatur (Batra, 1975; Deth und van Breemen, 1977) wurde eine Beteiligung der Mitochondrien an der Regulation der cytoplasmatischen Calciumkonzentration diskutiert. Ein direkter Nachweis für die Freisetzung von Calciumionen aus den Mitochondrien konnte allerdings nicht erbracht werden. Mögliche Mechanismen der Calciumaufnahme in die Mitochondrien, die präferentiell zur oxydativen Phosphorylierung stattfindet, werden bei Lehninger et al. (1967) besprochen. Kürzlich

wurde auch die Isolierung eines Calcium-Trägermoleküls aus der inneren Mitochondrienmembran des Herzmuskels beschrieben (Jeng et al., 1978).

Im Zusammenhang mit Untersuchungen, in denen auch eine präsynaptische Wirkung von d-Tubocurarin vermutet wurde (vgl. del Castillo und Anderson, 1974), sei erwähnt, daß in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf einen signifikanten Einfluß des Pharmakons auf den Acetylcholingehalt der Nervenendigungen "vor" oder nach elektrischer Reizung beobachtet wurde (Tab. 9, S. 98).

4.6. Der Calciumstoffwechsel der Nervenendigungen

4.6.1. Mitochondrien

4.6.1.1. Calciumausschüttung in Gegenwart von d-Tubocurarin

Auch unter Bedingungen, unter denen die Organantwort durch d-Tubocurarin zu 93 bis 96 % unterdrückt war, konnte die stimulationsbedingte Calciumausschüttung aus den Mitochondrien nicht vollständig, sondern nur von 77 % auf 40 % (in situ), bzw. von 69 % auf 24 % (in vitro) reduziert werden (die Meßwerte für die Calcium- und Acetylcholinausschüttung fallen in den in vitro Versuchen stets etwas niedriger aus, wenn die zur Isolierung der Mitochondrien und Nervenendigungen verwendeten Gewebeproben nicht vollständig deckungsgleich mit dem Innervationsbereich des gereizten zuführenden Nerven sind). Da das Ausmaß der Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien der relativen Abnahme der Organantwort proportional ist, kann der unbeeinflusste Anteil der Calciumfreisetzung nicht durch die wenigen (ca. 5 %) unblockierten Elektroplaquezellen erklärt werden. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß die in Gegenwart von Curare beobachtete Calciumausschüttung aus den Mitochondrien der Nervenendigungen erfolgt. Es wurde berechnet (Kap. 3.2.2.4.); daß 43 % (in situ), bzw. 28 % (in vitro) des Calciumabfalls

in der Mitochondrienfraktion präsynaptischen Mitochondrien zuzuschreiben ist, die offenbar aus aufgebrochenen Nervenendigungen stammen und gemeinsam mit den postsynaptischen Mitochondrien sedimentieren.

Der Abfall im Calciumgehalt der präsynaptischen Mitochondrien infolge der elektrischen Reizung war in der Fraktion isolierter Nervenendigungen nicht zu beobachten (Kap. 3.2.3.), da die in dieser Fraktion enthaltenen Mitochondrien im Inneren der membranumschlossenen Nervenendigungen vorliegen und das Calcium wahrscheinlich an das terminale Cytoplasma abgeben. Diese Konstanz im Calciumgehalt der Fraktion der Nervenendigungen stützt die Auffassung, daß die erhöhte Calciumpermeabilität der Nervenzellmembran das Aktionspotential nicht lange überdauert.

Durch Auswertung elektronenmikroskopischer Dünnschnitte (Kap. 3.2.2.5.) wurde gezeigt, daß die präsynaptischen Mitochondrien etwa 30 % zum gesamten mitochondrialen Volumen des elektrischen Gewebes beitragen. Ein Vergleich mit den oben besprochenen biochemischen Daten legt nahe, daß die prä- und postsynaptischen Mitochondrien etwa mit gleicher Ausbeute in der Mitochondrienfraktion angereichert werden.

4.6.1.2. Interpretation der morphologischen Befunde

Die Technik zur Fixierung in Calcium-haltigen Fixierungslösungen nach Oschman und Wall (1972) wurde angewendet, um zu überprüfen, ob sich die biochemisch festgestellten Veränderungen im Calciumgehalt der Mitochondrien auch ultrastrukturell erfassen und zuordnen lassen. Bei unstimuliertem Kontrollgewebe wurde das gleiche ultrastrukturelle Bild erhalten wie mit der üblichen Fixierungsmethode nach Karnovsky (1965). Auch die Perfusion des elektrischen Gewebes mit einer physiologischen Salzlösung (modifiziert nach Israël und Tuček, 1974) änderte

nicht das morphologische Bild der Mitochondrien. Sowohl die präsynaptischen als auch die postsynaptischen Mitochondrien waren frei von elektronendichten Ablagerungen, während viele synaptische Vesikel ein elektronendichtes Granulum enthielten, wie es bereits früher für die cholinergen Vesikel der elektrischen Organe von *Narcine brasiliensis* (Bohan et al., 1973; Boyne et al., 1974) und *Torpedo marmorata* (Zimmermann und Whittaker, 1974a; Gautron und Blondet, 1978) und der neuromuskulären Endplatte des Frosches (Politoff et al., 1974) gezeigt worden ist. Durch Kombination der Röntgenfluoreszenzanalyse mit ultrastrukturellen Methoden wurde ein hoher Calciumgehalt auch in den Serotonin-haltigen Granula der Blutplättchen des Menschen (Martin et al., 1974) und in neurosekretorischen Vesikeln aus verschiedenen Versuchstieren nachgewiesen (Joó et al., 1977; Normann und Hall, 1978).

Nach elektrischer Reizung waren in den Mitochondrien des elektrischen Organs von *Torpedo* ausgeprägte elektronendichte Granula zu erkennen. Wenn die gereizten Gewebelöcher mit d-Tubocurarin perfundiert worden waren, wurden diese Ablagerungen ausschließlich in den präsynaptischen Mitochondrien beobachtet.

Derartige elektronendichte Ablagerungen wurden auch in den Mitochondrien der Krötenblase (in situ und in isolierten Zellen), und in isolierten Mitochondrien der Rattenniere nach Inkubation in Calcium-haltigen Medien (Peachey, 1964) und nach Perfusion des Gewebes mit hohen Calciumkonzentrationen oder Präinkubation mit Oxalat in der Herzmuskulatur des Säugers (Legato et al., 1968; Diculescu et al., 1971) beschrieben. Greenawalt et al. (1964) wiesen nach, daß die Größe der elektronendichten Ablagerungen vom Ausmaß der "Beladung" mit Calcium und Phosphat abhängt (vgl. auch Brierley und Slautterback, 1964), und daß die Mitochondrien der Rattenleber ihre

dichte, und folglich ihr Sedimentationsverhalten, ändern, wenn sich in ihnen Calciumphosphat-Ablagerungen bilden. Um Artefakte durch unterschiedliche Sedimentationskoeffizienten der Calcium-reichen und -armen Mitochondrien auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Calciumwerte sowohl auf den Proteingehalt der jeweiligen Fraktion als auch auf das mitochondriale Leitenzym Cytochrom-c-Oxydase bezogen. Greenawalt et al. (1964) berichten auch, daß 23% ihrer Mitochondrienpopulation keine Fähigkeit zur Calciumakkumulation besaßen. Es mag ein reiner Zufall sein, daß ebenfalls 23% des Calciumgehaltes der Mitochondrienfraktion von *Torpedo* durch die elektrische Reizung nicht freigesetzt wurden. Ebenso wie von anderen Autoren (Greenawalt et al., 1964; Yates und Yates, 1968) wurde auch in der vorliegenden Untersuchung im Zentrum der Calciumablagerungen in den präsynaptischen Mitochondrien oft ein weniger elektronendichter Bereich beobachtet (vgl. Abb. 24, S. 96), während die Granula der postsynaptischen Mitochondrien (Abb. 26, S. 97) eher den von Greenawalt et al. (1964) beschriebenen "normalen" Granula gleichen. Calciumablagerungen wurden auch in den Mitochondrien der Rattenleber nach Vergiftung mit Tetrachlormethan (Reynolds, 1965) und interessanterweise nach Injektion von Strychnin in den Mitochondrien der Motoneurone im Rückenmark der Ratte (Yates und Yates, 1968) nachgewiesen. Strychnin wirkt am Motoneuron wahrscheinlich über eine Blockierung der postsynaptischen Inhibition durch Glycin (vgl. Burgen und Mitchell, 1972).

Eine methodische Verbesserung wurde 1972 von Oschman und Wall durch eine Fixierungstechnik mit Calcium-haltigen Fixierungslösungen eingeführt (vgl. auch Sampson et al., 1970), mit der Calciumablagerungen an Zellmembranen des Riesenaxons der Tintenschnecke (Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974) und anderer Gewebe nachgewiesen wurden. In den Mitochondrien des oberen Cervikalganglions der Katze (Parducz und Joó, 1976) und der

isolierten Synaptosomenfraktion aus dem Großhirnkortex der Ratte (Párducz et al., 1977) konnten die Calciumablagerungen nur nach vorangegangener elektrischer Reizung oder nach Stimulierung mit erhöhten Kaliumchlorid-Konzentrationen beobachtet werden. Daß es sich bei den elektronendichten Ablagerungen tatsächlich um Calciumphosphate handelt, wurde von mehreren Autoren durch Analyse des Röntgenfluoreszenzspektrums belegt, das beim Beschuß einer kleinen Probesträche des Schnittes mit dem gebündelten Elektronenstrahl erhalten wird (Diculescu et al., 1971; Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974; Hall, 1975; Párducz und Joó, 1976).

Obwohl elektronendichte Calciumphosphat-Ablagerungen von vielen Autoren in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden sind, konnten bisher weder die Voraussetzungen für ihr Auftreten noch ihre eventuelle physiologische Funktion aufgeklärt werden. Für die cholinergen Vesikel wurde eine Bindung der Calciumionen an das ATP im Vesikellumen vorgeschlagen (Boyne et al., 1974, 1975), und für die Calciumbindung an die Membranen des Riesenaxons der Tintenschnecke wurde ein spezifisches Calcium bindendes Protein (Alemà et al., 1973, 1974) in Erwägung gezogen (Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974).

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß Calciumablagerungen gerade in denjenigen Mitochondrien beobachtet werden können, die - den biochemischen Untersuchungen zufolge - ihren Calciumgehalt zuvor verloren hatten. Es wird angenommen, daß diese Mitochondrien besonders große Mengen an Calcium aus der Fixierungslösung aufnehmen. Die Calciumaufnahme könnte über ein spezielles Trägermolekül erfolgen, das während der frühen Phasen der Fixierung noch teilweise funktionsfähig ist. Es ist auch möglich, daß ein Protein- oder Lipidbestandteil der Mitochondrienmatrix oder der Cristae eine besonders hohe Bindungskapazität für Calcium besitzt. Die bevor-

zugte Ablagerung von Calcium in den präsynaptischen Mitochondrien könnte auch eine erhöhte Calciumpermeabilität der Nervenzellmembranen nach tetanischer Reizung widerspiegeln. In jedem Fall bildet die vorangehende Stimulierung und Calciumfreisetzung eine notwendige Bedingung für die Ausbildung der Calciumgranula. Die bloße Gegenwart von Calciumionen im Fixativ ist hingegen ebenso wie die Injektion von Calcium in die Nervenendigung (Martin und Miledi, 1978) keine hinreichende Voraussetzung.

4.6.1.3. Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien und Kompartimentierung der Nervenendigung

Ebenso wie eine Vielzahl anderer sekretorischer Systeme (vgl. Kap. 1.1.2.1.) benötigen die cholinergen Nervenendigungen Calciumionen, um funktionsfähig zu bleiben (Harvey und MacIntosh, 1940). In der Einleitung zu dieser Arbeit (Kap. 1.1.2.2.) sind die wichtigsten experimentellen Befunde zusammengestellt, mit denen gezeigt worden ist, daß bei Aktivierung ein Calciumeinstrom (Hodgkin und Keynes, 1957) durch Natrium- und spezialisierte Calciumkanäle (Baker et al., 1971) in das Axon und in die isolierten Nervenendigungen (Blaustein und Wiesmann, 1970; Blaustein, 1975; Blaustein und Goldring, 1975; Blaustein und Oborn, 1975; Blaustein und Ector, 1976) stattfindet, der die Acetylcholinfreisetzung zur Folge hat (Miledi, 1973; Michaelson und Sokolovsky, 1978).

Es ist aber nicht der Calciumeinstrom als solcher, der die Transmitterausschüttung auslöst, sondern die erhöhte intraterminale Konzentration an freien Calciumionen (Miledi, 1973). Daher konnte auch durch Inhibitoren der Atmungskette, der oxydativen Phosphorylierung und der Calciumaufnahme in die Mitochondrien die spontane Acetylcholinfreisetzung aus der Nervenendigung verstärkt werden. Da die Calciumleitfähigkeit der Nervenzellmembran während des Aktionspotentials erhöht ist, kann die intra-

terminale Calciumkonzentration, und mit ihr zugleich die spontane Transmitterausschüttung, durch niederfrequente (0.09 bis 2 Hz) Reizung von Nerv-Muskel-Präparaten in Calcium-freier Lösung künstlich vermindert werden (Erulkar et al., 1978). Bei hochfrequenter Reizung (10 bis 100 Hz) wurde jedoch auch unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Miniaturendplattenpotentiale beobachtet (Erulkar und Rahamimoff, 1978). Durch dieses Ergebnis und weitere indirekte Befunde (Kap. 1.1.2.3.) wird nahegelegt, daß Calcium auch aus intrazellulären Quellen zur Verfügung gestellt werden kann.

Obwohl die Ausschüttung von Calciumionen aus den Mitochondrien und die Ablösung von Calciumionen von der Zellmembran für das cholinerge Neuron und verschiedene andere sekretorische Zellen wiederholt postuliert worden sind (Kap. 1.1.2.3.), konnte bisher für keine dieser Zellorganellen eine Calciumfreisetzung gezeigt werden. Dieser Nachweis wurde mit der vorliegenden Untersuchung für die Mitochondrien der cholinergen Neurone erbracht.

