

KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

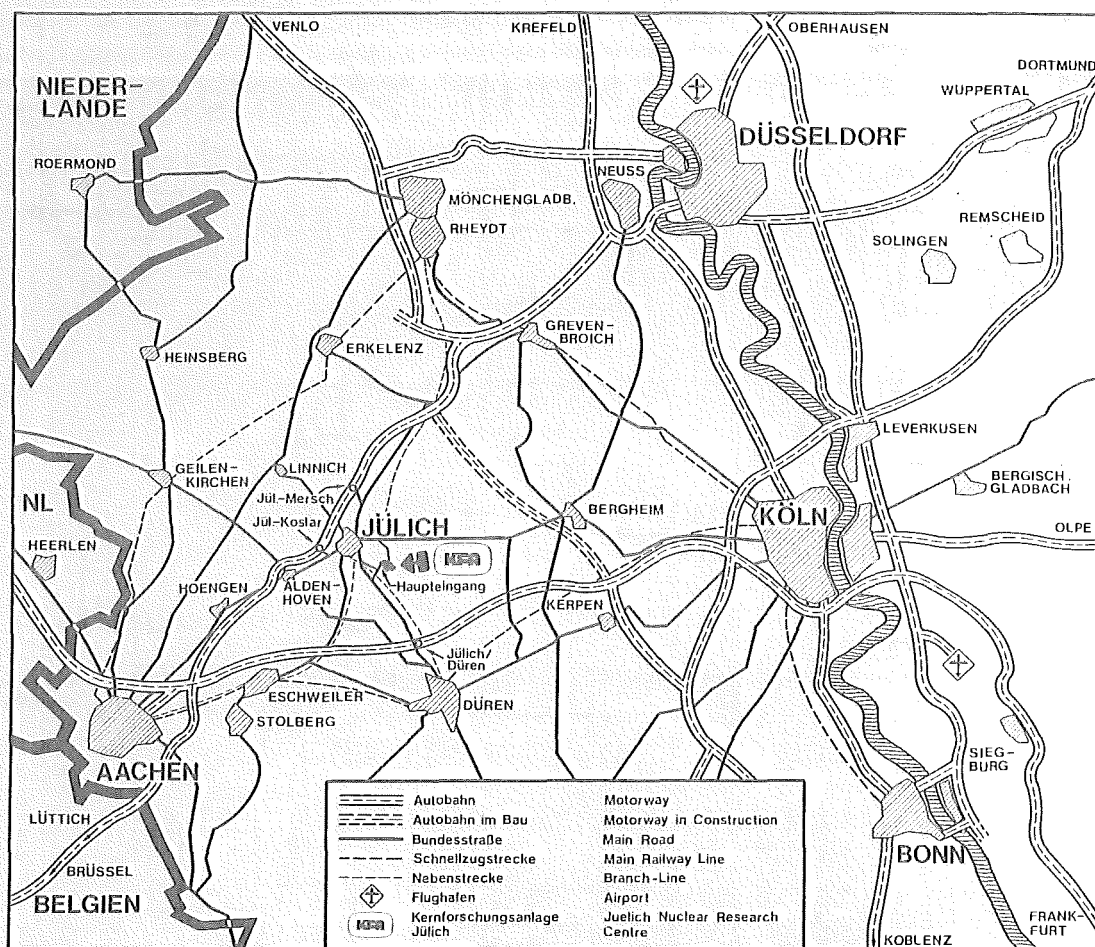
Institut für Neurobiologie

**Ultrastrukturuntersuchungen an der Retina
des Flußkrebsses *Astacus Leptodactylus* mit
Hilfe der Gefrierbruch - und
Ultradünnschnitt - Methode**

von

E. Winterhager

Jül - 1701
Februar 1981
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1701

Institut für Neurobiologie Jül – 1701

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833 556 kfa d

**Ultrastrukturuntersuchungen an der Retina
des Flußkrebsses *Astacus Leptodactylus* mit
Hilfe der Gefrierbruch - und
Ultradünnschnitt-Methode**

von

E. Winterhager

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Summary	III
1 Einleitung	1
1.1 Der Effekt von Licht- und Dunkel- adaptation auf die Ultrastruktur der Retinulazellen von <i>Astacus leptodactylus</i>	3
2 Material und Methode	6
2.1 Versuchsmaterial	6
2.1.1 Isolierung von Augen und Retinen	6
2.1.2 Isolierung von Rhabdomen	6
2.2 Methoden	8
2.2.1 Gefrierbrüche hell- und dunkel- adaptierter Retinen	8
2.2.1.1 Adaptationsbedingungen	8
2.2.1.2 Retinen von hell- und dunkel- adaptierten Krebsen	9
2.2.1.3 Retinen von in vitro hell- und dunkel- adaptierten ganzen Augen	10
2.2.1.4 Gefrierbrüche von Retinen im Ultra- hochvakuum	11
2.2.2 Gefriersprühen isolierter Rhabdome	12
2.2.3 Anhang des methodischen Teils	15
2.2.3.1 Abschätzung der von einer Retina bei Helladaptation absorbierten Photonen- zahl	15
2.2.3.2 Auswertungsmethoden zur Ermittlung von Partikeldichte und Partikelgröße	20
2.2.3.3 Laserdiffraktogramme der Partikelrei- hen auf den PF-Flächen der Mikrovillus- membranen	21
3 Ergebnisse	23
3.1 Ultrastrukturänderungen des Rhabdoms und der umgebenden Retinulazellen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand	23

II

3.1.1	Änderung der Partikelanordnung auf den plasmatischen Mikrovillusmembranflächen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand	23
3.1.2	Gefrierbrüche von Retinen im Ultra- hochvakuum	33
3.1.3	Unfixierte gefriergesprühte Rhabdome hell- und dunkeladaptierter Krebse	36
3.1.4	Abhängigkeit der Reihenbildung der Partikel von der Dauer und Intensität des Adaptationslichtes	40
3.1.5	Der Einfluß von Cycloheximid auf die Partikelreihenbildung auf den Mikro- villusmembranflächen bei Helladapta- tion des ganzen Krebsauges in vitro	41
3.1.5.1	Messungen des Elektroretinogramms einer isolierten Astacus-Retina unter Einwir- kung von Cycloheximid	46
3.1.6	Spektroskopische Messung der Meta- rhodopsinkonzentration von Krebsen unter verschiedenen Adaptationsbe- dingungen	48
3.1.7	Der lichtinduzierte Abbau der Photo- rezeptormembran	50
3.1.8	Anhang zu den Ergebnissen	67
4	Diskussion	
	Ultrastrukturänderungen des Rhabdoms und der umgebenden Retinulazellen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand	73
5	Literaturverzeichnis	83

III

Summary

Ultrastructural changes of the microvilli of the *Astacus* retina depending on the state of light adaptation were investigated by electron microscopy of replicas of freeze fracture faces.

(1) The particles on the plasmatic fracture face (PF) of the microvillus membrane, most of which being identical with rhodopsin, are distributed statistically in the state of dark adaptation. Upon light adaptation (≥ 24 h with $70 \mu\text{W cm}^{-2}$ or ≥ 3 h with $1-2 \text{ mW cm}^{-2}$) the particles become orientated in certain areas in a helical structure of rows (periodicity of 11 nm) around the microvillus. As shown by spray-frozen unfixed rhabdoms of light adapted eyes of *Astacus* these structures are not artefacts caused by glutaraldehyde or glycerol.

As the formation of these rows depends on duration and intensity of the adapting light it seems to be correlated with light-induced processes in the receptor.

(2) Addition of cycloheximide prevents the formation of rows of the particles during light adaptation, which might suggest a relation with protein synthesis.

(3) The structured areas could possibly represent rows of metarhodopsin molecules.

