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

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

des Fachbereiches Chemie der
Johannes Gutenberg - Universität
Mainz

vorgelegt von Rupert Schmidt

Göttingen 1975

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

Vorwort und Danksagungen VII

Nomenklatur und Abkürzungen IX

1. Einleitung und Problemstellung 1

1.1. Nervenzellen und Gliazellen 1

1.2. Die Synapsen 4

1.3. Das elektrische Organ von Torpedo marmorata als Modellsystem zur Untersuchung cholinerger Synapsen . 7

1.4. Die cholinergen synaptischen Vesikel aus dem elektrischen Organ von Torpedo 13

1.5. Problemstellung der Untersuchungen 15

2. Methoden und Ergebnisse der qualitativen Analyse des Metallionengehaltes 17

2.1. HCl- und H_2S-Gruppe 17

2.2. Urotropin-Gruppe 19

2.3. $(NH_4)_2S$-Gruppe 21

2.4. Ammoniumcarbonat-Gruppe 23

2.5. Lösliche Gruppe 23

2.6. Ergebnis 24

3. Material und Methoden 25

3.1. Allgemeine Maßnahmen beim Arbeiten mit subzellulären Fraktionen 25

3.2. Die Stimulation des elektrischen Organs von Torpedo marmorata 25

3.3. Die Isolierung der cholinergen synaptischen Vesikel 28

3.3.1. Kontinuierliche Dichtegradienten in Zonalrotoren 29

Seite

3.3.2. Diskontinuierliche Dichtegradienten in Ausschwingrotoren 31

3.3.3. Varianten der Vesikelpräparation 33

3.4. Der Aufschluß der Präparationsvorstufen 36

3.5. Morphologische Methoden 38

3.6. Azetylcholinbestimmung mit dem Blutegelmuskel 38

3.6.1. Extraktion 39

3.6.2. Präparation des Blutegelmuskels 39

3.6.3. Messung 40

3.6.4. Lösungen 41

3.7. ATP-Bestimmung 41

3.8. Proteinbestimmung 42

3.9. Esterasebestimmung 42

3.10. Die Bestimmung von Metallkationen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie 43

3.10.1. Arbeitsweise 43

3.10.2. Störungen bei der Atomabsorptionsspektralphotometrie und ihre Beseitigung 47

3.10.2.1. Durch die Meßmethodik bedingte Störungen 47

3.10.2.2. Durch die Probenzusammensetzung bedingte Störungen 51

3.10.3. Die Bestimmung von Metallionen unter den Bedingungen der extremen Spurenanalyse 56

3.10.3.1. Lithium 57

3.10.3.2. Natrium 58

3.10.3.3. Kalium 59

3.10.3.4. Magnesium 59

3.10.3.5. Kalzium 60

3.10.3.6. Zink 61

Seite

3.11. Verwendete Chemikalien 63

3.12. Auswertung der Ergebnisse 65

4. Ergebnisse 70

4.1. Quantitative Analyse der Präparationsvorstufen 70

4.2. Quantitative Analyse der Dichtegradienten 85

4.2.1. Kontinuierliche Gradienten von Zonalrotoren . 85

4.2.2. P_3^+-beladene Glycingradienten des Typs III ... 85

4.2.3. P_3^+-beladene Glycingradienten des Typs II 97

4.3. Untersuchung möglicher Artefakte und Berechnung der Konzentrationsverhältnisse in der Vesikelfraktion 107

4.3.1. Einflüsse des Suspensionsmediums 107

4.3.2. Auswascheffekte 108

4.3.3. Gradienten des Typs I 109

4.3.4. Konzentrationsverhältnisse in der Vesikelfraktion 109

5. Diskussion 111

5.1. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und Zink im elektrischen Organ von Torpedo marmorata 111

5.2. Der Ionengehalt im Blutplasma, in der Cerebrospinalflüssigkeit und im elektrischen Gewebe 112

5.3. Die Metallionen in den subzellulären Fraktionen des elektrischen Organs können mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie quantitativ bestimmt werden 114

5.4. Präparation der subzellulären Fraktionen 115

5.5. Natrium, Kalium und Magnesium als frei gelöste Ionen 117

5.6. Kalzium als physiologisch aktiver Membranbestandteil 118

Seite

5.7. Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Zink und zugesetztes Lithium als Bestandteile der cholinergen synaptischen Vesikel 119

5.8. Die reizabhängige Ablösung des Kalziums von der Membran 120

5.9. Ionenaustausch in den synaptischen Vesikeln als Folge der Transmitterfreisetzung 130

5.10. Zur Vesikelheterogenität 138

5.11. Über die Beteiligung einer Magnesium-ATPase 141

6. Zusammenfassung 142

Anhang 1: Datenverarbeitung A-1

Programm "LESEN" A-2

Programm "AUSWERTEN" A-5

Anhang 2: Literaturverzeichnis A-17

Vorwort und Danksagungen

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

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

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

des Instituts zur Verfügung stellte, sein Entgegenkommen, wenn experimentelle Komplikationen spezielle Anschaffungen notwendig machten, und nicht zuletzt seine reiche Erfahrung in den Fragen der Fraktionierung subzellulärer Organellen waren eine immer verfügbare Hilfe, ohne die die Durchführung dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre. Hierfür bin ich Herrn Prof. Whittaker zu tiefstem Dank verpflichtet.
Herr Dr. H. Zimmermann führte mich mit nie nachlassender Sorgfalt in die Arbeitsweisen der Neurochemie und -biologie ein. Außerdem haben mir unsere täglichen Diskussionen zahlreiche Gesichtspunkte erschlossen, viele Methoden aufgezeigt und mich auch immer wieder auf mögliche Fehlerquellen aufmerksam gemacht. Ihm gebührt mein herzlichster Dank. Die elektronenmikroskopischen Kontrolluntersuchungen zu dieser Arbeit wurden von Herrn Dr. Zimmermann durchgeführt.