Es mag zunächst überraschen, daß die cholinerge Nervenendigung über mehrere Mechanismen, die cytoplasmatische Calciumkonzentration anzuheben, verfügt. Quantitative Untersuchungen (Llinás und Steinberg, 1977) verdeutlichen jedoch, daß der Calciumeinstrom in die Nervenendigung nur jene synaptischen Vesikel erreicht, die in unmittelbarer Nähe (ca. 150 nm) zu den aktiven Zonen der Transmitterfreisetzung (Couteaux und Pécot-Dechavassine, 1970) postiert sind. Es erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, daß die Calciumionen in der verfügbaren Zeit genügend weit diffundieren könnten, um jene Speichervesikel zu mobilisieren, die sich weiter im Innern des synaptischen Endknopfes befinden. Die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien während tetanischer Reizung könnte dazu beitragen, auch diese Vesikel zu aktivieren.

Die hervortretenden Ähnlichkeiten zwischen jenen sekre-

torischen Systemen, in denen das Sekret exocytotisch aus Speichergranula freigesetzt wird (Kap. 1.1.2.), lassen vermuten, daß durch eine Übertragung der hier verwendeten Untersuchungsmethoden auf andere sekretorische Systeme vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

4.6.1.4. Beziehung zu elektrophysiologischen Untersuchungen

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, daß die wiederholte Benutzung einer Synapse zu einer deutlichen Vergrößerung der synaptischen Potentiale und einer erhöhten Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale führt (synaptische Potenzierung). Dabei können vier Prozesse unterschieden werden, die sich in ihren Zeitkonstanten (in Klammern) unterscheiden: die schnelle Facilitation (~ 50 ms), die langsame Facilitation (~ 300 ms), die Augmentation (~ 7 s) und die Potenzierung (> 20 s), die nach einem Tetanus viele Minuten bis Stunden andauern kann.

Die schnelle Facilitation ist mit der Hypothese erklärt worden (Katz und Miledi, 1968), daß die während des Aktionspotentials einströmenden Calciumionen an der Innenseite der Nervenzellmembran ein Reservoir von "aktivem Calcium" aufbauen, das die quantenhafte Acetylcholinausschüttung potenziert. Die Tatsache, daß die Facilitation die Freisetzungsperiode um mehr als das Hundertfache überdauert, kann im Rahmen dieser Hypothese nur dadurch erklärt werden, daß eine nichtlineare Geschwindigkeitsgleichung für die Inaktivierung des Calciums postuliert wird. Außerdem weisen die Autoren darauf hin, daß eine geringe langsame Facilitation auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium beobachtet werden konnte.

Auch die posttetanische Potenzierung ist erst mit dem Einstrom von Natrium- (Birks und Cohen, 1968), dann mit dem von Calciumionen (Weinreich, 1971) aus dem Inkubationsmedium in die Nervenendigung erklärt worden. Die

von Weinreich erhobenen Daten legen nahe, daß die post-tetanische Potenzierung vom Metabolismus der Nervenendigung abhängig ist, ein Effekt, der der Natriumpumpe in der Zellmembran zugeschrieben wurde. Tetanische Reizung vermag aber auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium die posttetanische Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale zu erhöhen (Miledi und Thies, 1971; Erulkar und Rahamimoff, 1978). Für die Augmentation (Magleby und Zengel, 1976) ist kein molekularer Mechanismus vorgeschlagen worden, aber die Ähnlichkeit mit der Facilitation und der Potenzierung legen nahe, daß auch dieses Phänomen durch Calciumionen ausgelöst wird.

Es wird vorgeschlagen, daß die in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zu beobachtende Facilitation und posttetanische Potenzierung durch Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien erklärt werden kann, da sie die Ablösung der Calciumionen von der plasmatischen Seite der Nervenzellmembran verhindert.

4.6.2. Nervenzellmembranen

Auch die Plasmamembran cholinergischer Neurone (z.B.: Statham und Duncan, 1976) und anderer sekretorischer Zellen (z.B. Nebennierenmark: Douglas und Rubin, 1961, siehe auch Douglas, 1975a; exokrines Pankreas: Matthews et al., 1973; Petersen und Ueda, 1975; Kondo und Schulz, 1976; Speicheldrüsen: Berridge et al., 1975; Mastzellen: Douglas, 1975b; Cochrane und Douglas, 1976; Leukocyten: Romero et al., 1975) ist als intrazelluläre Calciumquelle in Erwägung gezogen worden, ohne daß bisher eine Calciumablösung von der Zellmembran direkt nachgewiesen werden konnte. Insbesondere wird vermutet, daß die Ablösung von Calciumionen von der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran die Ionenpermeabilität der Membran erhöht (vgl. Douglas, 1975a). Es war deshalb im Rahmen der vor-

liegenden Untersuchung von Interesse, ob in Zellmembranreichen Fraktionen aus dem elektrischen Organ von Torpedo Hinweise auf eine stimulationsbedingte Calciumablösung gewonnen werden können.

Obwohl keine genauen, quantitativen Angaben zur Reinheit der Fraktion gemacht werden können, die an der Grenzfläche zwischen 0.8 und 1.3-molarer Saccharose erhalten wurde, legen die im Kapitel 3.1.3.6. erhobenen Befunde (vgl. auch Abb. 8, S. 39) nahe, daß sie stark mit Nervenzellmembranen angereichert war. Nach elektrischer Reizung des Gewebes wurde nur eine geringfügige Verminderung im Calciumgehalt dieser Fraktion verzeichnet. Allerdings wird durch dieses Ergebnis die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß kleinere spezialisierte Bereiche der Nervenzellmembran einen aktiveren Calciumstoffwechsel besitzen.

Calciumablagerungen wurden an der Zellmembran des Axons und den Nervenendigungen cholinergischer Neurone in morphologischen Studien von verschiedenen Autoren beschrieben (z.B.: Sampson et al., 1970; Hillman und Llinás, 1974; Oschman et al., 1974; Martin und Miledi, 1978).

Der hohe Calciumgehalt (574 nmol / mg Protein) der mit Nervenzellmembranen angereicherten Fraktion aus dem elektrischen Organ von Torpedo ist auch deshalb bemerkenswert, weil Davis und Bloom (1973), die verschiedene Methoden zur Isolierung synaptischer Membrankomplexe (synaptic junctional complexes) verglichen haben, berichten, daß sich die Gegenwart von Calciumionen während der Isolierung stabilisierend auf die Ultrastruktur der Membranen auswirkt, ein Einfluß, der zuvor auch schon von Cotman et al. (1971) erwähnt wurde.

Es wurde diskutiert, daß das einlaufende Aktionspotential in elektrisch erregbaren Geweben die Membranpermeabilität

für Natrium- und Calciumionen erhöhen könnte, indem das membrangebundene Calcium, das dehydratisierend wirkt (Manery, 1966), abgegeben (Abood, 1966) und die Membran hydrophiler wird (Watanabe und Tasaki, 1971; Madeira und Antunes-Madeira, 1973). Als Ursache für die Veränderungen in den Membraneigenschaften wurden Konformationsänderungen von Makromolekülen (Watanabe und Tasaki, 1971), eventuell Glykoproteinen (Madeira und Antunes-Madeira, 1973), und auch Wechselwirkungen des Calciums mit sauren Phospholipiden (Papahadjopoulos, 1968; vgl. auch den Übersichtsartikel von Triggle, 1972) oder Peptidsequenzen in Erwägung gezogen.

4.6.3. Synaptische Vesikel

Bei der Isolierung von synaptischen Vesikeln aus Nervengewebe kann nur ein Teil des im Gewebe vorliegenden Acetylcholins in der Vesikelfraktion wiedergefunden werden (sog. stabil gebundenes Acetylcholin, Whittaker et al., 1964). Das restliche Acetylcholin wird während der Homogenisierung und Isolierung von der im Zellextrakt reichlich vorhandenen Acetylcholinesterase hydrolysiert (sog. labil gebundenes Acetylcholin). Die Menge an sog. labil gebundenem Acetylcholin errechnet sich ausschließlich aus der Differenz zwischen dem Gesamtgehalt des Gewebes und derjenigen Acetylcholinmenge, die nach der Fraktionierung des Gewebes in den synaptischen Vesikeln wiedergefunden wird. Eine Zuordnung des sog. labil gebundenen Acetylcholins zu einem bestimmten Zellkompartiment ist bis jetzt nicht möglich gewesen. Trotzdem war die Frage, ob das Acetylcholin bei der cholinergen Erregungsübertragung unmittelbar aus den Speichervesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird ("Vesikelhypothese") oder ob das sog. labil gebundene Acetylcholin als unmittelbare Quelle für das freigesetzte Acetylcholin anzusehen sei, Gegenstand zahlreicher Kontroversen (für eine gründliche Diskussion der unterschiedlichen Standpunkte ist der Leser auf die folgenden Arbeiten verwiesen:

Collier, 1969; Marchbank und Israël, 1971, 1972; Chakrin et al., 1972; Dunant et al., 1974; Zimmermann und Whittaker, 1974a; Dunant et al., 1976; Zimmermann, 1976; Israël et al., 1977; Zimmermann und Denston, 1977b; Boyne, 1978; Suszkiw, 1978).

In der jüngsten Vergangenheit ist von Zimmermann und Mitarbeitern gezeigt worden, daß die synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo nicht homogen sind, sondern daß sie eine metabolisch besonders aktive Subpopulation enthalten, die einen oder mehrere Zyklen der Entladung und Wiederaufnahme von Acetylcholin durchläuft und die durch Zonal-Dichtegradientenzentrifugation von metabolisch weniger aktiven synaptischen Vesikeln abgetrennt werden kann (vgl. Kap. 1.3.). Der Metallgehalt der verschiedenen Vesikelpopulationen konnte mit den verfügbaren Untersuchungsmethoden nicht getrennt analysiert werden, da in den Vesikelfraktionen von Zonal-Dichtegradienten die Nachweisgrenzen der Atomabsorptionsspektralphotometrie unterschritten werden. Versuche zur Auftrennung synaptischer Vesikel in verschiedene Subpopulationen auf Dichtegradienten in Ausschwingrotoren führten zu unbefriedigenden Separierungen (Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). In der vorliegenden Arbeit konnten daher nur Vesikelfraktionen untersucht werden, die Beiträge von den verschiedenen Vesikelpopulationen beinhalten. Durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen konnten jedoch Vesikelfraktionen isoliert werden, die entweder ganz überwiegend jene größeren Vesikel "vor" der exocytotischen Transmitterausschüttung (Kontrollgewebe) oder jene synaptischen Vesikel enthielten, die nach repetitiver Reizung des Gewebes (5000 Impulse, 5 Hz) auftreten (vgl. Zimmermann und Whittaker, 1974a; Suszkiw et al., 1978). In der zuletzt genannten Vesikelpopulation ist der Acetylcholin- und ATP-Gehalt auf etwa 5 % des Kontrollwertes abgesunken (Kap. 3.2.5.).

4.6.3.1. Metallionengehalt

Die Bestimmung so kleiner Metallionenkonzentrationen, wie sie in der Fraktion isolierter synaptischer Vesikel vorliegen, bereitet experimentelle Schwierigkeiten (vgl. Kap. 3.1.3.7.). Ein Vergleich der Verteilung der Leit-substanzen der cholinergen synaptischen Vesikel und verschiedener Metallkationen auf die Fraktionen der Dichtegradienten zeigt jedoch, daß sich ein Teil der Metalle gemeinsam mit den synaptischen Vesikeln an der Grenzfläche zwischen der 0.15 und 0.4-molaren Saccharose anreichert. Da der auf Acetylcholin bezogene Metallgehalt gegenüber kleineren Variationen in der Präparationsmethodik (Volumen der 0.15-molaren Saccharoseschicht, Zentrifugationszeit, Glycin- bzw. NaCl-Lösungen als Präparationsmedien) weitgehend invariant ist, kann angenommen werden, daß die in der Vesikelfraktion gemessenen Metallionen tatsächlich im Innern der Vesikel oder an die Vesikeloberfläche gebunden vorliegen. Für das Natrium muß allerdings wegen des großen Überschusses an diesem Metall im elektrischen Gewebe eine Kontamination durch frei gelöste Natriumionen in Rechnung gestellt werden (Kap. 3.1.3.8.). Auch der Calciumionengehalt der Vesikelfraktion kann nur dann ermittelt werden, wenn berücksichtigt wird, daß die auf die Dichtegradienten aufgetragene vorgereinigte Vesikelfraktion P_3^+ noch Mitochondrien enthält, die zwar in dichtere Fraktionen des Gradienten sedimentieren, aber während des Zentrifugierens einen Teil ihres großen Calciumgehaltes abgeben können, der dann die Meßwerte in der Vesikelfraktion verfälschen würde. Wenn Mitochondrien aus dem elektrischen Organ von Torpedo Natriumchloridlösungen ausgesetzt werden, verlieren sie den überwiegenden Teil ihres Calciumgehaltes (Kap. 3.3.1.), so daß auch bei einer Präparation von synaptischen Vesikeln in NaCl-Lösungen keine wesentliche Kontamination mit Calciumionen, die sich während des Zentrifugierens auf dem Dichtegradienten von den Mitochondrien ablösen, befürchtet zu werden braucht. Der

Einwand, daß sich auch die vesikulären Calciumionen durch Präparation in NaCl-Lösungen ablösen könnten, wird andererseits durch Experimente zur Inkubation von Vesikeln in NaCl-Lösungen entkräftet (Kap. 3.3.2.).

Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren kann somit ein Bild von der stöchiometrischen Ionenzusammensetzung der cholinergen synaptischen Vesikel entworfen werden. Pro Acetylcholinmolekel sind an die cholinergen Vesikel folgende Mengen an Ionen gebunden: Natrium - 0.30, Kalium - 0.10, Magnesium - 0.07, Calcium - 0.28, ATP - 0.22. Zwei Fragen müssen diskutiert werden:

1. Lassen die Meßwerte der Vesikelfraktion in vitro Rückschlüsse auf die Ionenzusammensetzung der synaptischen Vesikel in situ zu, oder spiegeln sie lediglich die artifizielle Zusammensetzung der Präparationslösung wieder?
2. Kann unterschieden werden, ob die Metallionen im Lumen der Vesikel oder an deren Oberfläche gebunden vorliegen?