(4) The packing density of the particles of dark adapted retinae is found to be as great as 5000 ± 600 per μm^2 membrane area, that of light adapted retinae as great as $7000 \pm 1400 \mu\text{m}^{-2}$, and is enriched in the structured areas to $11000 \pm 1000 \mu\text{m}^{-2}$. The mean diameter of the particles is 80 Å.

(5) Under high vacuum conditions (UHV) most of the particles of the microvillus membrane are 40-50 Å in diameter, which agrees with the theoretically expected value of rhodopsin.

IV

(6) Illumination with light of higher intensity causes , in addition to the normal light-induced structural changes of the photoreceptor membrane, the formation of myelin-like membrane complexes, which leads to the destruction of the photoreceptor.

1 Einleitung

Elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen an Evertibratenaugen (z.B. Krebs, *Limulus* und Fliegen) haben fundamentales Wissen über den Mechanismus der Photorezeption erbracht (Stieve 1973, 1976, 1977; Hamdorf und Schwemer 1975).

Kenntnisse über die Morphologie der Augen des Sumpfkrebsses (*Astacus leptodactylus*) und des amerikanischen Flußkrebsses (*Procambarus clarkii*) sind lichtmikroskopisch von Bernhards (1916) und elektronenmikroskopisch von Eguchi (1965), Eguchi und Waterman (1966), Eguchi et al. (1973) und Krebs (1972) vermittelt worden.

Astacus leptodactylus besitzt ein typisches Decapodenrhabdom, bestehend aus zusammengesetzten tubulären Strukturen, den Mikrovilli, die von sieben der acht Retinulazellen eines Ommatidiums gebildet werden. Die achte Zelle, die durch das Fehlen von Pigmentgranula gekennzeichnet ist, bildet nur die distale Spitze des Rhabdoms und sendet einen schmalen Axonfortsatz entlang der Retinula nach proximal (Krebs 1972; Hafner 1977). Abb. 1, 2A und 2B geben eine schematische Übersicht über den Aufbau der Retina von *Astacus leptodactylus*. Die Annahme, das Rhabdom sei Sitz des Photopigmentes Rhodopsin und der Ort der photochemischen Reaktion, gilt als gesichert (Eakin 1966; Wilms 1977; Waterman et al. 1969). Es kann funktionell mit den Außensegmenten von Stäbchen und Zapfen der Vertebraten verglichen werden.

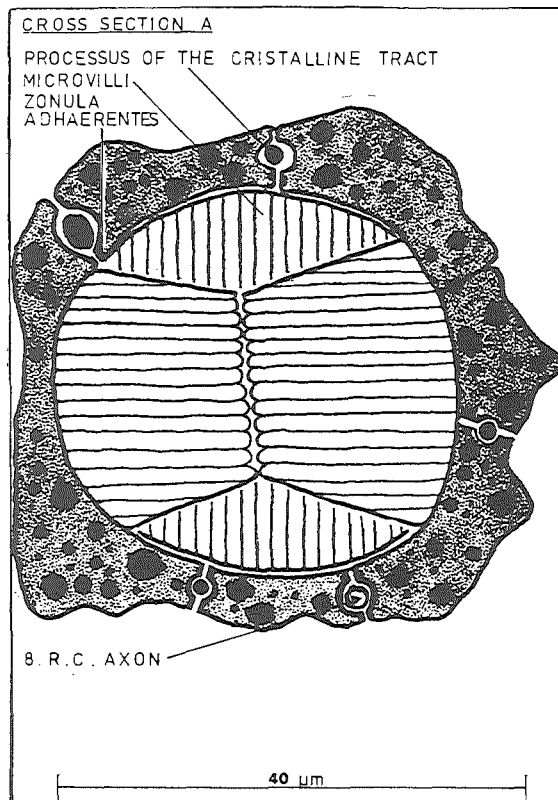


ABB.2A QUERSCHNITT DURCH DIE RETINULAZELLE

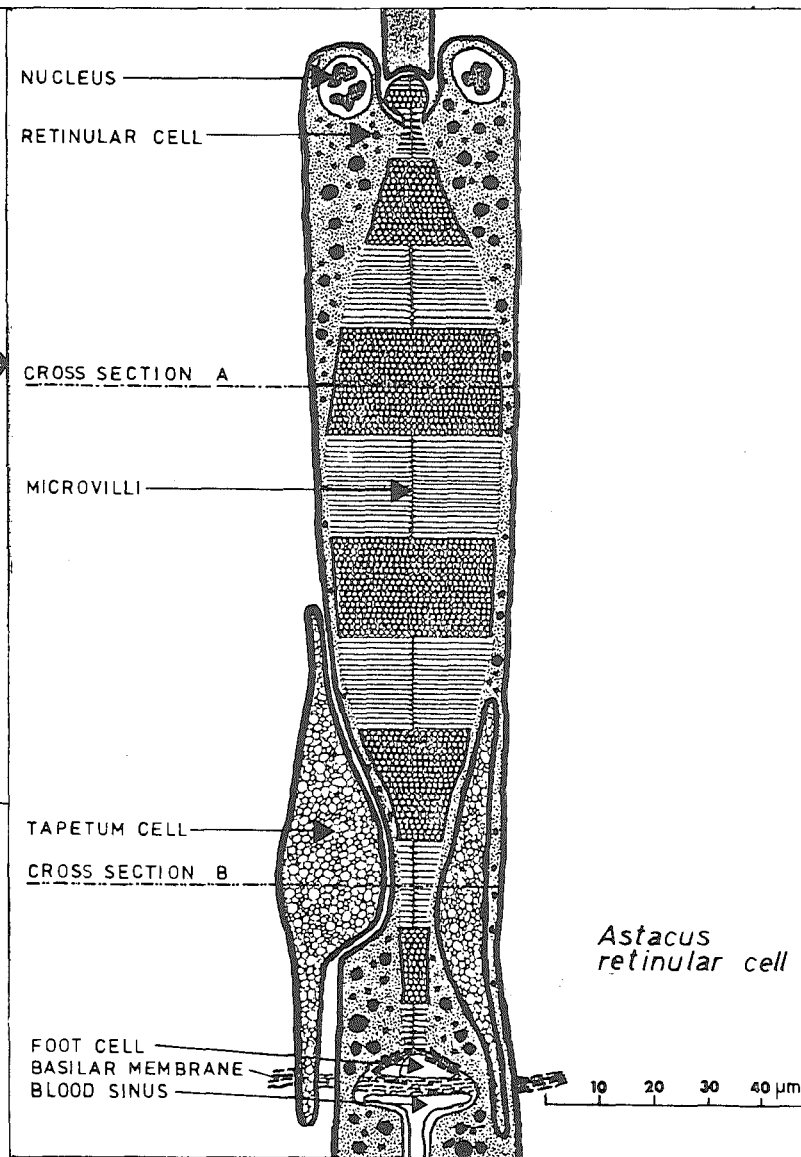


ABB.1 SCHEMA EINER ASTACUS RETINULAZELLE

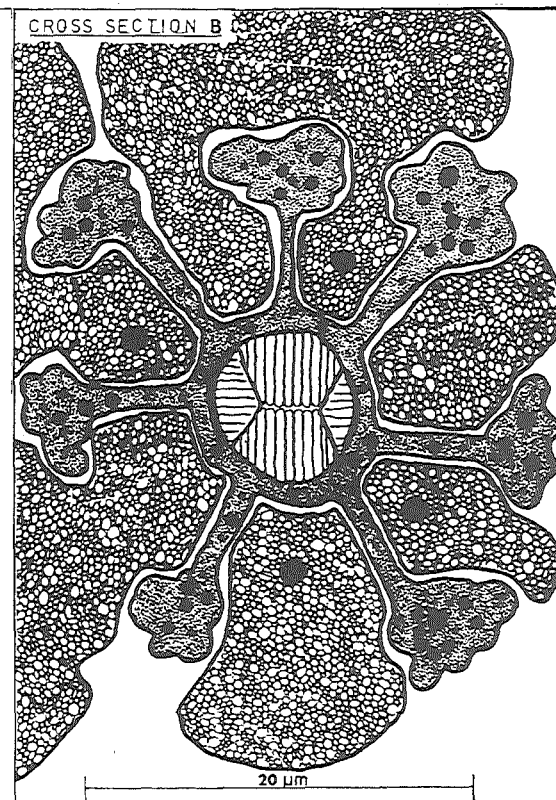


ABB.2B QUERSCHNITT RETINULAZELLE MIT ANGRENZENDE TAPETUM ZELLEN

1.1 Der Effekt von Licht- und Dunkeladaptation auf die Ultrastruktur der Retinulazellen von *Astacus leptodactylus*

Gefrierätzungsuntersuchungen (Fernandez und Nickel 1976; Eguchi und Waterman 1976; Uebachs 1976) haben gezeigt, daß die plasmatischen Membranflächen der Mikrovilli des Krebses mit Partikeln von 70 - 80 Å Durchmesser bedeckt sind, bei denen es sich wahrscheinlich zum größten Teil um Rhodopsin handelt.