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

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

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

Nomenklatur und Abkürzungen

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

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

P_n siehe unten

Prot. Protein

RSK relative spezifische Konzentration, vgl. S. 66

S_n siehe unten

S.E.M. Standardabweichung des Mittelwertes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.9. Ionenaustausch in den synaptischen Vesikeln als Folge der Transmitterfreisetzung

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

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

Zwei Gesichtspunkte werden dabei meist außer acht gelassen:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$(12) \qquad X^+_{sol.} + Y^+_{membr.} \rightleftharpoons X^+_{membr.} + Y^+_{sol.}$$

eine freie Bindungsenergie

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

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

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

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

5.10. Zur Vesikelheterogenität

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

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

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

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

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

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

5.11. Über die Beteiligung einer Magnesium-ATPase

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

6. Zusammenfassung

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

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

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

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

Anhang 1: Datenverarbeitung

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

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

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

PROGRAMM "LESEN"

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

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

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

PROGRAMM "AUSWERTEN"

```
55 GOTO 55000
60 PRINT 'FILENAME ';
61 LET Z9=1
62 LET Z8=Z8+1
65 INPUT F$
66 PRINT 'VERGLEICH?     JA = 1     NEIN = 0'
67 INPUT V1
68 IF V0=1 THEN 71
70 OPEN DATEN FOR INPUT AS FILE 1
71 GOSUB 41080
72 LET Z9=2
74 INPUT FROM 1: P0$
75 INPUT FROM 1: P1$
76 INPUT FROM 1: P2$
77 INPUT FROM 1: P3$
78 INPUT FROM 1: P4$
79 INPUT FROM 1: P5$
80 INPUT FROM 1: P6$
81 INPUT FROM 1: P7$
82 INPUT FROM 1: P8$
83 INPUT FROM 1: P9$
96 INPUT FROM 1: M0$
97 INPUT FROM 1: M1$
98 INPUT FROM 1: M2$
99 INPUT FROM 1: M3$
100 INPUT FROM 1: M4$
101 INPUT FROM 1: M5$
102 INPUT FROM 1: M6$
103 INPUT FROM 1: M7$
104 INPUT FROM 1: M8$
105 INPUT FROM 1: M9$
106 INPUT FROM 1: N0$
107 INPUT FROM 1: N1$
110 IF Z8>1 THEN 200
138 DIM O(10)
139 DIM G(10)
140 DIM Q(13)
```

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

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

```
1231 GOSUB 14000
1233 GOSUB 16000
1235 GOSUB 17000
1237 GOSUB 18000
1239 IF M$=M9$ THEN 1243
1240 GOSUB 20000
1241 GOSUB 30050
1242 RETURN
1243 GOSUB 19000
1244 RETURN
1245 GOSUB 41000
1250 IF P$=P0$ THEN 1270
1260 IF P$=P1$ THEN 1270
1265 GO TO 1505
1270 IF F1=F THEN 1280
1275 RETURN
1280 IF Q(M1)=0 THEN 1285
1283 GOSUB 12100
1284 RETURN
1285 GOSUB 11000
1390 RETURN
1505 IF F1=F THEN 1520
1510 RETURN
1520 GOSUB 13000
1530 GOSUB 10000
1550 GOSUB 21100
1600 GOSUB 14000
1700 GOSUB 16000
1800 GOSUB 17000
1900 GOSUB 18000
2000 GOSUB 20000
2005 GOSUB 30050
2010 RETURN
10000 REM SUBROUTINE ZUM NORMIEREN DES NULLWERTES
10080 FOR F1=1 TO F
10090 IF A1>0 THEN 10110
10100 LET D1=0
10110 IF E(F1)<D1 THEN 10120
```

```
10115 GO TO 10130
10120 LET D1=E(F1)
10130 LET A1=A1+1
10138 NEXT F1
10140 IF F1=F THEN 10160
10150 RETURN
10160 FOR A=1 TO F
10170 LET E(A)=E(A)-D1
10180 NEXT A
10190 RETURN
11000 REM SUBROUTINE ZUM SPEICHERN DER BLINDWERTE
11090 LET Q(M1)=Q(M1)+1
11100 FOR A=1 TO F
11110 LET C(M1,A)=D(A)
11120 NEXT A
11190 RETURN
12000 REM SUBROUTINE ZUM MITTELN DER BLINDWERTE
12100 FOR A=1 TO F
12110 LET C(M1,A)=(C(M1,A)+D(A))/(Q(M1)+1)
12120 NEXT A
12190 RETURN
13000 REM SUBROUTINE ZUM SUBTRAHIEREN DER BLINDWERTE
13090 FOR A=1 TO F
13100 IF S$='S005' THEN 13114
13101 IF S$='S006' THEN 13114
13102 IF S$='S007' THEN 13114
13103 IF S$='S008' THEN 13114
13113 GO TO 13116
13114 LET O2=0
13115 GO TO 13118
13116 LET O2=1
13118 LET E(A)=D(A)-C(M1-O2,A)
13120 NEXT A
13190 RETURN
14000 REM SUBROUTINE ZUR NORMIERUNG AUF 1 GRAMM GEWEBE
14100 FOR A=1 TO F
14110 LET E(A)=E(A)/Q
```

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

```
20100 PRINT 'RSK-WERT'
20102 IF P(G1,A)=D THEN 20106
20104 GO TO 20109
20106 PRINT 'KENNE KEIN PROTEIN'
20108 RETURN
20109 FOR A=1 TO F
20110 LET E(A)=E(A)/P(G1,A)
20112 PRINT E(A)
20120 NEXT A
20190 RETURN
21100 FOR A=1 TO F
21110 LET E(A)=(1000*E(A))/M2
21140 NEXT A
21150 RETURN
30050 REM SUBROUTINE ZUR MITTELWERTBILDUNG UND ZUM STATISTISCHEN
      VERGLEICH DER GRADIENTEN
30098 FOR A=1 TO F
30099 LET B5=D
30100 LET G(A)=E(A)
30101 LET E(A)=E(A)-Z(Z8,P1,G1,A)*E(A)
30102 IF Z(Z8,P1,G1,A)=1 THEN 30111
30104 FOR Q9=1 TO 6
30105 IF (A-G9)<1 THEN 30111
30106 LET E(A)=E(A)+Z(Z8,P1,G1,A-Q9)*G(A-Q9)
30107 GO TO 62000
30108 GO TO 30111
30109 NEXT Q9
30111 LET E(A)=E(A)/(B5+1)
30120 NEXT A
30200 LET O5=D
30220 FOR A=1 TO F
30260 IF A-1<1 THEN 30400
30280 IF Z(Z8,P1,G1,A-1)=1 THEN O5=O5+1
30400 LET O(A-O5)=E(A)
30420 NEXT A
30500 FOR A=1 TO F
30520 LET E(A)=O(A)
30540 NEXT A
31600 IF V1=1 THEN GO TO 31605 ELSE GO TO 31700
```