1. a) Wenn Lithiumionen, die natürlicherweise nicht im elektrischen Gewebe auftreten, zum ersten Überstand der Differentialzentrifugationen zugesetzt werden, wird von ihnen ein vergleichbarer Prozentsatz in der Vesikelfraktion wiedergefunden wie von den anderen Alkalimetallen; dagegen ist dieser Prozentsatz um einen Faktor 3, beziehungsweise 30 niedriger als derjenige des Magnesiums beziehungsweise Calciums (Kap. 3.1.3.8.). b) Werden isolierte synaptische Vesikel in Lösungen inkubiert, die einen Natriumgehalt aufweisen, der der Konzentration an freien Natriumionen im Zellhomogenat vergleichbar ist, so verlieren sie ca. 40 % ihres Kaliums und binden Natriumionen. Der Erdalkalimetallgehalt ändert sich unter diesen Bedingungen nicht (Kap. 3.3.2.). Bei Inkubation synaptischer Vesikel in Calciumchloridlösungen, deren Calciumgehalt der freien Calciumionenkonzentration im Zell-

homogenat entsprach, konnten ebenfalls keine Veränderungen im Ionengehalt der synaptischen Vesikel festgestellt werden. Auch der Acetylcholin- und ATP-Gehalt war gegenüber kurzfristigen Calciumchloridinkubationen invariant (Kap. 3.3.3.). c) Durch Millipore^R-Filtration der Vesikelfraktion werden zwei Drittel (Ca) oder mehr (Mg) der Erdalkalimetalle, aber nur ein Drittel (Na) oder weniger (K) der Alkalimetalle mit den Zellpartikeln auf dem Filter zurückgehalten (Kap. 3.1.3.8.). Die Stärke der Metallionenbindung an die synaptischen Vesikel legt eine Abhängigkeit vom Ionenpotential der Metalle nahe (vgl. Abb. 18, S. 81). Aus diesen Befunden (a bis c) wird geschlossen, daß die Erdalkalimetalle fest gebundene Bestandteile der cholinergen Vesikel sind, während die Alkalimetalle unter den Bedingungen der Präparation von den synaptischen Vesikeln aufgenommen und auch abgegeben werden können. Insbesondere kann ein Teil des Kaliums gegen Natrium ausgetauscht werden. Daß auch ein Bruchteil der Alkalimetalle fester an die Vesikel gebunden sein könnte, kann mit den erhobenen Daten nicht ausgeschlossen werden.

2. Zwischen einer Bindung der Metallionen an die äußere Oberfläche der synaptischen Vesikel und einem Einschluß in das Lumen dieser Zellorganellen kann experimentell nur schwer entschieden werden. Es scheint möglich, daß die Erdalkalimetalle im Innern der Vesikel gebunden vorliegen und die Alkalimetalle lediglich an der Außenseite der Vesikelmembran haften. Durch Schocken der synaptischen Vesikel mit Wasser und anschließendes Abfiltrieren der zerplatzten Vesikelmembranen konnte gezeigt werden (Tab. 6, S. 80), daß die Bindung der Magnesium- und Natriumionen an die Strukturen des Filtrationsrückstands durch diese Behandlung gegenüber dem unmittelbaren Filtrieren der Vesikelfraktion nur wenig verändert wird (Kap. 3.1.3.8., Tab. 6, S. 80). Die Meßwerte der Tabelle 6 (Zeile 3 und 4) können so interpretiert

werden, daß ca. 29 % des Natriums und 96 % des Magnesiums aber nur 6 % des Kaliums und 17 % des Calciums an Membranstrukturen der Vesikelfraktion gebunden sind. 15 % des Kaliums und 49 % des Calciums aber nur 4 % des Natriums und 0 % des Magnesiums werden durch das Schocken mit Wasser von den cholinergen Vesikeln abgelöst, und lagen somit wahrscheinlich im Lumen der Vesikel vor. Die verbleibenden 79 % des Kaliums, 67 % des Natriums, 34 % des Calciums und 4 % des Magnesiums sind so locker an die Vesikel gebunden, daß sie schon bei einfacher Filtration (ohne Wasserschok) von den Zellstrukturen abgelöst werden. Es kann nicht entschieden werden, ob diese Ionen im Sog der Vakuumfiltration aus den Vesikeln hinausdiffundierten, oder ob sie durch die Waschlösung von der Vesikeloberfläche abgewaschen wurden. Es wird abschließend nochmals darauf hingewiesen, daß die Empfindlichkeit der Atomabsorptionsspektrophotometrie nicht ausreicht, um sicher zwischen verschiedenen intravesikulären Ionenkompartimenten zu unterscheiden. Eine endgültige Analyse dieser Fragestellung wird daher die Entwicklung effektiverer Anreicherungsverfahren für die synaptischen Vesikel oder die Entwicklung empfindlicherer analytischer Methoden abwarten müssen. Erfolgversprechend würden hochauflösende ultrastrukturelle Methoden erscheinen, die eine spezifische Lokalisation von Metallionen ermöglichen.

Der Beitrag der Metallkationen zur Osmolarität der Vesikelfraktion steht jedenfalls mit Abschätzungen zur Osmolarität der Körperflüssigkeiten von Rochen und Haien in Einklang, so daß die gemessenen Metallkationen von daher gesehen durchaus im Innern der Vesikel vorliegen könnten (vgl. Kap. 3.1.3.8.). Eine Abschätzung der elektrischen Ladungsverhältnisse zeigt, daß den pro Acetylcholin kation (einschließlich der positiven Ladung des Acetylcholins) vorliegenden 2.10 (= 1.00 + 1 x 0.30 + 1 x 0.10 + 2 x 0.07 + 2 x 0.28) positiven Ladungen nur

0.77 (= 3.5×0.22) negative Ladungen des ATPs gegenüberstehen (dabei ist eine durchschnittliche negative Ladung des ATP-Moleküls von 3.5 angenommen worden, vgl. Lehninger, 1976). Der positive Ladungsüberschuß könnte durch freie anorganische Anionen, Lipide (Baker et al., 1975) und Proteine der Vesikelmembran oder durch das negativ geladene Glycosaminoglycan Vesikulin (Stadler und Whittaker, 1978) kompensiert sein.

4.6.3.2. Vergleich mit anderen Mikrosomenfraktionen

Andere quantitative Untersuchungen zum Metallionengehalt der cholinergen synaptischen Vesikel von Torpedo sind nicht bekannt. Carpenter und Parsons (1978) zeigten, daß die auf NaCl-haltigen Dichtegradienten isolierten synaptischen Vesikel von Torpedo californica ihren Natriumgehalt erst bei Zusatz eines Ionophors (Gramicidin) zum Natrium-armen Inkubationsmedium abgeben. Sie liefern auch Hinweise dafür, daß die durch Natriumabgabe bedingte Hyperpolarisation der Vesikelmembran (Innenseite negativ) durch anschließende spontane Cholin- oder Acetylcholin-aufnahme wieder rückgängig gemacht werden kann. Auch Suszkiw (1976) hat über einen Einfluß der Metallionenzusammensetzung auf die Beladung von leeren Vesikeln ("ghosts") mit Acetylcholin berichtet.

Angaben zum Metallgehalt einer (nicht transmitterspezifischen) mit Membranen verunreinigten Vesikelfraktion sind bei Hanig et al. (1972) zu finden: Diese auf ein Gramm Großhirnkortex des Kaninchens bezogenen Meßwerte sind zwar um einen Faktor 10 bis 35 höher als diejenigen der vorliegenden Untersuchung, aber Hanig et al. berichten auch über einen etwa 75-fach höheren Proteingehalt ihrer Vesikel- und Membran-haltigen Fraktion (bezogen auf 1 g Gewebe) und machen keinerlei Angaben zur Reinheit der untersuchten Fraktionen. Ross (1977) nennt einen Calciumgehalt der synaptischen Vesikel aus dem Gehirnkortex von Mäusen von 60 nmol / mg Protein,

der deutlich niedriger ist als derjenige der cholinergen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo (277 nmol Ca / mg Protein, diese Untersuchung). Bei einem Vergleich der Meßwerte sollte der unterschiedliche Durchmesser der cholinergen Vesikel aus Gehirngewebe und dem elektrischen Organ in Erwägung gezogen werden.

Unter den zahlreichen Studien, in denen über eine ATP- und/oder ATPase-abhängige Calciumaufnahme in eine Mikrosomenfraktion aus Nervengewebe berichtet und dieses Aufnahmesystem mit dem des sarkoplasmatischen Retikulums verglichen wird (z.B.: Otsuka et al., 1965; Yoshida et al., 1966; Robinson und Lust, 1968; de Meis et al., 1970; Diamond und Goldberg, 1971; Nakamura und Konishi, 1974; Trotta und de Meis, 1975; Russel und Thorn, 1975; Kendrick et al., 1977; Rahamimoff und Abramovitz, 1978a, 1978b), ist diejenige von Blitz et al. (1977) hervorzuheben: In dieser Arbeit wird eine weitgehende Analogie in der Zusammensetzung und den Eigenschaften von Fragmenten des sarkoplasmatischen Retikulums der Skelettmuskulatur einerseits und den mit einem vielflächigen Proteingerüst aus Clathrin (Pearse, 1975) umgebenen Vesikeln ("coated vesicles") andererseits beschrieben; letztere sind möglicherweise an dem endocytotischen Rezirkulieren vesikulärer Membranbestandteile (Heuser und Reese, 1973; Fried und Blaustein, 1976) beteiligt (Tanaka et al., 1976). Die Interpretation der älteren und einiger der neueren Arbeiten (Kendrick et al., 1977; Rahamimoff und Abramovitz, 1978a, 1978b) wird dadurch erschwert, daß die untersuchten Zellfraktionen biochemisch nur ungenügend charakterisiert wurden.

Für verschiedene sekretorische Granula ist eine geringe Austauschbarkeit des Calciums (Neurohypophyse: Russel und Thorn, 1975; exokrines Pankreas: Clemente und Meldolesi, 1975) beziehungsweise eine geringe Membranpermeabilität für Wasserstoff-, Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium-

und Mangan(II)ionen (Rindernebenniere: Johnson und Scarpa, 1976) nachgewiesen worden.

4.6.3.3. Metallionenaufnahme infolge Nervenaktivität

Es ist vermutet worden, daß die Ausschüttung des cholinergen (Whittaker, 1973) und anderer Transmitter (Uvnäs, 1973) im Ionenaustausch gegen Metallkationen erfolgt, die über sich öffnende Poren in die synaptischen Vesikel aufgenommen werden könnten, wenn die Vesikel bei der Exocytose mit der Zellmembran der Nervenendigung verschmelzen. Kürzlich ist die exocytotische Freisetzung des Acetylcholins im elektrischen Organ von Torpedo experimentell weitgehend bestätigt worden (vgl. Kap. 1.3.). Auch ein Rezirkulieren der Vesikel wurde in diesem ebenso wie in anderen Systemen nachgewiesen (Zimmermann und Denston, 1977a). Es war deshalb von Interesse, zu untersuchen, ob die synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo nach elektrischer Reizung einen höheren Metallionengehalt aufweisen.

Die Nachforschungen werden dadurch erschwert, daß die Zahl der synaptischen Vesikel nach repetitiver Reizung mit 5000 Impulsen (5 Hz) auf etwa die Hälfte abfällt (Zimmermann und Whittaker, 1974a), und die nach Stimulierung zu isolierende Gesamtpopulation an Vesikeln eine größere Kontamination mit nicht vesikulärem Protein aufweist (vgl. Zimmermann und Whittaker, 1974a; Suszkiw et al., 1978). Es wurde daher angenommen, daß die Gesamtmenge der Kationen der cholinergen Vesikel (Abb. 28, S. 105) das beste Maß für die relative Größe der Vesikelpopulationen "vor" und nach repetitiver Reizung des Gewebes bietet.

Es fällt auf, daß die Menge an Calcium- und Magnesiumionen nach elektrischer Reizung absolut, und relativ zur Gesamtmenge der vesikulären Kationen, vergrößert ist. Wegen der bereits oben (Kap. 4.6.3.1.) diskutierten ge-

ringeren Bindungsstärke der Alkalimetalle an die synaptischen Vesikel kann allerdings nicht entschieden werden, ob an den synaptischen Vesikeln auch ein Ionenaustausch des Transmitters gegen Natrium- und Kaliumionen stattgefunden hat, der lediglich durch das nachträgliche Herausdiffundieren der Alkalimetalle während der Präparation der experimentellen Bestimmung nicht mehr zugänglich war. Daß nach der Ausschüttung der elektrisch positiv geladenen Transmittermolekeln eine höhere negative Ladungsdichte zur Bindung der Metallkationen in oder an den synaptischen Vesikeln zur Verfügung steht, wird auch durch die dem Ionenpotential folgende geringere Ablösung von Metallionen in die Waschlösung S_3^+ belegt (Abb. 29, S. 107).

Eine reizabhängige Zunahme der Calciumkonzentration wurde auch für die neutrophilen Leukocyten (Woodin und Wieneke, 1964) und später für die chromaffinen Granula bei extensiver Stimulierung von Gewebeexplantaten des Rinder-Nebennierenmarks (Borowitz, 1969; Serck-Hanssen und Christiansen, 1973) gezeigt. Borowitz berichtet zugleich von einer Magnesiumzunahme in der Adrenalin-reichen weniger dichten Granulafraktion (aber einer Magnesiumabnahme in der dichteren Noradrenalin-reichen Granulafraktion), während in den anderen Arbeiten kein Versuch unternommen wurde, die Ionenspezifität der Calciumaufnahme zu überprüfen. Kürzlich wurde auch die Aufnahme von ^{45}Ca in isolierte chromaffine Granula beschrieben (Kostron et al., 1977a).