Eine Bestätigung dieser Annahme liefern die Untersuchungen an Fliegen, die mit einer Vitamin A-Mangel-diät aufgezogen worden sind: bei diesen ist die Partikeldichte auf ca. 16 % verringert. Diese Abnahme der Partikeldichte stimmt mit der spektroskopisch ermittelten Verminderung der Sehpigmentkonzentration auf 12 % annähernd überein (Boschek und Hamdorf 1976). Larrivee et al. (1979) finden mit Hilfe der gleichen Methode, daß ca. 70 - 80 % des Photorezeptormembranproteins aus Rhodopsin besteht.

Die Retinulazellen und die zugehörigen Mikrovilli als Träger des lichtempfindlichen Pigmentes zeigen unter bestimmten Adaptationszuständen charakteristische morphologische Veränderungen.

So treten bei vielen Evertrebraten (*Limulus*, Fahrenbach 1969; Ameise, Menzel und Knaut 1973; Assel, Tuurala und Lehtinen 1967; Krebs, Bernhards 1916; Heuschrecke, Horridge und Barnard 1965) Pigmentgranulawanderungen innerhalb der Retinulazellen zum Rhabdom hin auf, während sich bei Dunkeladaptation große Zisternen um das Rhabdom ausbilden* (Assel, Tuurala und Lehtinen 1967; Ameise, Menzel und Knaut 1973; Heuschrecke, Horridge und Barnard 1965; *Limulus*, Fahrenbach 1969; Behrens 1976).

* Beide Erscheinungen sind Mechanismen zur Regulierung der Lichtmenge innerhalb des Rhabdoms.

Bekannt ist ferner, daß sich nach Belichtung vermehrt pinozytotische Vesikel aus dem Membranbereich zwischen den Mikrovillusausstülpungen abschnüren, die vermutlich durch sekundäre Endozytose in multivesikuläre Körperchen aufgenommen werden.

Über einen gemischt-lamellar-vesikulären Zustand lagern sich die Vesikelmembranen zu multilamellaren Körperchen um, die zu sogenannten 'dense bodies' werden (White 1967, 1968; Eguchi und Waterman 1976).

Diesen Vorgang kann man als einen lichtinduzierten Abbau der Mikrovillusmembran verstehen.

Ein histochemisch nachweisbares, vermehrtes Auftreten saurer Phosphatase weist auf eine lysosomale Funktion der Zellkörperchen hin (Eguchi und Waterman 1976).

Der lichtinduzierte Abbau der photopigmenthaltigen Membran bewirkt bei dem Rhabdom des Moskito-Larvalauges eine Abnahme des Rhabdomvolumens, die von Dauer und Stärke der Lichteinstrahlung abhängt und im Dunkeln rückgängig gemacht werden kann (White und Lord 1975).

Dagegen ist bisher weder bei *Procambarus** noch bei der Krabbe *Libinia* und dem Hummer *Homarus* eine lichtbedingte Verringerung des Rhabdomvolumens mit den zur Verfügung stehenden technischen Hilfsmitteln aufzufinden (Eguchi 1966; Fernandez und Nickel 1976).

Schwemer (1979) weist an der Fliege *Calliphora* nach, daß die Geschwindigkeit des Rhodopsinabbaus - und damit möglicherweise auch die Turnover-Rate der photosensorischen Membran - von der Metarhodopsinkonzentration abhängen.

Da Bildung und Konzentration des Metarhodopsins von der Wellenlänge des Adaptationslichtes abhängig sind, können einige widersprüchlichen Ergebnisse der morpho-

* Die Untersuchungen von Hafner (in Vorbereitung) an *Procambarus*-Retinen weisen allerdings auf eine Volumenabnahme des Rhabdoms während der Hellphase des diurnalen Rhythmus hin.

logischen Untersuchungen bei verschiedenen Evertebraten eventuell auf unterschiedliche Adaptationsbedingungen bzw. unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit der Tiere zurückzuführen sein.*

Im Gegensatz zu dem Membranabbau sind Art und Weise sowie Ort der Neusynthese und des Einbaus nahezu ungeklärt. Auch autoradiographische Untersuchungen an *Procambarus* (Hafner und Bok 1977) und an der Biene (Perrelet 1972) geben keine eindeutige Antwort. Bei *Procambarus* nimmt die H^3 -Leucin-Markierung vom distalen zum proximalen Ende des Rhabdoms ab, was für die Kernregion als Syntheseort spricht.

Änderung in Größe und Anzahl der Partikel der Mikrovillusmembranflächen nach Langzeit-Hell- und Dunkeladaptation wurden bisher nur bei der Schnecke (*Helix aspersa*) (Brandenburger et al. 1976) nachgewiesen. Ob ein diurnaler Rhythmus im Auf- und Abbau der photosensorischen Membran bei *Astacus*, ähnlich wie beim Laterallauge von *Limulus* (Chamberlain und Barlow 1979), der Spinne *Dinopis* (Blest 1978) sowie bei Vertebraten (Young 1974; O'Day und Young 1978), vorkommt und inwieweit dieser dann die experimentellen Adaptationsbedingungen störend beeinflussen könnte, ist nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit hat zur Aufgabe, mit Hilfe der Gefrierätztechnik eine vom Adaptationszustand abhängige Ultrastrukturänderung sowohl der Rhodopsin-anordnung auf der Mikrovillusfläche des Rhabdoms als auch der umgebenden Retinulazelle von *Astacus leptodactylus* gegebenenfalls nachweisen zu können.

* Zusammenstellung über die spektrale Empfindlichkeit verschiedener Evertebratenretinen s. M. Wilms 1977 .

2 Material und Methode

2.1 Versuchsmaterial

2.1.1 Isolierung von Augen und Retinen

Für die Untersuchungen wurden Stielaugen des Sumpfkrebsses *Astacus leptodactylus* benutzt, der in Aquarien bei 13 °C gehalten wird.

Vor Versuchsbeginn wurden die Krebse jeweils in einem lichtdichten Aquarium 12 bis 18 Stunden dunkeladaptiert.

Im Experiment wurde entweder das ganze Auge, das an den weichen Gelenkhäutchen am proximalen Ende des Augenstiels abgeschnitten wird, oder nur die Retina ohne den dioptrischen Apparat verwendet. Die Isolierung der Retina geschah nach der Methode von Steinbeck (1972). Bei den Versuchen mit ganzen Augen wurde die Cornea an der Grenze zum Augenstiel mit einer Präpariernadel vorsichtig perforiert, um die Retina der Außenlösung besser zugänglich zu machen.

2.1.2 Isolierung von Rhabdomen

Zur Isolierung der Rhabdome wurden 1 bis 2 Retinen in ein Reagenzglas mit 200 µl van Harreveld-Lösung überführt und mit dem stumpfkantigen Mikroquirlvorsatz eines Handmixgerätes in etwa 10 Schüben von je 1 sec Dauer homogenisiert (Uebags 1976, Wilms 1977).