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

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

```
50119 IF X(X,N1)<=0 THEN 50310
50120 LET S(X,N1,A)=H(X,N1,A)-(F(X,N1,A)Δ2)/X(X,N1)
50129 IF X(Y,N1)<=0 THEN 50300
50130 LET S(Y,N1,A)=H(Y,N1,A)-(F(Y,N1,A)Δ2)/X(Y,N1)
50139 IF (X(X,N1)+X(Y,N1))<=2 THEN 50300
50140 LET S(X,N1,A)=(S(X,N1,A)+S(Y,N1,A))
50141 LET S(X,N1,A)=S(X,N1,A)/(X(X,N1)+X(Y,N1)-2)
50150 LET S(X,N1,A)=SQR(S(X,N1,A))
50160 LET S(X,N1,A)=S(X,N1,A)*SQR(1/X(X,N1)+1/X(Y,N1))
50162 LET T(X,N1,A)=(F(X,N1,A)/X(X,N1)-F(Y,N1,A)/X(Y,N1))
50164 LET T(X,N1,A)=T(X,N1,A)/S(X,N1,A)
50175 PRINT 'VERGLICHEN  ';X;'  ';Y;'   ';
50178 PRINT 'FRAKTION ';A
50179 PRINT 'DIFFERENZ DER MITTELWERTE = ';
50180 PRINT (F(X,N1,A)/X(X,N1)-F(Y,N1,A)/X(Y,N1));'  ';
50190 PRINT 'T-WERT = ';T(X,N1,A);
50200 PRINT '     ';(X(X,N1)+X(Y,N1)-2);' FREIHEITSGRADE'
50280 NEXT A
50300 NEXT Y
50310 NEXT X
50320 NEXT N1
50330 GO TO 64998
51000 GOSUB 60000
51001 REM SUBROUTINE ORDNET DER KOMPONENTE EINEN WERT N1 ZU
51002 IF M$=MO$ THEN N1=0
51010 IF M$=M1$ THEN N1=0
51020 IF M$=M2$ THEN N1=2
51030 IF M$=M3$ THEN N1=3
51040 IF M$=M4$ THEN N1=4
51050 IF M$=M5$ THEN N1=5
51060 IF M$=M6$ THEN N1=6
51070 IF M$=M7$ THEN N1=7
51080 IF M$=M8$ THEN N1=8
51090 IF M$=M9$ THEN N1=9
51200 LET B(X)=X(X,N1)
51210 RETURN
55000 REM SUBROUTINE ZUR DICHTENORMIERUNG
55010 PRINT 'ZAHL DER EXPERIMENTE'
```

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

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

Anhang 2: Literaturverzeichnis

Abood, L.G. (1966): Interrelationships between phosphates and calcium in bioelectric phenomena. Int. Rev. Neurobiol., 9, 223-261.

Alnaes, E. and Rahamimoff, R. (1975): On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol., 248, 285-306.

Amsterdam, A., Ohad, I. and Schramm, M. (1969): Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. J. Cell Biol., 41, 753-773.

Babel-Guérin, E. (1974): Metabolisme du calcium et liberation de l'acetylcholine dans l'organe electrique de la torpille. J. Neurochem., 23, 525-532.

Babuchin, A. (1876): Übersicht der neuen Untersuchungen über Entwickelung,Bau und physiologische Verhältnisse der elektrischen und pseudoelektrischen Organe. Arch. Anat. Phys., 18, 501-542.

Baker, P.F., Hodgkin, A.L. and Ridgway, E.B. (1971): Depolarization and calcium entry in squid axons. J. Physiol., 218, 709-755.

Banks, P. (1965): The adenosine-triphosphatase activity of adrenal chromaffin granules. Biochem. J., 95, 490-496.

Banks, P. and Helle, K. (1965): The release of protein from the stimulated adrenal medulla. Biochem. J., 97, 40-41C.

Bargmann, W. (1954): Über die Endomeninx der Fische. (Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Turbanorgane.) Z. Zellforsch., 40, 88-100.

Batra, S. (1973): The role of mitochondrial calcium uptake in contraction and relaxation of the human myometrium. Biochim. Biophys. Acta, 305, 428-432.

Bazemore, A.W., Elliott, K.A.C. and Florey, E. (1957): Isolation of Factor 1. J. Neurochem., 1, 334-339.

Berl, S., Puszkin, S. and Nicklas, W.J. (1973): Actomyosin-like protein in brain. Actomyosin-like protein may function in the release of transmitter material at synaptic endings. Science, 179, 441-446.

Berneis, K.H., Da Prada, M. and Pletscher, A. (1970): Metal-dependent aggregation of nucleotides with formation of biphasic liquid systems. Biochim. Biophys. Acta. 215, 547-549.

Berneis, K.H., Da Prada, M. and Pletscher, A. (1971): A possible mechanism for uptake of biogenic amines by storage organelles: incorporation into nucleotide-metal aggregates. Experientia, 27, 917-918.

Berneis, K.H., Pletscher, A. and Da Prada, M. (1969): Metal-dependent aggregation of biogenic amines: a hypothesis for their storage and release. Nature, 224, 281-283.

Bernstein, J. (1912): Elektrobiologie. Fr. Vieweg, Braunschweig.

Birks, R.I. and Cohen, M.W. (1965): Effects of sodium on transmitter release from frog motor nerve terminals. In: Muscle, hrsg. von Paul, W.M., Daniel, E.E., Kay, C.M., und Monkton, G. London, Pergamon Press, S. 403-420.

Blaustein, M.P. (1971): Preganglionic stimulation increases calcium uptake by sympathetic ganglia. Science, 172, 391-393.

Blaustein, M.P. (1974): The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 70, 33-82.

Blaustein, M.P. and Oborn, C.J. (1975): The influence of sodium on calcium fluxes in pinched-off nerve terminals in vitro. J. Physiol., 247, 657-686.

Bloom, F. and Barrnett (1966): Fine structural localization of acetylcholinesterase in electroplaque of the electric eel. J. Cell Biol., 29, 475-495.

Bock, E. and Jørgensen, O.S.: Rat brain synaptic vesicles and synaptic plasma membranes compared by crossed immunoelectrophoresis. FEBS Letters, im Druck.

Borowitz, J.L. (1969): Effect of acetylcholine on the subcellular distribution of ^{45}Ca in bovine adrenal medulla. Biochem. Pharmakol., 18, 715-723.