Es ist vorgeschlagen worden (Serck-Hanssen und Christiansen, 1973; Borowitz et al., 1975; Winkler et al., 1975), daß die Calciumaufnahme in die sekretorischen Granula dazu dienen könnte, die während der Stimulierung des Gewebes angestiegene cytoplasmatische Calciumkonzentration wieder zu senken, indem Calcium gemeinsam mit dem Sekret exocytotisch ausgeschüttet wird (vgl. auch Selinger et al.,

1970; Ceccarelli et al., 1975). Andere Autoren haben darauf hingewiesen, daß Magnesium- und Calciumionen das scheinbare mittlere Molekulargewicht von ATP-Aggregationen mit biogenen Aminen erhöhen (Berneis et al., 1969), und daß Komplexe dieser Erdalkalimetalle mit ATP oder GTP biogene Amine inkorporieren (Berneis et al., 1971). Es wurde vorgeschlagen (Pletscher et al., 1973; vgl. auch Da Prada und Pletscher, 1974, bzgl. der Seronin-haltigen Speichergranula von Blutplättchen), daß ein derartiger passiver Bindungsmechanismus, zusätzlich zur aktiven Catecholaminaufnahme (Kirschner, 1962) und der durch ein Trägermolekül vermittelten ATP-Aufnahme (Kostron et al., 1977b) in die Vesikel, dazu beitragen könnte, die hohe Konzentration des Sekrets in den Speichergranula aufrechtzuerhalten.

4.7. Offene Fragen und Hypothesen zur Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung. - Ist Calcium ein "zweiter Überträgerstoff"?

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß cholinerge Nervenendigungen ihre cytoplasmatische Calciumkonzentration nicht nur durch den Calciumeinstrom während des Aktionspotentials, sondern auch durch intrazelluläre Calciumfreisetzung aus Mitochondrien erhöhen können.

Es ist im Rahmen dieser Studie nicht versucht worden, den Mechanismus der Calciumausschüttung aus den Mitochondrien aufzuklären. Es wurde jedoch gezeigt, daß Natriumionen, die während des Aktionspotentials in den synaptischen Endknopf einströmen, in der Lage sind, die Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien in vitro auszulösen (vgl. auch Drahotka et al., 1965; Dransfeld et al., 1967).

Allerdings setzen auch andere Alkalimetalle Calciumionen frei. Es wäre denkbar, daß die Ionenspezifität der mitochondrialen Calciumausschüttung während der Isolierung der Zellorganellen verloren gegangen ist. Ferner führt die depolarisierende Wirkung des Parasympathomimetikums

Carbachol zur Calciumfreisetzung sowohl aus den präsynaptischen als auch aus den postsynaptischen Mitochondrien (Kap. 3.2.2.7.). Es ist aber nicht klar, ob die Depolarisation selbst eine hinreichende Bedingung für die Calciumausschüttung aus den Mitochondrien darstellt.

Ein alternativer Freisetzungsmechanismus könnte auf der Einwirkung von cyclischem AMP auf die Mitochondrien beruhen. Die Bedeutung cyclischer Nucleotide für verschiedene sekretorische Systeme ist schon vor längerer Zeit betont worden (z.B.: Rasmussen, 1970; Prince et al., 1972; Borle, 1973; Nijjar und Pritchard, 1973). Berridge (1975) hat eine sehr gründliche Zusammenstellung der Literatur über die wechselseitigen Kontrollmechanismen der "zweiten Überträgerstoffe", Calcium, cyclisches AMP und cyclisches GMP, gegeben, so daß hier der Hinweis genügen soll, daß sie in den Nervenendigungen wahrscheinlich gleichsinnig regulativ ("monodirectional control") wirken.

Um die Calciumionen als "zweiten Überträgerstoff" in der cholinergen Nervenendigung bezeichnen zu können, müßte ihr direkter stimulierender Einfluß auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Acetylcholinausschüttung gezeigt werden. Als Nachweis für einen direkten stimulierenden Einfluß könnte man das bereits oben (Kap. 1.1.2.2.) beschriebene Experiment der Calciuminjektion in die Nervenendigung (Miledi, 1973) werten. Die molekulare Natur des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes ist hingegen unbekannt.

Für verschiedene sekretorische Systeme ist vorgeschlagen worden, daß die Calciumionen die elektrostatische Abstoßung zwischen negativen Ladungszentren in der Plasmamembran und der Vesikelmembran vermindern könnten (z.B.: Helle, 1973), aber mit dieser Vorstellung kann nicht er-

klärt werden, warum es dann nicht zu einer unspezifischen Fusion der Speichergranula untereinander kommt, und auch die Demonstration spezifischer Anlagerungszentren für die synaptischen Vesikel (z.B.: Akert et al., 1972; Pfenninger und Rovaien, 1974) bleibt unberücksichtigt. Andererseits könnten spezifische Wechselwirkungen mit aktiven Zentren in der Plasmamembran, die eine höhere Affinität zu Magnesiumionen haben, zu Konformationsänderungen führen, die die Sekretion ermöglichen. Die Unfähigkeit des Magnesiums, diese Konformationsänderungen einzuleiten, könnte dann zugleich seinen inhibitorischen Effekt erklären (Madeira und Antunes-Madeira, 1973).

Andere Autoren weisen auf die Gegenwart von ATP in der Plasmamembran hin und vermuten, daß die ATPasen der Speichervesikel über eine Spaltung der ATP's Phosphationen freisetzen, die um das Calcium der Membran kompetitieren und dadurch die Voraussetzung für eine Fusion schaffen (Woodin und Wieneke, 1964; Poste und Allison, 1973). Nach diesen Autoren sollen Membranen, die viel Calcium gebunden haben, nicht genügend fluid sein, um zu verschmelzen. Andererseits ist auch vorgeschlagen worden, daß gerade die Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase der Zellmembran durch Calciumionen die quantenhafte Acetylcholinausschüttung initiieren könnte (Vizi, 1978).

Auf die weitreichenden Analogien zwischen der Kopplung von Erregung und Kontraktion sowohl in der Skelett- (z.B.: Martonosi und Feretos, 1964) als auch der Herz- (z.B.: Repke und Katz) und der glatten Muskulatur (z.B.: Batra, 1973b) einerseits und der Kopplung von Erregung und Sekretion andererseits wurde nachhaltig verwiesen (Douglas und Rubin, 1963). Die Entdeckung der Mikrotubuli und Mikrofilamente in den sekretorischen Geweben hat zu Modellen geführt, die eine durch Calciumionen ausgelöste Kontraktion des mikrotubulären und/oder mikrofilamentösen Systems postulieren (z.B.: Schmitt, 1968; Malaisse et al.,

1971). Sogar 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 ist vorgeschlagen worden (Berl et al. 1973; Blitz und Fine, 1974; Übersichtsartikel: Trifaró, 1978). Kürzlich wurde Actin in den synaptischen Vesikeln von Torpedo nachgewiesen (Tashiro und Stadler, 1977).

Die Anwesenheit von ATPase-Aktivitäten in den sekretorischen Granula und der Zellmembran hat verschiedene Autoren veranlaßt, die Einwirkung von ATP in Gegenwart oder Abwesenheit weiterer Faktoren des Cytoplasmas auf die Sekretspeicherung zu untersuchen (Oka et al., 1967; Poisner und Trifaró, 1967; Matsuda et al., 1968; Poisner und Hava, 1970; Hata et al., 1976; Michaelson et al., 1978). Tatsächlich wird über eine Freisetzung des Acetylcholins und der Catecholamine berichtet, aber die Möglichkeit, daß diese Effekte lediglich durch die Ansäuerung des Inkubationsmediums mit Phosphorsäure bedingt sein könnten (die Pufferkapazität der Inkubationsflüssigkeiten kann infolge der ATP-Hydrolyse durchaus überschritten werden), wird in den zitierten Arbeiten nicht diskutiert.

Greengard und Mitarbeiter haben die Calcium-abhängige Phosphorylierung spezifischer Proteine bei Depolarisierung von Synaptosomen aus Rattengehirn untersucht (Krueger et al., 1977). In jüngster Zeit berichteten sie über die Isolierung eines Proteins, das gemeinsam mit Calciumionen ein Proteinkinasesystem zu aktivieren vermag (Schulman und Greengard, 1978). Wahrscheinlich kann dieser Calcium-abhängige Faktor die Proteinphosphorylierung außerdem indirekt regulieren, indem er die Konzentration an cyclischem AMP durch Aktivierung der Phosphodiesterase und der Adenylatcyclase beeinflusst.

Es gibt somit sehr verschiedene Hypothesen über die Wirkungsweise der Calciumionen, aber keine experimentell abgesicherte Theorie. Zukünftige Untersuchungen werden den molekularen Ort der Calciumwirkung definieren müssen, und zukünftige Hypothesen zur Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung sollten die biochemischen Wechselwirkungen zwischen den "zweiten Überträgerstoffen" mit in Erwägung ziehen.

Literaturverzeichnis

- Abood, L.G. (1966): Interrelationships between phosphates and calcium in bioelectric phenomena. *Int. Rev. Neurobiol.* 9, 223-261.
- Akert, K., Pfenninger, K., Sandri, C. und Moore, H. (1972): Freeze etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes in synapses of the central nervous system. In: *Structure and function of synapses*, Hrsg.: Pappas, G.P. und Purpura, D.P., Raven Press, New York, 1972, S. 67-86.
- Alemà, S., Calissano, P., Rusca, G. und Giuditta, A. (1973): Identification of a calcium-binding, brain specific protein in the axoplasm of squid giant axons. *J. Neurochem.* 20, 681-689.
- Alemà, S., Calissano, P. und Giuditta, A. (1974): Studies on a calcium binding, brain specific protein from the nervous system of cephalopods. In: *Calcium binding proteins*, Hrsg.: Drabikowski, W., Strzelecka-Golaszewska, H. und Carafoli, E., PWN-Polish Scientific Publishers, Warschau und Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1974, S. 739-749.
- Alnaes, E. und Rahamimoff, R. (1975): On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J. Physiol. (London)* 248, 285-306.
- Apps, D.K. und Glover, L.A. (1978): Isolation and characterization of magnesium adenosinetriphosphatase from the chromaffin granule membrane. *FEBS Lett.* 85, 254-258.
- Amsterdam, A., Ohad, I. und 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): Métabolisme du calcium et libération de l'acétylcholine dans l'organe électrique de la torpille. *J. Neurochem.* 23, 525-532.

- Babel-Guérin, E. und Dunant, Y. (1972a): Entrée pré-synaptique de calcium lors de la stimulation de l'organe électrique. *Experientia* 28, 726.
- Babel-Guérin, E. und Dunant, Y. (1972b): Entrée de calcium et libération d'acétylcholine dans l'organe électrique de la Torpille. *C.R. Acad. Sci., Paris D* 275, 2961-2964.
- Babel-Guérin, E., Boyenval, J., Droz, B., Dunant, Y. und Hassig, R. (1977): Accumulation of calcium in cholinergic axon terminals after nerve activity. Localization by electron microscope radioautography at the nerve-electroplaque junction of Torpedo. *Brain Res.* 121, 348-352.
- 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. (1972): Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24, 177-223.
- Baker, P.F., Hodgkin, A.L. und Ridgway, E.B. (1971): Depolarization and calcium entry in squid axons. *J. Physiol. (London)* 218, 709-755.
- Baker, R.R., Dowdall, M.J. und Whittaker, V.P. (1975): The involvement of lysophosphoglycerides in neurotransmitter release: the composition and turnover of phospholipids of synaptic vesicles of guinea-pig cerebral cortex and Torpedo electric organ and the effect of stimulation. *Brain Res.* 100, 629-644.
- Banks, P. (1965): The adenosine-triphosphatase activity of adrenal chromaffin granules. *Biochem. J.* 95, 490-496.
- Banks, P. und 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.C. (1973a): Effect of some estrogens and progesterone on calcium uptake and calcium release by myometrial mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 22, 803-809.
- Batra, S.C. (1973b): The role of mitochondrial calcium uptake in contraction and relaxation of the human myometrium. *Biochim. Biophys. Acta* 305, 428-432.
- Batra, S.C. (1975): The role of mitochondria in the regulation of myoplasmic calcium concentration in smooth muscle. In: Calcium transport in contraction and secretion, Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 87-94.
- Berl, S., Puszkin, S. und 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., Pletscher, A. und Da Prada, M. (1969): Metal-dependent aggregation of biogenic amines: a hypothesis for their storage and release. *Nature* 224, 281-283.
- Berneis, K.H., Da Prada, M. und 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. und Pletscher, A. (1971): A possible mechanism for uptake of biogenic amines by storage organelles: incorporation into nucleotide-metal aggregates. *Experientia* 27, 917-918.
- Bernstein, J. (1912): *Elektrobiologie*. Fr. Vieweg, Braunschweig.
- Berridge, M.J. (1975): The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. In: *Advances in cyclic nucleotide research*, Hrsg.: Greengard, P. und Robinson, G.A., Raven Press, New York, Bd. 6, S. 1-98.

- Berridge, M.J., Oschman, J.L. und Wall, B.J. (1975): Intracellular calcium reservoirs in Calliphora salivary glands. In: Calcium transport in contraction and secretion. Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 131-138.
- Birks, R.I. und Cohen, M.W. (1965): Effects of sodium on transmitter release from frog motor nerve terminals. In: Muscle, Hrsg.: Paul, W.M., Daniel, E.E., Kay, C.M. und Monkton, G., London, Pergamon Press, S. 403-420.
- Bittiger, H. und Heid, J. (1977): The subcellular distribution of particle-bound negative charges in rat brain. J. Neurochem. 28, 917-922.
- Blaustein, M.P. (1974): The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 70, 33-82.
- Blaustein, M.P. (1975): Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. J. Physiol. (London) 247, 617-655.
- Blaustein, M.P. und Ector, C. (1976): Carrier-mediated sodium-dependent and calcium-dependent calcium efflux from pinched-off presynaptic nerve terminals (synaptosomes) in vitro. Biochim. Biophys. Acta 419, 295-308.
- Blaustein, M.P. und Goldring, J.M. (1975): Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: Evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. J. Physiol. (London) 247, 589-615.
- Blaustein, M.P. und Oborn, C.J. (1975): The influences of sodium on calcium fluxes in pinched-off nerve terminals in vitro. J. Physiol. (London) 247, 657-686.