Die Ausbeute an Rhabdomen beträgt meist 50 %; dies entspricht einer Anzahl von 1000 Rhabdome pro Retina. Eine lichtmikroskopische Kontrolle der Rhabdomsuspension zeigt im Vergleich zu Dünnschnitten von ganzen Retinen, daß die Bänderung des Rhabdoms, hervorgerufen durch die alternierende Anordnung der Mikrovilluspakete, noch vorhanden ist (s. Abb. 3).*

* Das Isolationsverfahren bedingt, daß die Mikrovilli von der Retinulazelle, deren Ausstülpungen sie sind, abgerissen werden.

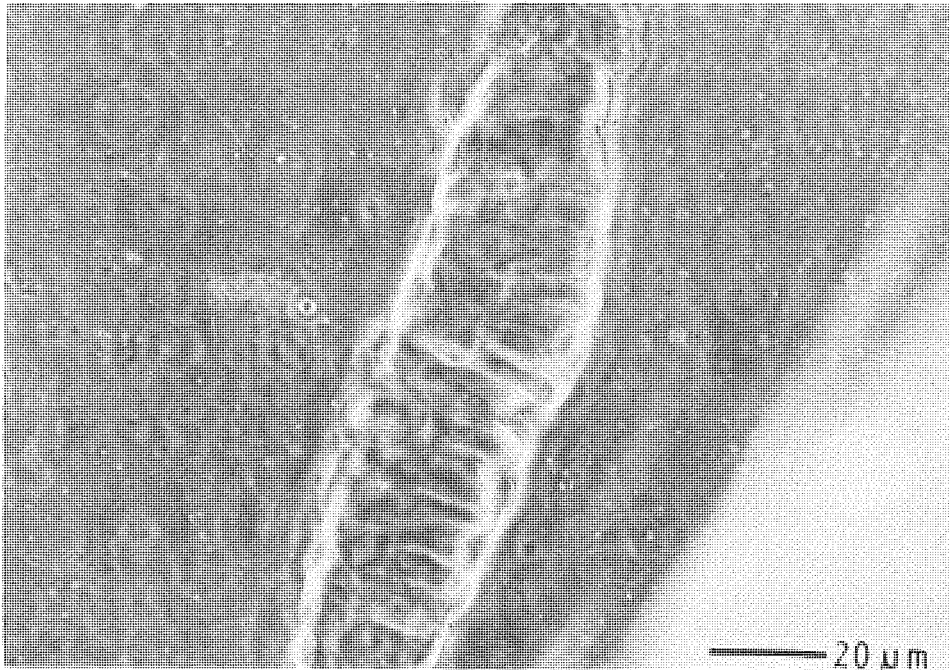


Abb. 3 Isoliertes Rhabdom in van Harreveld-Lösung.
Die Bänderung, hervorgerufen durch die
alternierend angeordneten Mikrovillipakete,
ist deutlich zu erkennen.

2.2 Methoden

2.2.1 Gefrierbrüche hell- und dunkeladaptierter Retinen

Ein Teil der im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche (Langzeithelladaptationen mit Raumlicht, sowie Dunkelkontrollen) wurden mit Dr. G. Dahl, Institut für Physiologie an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, zusammen durchgeführt.

2.2.1.1 Adaptationsbedingungen

Die Krebse wurden unter Wasser in Aquarien helladaptiert. Damit beide Augen gleichmäßig beleuchtet werden konnten, wurden die Krebse auf einer Platte festgeschnallt. In einer Versuchsserie wurden Krebse mit Raumlicht (Leuchtstoffröhren, Osram weiß universal) (s. Spektrum, Anhang des method. Teils) von ca. $70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$ (40A Optometer, Pin 10, United Detector Technology), entsprechend einer Beleuchtungsstärke von 140 lux, helladaptiert; in einer zweiten mit Hilfe eines Lichtleiters (Kaltlichtquelle Schott Kl 150B, Halogenlampe) (Spektrum s. Anhang des method. Teils) mit der Intensität von $1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$ (Beleuchtungsstärke von 4000 lux) helladaptiert.

Für die Dunkeladaptation wurde ein lichtdichtes Aquarium benutzt. Die Präparation der Retinen sowie die anschließende Fixierung erfolgte bei Rotlicht (Osram Lampe Typ 4563)* bzw. nach Helladaptation bei dem entsprechenden Adaptationslicht.

* Das Glas der Osrambirne wurde im Spektralphotometer Cary 118 gemessen und weist bei $\leq 615 \text{ nm}$ keine Transmission mehr auf.

2.2.1.2 Retinen von hell- und dunkeladaptierten Krebsen

Die hell- bzw. dunkeladaptierten Retinen wurden mit 2 % Glutaraldehyd (Fa. Serva) in 0,1 molarem Phosphatpuffer 1 Stunde fixiert und anschließend in van Harreveld-Lösung mit 20 - 30 % (v/v) Glycerin als Frostschutzmittel 20 - 30 Minuten belassen. Jede Retina wurde dann mit einer Rasierklinge in Längsrichtung der Retinulae in meist 4 Scheiben geschnitten, die in Präparateplättchen für die Doppelbruchanlage (Balzers AG) gesteckt und in flüssigem Freon (-156°C) eingefroren wurden.

In der mit flüssigem Stickstoff gekühlten Doppelbruchvorrichtung wurden die Präparate in die Gefrierätzanlage BA 360M oder BAF 300 (Balzers AG) überführt, die mit Elektronenverdampfungsquellen, einem Schwingquarzsichtdickenmesser sowie einer Turbomolekularpumpe ausgestattet sind. Das Brechen geschah bei einer Temperatur von -150°C und einem Vakuum von ca. 10^{-6} Torr. Bei dieser Temperatur lassen sich zwar plastische Deformationen von Molekülen reduzieren; um jedoch auch die Kontamination der Bruchflächen mit Fremdpartikeln (Kondensation der Restgase aus dem Vakuum) möglichst gering zu halten, wurde während der Bedampfung mit Platin-Kohlegebrochen und mithin auf das Ätzen verzichtet. Die Schichtdicke der Schrägbedampfung mit Platin-Kohle betrug ca. $20\text{ \AA}$ ($\approx 200\text{ Hz}$), diejenige der senkrechten stabilisierenden Kohleschicht ca. $250\text{ \AA}$ ($\approx 200\text{ Hz}$). Die Replicas wurden mit Natriumhypochloritlösung in ca. 3 Stunden von Gewebsresten befreit und anschließend 3 mal in destilliertem Wasser gespült. Die so gereinigten Abdrücke wurden auf mit Formvar befilmten Kupfernetzchen aufgefangen und im Jeol 100C, Siemens Elmiskop 101 oder Philips 400 be-

trachtet bzw. fotografiert.

2.2.1.3 Retinen von in vitro hell - und dunkeladaptierten ganzen Augen

Versuch zur Hell- und Dunkeladaptation wurden an Krebsaugen in vitro durchgeführt, um eine definierte Cycloheximidkonzentration (Begründung :s.u.) auf das Gewebe einwirken zu lassen und diese während der Versuchsdauer konstant halten zu können. Die gestielten Augen wurden in einem mit van Harreveld-Lösung gefüllten Glasbehälter hell- bzw. dunkeladaptiert. Im Falle der Helladaptation wurden sie zur Lichtquelle hin ausgerichtet und mit einer Intensität von $1-2 \text{ mWatt cm}^{-2}$ 6 Std belichtet (Kaltlichtquelle Schott 150B) . Die Weiterbehandlung (Präparieren der Retinen, Fixierung, Brechen) erfolgte wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben.