Borowitz, J.L., Fuwa, K. and Weiner, N. (1965): Distribution of metals and catecholamines in bovine adrenal medulla sub-cellular fractions. Nature, 205, 42-43.

Boyne, A.F., Bohan, T.P. and Williams, T.H. (1974): Effects of calcium-containing fixation solutions on cholinergic synaptic vesicles. J. Cell Biol., 63, 780-795.

Burger, W. (1967): Problems in the electrolyte economy of the spiny dogfish, Squalus acanthias. In:Sharks, skates, and rays, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson, and D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.

Carafoli, E. (1974): Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. Biochem. Soc. Symp., 39, 89-109.

Carafoli, E. and Rossi, C.S. (1971): Calcium transport in mitochondria. Advances in Cytopharmacology, 1, 209-227.

Case, R.M. and Clausen, T. (1973): The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. J. Physiol., 235, 75-102.

Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. and Mauro, A. (1973): Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol., 57, 499-524.

Clemente, F. and Meldolesi, J. (1975): Calcium and pancreatic secretion. J. Cell Biol., 65, 88-102.

Collier, B. (1969): The preferential release of newly synthesized transmitter by a sympathetic ganglion. J. Physiol., 205, 341-352.

Curtis, D.R., Perrin, D.D. and Watkins, J.C. (1960): The excitation of spinal neurones by the ionophoretic application of agents which chelate calcium. J. Neurochem., 6, 1-20.

Dale, H.H., Feldberg, W. and Vogt, M. (1936): Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. J. Physiol., 86, 353-380.

del Castillo, J. and Engbaek, L. (1954): The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. J. Physiol., 124, 370-384.

del Castillo, J. and Katz, B. (1954): Quantal components of the endplate potential. J. Physiol. (Lond.), 124, 560-573.

del Castillo, J. and Katz, B. (1956): Biophysical aspects of neuromuscular transmission. Prog. Biophys. biophys. Chem., 6, 121-170.

de Meis, L., Rubin-Altschul, B.M. and Machado, R.D. (1970): Comparative data of Ca^{2+} transport in brain and skeletal muscle. J. Biol. Chem., 245, 1883-1889.

de Robertis, E.D.P. and Bennett, H.S. (1955): Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1, 47-58.

de Robertis, E. and Rodriguez de Lores Arnaiz, G. (1969): Structural components of the synaptic region. In Handbook of Neurochemistry, herausgegeben von A. Lajtha, 2, 365-392, Plenum Press, New York.

de Robertis, E., de Iraldi, A.P., Rodriguez and Gomez, J. (1961): On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. J. biophys. biochem. Cytol., 9, 229-235.

de Robertis, E., Rodriguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino de Iraldi, A. and Zieher, L.M. (1963): Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. J. Neurochem., 10, 225-235.

Diamond, J.M. and Wright, E.M. (1969): Biological membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. Ann. Rev. Physiol., 31, 581-646.

Diner, O. (1967): L'expulsion des granules de la médullo-surrénale chez le Hamster. C.R. Acad. Sc. Paris, D 265, 616-619.

Douglas, W.W. (1974): Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis-vesiculation sequence. Biochem. Soc. Symp., 39, 1-28.

Douglas, W.W. and Poisner, A.M. (1964): Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis. J. Physiol., 172, 1-18.

Douglas, W.W. and Rubin, R.P. (1963): The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. J. Physiol., 167, 288-310.

Douglas, W.W., Ishida, A. and Poisner, A.M. (1965): The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from the isolated neurohypophysis. J. Physiol., 181, 753-759.

Dowdall, M.J. and Simon, E.J. (1973): Comparative studies on synaptosomes: uptake of N-Me-^{3}H choline by synaptosomes from squid optic lobes. J. Neurochem., 21, 969-982.

Dowdall, M.J. and Zimmermann, H. (1974): Evidence for heterogeneous pools of acetylcholine in isolated cholinergic synaptic vesicles. Brain Research, 71, 160-166.

Dowdall, M.J., Boyne, A.F. and Whittaker, V.P. (1974): Adenosine triphosphate, a constituent of cholinergic synaptic vesicles. Biochem. J., 140, 1-12.

Dujmovic, M., Adrian, P. and Knözinger, E. (1974): Eine neuartige Methode der Kompensation unspezifischer Lichtverluste in der Atom-Absorptions-Spektroskopie, Beckman Report, 1 u. 2 / 1974, S. 36-39.

Eccles, J.C. (1964): The Physiology of Synapses. Springer-Verlag, Berlin.

Elliott, T.R. (1914): The Sidney Ringer memorial lecture on the adrenal glands. Brit. Med. J., 1914, S. 1393-1397.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol., 7, 88.

Euler, von, C. (1962): On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In: Physiologie de l'hippocampe. Colloques internationeaux du Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1962, S. 135-145.

Falck, B., Häggendal, J. and Owman, C. (1963): The localisation of adrenalin in adrenergic nerves in the frog. Q. J. Exp. Physiol., 48, 253-257.

Fatt, P. and Katz, B. (1952): Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. Physiol., 117, 109-128.

Fawcett, D.W., Powell, A.E. and Sachs, H. (1968): Biosynthesis and release of neurophysin. Endocrinology 83, 1299.

Feldberg, W., Fessard, A. (1942): The cholinergic natur of the nerves ot the electric organ of the Torpedo (Torpedo marmorata). J. Physiol., 101, 200-216.

Fillion, G.M.B., Slorach, S.A. and Uvnäs, B. (1970): The release of histamine, heparin and granule protein from rat mast cells treated with compound 48/80 in vitro. Acta physiol. scand., 78, 547-560.

Foreman, J.C. and Mongar, J.L. (1972): The role of the alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion. J. Physiol., 224, 753-769.

Frankenhaeuser, B. (1957): The effect of calcium on the myelinated nerve fibre. J. Physiol., 137, 245-260.

Frankenhaeuser, B. and Hodgkin, A.L. (1957): The action of calcium on the electrical properties of squid axons. J. Physiol., 137, 218-244.

Fritsch, G. (1890): Die elektrischen Fische. Zweite Abteilung. Die Torpedineen, von Veit, Leipzig.

Gaddum, J.H. and Stephenson, R.P. (1958): A microbath. Brit. J. Pharmacol., 13, 493-497.