- Blaustein, M.P. und Wiesmann (1970): Effect of sodium ions on calcium movements in isolated synaptic terminals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 664-671.
- Blaustein, M.P., Kendrick, N.C., Fried, R.C. und Ratzlaff, R.W. (1977): Calcium metabolism at the mammalian presynaptic nerve terminal: Lessons from the synaptosome. In: Society of Neuroscience Symposia 2, Approaches to the cell biology of neurons, Hrsg.: Cowan, W.M. und Ferrendelli, J.A., Bethesda, 1977, S. 172-194.
- Blitz, A.L. und Fine, R.E. (1974): Muscle-like contractile proteins and tubuline in synaptosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4472-4476.
- Blitz, A.L., Fine, R.E. und Toselli, P.A. (1977): Evidence that coated vesicles isolated from brain are calcium-sequestering organelles resembling sarcoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 75, 135-147.
- Bohan, T.P., Boyne, A.F. und Guth, P.S. (1973): Electron-dense particle in cholinergic synaptic vesicles. Nature 244, 32-34.
- Borle, A.B. (1973): Calcium metabolism at the cellular level. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 1944-1950.
- Borowitz, J.L. (1969): Effect of acetylcholin on the sub-cellular distribution of ⁴⁵Ca in bovine adrenal medulla. Biochem. Pharmacol. 18, 715-723.
- Borowitz, J.L., Fuwa, K. und Weiner, N. (1965): Distribution of metals and catecholamines in bovine adrenal medulla sub-cellular fractions. Nature 205, 42-43.
- Borowitz, J.L., Leslie, S.W. und Baugh, L. (1975): Adrenal catecholamine release: possible termination mechanisms. In: Calcium transport in contraction and secretion, Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 227-234.

- Boyne, A.F. (1978): Neurosecretion: integration of recent findings into the vesicle hypothesis. *Life Sci.* 22, 2057-2066.
- Boyne, A.F., Bohan, T.P. und Williams, T.H. (1974): Effects of calcium-containing fixation solutions on cholinergic synaptic vesicles. *J. Cell Biol.* 63, 780-795.
- Boyne, A.F. Bohan, T.P. und Williams, T.H. (1975): Changes in cholinergic synaptic vesicle populations and the ultrastructure of the nerve terminal membranes of *Narcine brasiliensis* electric organ stimulated to fatigue in vivo. *J. Cell Biol.* 67, 814-825.
- Brading, A.F. (1978): Calcium induced increase in membrane permeability in the guinea-pig taenia coli: Evidence for involvement of a sodium-calcium exchange mechanism. *J. Physiol. (London)* 275, 65-84.
- Breer, H., Morris, S.J. und Whittaker, V.P. (1977): Adenosine triphosphatase activity associated with purified cholinergic synaptic vesicles of *Torpedo marmorata*. *Eur. J. Biochem.* 80, 313-318.
- Breer, H., Morris, S.J. und Whittaker, V.P. (1978): A structural model of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata* deduced from density measurements at different osmotic pressures. *Eur. J. Biochem.* 87, 453-458.
- Brierley, G.P. und Slautterback, D.B. (1964): Studies on ion transport. IV. An electron microscope study of the accumulation of Ca^{2+} and inorganic phosphate by heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 183-186.
- Buchs, M., Dreifuss, J.J., Grau, J.D. und Nordmann, J.J. (1972): Strontium as a substitute for calcium in the process leading to neurohypophyseal hormone secretion. *J. Physiol. (London)* 222, 168-169.
- Burgen, A.S.V. und Mitchell, J.F. (1972): *Gaddum's Pharmacology*, 7th ed., Oxford University Press, London.

- Burger, J.W. (1967): Problems in the electrolyte economy of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. In: *Sharks, skates and rays*, Hrsg.: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. und Rall, D.P., The John Hopkins Press, Baltimore, 1967, S. 177-185.
- Bygrave, F.L. (1978): Mitochondria and the control of intracellular calcium. *Biol. Rev.* 53, 43-79.
- Carafoli, E. (1974): Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. *Biochem. Soc. Symp.* 39, 89-109.
- Carafoli, E. und Lehninger, A.L. (1971): A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem. J.* 22, 681-690.
- Carafoli, E. und Rossi, C.S. (1971): Calcium transport in mitochondria. *Advanc. in Cytopharmacol.* 1, 209-227.
- Carafoli, E. und Sacktor, B. (1972): The effects of Ruthenium red on reactions of blowfly muscle mitochondria with calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49, 1498-1503.
- Carpenter, R.S. und Parsons, S.M. (1978): Electrogenic behavior of synaptic vesicles from *Torpedo californica*. *J. Biol. Chem.* 253, 326-329.
- Case, R.M. und Clausen, T. (1973): The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. *J. Physiol. (London)* 235, 75-102.
- Ceccarelli, B. und Hurlbut, W.P. (1975): The effects of prolonged repetitive stimulation in hemicholinium on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)* 247, 163-188.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. und Mauro, A. (1972): Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J. Cell Biol.* 54, 30-38.

- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. und Mauro, A. (1973):
Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the
frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57,
499-524.
- Ceccarelli, B., Clemente, F. und Meldolesi, J. (1975):
Secretion of calcium in pancreatic juice. *J. Physiol.*
(London) 245, 617-638.
- Chakrin, L.W., Marchbanks, R.M., Mitchell, J.F. und
Whittaker, V.P. (1972): The origin of the acetylcholine
released from the surface of the cortex. *J. Neuro-
chem.* 19, 2727-2736.
- Chan, K.Y. und Bunt, A.H. (1978): An association between
mitochondria and microtubules in synaptosomes and
axon terminals of cerebral cortex. *J. Neurocytol.* 7,
137-143.
- Chang, H.W. und Neumann, E. (1976): Dynamic properties of
isolated acetylcholine receptor proteins: Release
of calcium ions caused by acetylcholine binding.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3364-3368.
- Clemente, F. und Meldolesi, J. (1975): Calcium and pancreatic
secretion. *J. Cell Biol.* 65, 88-102.
- Cochrane, D.E. und Douglas, W.W. (1976): Histamin release
by exocytosis from rat mast cells on reduction of
extracellular sodium: A secretory response inhibited
by calcium, strontium, barium, or magnesium. *J.*
Physiol. (London) 257, 433-448.
- Collier, B. (1969): The preferential release of newly
synthesized transmitter by a sympathetic ganglion.
J. Physiol. (London) 205, 341-352.
- Cooke, W.J. und Robinson, J.D. (1971): Factors influencing
calcium movements in rat brain slices. *Am. J.*
Physiol. 221, 218-225.
- Cooperstein, S.J. und Lazarow, A. (1951): A microspectro-
photometric method for the determination of cytochrome
oxidase. *J. Biol. Chem.* 189, 665-670.

- Cotman, C.W., Levy, W., Banker, G. und Taylor, D. (1971):
An ultrastructural and chemical analysis of the effect
of Triton X-100 on synaptic plasma membranes. *Bio-
chim. Biophys. Acta* 249, 406-418.
- Couteaux, M.R. und Pécot-Dechavassine, M. (1970): Vésicules
synaptiques et poches au niveau des "zones actives"
de la jonction neuromusculaire. *C.R. Acad. Sci., Paris*,
D 271, 2346-2349.
- Crompton, M., Sigel, E., Salzmann, M. und Carafoli, E.
(1976a): A kinetic study of the energy-linked influx
of Ca^{2+} into heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 69,
429-434.
- Crompton, M., Capano, M. und Carafoli, E. (1976b): The
sodium-induced efflux of calcium from heart mito-
chondria. A possible mechanism for the regulation
of mitochondrial calcium. *Eur. J. Biochem.* 69,
453-462.
- Crompton, M., Hediger, M. und Carafoli, E. (1978a):
The effect of inorganic phosphate on calcium influx
into rat heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res.*
Commun. 80, 540-546.
- Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H. und Carafoli, E. (1978b):
The interrelation between the transport of sodium
and calcium in mitochondria of various mammalian
tissues. *Eur. J. Biochem.* 82, 25-31.
- Da Prada, M., Pletscher, A. (1968): Isolated 5-hydroxytryptamine
organelles of rabbit blood platelets: physiological
properties and drug induced changes. *Brit. J. Phar-
macol.* 34, 591-597.
- Da Prada, M. und Pletscher, A. (1974): Mechanisms of
5-hydroxytryptamine storage in subcellular organelles
of blood platelets. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 10,
311-320.
- Davies, L.P., Whittaker, V.P. und Zimmermann, H. (1977):
Axonal transport in the electromotor nerves of *Torpedo*
marmorata. *Exp. Brain Res.* 30, 493-510.

- Davis, G.A. und Bloom, F.E. (1973): Isolation of synaptic junctional complexes from rat brain. *Brain Res.* 62, 135-153.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. und Appelmans, F. (1955): Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-617.
- del Castillo, J. und Anderson, M. (1974): Curare. In *Neuropoisons, their pathophysiological actions*, Band 2, Poisons of plant origin, Hrsg.: Simpson, L.L. und Curtis, D.R., Plenum Press, New York und London, S. 99-156.
- del Castillo, J. und Engbaek, L. (1954): The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol. (London)*, 124, 370-384.
- del Castillo, J. und Katz, B. (1954): Quantal components of the endplate potential. *J. Physiol. (London)* 124, 560-573.
- del Castillo, J. und Katz, B. (1956): Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 6, 121-170.
- de Meis, L., Rubin-Altschul, B.M. und Machado, R.D. (1970): Comparative data of Ca^{2+} transport in brain and skeletal muscle microsomes. *J. Biol. Chem.* 245, 1883-1889.
- de Robertis, E.D.P. und 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., Rodriguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrinò de Iraldi, A. und Zieher, L.M. (1963): Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.* 10, 225-235.
- Deth, R. und van Breemen, C. (1977): Agonist induced release of intracellular Ca^{2+} in the rabbit aorta. *J. Membr. Biol.* 30, 363-380.

- Diamond, I. und Goldberg, A.L. (1971): Uptake and release of ^{45}Ca by rat brain microsomes, synaptosomes and synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 18, 1419-1431.
- Diamond, J.M. und Wright, E.M. (1969): Biological membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Annu. Rev. Physiol.* 31, 581-646.
- Dicker, S.E. (1966): Release of vasopressin and oxytocin from isolated pituitary glands of adult and newborn rats. *J. Physiol. (London)* 185, 429-444.
- Diculescu, I., Popescu, L.M., Ionescu, N. und Butucescu, N. (1971): Ultrastructural study of calcium distribution in cardiac muscle cells. *Z. Zellforsch.* 121, 181-198.
- Diner, O. (1967): L'expulsion des granules de la médullo-surrénale chez le Hamster. *C.R. Acad. Sci., Paris, D* 265, 616-619.
- Douglas, W.W. (1963): A possible mechanism of neurosecretion: release of vasopressin by depolarization and its dependence on calcium. *Nature* 197, 81-82.
- Douglas, W.W. (1974): Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence. *Biochem. Soc. Symp.* 39, 1-28.
- Douglas, W.W. (1975a): Secretomotor control of adrenal medullary secretion: synaptic, membrane, and ionic events in stimulus-secretion coupling. In: *Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology. Bd. VI.*, Washington, 1975, S. 367-388.
- Douglas, W.W. (1975b): Stimulus-secretion coupling in Mast cells: Regulation of exocytosis by cellular and extracellular calcium. In: *Calcium transport in contraction and secretion*. Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975 S. 167-174.

- Douglas, W.W. und Poisner, A.M. (1963): The influence of calcium on the secretory response of the submaxillary gland to acetylcholine or to noradrenaline. *J. Physiol. (London)*, 165, 528-541.
- Douglas, W.W. und 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. (London)* 172, 1-18.
- Douglas, W.W. und Rubin, R.P. (1961): The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (London)* 159, 40-57.
- Douglas, W.W. und Rubin, R.P. (1963): The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol. (London)* 167, 288-310.
- Douglas, W.W. und Rubin, R.P. (1964): Stimulant action of barium on the adrenal medulla. *Nature* 203, 305-307.
- Douglas, W.W., Ishida, A. und Poisner, A.M. (1965): The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from the isolated neurohypophysis. *J. Physiol. (London)* 181, 753-759.
- Dowdall, M.J. (1976a): Dissociation of choline transport from acetylcholine synthesis in nerve terminal sacs from Torpedo electric organ. *Abstr. FEBS Symp. on Biochem. of Membr. Transport. Zürich, 1976*, S. 326.
- Dowdall, M.J. (1976b): Characterization of high-affinity choline transport in nerve-terminal sacs from Torpedo electric organ. *Abstr. Commun. 1st Meet. Eur. Soc. Neurochem., Bath, 1976*, S. 26.
- Dowdall, M.J. (1977): The biochemistry of Torpedo cholinergic neurons. In: *Biochemistry of characterized neurons*, Hrsg.: Osborn, N.N., Pergamon Press, Oxford and New York, 1977.

- Dowdall, M.J. und 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. und Zimmermann, H. (1977): The isolation of pure cholinergic nerve terminal sacs (T-sacs) from the electric organ of juvenile Torpedo. *Neuroscience* 2, 405-421.
- Dowdall, M.J., Boyne, A.F. und Whittaker, V.P. (1974): Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.*, 140, 1-12.
- Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C.S., Gamble, R.L. und Lehninger, A.L. (1965): The steady state maintenance of accumulated Ca⁺⁺ in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 240, 2712-2720.
- Dransfeld, H., Greeff, K., Hess, D. und Schorn, A. (1967): Die Abhängigkeit der Ca⁺⁺ Aufnahme isolierter Mitochondrien des Herzmuskels von der Na- und K-Konzentration als mögliche Ursache der ionotropen Digitalwirkung. *Experientia* 23, 375-377.
- Dunant, Y., Gautron, J., Israël, M., Lesbats, B. und Manaranche, R. (1974): Evolution de la décharge de l'organe électrique de la Torpille et variations simultanées de l'acetylcholine au cours de la stimulation. *J. Neurochem.* 23, 635-643.
- Dunant, Y., Israël, M., Lesbats, B. und Manaranche, R. (1976): Loss of vesicular acetylcholine in the Torpedo electric organ on discharge against high external resistance. *J. Neurochem.* 27, 975-977.
- Ebashi, S., Kodama, A. und Ebashi, F. (1968): Troponin. I. Preparation and physiological function. *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 465-477.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. und Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

- Erulkar, S.D. und Rahamimoff, R. (1978): The role of calcium ions in tetanic and post-tetanic increase of miniature end-plate potential frequency. *J. Physiol. (London)* 278, 501-511.
- Erulkar, S.D., Rahamimoff, R. und Rotshenker, S. (1978): Quelling of spontaneous transmitter release by nerve impulses in low extracellular calcium solutions. *J. Physiol. (London)* 278, 491-500.
- Fatt, P. und Katz, B. (1952): Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (London)* 117, 109-128.
- Fawcett, D.W., Powell, A.E. und Sachs, H. (1968): Biosynthesis and release of neurophysin. *Endocrinology* 83, 1299.
- Feinman, R.D. und Detwiler, T.C. (1974): Platelet secretion induced by divalent cation ionophores. *Nature* 249, 172-173.
- Feldberg, W., Fessard, A. (1942): The cholinergic nature of the nerves to the electric organ of the Torpedo (Torpedo marmorata). *J. Physiol. (London)* 101, 200-216.
- Feldberg, W., Fessard, A. und Nachmannson, D. (1940): The cholinergic nature of the nervous supply to the electric organ of the Torpedo (Torpedo marmorata). *J. Physiol. (London)* 97, 3-5p.
- Fillion, G.M.B., Slorach, S.A. und 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.
- Flatman, P. und Lew, V.L. (1977): Does ionophore A23187 mediate Na transport in the absence of divalent cations? *Nature* 270, 444-445.
- Foreman, J.C. und Mongar, J.L. (1972): The role of the alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion. *J. Physiol. (London)* 224, 753-769.