Zusatz von Cycloheximid :

Cycloheximid hemmt sowohl die Initiierung als auch den Fortgang der Proteinsynthese bei allen Zellen , die Ribosomen vom 80S-Typ besitzen (genaueres s. Obrig 1971) (z.B. HeLa-Zellen , Leberzellen von Kaninchen oder Ratte, Hefezellen, verschiedene Pflanzenzellen). Die Konzentration zu optimalen Hemmung der Proteinsynthese ist je nach Objekt verschieden:

Sie beträgt bei Hefezellen $0.5 - 1 \mu\text{g/ml}$ (80-90% Hemmung der Proteinsynthese; Siegel und Sisler 1964a, 1964b), bei zellfreien Systemen $28 \mu\text{g/ml}$ (90% Hemmung der Polyphenylalanin-Synthese ; Obrig et al. 1971), bei HeLa-Zellen $250 \mu\text{g/ml}$ (70% Hemmung des H^3 -Uridin-Einbaus in ribosomale RNA; Jackson und Studzinski 1968), sowie bei Leberzellen $1-4 \text{ mg/kg}$ (65% Hemmung der Proteinsynthese der membrangebundenen Ribosomen; Hwang et al. 1974, s. auch Bennett et al. 1964).

Die Krebsaugen wurden in vitro unter Zusatz von Cycloheximid (250 µg/ml van Harreveld) inkubiert und gemäß der obigen Beschreibung 6 Stunden mit einer Intensität von 1 - 2 mWatt cm⁻² helladaptiert.

Wenn Cycloheximid die Proteinsynthese hemmt, dann sollte es die Neusynthese der Rhabdommembran unterbinden oder zumindest reduzieren.

Bei einigen Experimenten wurde der Inhibitor erst 30 Minuten nach Beginn der Belichtung zugegeben.

2.2.1.4 Gefrierbrüche von Retinen im Ultrahochvakuum

Im Rahmen eines EMBO-Lehrganges an der ETH Zürich wurden Astacus-Retinen in der von H. Gross entwickelten Ultrahochvakuumanlage gefriergebrochen.

Das dieser Apparatur zugrunde liegende Prinzip bietet gegenüber der Standardmethode der Gefrierätzung den Vorteil, daß das Betriebsvakuum auf $2 \cdot 10^{-9}$ Torr erniedrigt worden ist (statt 10^{-6} Torr), wodurch das Gefrierätzen biologischer Objekte auch bei -196°C weitgehend ohne Kontamination möglich wird.

Weiterhin können aufgrund der geringen Temperatur plastische Deformationen, d.h. Strukturveränderungen der Membranen und Moleküle durch das Brechen oder Schneiden, sowie Erwärmung durch das Bedampfen weiter reduziert werden.

Näheres über diese Methode bietet die Dissertation von Heinz Gross: 'Gefrierätzung im Ultrahochvakuum (UHV) bei -196°C'.

2.2.2 Gefriersprühen isolierter Rhabdome

Die Gefriersprühversuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn G. Dahl und Herrn Weiß am Institut für Physiologie an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, durchgeführt.

Um die rhodopsinhaltige Membran im nativen Zustand, d.h. ohne mögliche Veränderungen durch die Einflüsse von Fixierung (Glutaraldehyd) und Frostschutzmittel (Glycerin) betrachten zu können, wurde ein von Bachmann (1973) entwickeltes spezielles Verfahren zum Einfrieren des Gewebes, das Gefriersprühen, erprobt. Hierbei wird in der von der Fa. Balzers gebauten Gefriersprühanlage die Suspension mit Hilfe einer Sprühpistole in kleine Spraytröpfchen zerstäubt (Durchmesser 10 - 50 μm) und in flüssiges Propan ($-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingesprüht.

Durch den Verzicht auf den Präparateträger und die Verringerung der Probengröße werden hinreichend große Einfriergeschwindigkeiten erzielt, so daß ein Frostschutzmittel und damit auch eine vorherige Fixierung der Membran nicht mehr erforderlich ist.

Die gefrorenen Tropfen des Präparats werden in eine stickstoffgekühlte Thermostatenbox überführt, nach Abpumpen des Propans mit einem organischen Bindemittel (n-Butylbenzol) bei $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ angeteigt und auf einen Präparatehalter gleicher Temperatur übertragen.

Die anschließende Gefrierätzung erfolgt in der üblichen Weise (s. Anleitung der Fa. Balzers).

Da beim Sprühen hohe Scherkräfte auftreten und die Suspension sehr fein zerstäubt wird (s.o.), eignet sich die Spühpistole für die relativ großen Rhabdome (maximal 50 μm breit, ca. 130 μm lang) nicht.

Die Sprühpistole wurde durch eine Glaspipette ersetzt, in deren Spitze eine für das Elektronenmikroskop her-

gestellte Blende von 70 μm Durchmesser eingeschmolzen ist.

Die in die Pipette gefüllte Rhabdomsuspension wird nun mittels Druckluft (0.75 atü) kontinuierlich durch die Blende gepreßt und dadurch zu einem feinen Strahl geformt. Bevor dieser in das flüssige Propan trifft, wird er von einer mit drei gleichen Öffnungen versehenen rotierenden Scheibe zerhackt (s. Abb. 4) (Dahl und Weiß, unveröffentlicht). Das Zerhacken ist von Vorteil, weil die entstehenden kurzen Abschnitte sich beim Eintritt in das Propan zu kleinen Tröpfchen abkugeln, die schneller eingefroren werden können als der kontinuierliche Strahl, der als ein kegelförmiges Gebilde aus dem Propan gleichsam herauswächst.

Dieses Verfahren eignet sich zum Einfrieren größerer Objekte, da selbst bei einer Blendenöffnung von 100 μm Erythrozyten (Mensch) in den dabei entsprechenden größeren Tropfen noch ohne Eiskristallbildung eingefroren waren.

Da die Isolierung der Rhabdome stets ein verhältnismäßig großes Flüssigkeitsvolumen erfordert, ist die Dichte der Rhabdome in der Suspension mit 20 - 40 Rhabdome/ μl - und damit auch die Ausbeute an Replica mit gefriergesprühten Rhabdomen - sehr gering.

Wegen ihrer mechanischen Empfindlichkeit empfiehlt es sich nicht, die Rhabdome, z.B. durch Zentrifugation, zu konzentrieren.