Germain, M. and Proulx, P. (1965): Adenosinetriphosphatase activity in synaptic vesicles of rat brain. Biochem. Pharmacol., 14, 1815-1819.

Gilbert, P.W., Mathewson, R.F. and Rall, D.P. (1967): Sharks, skates, and rays. The John Hopkins Press. Baltimore.

Haga, T. and Noda, H. (1973): Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. Biochem. Biophys. Acta, 291, 564-575.

Hanig, R.C. and Aprison, M.H. (1965): Determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in rabbit caudate nuclei by atomic absorption spectrophotometry. Life Sciences, 4, 945-948.

Hanig, R.C. and Aprison, M.H. (1967): Determination of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium, zinc and chloride concentrations in several brain areas. Anal. Biochem., 21, 169-177.

Hanig, R.C., Tachiki, K.H. and Aprison, M.H. (1972): Subcellular distribution of potassium, sodium, magnesium, calcium and chloride in cerebral cortex. J. Neurochem., 19, 1501-1507.

Harvey, A.M. and MacIntosh, F.C. (1940): Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. J. Physiol., 97, 408-416.

Hebb, C.O. and Krnjević, K. (1962): The physiological significance of acetylcholine. In: Neurochemistry, herausgegeben von K.A.C. Elliott, I.H. Page and J.H. Quastel, Thomas, Springfield.

Hebb, C.O. and Whittaker, V.P. (1958): Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. J. Physiol., 142, 187-196.

Helle, K.B. (1973): Storage and release of neurotransmitters. Abstr. 9th Int. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, S. 440.

Heuser, J.E. and Reese, T.S. (1973): Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Cell Biol., 57, 315-344.

Hillman, D.E. and Llinás, R. (1974): Calcium-containing electron-dense structures in the axons of the squid giant synapse. J. Cell Biol., 61, 146-155.

Hoar, W.S. and Randall, D.J. (1969): Fish Physiology, Band 1, Excretion, Ionic Regulation, and Metabolism, Academic Press, New Yoek and London.

Hodgkin, A.L. (1958): The Croonian Lecture: Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres. Proc. Roy Soc., Ser., B., 148, 1-37.

Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D. (1955): Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol. (Lond.), 128, 28-60.

Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D. (1957): Movements of labelled calcium in squid giant axons. J. Physiol., 138, 253-281.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952a): Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. (lond.), 116, 449-472.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952b): The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (Lond.), 116, 473-496.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952c): The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (Lond.), 116, 497-506.

Hokin, L.E. (1966): Effects of calcium omission on acetylcholine-stimulated amylase secretion and phospholipid synthesis in pigeon pancreas slice. Biochim. Biophys. Acta, 115, 219.

Holland, W.C. and Auditore, G.V. (1955): Distribution of potassium in liver, Kidney and brain of the rat and guinea pig. Am. J. Physiol., 1955, 309-313.

Horsfield, G.I. (1965): The effect of compound 48/80 on the rat mast cell. J. Path. Bact., 90, 599-605.

Hosie, R.J.A. (1965): The localization of adenosine triphosphatase in morphologically characterized fractions of guinea pig brain. Biochem. J., 96, 404.

Hubbard, J.I. (1970): Mechanism of transmitter release, Prog. Biophys. Mol. Biol., 21, 33-124.

Hubbard, J.I. and Kwanbunbumpen, S. (1968): Evidence for the vesicle hypothesis. J. Physiol., 194, 407-420.

Ibata, Y. and Otsuka, N. (1968): Electronmicroscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. J. Histochem. Cytochem., 17, 171-175.

Ichikawa, A. (1965): Fine structural changes in response to hormonal stimulation of the perfused canine pancreas. J. Cell Biol., 24, 369-385.

Israël, M., Gautron, J. and Lesbats, B. (1968): Isolement des vésicules synaptiques de l'organe électrique de la Torpille et localisation de l'acétylcholine à leur niveau. Acad. Sci., Paris, 266, 273-275.

Israël, M., Gautron, J. and Lesbats, B. (1970): Fractionnement de L'Organe Electrique de La Torpille: Localisation Subcellulaire de L'Acetylcholine. J. Neurochem., 17, 1441-1450.

Iversen, L.L. (1967): The Uptake and Storage of Noradrenalin in Sympathetic Nerves. Cambridge, University Press.

Jander, G. and Blasius, B. (1967): Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie, Hirzel, Stuttgart.

Jenkinson, D.H. (1960): The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end-plate. J. Physiol., 152, 309-323.

Kadota, K., Mori, S. and Imaizumi, R. (1967): The properties of ATPase of synaptic vesicle fraction. J. Biochem., 61, 424-432.

Kamino, K., Uyesaka, N., Ogawa, M. and Inouye, A. (1975): Calcium-binding of synaptosomes isolated from rat brain cortex. II. Inhibitory effects of magnesium ions and some other cations. J. Membrane Biol., 21, 113-124.

Katz, B. (1969): The Release of Neuronal Transmitter Substances. University Press, Liverpool.

Katz, B. and Miledi, R. (1965): The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. Proc. R. Soc. Lond., B 161, 496.

Kawamura, H., Tanaka, G. and Ohyagi, Y. (1973): The rapid determination of barium in bone by atomic absorption spectrophotometry. Spectrochim. Acta, B 28, 309-318.

Keller, P.J. and Cohen, E. (1961): Enzymic composition of some cell fractions of bovine pancreas. J. biol. Chem., 236, 1407-1413.

Klein, R.L. and Thureson-Klein, Å. (1971): An electron microscopic study of noradrenaline storage vesicles isolated from bovine splenic nerve trunk. J. Ultrastructure Research, 34, 473-491.

Kotz, L., Kaiser, G., Tschöpel, P. und Tölg, G. (1972): Aufschluß biologischer Matrices für die Bestimmung sehr niedriger Spurenelementgehalte bei begrenzter Einwaage mit Salpetersäure unter Druck in einem Teflongefäß. Z. Anal. Chem., 260, 207-209.

Lagercrantz, H. and Stajärne, L. (1974): Evidence that most noradrenaline is stored without ATP in sympathetic large dense core nerve vesicles. Nature, 249, 843-844.

Lastowecka, A. and Trifaró, J.M. (1974): The effect of sodium and calcium ions on the release of catecholamines from the adrenal medulla: sodium deprivation induces release by exocytosis in the absence of extracellular calcium. J. Physiol., 236, 681-705.