- Fortier, A., Leduc, J. und D'Iorio, A. (1959): Biochemical composition of the chromaffin granules of the medulla. *Rev. Can. Biol.* 18, 110-115.
- Fried, R. und Blaustein, M.P. (1976): Synaptic vesicles in synaptosomes recycling in vitro. *Nature, New Biol.* 261, 255-256.
- Fritsch, G. (1890): Die elektrischen Fische. Zweite Abteilung. Die Torpedineen, von Veit, Leipzig.
- Fuchs, F. und Briggs, F.N. (1968): The site of calcium binding in relation to the activation of myofibrillar contraction. *J. Gen. Physiol.* 51, 655-676.
- Gaddum, J.H. und Stephenson, R.P. (1958): A microbath. *Brit. J. Pharmacol.* 13, 493-497.
- Gautron, J. und Blondet, B. (1978): Effet du calcium et de la stimulation sur les terminaisons nerveuses des jonctions nerf-électroplaque de la Torpille. *Biol. Cell.* 31, 31-44.
- Germain, M. und Proulx, P. (1965): Adenosinetriphosphatase activity in synaptic vesicles of rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1815-1819.
- Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. und Rall, D.P. (1967): Sharks, skates, and rays. The John Hopkins Press. Baltimore.
- Glagoleva, I.M., Liberman, Y.A. und Khashayev, Z. (1970): Effect of uncoupling agents of oxidative phosphorylation on the release of acetylcholine from nerve endings. *Biophysics* 15, 74-82.
- Goddard, G.A. und Robinson, J.D. (1976): Uptake and release of calcium by rat brain synaptosomes. *Brain Res.* 110, 331-350.
- Gray, E.G. und Whittaker, V.P. (1962): The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* 96, 79-88.

- Greenawalt, J.W., Rossi, C.S. und Lehninger, A.L. (1964):
Effect of active accumulation of calcium and phosphate
ions on the structure of rat liver mitochondria.
J. Cell Biol. 23, 21-38.
- Grodsky, G.M. und Bennett, L.L. (1966): Cation requirements
for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-913.
- Haga, T. und Noda, H. (1973): Choline uptake systems of
rat brain synaptosomes. Biochem. Biophys. Acta 291,
564-575.
- Hagen, P. (1962): Adenosine triphosphate-degrading enzyme
of adrenal medulla mitochondria. Biochem. J. 82, 25P.
- Hales, C.N. und Milner, R.D.G. (1968): Cations and the
secretion of insulin from rabbit pancreas in vitro.
J. Physiol. (London) 199, 177-187.
- Hall, T.A. (1975): The applicability of microprobe analysis
to calcium studies. In: Calcium transport in con-
traction and secretion, Hrsg.: Carafoli, E., Clementi,
F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland
Publishing Company, Amsterdam, 1975 S. 9-13.
- Hanig, R.C. und 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. und 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. und Aprison, M.H. (1972):
Subcellular distribution of potassium, sodium, magnesium,
calcium and chloride in cerebral cortex. J. Neuro-
chem. 19, 1501-1507.
- Harvey, A.M. und MacIntosh, F.C. (1940): Calcium and synaptic
transmission in a sympathetic ganglion. J. Physiol.
(London) 97, 408-416.

- Hata, F., Kuo, C.H., Matsuda, T. und Yoshida, H. (1976):
Factors required for Ca-sensitive acetylcholine
release from crude synaptic vesicles. J. Neurochem. 27,
139-144.
- Hebb, C.O. und Whittaker, V.P. (1958): Intracellular
distributions of acetylcholine and choline acetylase.
J. Physiol. (London) 142, 187-196.
- Heinrich, P., Da Prada, M. und Pletscher, A. (1972):
Magnesium-dependent ATPase in membranes of 5-hydroxy-
tryptamine storage organelles. Biochem. Biophys.
Res. Commun. 46, 1769-1775.
- Helle, K.B. (1973): Storage and release of neurotransmitters.
Abstr. 9th Int. Congr. Biochem., Stockholm, 1973 S. 440.
- Heuser, J.E. und 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.
- Heuser, J., Katz, B. und Miledi, R. (1971): Structural
and functional changes of frog neuromuscular junctions
in high calcium solutions. Proc. R. Soc. Lond., B 178,
407-415.
- Hillarp, N.Å. (1958a): Enzymic systems involving adenosine
phosphates in the adrenaline and noradrenaline con-
taining granules of the adrenal medulla. Acta Physiol.
Scand. 42, 144-165.
- Hillarp, N.Å. (1958b): Adenosine phosphate and inorganic
phosphate in adrenaline and noradrenaline containing
granules of the adrenal medulla. Acta Physiol. Scand. 42,
321-332.
- Hiller, J.-E. (1952): Grundriß der Kristallchemie. Walter
de Gruyter & Co., Berlin, S. 111.
- Hillman, D.E. und 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. und Randall, D.J. (1969): Fish Physiology, Band 1, Excretion, ionic regulation, and metabolism, Academic Press, New York und London.
- Hodgkin, A.L. und Keynes, R.D. (1957): Movements of labelled calcium in squid giant axons. J. Physiol. (London) 138, 253-281.
- Hokin, L.E. (1966): Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slices. Biochim. Biophys. Acta 115, 219-221.
- Holland, W.C. und Auditore, G.V. (1955): Distribution of potassium in liver, kidney and brain of the rat and guinea pig. Am. J. Physiol. 1955, 309-313.
- Holmes, W.N. und Donaldson, E.M. (1969): The body compartments and the distribution of electrolytes. In: Fish Physiology, Hrsg.: Hoar, W.S. und Randall, D.J., Bd. 1, Excretion, ionic regulation, and metabolism. Academic Press, New York und London, 1969, S. 1-89.
- Holtzman, E. (1977): The origin and fate of secretory packages, especially synaptic vesicles. Neuroscience 2, 327-355.
- Holtzman, E., Freeman, A.R. und Kashner, L.A., (1971): Stimulation dependent alterations in peroxidase uptake at lobster neuromuscular junctions. Science 173, 733-736.
- Hopkins, C.R. (1970): Studies on secretory activity in the pars intermedia of *Xenopus laevis*. 3. The synthesis and release of melanocyte stimulating hormone (MSH) in vitro. Tissue Cell 2, 83-98.
- 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 triphosphatases in morphologically characterized subcellular fractions of guinea-pig brain. Biochem. J. 96, 404-412.

- Hubbard, J.I. und Kwanbunbumpen, S. (1968): Evidence for the vesicle hypothesis. J. Physiol. (London) 194, 407-420.
- Hubbard, J.I. und Løyning, Y. (1966): The effects of hypoxia on neuromuscular transmission in a mammalian preparation. J. Physiol. (London) 185, 205-223.
- Ibata, Y. und 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.
- Imai, S., Riley, A.L. und Berne, R.M. (1964): Effect of ischemia on adenine nucleotides in cardiac and skeletal muscle. Circulation Res. 15, 443-450.
- Ishida, A. (1968): Stimulus-secretion coupling on the oxytocin release from the isolated posterior pituitary lobe. Jpn. J. Physiol. 18, 471-480.
- Israël, M. und Tuček, S. (1974): Utilization of acetate and pyruvate for the synthesis of 'total', 'bound' and 'free' acetylcholine in the electric organ of Torpedo. J. Neurochem. 22, 487-491.
- Israël, M., Gautron, J. und 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. und Lesbats, B. (1970): Fractionnement de l'organe électrique de la Torpille: Localisation subcellulaire de l'acétylcholine. J. Neurochem. 17, 1441-1450.
- Israël, M., Lesbats, B., Manaranche, R., Marsal, J., Mastour-Franchon, P. und Meunier, F.M. (1977): Related changes in amounts of ACh and ATP in resting and active Torpedo nerve electroplaque synapses. J. Neurochem. 28, 1259-1267.

- Ito, S., Nakazato, Y. und Ohga, A. (1978): The effect of the ionophores X-537A and A23187 on the noradrenaline output from peripheral adrenergic neurons in the presence of various divalent cations. *Br. J. Pharmacol.* 62, 91-98.
- Jeng, A.Y., Ryan, T.E. und Shamoo, A.E. (1978): Isolation of a low molecular weight Ca^{2+} carrier from calf heart inner mitochondrial membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 2125-2129.
- Jenkinson, D.H. (1960): The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. *J. Physiol. (London)* 152, 309-323.
- Johnson, M.K. (1960): The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.* 77, 610-618.
- Johnson, R.G. und Scarpa, A. (1976): Ion permeability of isolated chromaffin granules. *J. Gen. Physiol.* 68, 601-631.
- Jones, S.F. und Kwanbunbumpen, S. (1970): The effects of nerve stimulation and hemicholinium-on-synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)* 207, 31-50.
- Joó, F., Erdélyi, L. und Halász, N. (1977): Binding of barium to neurosecretory granules in the snail brain: a possible molecular mechanism of neurohormone release. *Neurosci. Lett.* 6, 187-191.
- Kadota, K., Mori, S. und Imaizumi, R. (1967): The properties of ATPase of synaptic vesicle fraction. *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 424-432.
- Kagayama, M. und Douglas, W.W. (1974): Electron microscope evidence of calcium-induced exocytosis in mast cells treated with 48/80 or the ionophores A-23187 and X-537A. *J. Cell Biol.* 62, 519-526.

- Kaiser, R. und Gottschalk, G. (1972): *Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten. Soforthilfe für statistische Tests mit wenigen Meßdaten.* BI Hochschultaschenbücher, Mannheim, 1972. S. 18-21.
- Kamino, A., Uyesaka, N. und Inouye, A. (1974): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. I. Effects of high external potassium ions. *J. Membr. Biol.* 17, 13-26.
- Kamino, K., Uyesaka, N., Ogawa, N. und Inouye, A. (1975a): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. II. Inhibitory effects of magnesium ions and some other cations. *J. Membr. Biol.* 21, 113-124.
- Kamino, K., Inouye, K., Ogawa, M., Uyesaka, N. und Inouye, A. (1975b): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. III. Binding with some divalent heavy metal ions and calcium-binding sites. *J. Membr. Biol.* 23, 21-31.
- Kamino, K., Ogawa, M., Uyesaka, N. und Inouye, A. (1976): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. IV. Effects of Ruthenium Red on the co-operative nature of calcium-binding. *J. Membr. Biol.* 26, 345-356.
- Karnovsky, M.J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A-138A.
- Katz, B. (1969): *The Release of Neuronal Transmitter Substances.* University Press, Liverpool, S. 1-60.
- Katz, B. und Miledi, R. (1965): The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 161, 496-503.
- Katz, B. und Miledi, R. (1968): The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol. (London)* 195, 481-492.

- Katz, B. und Miledi, R. (1972): The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J. Physiol. (London)* 224, 665-699.
- Katz, N.L. und Edwards, C. (1973): Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and neurally evoked transmitter release from frog motor nerve terminals. *J. Gen. Physiol.* 61, 259.
- Keller, P.J. und Cohen, E. (1961): Enzymic composition of some cell fractions of bovine pancreas. *J. Biol. Chem.* 236, 1407-1413.
- Kendrick, N.C., Blaustein, M.P., Fried, R.C. und Ratzlaff, R.W. (1977): ATP-dependent calcium storage in pre-synaptic nerve terminals. *Nature* 265, 246-248.
- Kirshner, N. (1962): Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 237, 2311-2317.
- Klein, R.L. und Lagercrantz, H. (1971): ATP hydrolysis and noradrenaline transport in purified vesicles from splenic nerve trunk. *Acta Physiol. Scand.* 83, 70-76.
- Kondo, S. und Schulz, I. (1976): Ca^{++} fluxes in isolated cells of rat pancreas. Effect of secretagogues and different Ca^{++} concentrations. *J. Membr. Biol.* 29, 185-203.
- Kopin, I.J. (1968): False adrenergic transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol.* 8, 377-394.
- Korneliusson, H. (1972): Ultrastructure of normal and stimulated motor endplates. *Z. Zellforsch.* 130, 28-57.
- Kostron, H., Winkler, H., Geissler, D. und König, P. (1977a): Uptake of calcium by chromaffin granules in vitro. *J. Neurochem.* 28, 487-493.
- Kostron, H., Winkler, H., Peer, L.J. und König, P. (1977b): Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: A carrier-mediated transport. *Neuroscience* 2, 159-166.