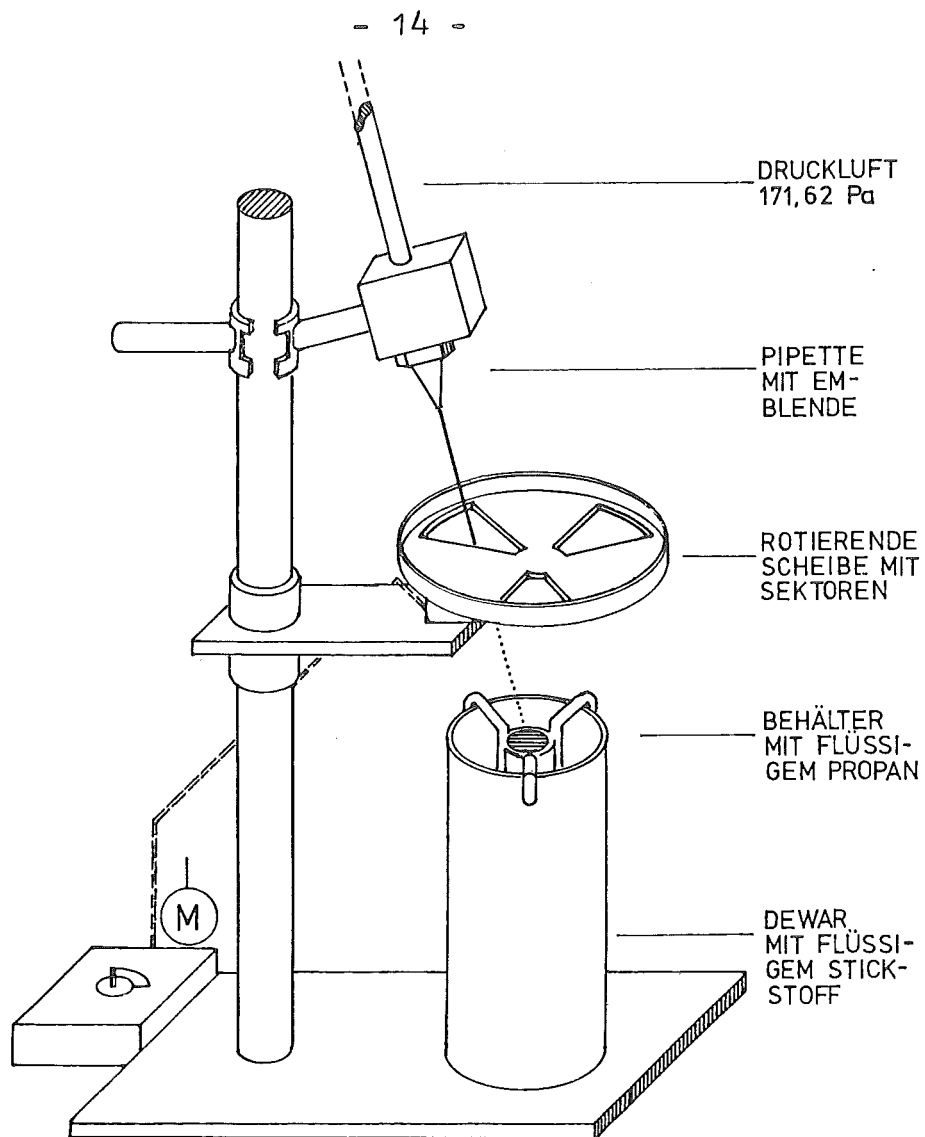


Abb. 4 Apparatur zum Einfrieren von Suspensionen
ohne Frostschutzmittel (entwickelt von
Dahl und Weiß).

2.2.3 Anhang des methodischen Teils

2.2.3.1 Abschätzung der von einer Retina bei Helladaptation absorbierten Photonenzahl

Abb. 5A zeigt das Emissionsspektrum (entnommen aus Schott-Produktinformation Nr. 7037) der Lampe (Kaltlichtquelle Schott Kl 150 B), die zur Helladaptation mit hoher Intensität benutzt wurde. Die von der Lampe emittierte Lichtintensität (= Fläche unter dem Kurvenzug) beträgt, gemessen in Höhe des Krebsauges, $1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$ (Lichtmeßgerät 40A Optometer, Pin 10; United Detector Technology). Da die Oberfläche eines Krebsauges mit 6.28 mm^2 angenommen wird (Halbkugel mit Radius 1 mm), ist die effektive, das Auge erreichende Lichtintensität ca. $62.8 - 125.6 \text{ µWatt}$. Um die auf die Augenoberfläche auftreffende Photonenzahl zu ermitteln, wurde die Fläche unter der spektralen Emissionskurve in Intervalle von 20 nm unterteilt und somit in einzelne Rechtecke zerlegt. Aus dem Anteil jedes Intervalls an der Gesamtintensität (hierfür wurde der Wert 125.6 µW eingesetzt) und der mittleren Energie eines Photons pro Intervall läßt sich die Photonendichte im Intervall und mithin die auf die Augenoberfläche gelangende Photonenzahl errechnen.

Nun kann man direkt keine Aussage darüber machen, wieviel Photonen die Sehzellmembran erreichen und von den Rhodopsinmolekülen absorbiert werden, da ganze Augen sich nicht spektroskopisch untersuchen lassen.

Es ist indes möglich, aus dem Extinktionsspektrum* der Rhabdomsuspension einer dunkeladaptierten Krebsretina die Absorption des eingestrahnten Meßlichtes

* Das Extinktionsspektrum der Rhabdomsuspension einer Krebsretina wurde freundlicherweise von K. Hamacher (s. Hamacher, Dissertation, in Vorbereitung) zur Verfügung gestellt.

zu bestimmen (d.h. bei jeder Wellenlänge wird ein bestimmter Prozentsatz des eingestrahltten Lichtes absorbiert) und dieses Absorptionsspektrum (Abb.5 B) dann auf das Emissionsspektrum der Lampe zu normieren*. (Dies ist durch den in das Emissionsspektrum eingezeichneten kleinen Kurvenzug dargestellt.)

So erhält man wiederum den Anteil der auf das Auge treffenden Lichtquanten, der - im zellfreien System - von Chromoprotein maximal absorbiert werden kann; also quasi eine Maximalabschätzung, ohne den Einfluß des dioptrischen Apparates, der Schirmpigmente, der Lage und Packungsdichte der Mikrovilli zu berücksichtigen.

Unter diesen Voraussetzungen und nach den o.a. Berechnungen beträgt die auf das Krebsauge treffende Photonenzahl bei Helladaptation mit 2 mW cm^{-2} :

$8.035 \cdot 10^{15} \text{ sec}^{-1}$; davon werden gemäß Absorptionsspektrum

$4.106 \cdot 10^{14} \text{ sec}^{-1}$ (= 5.1 %) absorbiert.

Entsprechendes gilt für die Helladaptation mit Raumlicht (Leuchtstoffröhren Osram 25 SA universal weiß; $70 \text{ } \mu\text{Watt cm}^{-2}$):

Mit Hilfe von Kantenfiltern (Schott OG) und dem Lichtmeßgerät wurde festgestellt, daß sich das Emissionsspektrum der Leuchtstoffröhren (Farbtemperatur ca. 4570 K) qualitativ nicht von demjenigen der Kaltlichtquelle (Schott Kl 150 B) unterscheidet. Somit läßt sich auch hier nach dem angegebenen Verfahren die absorbierte Photonenzahl bestimmen.

Sie beträgt: $1.437 \cdot 10^{13} \text{ sec}^{-1}$.

* Man sieht, daß die Lampe oberhalb 650 nm noch Quanten emittiert, die Rhabdomsuspension jedoch nicht mehr absorbiert. Der umgekehrte Fall tritt unterhalb 400 nm auf: hier würde die Rhabdomsuspension noch absorbieren, die Lampe sendet aber keine Photonen mehr aus.

Bei einem Proteingehalt von 1 μg pro Krebsretina und einem Rhodopsinanteil von 50 % (K. Hamacher, pers. Mitteilung) gelangt man zu einer Molekülzahl von $8.16 \cdot 10^{12}$ Rhodopsin/Retina und damit zu einem Verhältnis von ca. 50 absorbierten Photonen pro Rhodopsin und sec im Falle der Helladaptation mit 2 mW cm^{-2} , bzw. von ca. 2 absorbierten Photonen pro Rhodopsin und sec im Falle der Helladaptation mit $70 \mu\text{W cm}^{-2}$.