Lazarewicz, J.W., Haljamäe, H. and Hamberger, A. (1974): Calcium metabolism in isolated brain cells and subcellular fractions. J. Neurochem., 22, 33-46.

Lehninger, A.L. (1971): Biochemistry, Worth Publishers, New York, 5. Aufl., 1971, S. 289.

Liley, A.W. (1956): The quantal components of the mammalian end-plate potential. J. Physiol., 133, 571-587.

Llinás, R., Blinks, J.R. and Nicholson, C. (1972): Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. Science, 176, 1127-1129.

Locke, F.S. (1894): Notiz über den Einfluß physiologischer Kochsalzlösung auf die elektrische Erregbarkeit von Muskel und Nerv. Zentralbl. Physiol., 8, 166.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265-275.

L'vov, B.V. (1970): Atomic Absorption Spectrochemical Analysis, Adam Hilger, London.

Madeira, V. and Antunes-Madeira, M.C. (1973): Interaction of Ca^{2+} and Mg^{2+} with synaptic plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta, 323, 396-407.

Malaisse, W.J. (1972): Role of calcium in insulin secretion Israel J. Med. Sci., 8, 244.

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O. and Lacy, P.E. (1971): The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system, Diabetes, 20, 257.

Manery, J.F. (1966): Effects of Ca ions on membranes. Fed. Proc., 25, 1804-1810.

Marchbanks, R.M. and Israël, M. (1972): The heterogeneity of bound acetylcholine and synaptic vesicles. Biochem. J., 129, 1049-1061.

Maren, T.H. (1967): Special body fluids of the elasmobranch. In: Sharks, skates, and rays, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson und D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.

Martin, J.H., Carson, F.L. and Race, G.J. (1974): Calcium-containing platelet granules. J. Cell Biol., 60, 775-777.

Martonosi, A. and Feretos, R. (1964): Sarcoplasmic reticulum. I. The uptake of Ca^{++} by sarcoplasmic reticulum fragments. J. biol. Chem., 239, 648-658.

Massmann, H. (1973): Colloquium Spectroscopicum Intern. XVII, Florenz 16-22 Sep., 51.

Mathewson, R.F., Wachtel, A. and Grundfest, H. (1959): In: Bioelectrogenesis, herausgegeben von C. Chagas und A. Paes de Carvalho, S. 25-33. Elsevier, Amsterdam.

Matthews, E.K., Petersen, O.H. and Williams, J.A. (1973): Pancreatic acinar cells: Acetylcholine-induced membrane depolarization, calcium efflux and amylase release. J. Physiol., 234, 689-701.

McElroy, W.D. (1969): Biolumineszenz - Chemie und biologische Bedeutung. Umschau, 69, 472-474.

Miledi, R. (1973): Transmitter release induced by injection of calcium into nerve terminals. Proc. R. Soc. Lond., Ser. B. Biol. Sci. 183, 421.

Mongar, J.L. and Schild, H.O. (1958): The effect of calcium and pH on the anaphylactic reaction. J. Physiol., 140, 272-284.

Murdaugh, H.V. and Robin, E.D. (1967): Acid-base metabolism in the dogfish shark. In: Sharks, skates, and rays, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson und D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.

Nagasawa, J., Douglas, W.W. and Schulz, R.A. (1970): Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of 'synaptic vesicle' formation in posterior pituitary glands. Nature, Lond., 227, 407-409.

Nagy, A., Baker, R.R., Morris, S.J. and Whittaker, V.P. (1975): The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. Brain Research, in press.

Nickel, E. and Potter, L.T. (1970): Synaptic vesicles in freeze etched electric tissue of Torpedo. Brain Res., 23, 95.

Nijjar, M.S. and Pritchard, E.T. (1973): Calcium binding by a plasma membrane fraction isolated from rat submandibular glands. Biochim. Biophys. Acta, 323, 391-395.

Nordmann, J.J., Dreifuss, J.J. and Legros, J.J. (1971): A correlation of release of polypeptide hormones and of immunoreactive neurophysin from isolated rat neurohypophyses Experientia, 27, 1344-1345.

Ogneff, J. (1897): Über die Entwickelung des elektrischen Organs bei Torpedo. Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt. 270-304.

Okamoto, K. and Kawanishi, H. (1966): Submicroscopic histochemical demonstration of intracellular reactive zinc in cells of pancreatic islet. Endocrinol. Jap., 13, 305.

Oschman, J.L., Hall, T.A., Peters, P.D. and Wall, B.J. (1974): Association of calcium with membranes of squid giant axon. Ultrastructure and microprobe analysis. J. Cell Biol., 61, 156-165.

Otsuka, M., Ohtsuki, I. and Ebashi, S. (1965): ATP-dependent Ca binding of brain microsomes. J. Biochem., 58, 188-190.

Palay, S.L. and Palade, G.E. (1954): Electron microscope study of the cytoplasm of neurones. Anat. Rec., 118, 336.

Papahadjopoulos, D. (1968): Surface properties of acidic phospholipids: Interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bi-valent metal ions. Biochim. Biophys. Acta, 163, 240-254.

Pfenninger, K.H. and Rovainen, C.M. (1974): Stimulation- and calcium-dependence of vesicle attachment sites in the presynaptic membrane; a freeze-cleave study on the lamprey spinal cord. Brain Res., 72, 1-23.

Pihl, E. and Falkmer, S. (1967): Trials to modify the sulfide-silver method for ultrastructural tissue localization of heavy metals. Acta Histochem. (Jena), 27, 34.

Pletscher, A., Da Prada, M., Steffen, H., Lütold, B. and Berneis, K.H. (1973): Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. Brain Res., 62, 317-326.

Poisner, A.M. and Hava, M. (1970): The role of adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the release of catecholamines from the adrenal medulla. IV. Adenosine triphosphate-activated uptake of calcium by microsomes and mitochondria. Mol. Pharmacol., 6, 407-415.

Politoff, A.L., Rose, S. and Pappas, G.D. (1974): The calcium binding sites of the frog sartorius neuromuscular junction. J. Cell Biol., 61, 818-823.

Poste, G. and Allison, A.C. (1973): Membrane fusion. Biochim. Biophys. Acta, 300, 421-465.

Ramírez Muñoz, J. (1968): Atomic Absorption Spectroscopy, Elsevier, Publishing Comp. Amsterdam.

Randolph, M.L. and Ryan, R.R. (1950): A slicer for sampling liquids. Science, 112, 528.