- 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.
- Kraicer, J., Milligan, J.V., Gosbee, J.L., Conrad, R.G. und Branson, C.M. (1969): In vitro release of ACTH: effects of potassium, calcium and corticosterone. *Endocrinology* 85, 1144-1153.
- Krenz, W.D. und Zimmermann, H. (1978): Long term depression of Torpedo electric organ response on spaced stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.*, in press.
- Krueger, B.K., Forn, J. und Greengard, P. (1977): Depolarization-induced phosphorylation of specific proteins, mediated by calcium ion influx, in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 252, 2764-2773.
- Kuffler, S.W. und Yoshikami, D. (1975): The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J. Physiol. (London)* 251, 465-482.
- Laduron, P., Aerts, G., de Bie, K. und van Gompel, P. (1976): Tissue fractionation and catecholamines - IV. Adenosine triphosphatase in chromaffin granules: a distribution artefact. *Neuroscience* 1, 219-226.
- Lambert, D.H. und Parsons, R.L. (1970): Influence of polyvalent cations on the activation of muscle end plate receptors. *J. Gen. Physiol.* 56, 309-321.
- Lastowecka, A. und 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. (London)* 236, 681-705.
- Lazarewicz, J.W., Haljamäe, H. und Hamberger, A. (1974): Calcium metabolism in isolated brain cells and sub-cellular fractions. *J. Neurochem.* 22, 33-45.

- Lazarus, S.S., Barden, H. und Bradshaw, M. (1960):
Pancreatic beta cells and alloxane toxicity.
AMA Archiv. Pathol. 73, 210-223.
- Legato, M.J., Spiro, D. und Langer, G.A. (1968):
Ultrastructural alterations produced in mammalian
myocardium by variation in perfusate ionic com-
position. J. Cell Biol. 37, 1-12.
- Lehninger, A.L. (1970): Mitochondria and calcium ion
transport. Biochem. J. 119, 129-138.
- Lehninger, A.L. (1976): Biochemistry, Worth Publishers,
Inc., 2. Aufl., New York, 1976, S. 401.
- Lehninger, A.L., Carafoli, E. und Rossi, C.S. (1967):
Energy-linked ion movements in mitochondrial systems.
Adv. Enzymol. 29, 259-320.
- Llinás, R.R. und Steinberg, I.Z. (1977): The place of a
calcium hypothesis in synaptic transmission. Neuro-
sci. Res. Program Bull. 15, 565-574.
- Llinás, R.R., Blinks, J.R. und 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. und Randall, R.J.
(1951): Protein measurement with the Folin phenol
reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Lust, W.D. und Robinson, J.D. (1970a): Calcium accumulation
by isolated nerve ending particles from brain. I. The
site of energy-dependent accumulation. J. Neurobiol. 1,
303-316.
- Lust, D.W. und Robinson, J.D. (1970b): Calcium accumulation
by isolated nerve ending particles from brain. II.
Factors influencing calcium movements. J. Neurobiol. 1,
317-328.

- MacLeod, R.M. und Fontham, E.H. (1970): Influence of
ionic environment on the in vitro synthesis and
release of pituitary hormones. Endocrinology 86,
863-869.
- Madeira, V. und Antunes-Madeira, M.C. (1973): Interaction
of Ca²⁺ and Mg²⁺ with synaptic plasma membranes.
Biochim. Biophys. Acta 323, 396-407.
- Magleby, K.L. und Zengel, J.E. (1976): Augmentation:
A process that acts to increase transmitter release
at the frog neuromuscular junction. J. Physiol.
(London) 257, 449-470.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O. und
Lacy, P.E. (1971): The stimulus-secretion coupling
of glucose-induced insulin release. V. The parti-
cipation of a microtubular-microfilamentous system,
Diabetes 20, 257-265.
- Manery, J.F. (1966): Effects of Ca ions on membranes.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 25, 1804-1810.
- Mangan, J.L. und Whittaker, V.P. (1966): The distribution
of free amino acids in subcellular fractions of
guinea-pig brain. Biochem. J. 98, 128-137.
- Marchbanks, R.M. (1965): The choline content, anion
deficit and volume of synaptosomes. J. Neurochem. 25,
463-470.
- Marchbanks, R.M. und Israëli, M. (1971): Aspects of acetyl-
choline metabolism in the electric organ of *Torpedo*
marmorata. J. Neurochem. 18, 439-448.
- Marchbanks, R.M. und Israëli, 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, Hrsg.: Gilbert,
P.W., Mathewson, R.F. und Rall, D.P., The John
Hopkins Press, Baltimore, 1967, S. 287-292.

- Martin, J.H., Carson, F.L. und Race, G.J. (1974): Calcium-containing platelet granules. *J. Cell Biol.* 60, 775-777.
- Martin, R. und Miledi, R. (1978): A structural study of the squid synapse after intraaxonal injection of calcium. *Proc. R. Soc. London, B* 201, 317-333.
- Martonosi, A. und Feretos, R. (1964): Sarcoplasmic reticulum. I. The uptake of Ca^{++} by sarcoplasmic reticulum fragments. *J. Biol. Chem.* 239, 648-658.
- Matsuda, T., Hata, F. und Yoshida, H. (1968): Stimulatory effect of Na^+ and ATP on the release of acetylcholine from synaptic vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 150, 739-741.
- Matthews, E.K., Petersen, O.H. und Williams, J.A. (1973): Pancreatic acinar cells: Acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. *J. Physiol. (London)* 234, 689-701.
- McElroy, W.D. (1969): Biolumineszenz - Chemie und biologische Bedeutung. *Umschau* 69, 472-474.
- Meldolesi, J., Jamieson, J.D. und Palade, G.E. (1971): Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. III. Enzymatic activities. *J. Cell Biol.* 49, 150-158.
- Meunier, F.M. (1978): Effet de la dépolarisation sur la libération d'ATP pré- et postsynaptique, Abstr. Nucleotides & Neurotransmission. Conférences on Biologie de Gif. Dec. 1977, S. 15.
- Michaelson, D.M. und Sokolovsky, M. (1978): Induced acetylcholine release from active purely cholinergic Torpedo synaptosomes. *J. Neurochem.* 30, 217-230.
- Michaelson, D.M., Pinchasi, I. und Sokolovsky, M. (1978): Factors required for calcium dependent acetylcholine release from isolated Torpedo synaptic vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 547-552.

- Miledi, R. (1973): Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 183, 421-425.
- Miledi, R. und Thies, R. (1971): Tetanic and post-tetanic rise in frequency of miniature endplate potentials in low-calcium solutions. *J. Physiol. (London)* 212, 245-257.
- Mengar, J.L. und Schild, H.O. (1958): The effect of calcium and pH on the anaphylactic reaction. *J. Physiol. (London)* 140, 272-284.
- Moore, C.L. (1971): Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by Ruthenium Red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305.
- Murdaugh, H.V., Jr. und Robin, E.D. (1967): Acid-base metabolism in the dogfish shark. In: *Sharks, skates, and rays*, Hrsg.: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. und Rall, D.P., The John Hopkins Press, Baltimore, 1967, S. 249-264.
- Nagasawa, J., Douglas, W.W. und Schulz, R.A. (1970): Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of 'synaptic vesicle' formation in posterior pituitary glands. *Nature* 227, 407-409.
- Nagy, A., Baker, R.R., Morris, S.J. und Whittaker, V.P. (1976): The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* 109, 285-309.
- Nakamura, K. und Konishi, K. (1974): Mechanism of adenosine triphosphate-dependent Ca^{2+} uptake of brain microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 75, 1129-1133.
- Nickel, E. und Potter, L.T. (1970): Synaptic vesicles in freeze etched electric tissue of Torpedo. *Brain Res.* 23, 95-100.
- Nijjar, M.S. und 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. und Legros, J.J. (1971): A correlation of release of polypeptide hormones and of immunoreactive neurophysin from isolated rat neurohypophyses. *Experientia* 27, 1344-1345.
- Normann, T.C. (1974): Calcium-dependence of neurosecretion by exocytosis. *J. Exp. Biol.* 61, 401-409.
- Normann, T.C. und Hall, T.A. (1978): Calcium and sulfur in neurosecretory granules and calcium in mitochondria as determined by electron microscope X-ray microanalysis. *Cell Tiss. Res.* 186, 453-463.
- Novikoff, A.B. und Holtzman, E. (1970): Cells and Organelles. Holt, Rinehart und Winston, Inc., New York, 1970. S. 206-211.
- Ogneff, J. (1897): Über die Entwicklung des elektrischen Organs bei Torpedo. *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt.*, 270-304.
- Ohsawa, K., Dowe, G.H.C., Morris, S.J. und Whittaker, V.P. (1978): The stoichiometry of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res.*, im Druck.
- Oka, M., Ohuchi, T., Yoshida, H. und Imaizumi, R. (1967): Stimulatory effect of adenosine triphosphate and magnesium on the release of catecholamines from adrenal medullary granules. *Jap. J. Pharmacol.* 17, 199-207.
- Okamoto, K. und Kawanishi, H. (1966): Submicroscopic histochemical demonstration of intracellular reactive zinc in cells of pancreatic islet. *Endocrinol. Jap.* 13, 305.
- Oschman, J.L. und Wall, B.J. (1972): Calcium binding to intestinal membranes. *J. Cell Biol.* 55, 58-73.
- Oschman, J.L., Hall, T.A., Peters, P.D. und 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. und Ebashi, S. (1965): ATP-dependent Ca binding of brain microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 58, 188-190.
- Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H. und Araki, C. (1966): On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J. Biochem. (Tokyo)* 59, 501-510.
- Palay, S.L. und Palade, G.E. (1954): Electron microscope study of the cytoplasm of neurons. *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.
- Pappas, G.D. und Rose, S. (1976): Localization of calcium deposits in the frog neuromuscular junction at rest and following stimulation. *Brain Res.* 103, 362-365.
- Párducz, A. und Joó, F. (1976): Visualization of stimulated nerve endings by preferential calcium accumulation of mitochondria. *J. Cell Biol.* 69, 513-517.
- Párducz, A., Joó, F. und Karnushina, I. (1977): Localization of calcium by X-ray microanalysis in nerve terminals of different functional activity. *Proc. Intern. Soc. Neurochem.* 6, 195.
- Parsons, J.A. (1969): Calcium ion requirement for prolactin secretion by rat adenohypophyses in vitro. *Am. J. Physiol.* 217, 1599-1603.
- Patriarca, P. und Carafoli, E. (1969): A comparative study of the intracellular Ca⁺⁺ movements in white and red muscle. *Experientia* 25, 598-599.
- Peachey, L.D. (1964): Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. *J. Cell Biol.* 20, 95-111.
- Pearse, B.M.F. (1975): Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97, 93-98.

- Pereira, R.S. und Sawaya, P. (1957): Contribution à l'étude de la composition chimique du sang de certains sélaciens du Brésil. Bol. Fac. Fil., Ciênc. Letr. Univ. S. Paulo - Zool. 21, 85-92.
- Petersen, O.H. und Ueda, N. (1975): Ca²⁺ control of pancreatic enzyme secretion. In: Calcium transport in contraction and secretion. Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 147-156.
- Pfenninger, K.H. und 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. und 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. und Berneis, K.H. (1973): Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. Brain Res. 62, 317-326.
- Poisner, A.M. und Douglas, W. (1968a): Adenine triphosphate and adenosine triphosphate in hormone-containing granules of posterior pituitary gland. Science 160, 203-204.
- Poisner, A.M. und Douglas, W.W. (1968b): A possible mechanism of release of posterior pituitary hormones involving adenosine triphosphate and an adenosine triphosphatase in the neurosecretory granules. Mol. Pharmacol. 4, 531-540.
- Poisner, A.M. und 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.

- Poisner, A.M. und Trifaró (1967): The role of ATP and ATPase in the release of catecholamines from the adrenal medulla. I. ATP-evoked release of catecholamines, ATP, and protein from isolated chromaffin granules. Mol. Pharmacol. 3, 561-571.
- Politoff, A.L., Rose, S. und Pappas, G.D. (1974): The calcium binding sites of synaptic vesicles of the frog sartorius neuromuscular junction. J. Cell Biol. 61, 818-823.
- Poste, G. und Allison, A.C. (1973): Membrane fusion. Biochim. Biophys. Acta 300, 421-465.
- Prince, W.T., Berridge, M.J. und Rasmussen, H. (1972): Role of calcium and adenosine-3',5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 553-557.
- Publicover, S.J., Duncan, C.J. und Smith, J.L. (1977): Ultrastructural changes in muscle mitochondria in situ, including the apparent development of internal septa, associated with the uptake and release of calcium. Cell Tiss. Res. 185, 373-385.
- Pysh, J.J. und Wiley, R.G. (1974): Synaptic vesicle depletion and recovery in cat sympathetic ganglia electrically stimulated in vivo. J. Cell Biol. 60, 365-374.
- Racker, E. (1950): Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochim. Biophys. Acta 4, 211-214.
- Rahamimoff, H. und Abramovitz, E. (1978a): Calcium transport in a vesicular membrane preparation from rat brain synaptosomes. FEBS Lett. 89, 223-226.
- Rahamimoff, H. und Abramovitz, E. (1978b): Ca transport and ATPase activity of synaptosomal vesicles from rat brain. FEBS Lett. 92, 163-167.
- Rahamimoff, R. (1977): The regulation of intracellular calcium concentration and transmitter release. Neurosci. Res. Program Bull. 15, 575-581.

- Rahamimoff, R., Rahamimoff, H., Binah, O. und Meiri, U. (1975): Control of neurotransmitter release by calcium ions and the role of mitochondria. In: Calcium transport in contraction and secretion, Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 253-260.
- Rahamimoff, R., Erulkar, S.D., Alnaes, E., Meiri, H., Rotshenker, S. und Rahamimoff, H. (1976): Modulation of transmitter release by calcium ions and nerve impulses. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XL, The Synapse, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976. S. 107-116.
- Rasmussen, H. (1970): Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. Science 170, 404-412.
- Repke, D.I. und Katz, A.M. (1972): Calcium-binding and calcium-uptake by cardiac microsomes: A kinetic analysis. J. Molec. Cell. Cardiol. 4, 401-416.
- Reynolds, E. (1965): Liver parenchymal cell injury. III. The nature of calcium associated electron opaque masses in rat liver mitochondria following poisoning with carbon tetrachloride. J. Cell Biol. 25, 53-75.
- Ringer, S. (1883): A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J. Physiol. (London) 4, 29-42.
- Robinson, J.D. und Lust, W.D. (1968): Adenosine triphosphate-dependent calcium accumulation by brain microsomes. Arch. Biochem. 125, 286-294.
- Romero, D., Zabucchi, G. und Soranzo, M.R. (1975): The role of calcium in the modulation of leucocyte functions. In: Calcium transport in contraction and secretion. Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 195-202.