Spektrale Emission

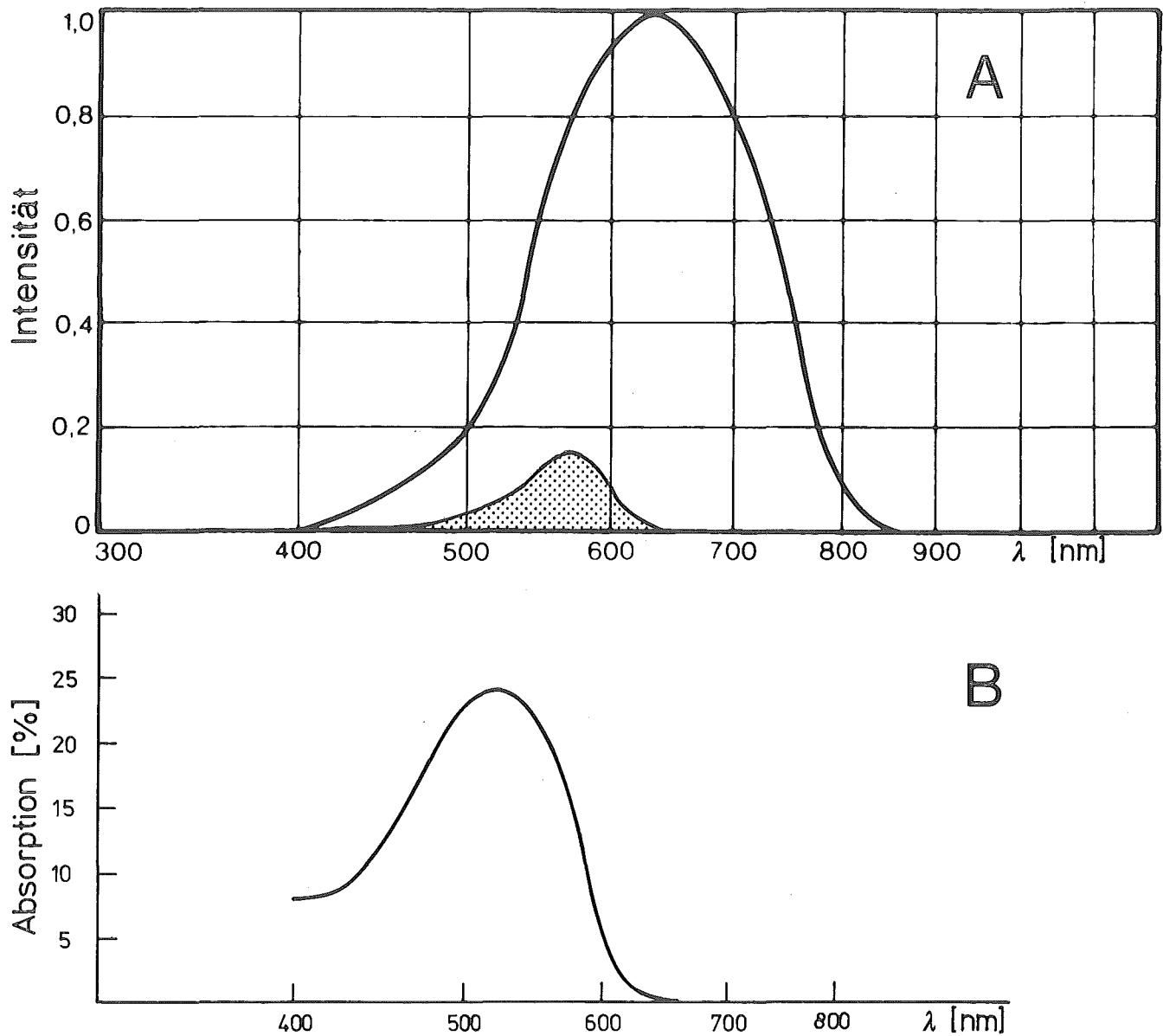


Abb. 5 A Emissionsspektrum der Kaltlichtquelle Schott KL 150B mit Lichtleiter (s. Schott Produktinformation Nr. 7037). Die von der Lampe emittierte Lichtenergie beträgt in Höhe des Krebsauges (s. Material und Methode) noch $1 - 2 \text{ mW sec cm}^{-2}$. In die Emissionskurve schraffiert eingezeichnet ist der Anteil des von der Rhabdomsuspension einer Retina absorbierten Lichtes (ca. 5 %), der aus den Daten der Abb. 5 B bestimmt wurde.

Abb. 5 B Absorptionsspektrum der beschallten Rhabdomsuspension einer Krebsretina. Die Absorption wurde nach den Werten eines von K. Hamacher freundlicherweise zur Verfügung gestellten Extinktionsspektrums (K. Hamacher, unveröffentlicht) berechnet.

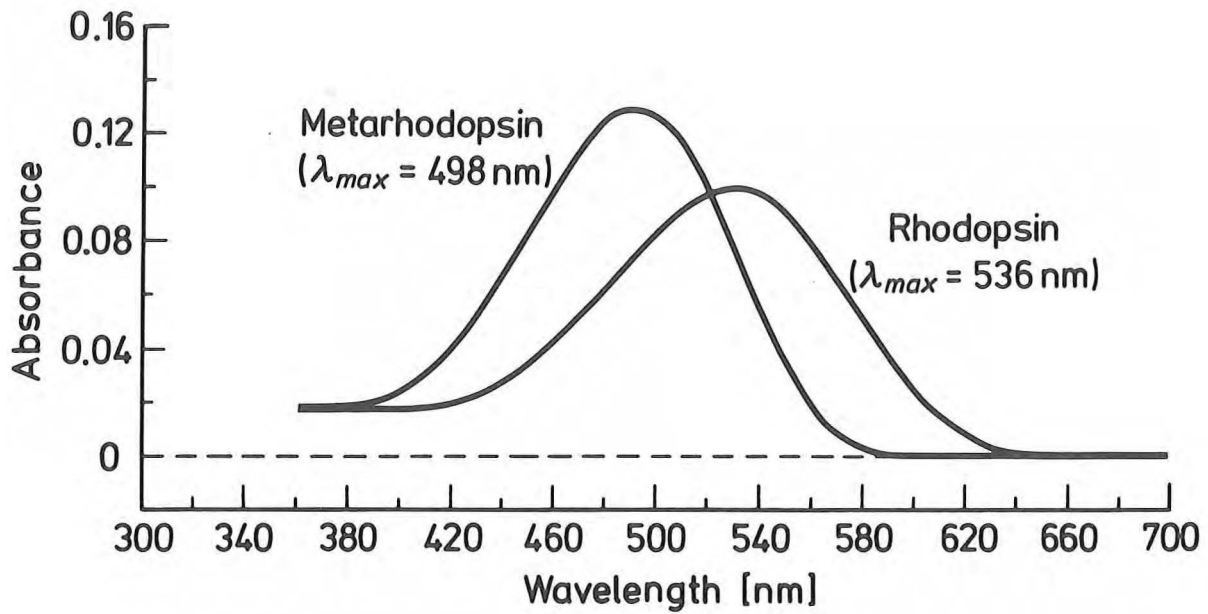


Abb. 5C Hypothetisches Absorptionsspektrum des Rhodopsins und Metarhodopsins von *Astacus leptodactylus*.
(Entnommen aus der Dissertation von M. Wilms (1977); näheres s. dort).

2.2.3.2 Auswertungsmethoden zur Ermittlung von Partikeldichte und Partikelgröße

Zur Berechnung der Partikeldichte wurden auf verschiedenen Bildern gleicher Vergrößerung jeweils 1 mm^2 große Areale ausgezählt, und zwar so viele, daß ihre Flächensumme etwa $1 \mu\text{m}^2$ in Realität ergab. Aus dem für 1 mm^2 Bildfläche erhaltenen Partikelzahlen wurden Mittelwert und Streuung bestimmt, diese wiederum auf 1 mm^2 Realfläche hochgerechnet. Zu jedem Adaptationswert wurden die Bilder von mehreren (3 -6) Retinen ausgewertet.

Die Partikelgrößen wurden folgendermaßen bestimmt: Areale mit deutlich erkennbaren Partikelstrukturen wurden ausgewählt und innerhalb dieser Areale von $1 - 2 \text{ mm}^2$ alle Partikel quer zur Bedampfungsrichtung mit einer Lupe mit Skaleneinteilung ausgemessen. Meßunterschiede von $7 \overset{\circ}{\text{Å}}$ konnten wahrgenommen werden.

2.2.3.3 Laserdiffraktogramme der Partikelreihen den PF-Flächen der Mikrovillusmembranen

Die Laserdiffraktogramme wurden von Herrn Dr. Hahn,
Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der
Universität Düsseldorf hergestellt.

Zur Ermittlung der Periodizität der Partikelreihen
wurde von Negativen mit größeren Arealen dieser
regelmäßigen Strukturen mit Hilfe von Laserlicht
ein Beugungsmuster hergestellt (Theorie s. Thon
1964).