Rasmussen, H. (1970): Cell communication, calcium ion, and cyclic AMP. Science, 170, 404-412.

Repke, D.I. and Katz, A.M. (1972): Calcium-binding and calcium-uptake by cardiac microsomes: A kinetic analysis. J. Molec. Cell. Cardiol., 4, 401-416.

Ringer, S. (1883): A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J. Physiol., 4, 29-42.

Robbins, J. (1959): The excitation and inhibition of crustacean muscle by amino acids. J. Physiol., 148, 39-50.

Robinson, J.D. and Lust, W.D. (1968): Adenosine triphosphate-dependent calcium accumulation by brain microsomes. Arch. Biochem., 125, 286-294.

Rubin, R.P. (1974): Calcium and the Secretory Process. Plenum Press, New York and London.

Russel, J.T. and Thorn, N.A. (1975): Adenosine triphosphate dependent calcium uptake by subcellular fractions from bovine neurohypophyses. Acta physiol. scand., 93, 364-377.

Russel, J.T., Warberg, J. and Thorn, N.A. (1974): Calcium and stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis. IV. Effect of N-ethylmaleimide on 45-calcium^{2+} transport and vasopressin release by isolated rat neurohypophyses. Acta endocr. (Kbh.). 77, 691-698.

Ryall, R.W. (1962): Sub-cellular distribution of pharmacologically active substances in guinea pig brain. Nature, 196, 680-681.

Ryall, R.W. (1964): The subcellular distributions of acetylcholine, substance P, 5-hydroxytryptamine, γ-aminobutyric acid and glutamic acid in brain homogenates. J. Neurochem., 11, 131-145.

Schatzmann, H.J. and Vincenzi, F.F. (1969): Calcium movements across the membrane of human red cells. J. Physiol., 201, 369-395.

Schmidt, J. and Raftery, M.A. (1974): The cation sensitivity of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. J. Neurochem., 23, 617-623.

Schmitt, F.O. (1968): Fibrous proteins - neuronal organelles. Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1092.

Schneider, F.H., Smith, A.D. and Winkler, H. (1967): Secretion from the adrenal medulla: biochemical evidence for exocytosis. Br. J. Pharmac. Chemother., 31, 94-104.

Selinger, Z. (1975): Three functions of calcium in the rat parotid gland. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.

Selinger, Z., and Naim, E. (1970): The effect of calcium on amylase secretion by rat parotid slices. Biochim. biophys. Acta, 203, 335-337.

Selinger, Z., Naim, E. and Lasser, M. (1970): ATP-dependent calcium uptake by microsomal preparations from rat parotid and submaxillary glands. Biochim. Biophys. Acta, 203, 326.

Serck-Hanssen, G. (1972): The release of protein in the course of catecholamine secretion from bovine adrenals perfused in vitro. Acta physiol. scand., 86, 289-298.

Serck-Hanssen, G. and Christiansen, E.N. (1973): Uptake of calcium in chromaffin granules of bovine adrenal medulla stimulated in vitro. Biochim. Biophys. Acta, 307, 404-414.

Serck-Hanssen, G. and Helle, K. (1972): Biochemical and morphological characterization of chromaffin granules accumulating during in vitro secretion from perfused adrenal glands. Biochim. Biophys. Acta, 273, 199-207.

Sheridan, M.N., Whittaker, V.P. and Israël, M. (1966): The subcellular fractionation of the electric organ of Torpedo. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat., 74, 291-307.

Sjöstrand, F.S. (1953): The ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye. J. appl. Physics, 214, 1422.

Skou, J.C. (1960): Further investigations on a $Mg^{++} + Na^{+}$-activated adenosine triphosphatase possibly related to the active-linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. Biochim. Biophys. Acta, 42, 6-23.

Slavin, W. (1968): Atomic Absorption Spectroscopy. Interscience Publishers, New York, London, Sydney.

Smith, A.D. (1971): Summing up: some implications of the neuron as a secreting cell. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B 261, 423-437.

Stanley, P.E. and Williams, S.G. (1969): Use of liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Analyt. Biochem., 29, 381-392.

Szerb, J.C. (1961): The estimation of acetylcholine, using leech muscle in a microbath. J. Physiol. (Lond.), 158, 8-9P.

Tamir, H., Rapport, M.M. and Roizin, L. (1974): Preparation of synaptosomes and vesicles with sodium diatrizoate. J. Neurochem. 23, 943-949.

Tan, A.T. (1975): Mobilization of synaptic membrane-bound calcium by acidic amino acids. J. Neurochem. 24, 127-134.

Thorson, T.B. (1967): Osmoregulation in fresh-water elasmobranchs. In: Sharks, skates, and rays, herausgegeben von P.W. Gilbert, R.F. Mathewson, and D.P. Rall. The John Hopkins Press, Baltimore, 1967.

Triggle, D.J. (1972): Effects of calcium on excitable membranes and neurotransmitter action. Prog. Surf. Memb. Sci., 5, 267-331.

Tsuji, S., Rieger, G. and Peltre, G. (1973): In: La Transmission cholinergique de l'excitation, herausgegeben von INSERM, S. 129-130, Paris.

Urry, D.W., Long, M.M., Ohnishi, T., Jacobs, M. and Mitchell, L.W. (1975): Binding affinities, ion selectivities and conformation of calcium complexes. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.

Usherwood, P.N.R. and Grundfest, H. (1964): Inhibitory postsynaptic potentials in grasshopper muscle. Science, N.Y., 143, 817-818.

Usherwood, P.N.R. and Grundfest, H. (1965): Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects. J. Neurophysiol., 28, 497-518.

Uttenthal, L.O., Livett, B.G. and Hope, D.B. (1971): Release of neurophysin together with vasopressin by a Ca^{2+}-dependent mechanism. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B 261, 379.

Uvnäs, B. (1973): An attempt to explain nervous transmitter release as due to nerve impulse-induced cation exchange. Acta physiol. scand., 87, 168-175.

Vilhardt, H. and Hope, D.B. (1974): Adenosine triphosphatase activity in the neural lobe of the bovine pituitary gland. Biochem. J., 143, 181-190.

Vilhardt, H. and Thorn, N.A., unveröffentlicht, zitiert nach Russel and Thorn, 1975.

Viveros, O.H., Arqueros, L. and Kirshner, N. (1971): Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VII. Effect of insulin administration on the buoyant density, dopamine-hydroxylase, and catecholamine content of adrenal storage vesicles. Mol. Pharmacol., 7, 444-454.