- Rose, B. und Loewenstein, W.R. (1975): Calcium ion distribution in cytoplasm visualized by aequorin: Diffusion in cytosol restricted by energized sequestering. Science 190, 1204-1206.
- Rosenbluth, J. (1975): Synaptic membrane structure in Torpedo electric organ. J. Neurocytol. 4, 697-712.
- Ross, D.H. (1977): Calcium content and binding in synaptosomal subfractions during chronic morphine treatment. Neurochem. Res. 2, 581-593.
- Rubin, R.P. (1974): Calcium and the Secretory Process. Plenum Press, New York and London.
- Russel, J.T. und 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. und 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 Endocrinol. 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.
- Samli, M.H. und Geschwind, Y.I. (1968): Some effects of energy-transfer inhibitors and of Ca^{2+} -free or K^{+} -enhanced media on the release of luteinizing hormone (LH) from rat pituitary glands in vitro. Endocrinology 82, 225-231.
- Sampson, H.W., Dill, R.E., Matthews, J.L. und Martin, J.H. (1970): An ultrastructural investigation of calcium-dependent granules in the rat neurophil. Brain Res. 22, 157-162.

- Scarpa, A. und Graziotti, P. (1973): Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. I. Stopped-flow measurements of Ca^{++} uptake by cardiac mitochondria. *J. Gen. Physiol.* 62, 756-772.
- Schaffner, W. und Weissmann, C. (1973): A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Analyt. Biochem.* 56, 502-514.
- Schatzmann, H.J. und Vincenzi, F.F. (1969): Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol. (London)* 201, 369-395.
- Schmidt, R. (1975): Qualitative und quantitative Analyse des Metallionengehaltes der cholinergen synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo. Diplomarbeit an der Universität Mainz.
- Schmidt, J. und 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. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 1092.
- Schulman, H. und Greengard, P. (1978): Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *Nature* 271, 478-479.
- Schumann, H.J. (1958): Über den Noradrenalin und ATP Gehalt synaptischer Nerven. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 233, 296-300.
- Selinger, Z. und Naim, E. (1970): The effect of calcium on amylase secretion by rat parotid slices. *Biochim. Biophys. Acta* 203, 335-337.
- Selinger, Z., Naim, E. und Lasser, M. (1970): ATP-dependent calcium uptake by microsomal preparations from rat parotid and submaxillary glands. *Biochim. Biophys. Acta* 203, 326-334.
- Serck-Hanssen, G. und Christiansen, E.N. (1973): Uptake of calcium in chromaffin granules of bovine adrenal medulla stimulated in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 404-414.

- Sheridan, M.N. (1965): The fine structure of the electric organ of *Torpedo marmorata*. *J. Cell Biol.* 24, 129-141.
- Sheridan, M.N., Whittaker, V.P. und Israël, M. (1966): The subcellular fractionation of the electric organ of *Torpedo*. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 74, 291-307.
- Silinsky, E.M. (1975): On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (London)* 247, 145-162.
- Silinsky, E.M. (1978): On the role of barium in supporting the asynchronous release of acetylcholine quanta by motor nerve impulses. *J. Physiol. (London)* 247, 157-171.
- Sjöstrand, F.S. (1953): The ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye. *J. Appl. Phys.* 214, 1422.
- Smith, A.D. (1971a): Summing up: some implications of the neuron as a secreting cell. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* 261, 423-437.
- Smith, A.D. (1971b): Secretion of proteins (chromogranin A and dopamin β -hydroxylase) from a sympathetic neuron. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* 261, 363.
- Smith, A.D. und Winkler, H. (1972): Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. *Handbook Exp. Pharmacol.* 33, 538-617.
- Stadler, H. und Whittaker, V.P. (1978): Identification of vesiculin as a glycosaminoglycan. *Brain Res.*, im Druck.
- Stahl, W.L. und Swanson, P.D. (1969): Uptake of calcium by subcellular fractions isolated from ouabain-treated cerebral tissues. *J. Neurochem.* 16, 1553-1563.
- Stanley, P.E. und Williams, S.G. (1969): Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal. Biochem.* 29, 381-392.

- Statham, H.E. und Duncan, C.J. (1976): Dantrolene and the neuromuscular junction: evidence for intracellular calcium stores. *Eur. J. Pharmacol.* 39, 143-152.
- Statham, H.E. und Duncan, C.J. (1977): The effect of sodium ions on mepp frequency at the frog neuromuscular junction. *Life Sci.* 20, 1839-1846.
- Suskiw, J.B. (1976): Acetylcholine translocation in synaptic vesicle ghosts in vitro. *J. Neurochem.* 27, 853-857.
- Susziw, J.B., Zimmermann, H. und Whittaker, V.P. (1978): Vesicular storage and release of acetylcholine in Torpedo electroplaque synapses. *J. Neurochem.* 30, 1269-1280.
- Szerb, J.C. (1961): The estimation of acetylcholine, using leech muscle in a microbath. *J. Physiol. (London)* 158, 8-9p.
- Tanaka, R., Takeda, M. und Jaimovich, M. (1976): Characterization of ATPase of plain synaptic vesicle and coated vesicle fractions isolated from rat brains. *J. Biochem. (Tokyo)* 80, 831-837.
- Tashiro, T. und Stadler, H. (1977): Proteins of cholinergic synaptic vesicles. *Proc. Intern. Soc. Neurochem.* 6, 196.
- Thorson, T.B. (1967): Osmoregulation in fresh-water elasmobranchs. In: *Sharks, skates, and rays*, Hrsg.: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. und Rall, D.P., The John Hopkins Press, Baltimore, 1967, S. 265-270.
- Tower, D.B. (1968): Ouabain and the distribution of calcium and magnesium in cerebral tissues in vitro. *Exp. Brain Res.* 6, 273-283.
- Trifaró, J.M. (1977): Common mechanisms of hormone secretion. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17, 27-47.
- Trifaró, J.M. (1978): Contractile proteins in tissues originating in the neural crest. *Neuroscience* 3, 1-24.

- Triggle, D.J. (1972): Effects of calcium on excitable membranes and neurotransmitter action. *Prog. Surf. Memb. Sci.* 5, 267-331.
- Trotta, E.E. und de Meis, L. (1975): ATP-dependent calcium accumulation in brain microsomes. Enhancement by phosphate and oxalate. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 239-247.
- Urry, D.W., Long, M.M., Ohnishi, T., Jacobs, M. und Mitchell, L.W. (1975): Polypeptide backbone complexation of calcium ion. In: *Calcium transport in contraction and secretion*. Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 25-34.
- Uvnäs, B. (1973): An attempt to explain nervous transmitter release as due to nerve impulse-induced cation exchange. *Acta Physiol. Scand.* 87, 168-175.
- Vargas, O., Miranda, R. und Orrego, F. (1976): Effects of sodium-deficient media and of a calcium ionophore (A-23187) on the release of (³H)-noradrenaline, (¹⁴C)- α -aminoisobutyrate, and (³H)- γ -aminobutyrate from superfused slices of rat neocortex. *Neuroscience* 1, 137-145.
- Vasington, F.D. und Murphy, J.V. (1961): Active binding of calcium by mitochondria. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 146.
- Vasington, F.D. und Murphy, J.V. (1962): Ca⁺⁺ uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 237, 2670-2677.
- Vasington, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. und Carafoli, E. (1972): The effect of Ruthenium Red on Ca⁺⁺ transport and respiration in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 256, 43-54.

- Vickers, G.R. (1976): Studies on the function and metabolism of calcium in the synaptosomal preparation. Dissertation des Darwin Colledge's, Cambridge.
- Vickers, G.R. und Dowdall, M.J. (1976): Calcium uptake in preterminal central synapses: Importance of mitochondria. *Exp. Brain Res.* 25, 429-445.
- Vilhardt, H. und Hope, D.B. (1974): Adenosine triphosphatase activity in the neural lobe of the bovine pituitary gland. *Biochem. J.* 143, 181-190.
- Vizi, E.S. (1972): Stimulation, by inhibition of (Na^+ - K^+ - Mg^{2+})-activated ATPase, of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. *J. Physiol. (London)* 226, 95-117.
- Vizi, E.S. (1978): Na^+ - K^+ -activated adenosinetriphosphatase as a trigger in transmitter release. *Neuroscience* 3, 367-384.
- Vizi, E.S., Illés, P., Rónai, A. und Knoll, J. (1972): The effect of lithium on acetylcholine release and synthesis. *Neuropharmacology* 11, 521-530.
- von Euler, 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.
- Wagner, R. (1847): Über den feineren Bau des elektrischen Organs im Zitterrochen. In der Dieterich'schen Buchhandlung Göttingen. (zitiert nach Fritsch, 1910).
- Wallach, D. und Schramm, M. (1971): Calcium and the exportable protein in rat parotid gland. *Eur. J. Biochem.* 21, 433-437.
- Watanabe, A. und Tasaki, I. (1971): The biionic action potential and indispensability of divalent cations in the external medium for nerve excitation. In: *Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis.* Hrsg.: Nichols, G., Jr. und Wassermann, R.H., Academic Press, London, S. 77-100.

- Weinreich, D. (1971): Ionic mechanism of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol. (London)* 212, 431-446.
- Weinstein, H. und Kuriyama, K. (1970): Retention and exchange of potassium in a synaptosomal fraction of mouse brain. *J. Neurochem.* 17, 493-501.
- Whittaker, V.P. (1973): The storage of acetylcholine in presynaptic nerve terminals. *Sci. Bas. Medic. Annu. Rev.*, 1973, 17-31.
- Whittaker, V.P. und Barker, L.A. (1972): The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. In: *Methods Neurochem.* 2, 1-52.
- Whittaker, V.P. und Sheridan, M.N. (1965): The morphology and acetylcholine content of cerebral cortical synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 12, 363-372.
- Whittaker, V.P. und Zimmermann, H. (1976): The innervation of the electric organ of Torpedinidae: a model cholinergic system. In: *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, Hrsg.: Malins, D.C. und Sargent, J.R., Academic Press, London, Vol. 3, S. 67-116.
- Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. und Kirkland, R.J.A. (1964): The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem. J.* 90, 293-303.
- Whittaker, V.P., Essman, W.B. und 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., Zimmermann, H. und Dowdall, M.J. (1975): The biochemistry of cholinergic synapses as exemplified by the electric organ of Torpedo. *J. Neural Transm. Suppl.* XII, 39-60.

- Winborn, W.B. und Seelig, L.L., Jr. (1970): Paraformaldehyde and s-collidine - a fixative for preserving large blocks of tissue for electron microscopy. *Texas Rep. Biol. Med.* 28, 347-361.
- Winkler, H., Peer, L., Kostron, H. und Geissler, D. (1975): Calcium and the catecholamine-storing vesicles of adrenal medulla. In: *Calcium transport in contraction and secretion*, Hrsg.: Carafoli, E., Clementi, F., Drabikowski, W. und Margreth, A., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975, S. 243-251.
- Woodin, A.M. und 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. und 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. und Snyder, S.H. (1973): High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J. Neurochem.* 21, 1355-1375.
- Yates, R.D. und Yates, J.C. (1968): The occurrence of intramitochondrial granules in nerve cells. *Z. Zellforsch.* 92, 388-393.
- Yoshida, H., Kadota, K. und Fujisawa, H. (1966): Adenosine triphosphate dependent calcium binding of microsomes and nerve endings. *Nature* 212, 291-292.
- Zimmermann, H. (1976): Untersuchungen zum Mechanismus der cholinergen synaptischen Übertragung im elektrischen Organ des Zitterrochen (Torpedo marmorata). *Habilitationschrift an der Universität Göttingen, Göttingen*, 1976.

- Zimmermann, H. (1978): Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ. *Neuroscience*, im Druck.
- Zimmermann, H. und Denston, C.R. (1976): Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Brain Res.* 111, 365-376.
- Zimmermann, H. und Denston, C.R. (1977a): Recycling of synaptic vesicles in the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ during induced transmitter release. *Neuroscience* 2, 695-714.
- Zimmermann, H. und Denston, C.R. (1977b): Separation of synaptic vesicles of different functional states from the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ. *Neuroscience* 2, 715-730.
- Zimmermann, H. und Dowdall, M.J. (1977): Vesicular storage and release of a false cholinergic transmitter (acetylpyrrolcholine) in the Torpedo electric organ. *Neuroscience* 2, 731-739.
- Zimmermann, H. und Whittaker, V.P. (1974a): 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. und Whittaker, V.P. (1974b): 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.
- Zimmermann, H. und Whittaker, V.P. (1977): Morphological and biochemical heterogeneity of cholinergic synaptic vesicles. *Nature* 267, 633-635.

Lebenslauf

Am 30.9.1950 wurde ich als dritter Sohn des Schriftleiters Georg Schmidt und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Lindner, in Groß-Hutbergen, Kreis Verden (Niedersachsen), geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Pestalozzi-Schule und von 1961 bis 1968 das Domgymnasium in Verden, in dessen mathematisch-naturwissenschaftlichem Zweig ich am 19.6.1968 die Reifeprüfung bestand.

Von 1968 bis 1973 studierte ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz Chemie mit den Nebenfächern Physik und Mathematik. Nach der Diplomvorprüfung (1971) in den Fächern anorganische, organische und physikalische Chemie, Experimentalphysik und Mathematik, bestand ich am 12.11.1973 die Diplomprüfung in Chemie in den Fächern anorganische, organische und physikalische Chemie und dem Wahlpflichtfach Biochemie.

In den Jahren 1974 und 1975 fertigte ich meine experimentelle Diplomarbeit mit dem Thema "Qualitative und quantitative Analyse des Metallionengehaltes der cholinergen synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo" unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Zimmermann in der Abteilung für Neurochemie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen an, die von Herrn Dr. V.P. Whittaker geleitet wird.

Von 1975 bis 1978 führte ich in derselben Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Rolle des Calciums bei der cholinergen Erregungsübertragung im elektrischen Organ des Zitterrochens (*Torpedo marmorata*) durch.