Wagner, R. (1847): Über den feineren Bau des elektrischen Organs im Zitterrochen. In der Dieterich'schen Buchhandlung Göttingen.

Wallach, D. and Schramm, M. (1971): Calcium and the exportable protein in rat parotid gland. Eur. J. Biochem., 21, 433-437.

Watanabe, A. and Tasaki, I. (1971): The biionic action potential and indispensability of divalent cations in the external medium for nerve excitation. Aus: Cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis. Hrsg. Nichols, G. Jr. and Wasserman, R.H., Academic Press.

Weinstein, H. and Kuriyama, K. (1970): Retention and exchange of potassium in a synaptosomal fraction of mouse brain. J. Neurochem., 17, 493-501.

Whittaker, V.P. (1959): The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from brain. Biochem. J., 72, 694-706.

Whittaker, V.P. (1965): The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain junction. Progr. Biophys. Mol. Biol., 15, 39-91.

Whittaker, V.P. (1969): The Synaptosome. In: Handbook of Neurochemistry, herausgegeben von A. Lajtha, 2, 327-364, Plenum Press, New York.

Whittaker, V.P. (1971): Origin and function of synaptic vesicles. Ann. N.Y. Acad. Sci., 183, 21-32.

Whittaker, V.P. (1972): The storage and release of acetylcholine. Biochem. J., 128, 73-74P.

Whittaker, V.P. (1972a): La vesicule cholinergique. In: La Système Cholinergique en Anesthésiologie et en Réanimation, herausgegeben von G.G. Nahas, J.C. Salamagne, P. Viars und G. Vourc'h. Seite 45. Librairie Arnette, Paris.

Whittaker, V.P. (1973a): The structural and chemical properties of synaptic vesicles. In: Proteins in the Nervous System, herausgegeben von D. Schneider, R.H. Angeletti, A. Bradshaw, A. Grasso and B.W. Moore, Raven Press, New York, Seite 155-169.

Whittaker, V.P. (1973b): The biochemistry of synaptic transmission. Naturwissenschaften, 60, 281-289.

Whittaker, V.P. and Barker, L.A. (1972): The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. In: Meth. Neurochem., 2, 1-52.

Whittaker, V.P., Dowdall, M.J. (1972): La Transmission Cholinergique de l'Excitation, Proc. Symp. de l'INSERM, S. 101 - 117. INSERM, Paris.

Whittaker, V.P. and Dowdall, M.J. (1975): Current state of research on cholinergic synapses. In: Cholinergic Mechanisms, Hrsg. Walser P.G., Raven Press, New York.

Whittaker, V.P. and Zimmermann, H. (1974): Biochemical Studies on Cholinergic Synaptic Vesicles. In: Synaptic Transmission and Neuronal Interaction, herausgegeben von M.V.L. Bennett, Raven, Press, New York.

Whittaker, V.P., Dowdall, M.J. and Boyne, A.F. (1972): The storage and release of acetylcholine by cholinergic nerve terminals: Recent results with non-mammalian preparations. Biochem. Soc. Symp., 36, 49-68.

Whittaker, V.P., Dowe, G.H.C. and Scotto, J. (1971): Vesiculin: a possible counter-ion for acetylcholine in the cholinergic synaptic vesicle. In J. Domonkos, A.F. Fonyó, I. Huszák and J. Szentágothai, Abstr. Commun. 3rd. Int. Meet. Int. Soc. Neurochem., Budapest, Akadémiai Kiadó, Budapest, Seite 266.

Whittaker, V.P., Essman, W.B. and Dowe, G.H.C. (1972): The isolation of pure synaptic vesicles from the electric organs of elasmobranch fish of the family Torpedinidae. Biochem. J., 128, 833-846.

Whittaker, V.P., Michaelson, I.A. and Kirkland, R.J.A. (1964): The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). Biochem. J., 90, 293-303.

Whittaker, V.P., Zimmermann, H. and Dowdall, M.J. (1975): The biochemistry of cholinergic synapses as exemplified by the electric organ of Torpedo. J. Neural Transmission, Suppl. XII, 39-60.

Whittaker, V.P., Dowdall, M.J., Dowe, G.H.C., Facino, R.M. and Scotto, J. (1974): Proteins of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo: Characterization of a low molecular weight acidic protein. Brain Res., 75, 115-131.

Wilde, W.S. (1955): Transport through biological membranes. Ann. Rev. Physiol., 17, 17-36.

Winkler, H., Peer, L., Geissler, D. and Kostron, H. (1975): A new role of calcium for catecholamine-storing vesicles. Auf dem Symposium 'Calcium Transport in Contraction and Secretion', Brixen, 1975. Im Druck, Elsevier, Amsterdam.

Wood, M.J. and Burnstock, G. (1967): Innervation of the lungs of the toad (Bufo marinus) I. Physiology and pharmacology. Comp. Biochem. Physiol., 22, 755-766.

Woodin, A.M. and Wieneke, A.A. (1963): The accumulation of calcium by the polymorphonuclear leucocyte treated with staphylococcal leucocidin and its significance in the extrusion of Protein. Biochem. J., 87, 487-495.

Woodin, A.M. and Wieneke, A.A. (1964): The participation of calcium, adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the extrusion of the granule proteins from the polymorphonuclear leucocyte. Biochem. J., 90, 498-509.

Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1973): Affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. J. Neurochem. 21, 1355-1375.

Yoshida, H., Kadota, K. and Fujisawa, H. (1966): Adenosine triphosphate dependent calcium binding of microsomes and nerve endings. Nature, 212, 291-292.

Zimmermann, H. (1975): Dynamics of synpatic transmission in the cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo. In: Cholinergic Mechanisms, herausgegeben von Walser, P.G., Raven Press, New York.

Zimmermann, H., Whittaker, V.P. (1973): The effect of stimulation on the composition and yield of cholinergic synaptic vesicles. Abstr. Commun. 4th Int. Meet. Int. Soc. Neurochem., Tokyo, Seite 321.

Zimmermann, H. and Whittaker, V.P. (1974): Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo: A combined biochemical, electrophysiological and morphological study. J. Neurochem., 22, 435-450.

Zimmermann, H. and Whittaker, V.P. (1974a): Different recovery rates of the electrophysiological, biochemical and morphological parameters in the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ after stimulation. J. Neurochem., 22, 1109-1114.