Der Abstand der periodischen Elemente (g) kann dann
aus folgenden Daten berechnet werden:

$$g = \frac{l \cdot \lambda \cdot V_d \cdot 2n}{V_e \cdot d} = 11,12 \text{ nm}$$

mit:

l = Beugungslänge (5.69 m)

λ = Wellenlänge des Laserlichtes (632.8 nm)

V_d = Vergr. des Diffraktogramms (1.5)

n = gemessene Beugungsordnung (2)

d = Abstand der Reflexe gleicher Ordnung (71 mm)

V_e = elektronenoptische Vergr. (27 360)

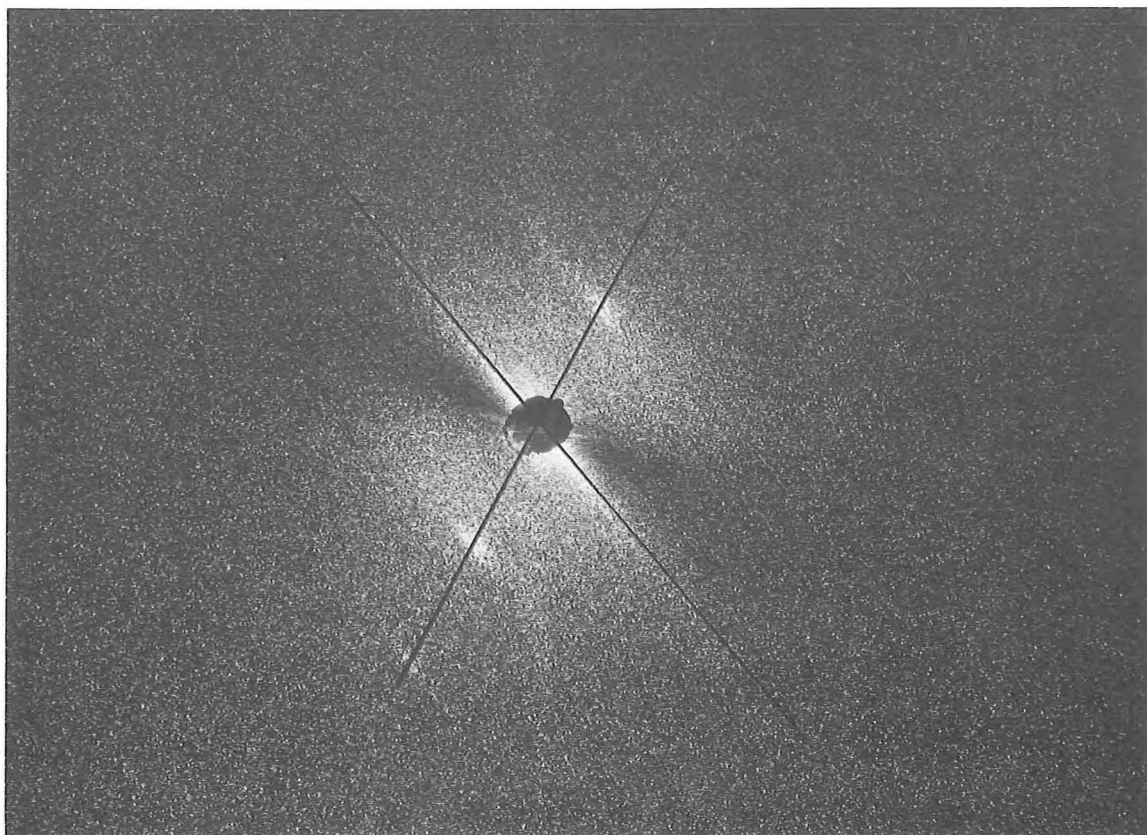


Abb. 6 Laserdiffraktogramm der Partikelreihen auf den PF-Flächen der Mikrovilli eines 48 h helladaptierten ($70 \mu\text{W cm}^{-2}$) Flußkrebsses.

3 Ergebnisse

3.1 Ultrastrukturänderungen des Rhabdoms und der umgebenden Retinulazellen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand

3.1.1 Änderung der Partikelanordnung auf den plasmatischen Mikrovillusmembranflächen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand

Die Retinen von unter verschiedenen Lichtbedingungen adaptierten Krebsen wurden gefriergebrochen (s. Material und Methode 2.2.1) und die Mikrovillusmembranflächen auf lichtinduzierte Ultrastrukturänderungen hin untersucht.

Abb. 7 gibt einen Überblick über den Teil einer gefriergebrochenen dunkeladaptierten Retina (Längsbruch) mit einem Rhabdom, dessen Mikrovillipakete abwechselnd quer und längs gebrochen sind, sowie den angrenzenden Retinulazellen.

In einem vergrößerten Ausschnitt eines Rhabdoms (Abb. 8) ist zu erkennen, daß die Mikrovilli Ausstülpungen der Retinulazellen sind. Wenn man den Bruchverlauf entlang der plasmatischen (PF) Membranfläche zweier Retinulazellen (s. Abb. 9), die alternierend Mikrovilli zur Mitte der Retinula hin ausstülpfen, betrachtet, fällt auf, daß der Durchmesser der angebrochenen Mikrovillusbasis meist größer ist als derjenige eines einzelnen Mikrovillus, der ca. 72 nm beträgt (Tab. 4). Dies spricht dafür, daß sich mehrere Mikrovilli aus der gemeinsamen Basismembran abzweigen. In der mittleren Rhabdomregion, dort wo sich die Tapetumzellen fingerförmig zwischen die Retinulazellen schieben, finden sich auf den PF-Membranflächen der Tapetumzellen Anhäufungen von Partikeln (s. Abb. 10

und Abb. 11), ähnlich der Struktur von 'gap-junctions'. Diese Strukturen könnten demnach Verbindungen der Tapetumzellen mit den Retinulazellen darstellen.

Auf den plasmatischen Membranhälften der Mikrovilli sind zahlreiche Partikel zu erkennen, die im dunkeladaptierten Zustand der Retina immer statistisch verteilt sind; die extraplasmatischen (EF) Flächen erscheinen dagegen glatt (s. Abb. 8). Die Mikrovilli von Krebsen, die nach 12 - 18 Std Dunkeladaptation 48 Std im Raumlicht ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$) helladaptiert worden sind, weisen auf ihren PF-Flächen Areale mit einer regelmäßigen Reihenbildung der Partikel auf (s. Abb. 11). Die Partikelreihen verlaufen schräg in einem Winkel von 22° (ermittelt aus dem Laserdiffraktogramm *) zur Mikrovillusbasis (Abb. 12 und 13). Areale mit Partikelreihen sind überall im Rhabdom zu finden.

Kleine Gebiete mit diagonal verlaufenden Partikelreihen sind auch auf den Mikrovillusmembranflächen (PF) von Procambarus-Retinen (Fernandez und Nickel 1976) sichtbar, treten allerdings nicht in Abhängigkeit von einer Hell- oder Dunkeladaptation auf.

Auf den EF-Flächen, die in Präparaten ohne Reihenbildung glatt erscheinen, treten, komplementär zu den Reihen, Riefen auf (Abb. 12):

Die klappsymmetrische Zuordnung von Reihen und Riefen läßt den Schluß zu, daß die Partikel als schraubenförmiger (helicaler) Strang um die Mikrovillussachsachse angeordnet sind. An Mikrovillienden ist im Längsbruch eine derartige wendelartige Struktur angedeutet (Abb. 14).

Auf allen vorliegenden Bildern sind die Partikelreihen linksgängig gewunden (Abb. 11, 12, 13, 14).

Aus Laserdiffraktogrammen ergibt sich eine Periodizität (mittlerer Abstand von Reihe zu Reihe) von

* Die Laserdiffraktogramme wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Hahn, Institut für Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf, angefertigt (s. Abb. 6 im Anhang zu Material und Methode).

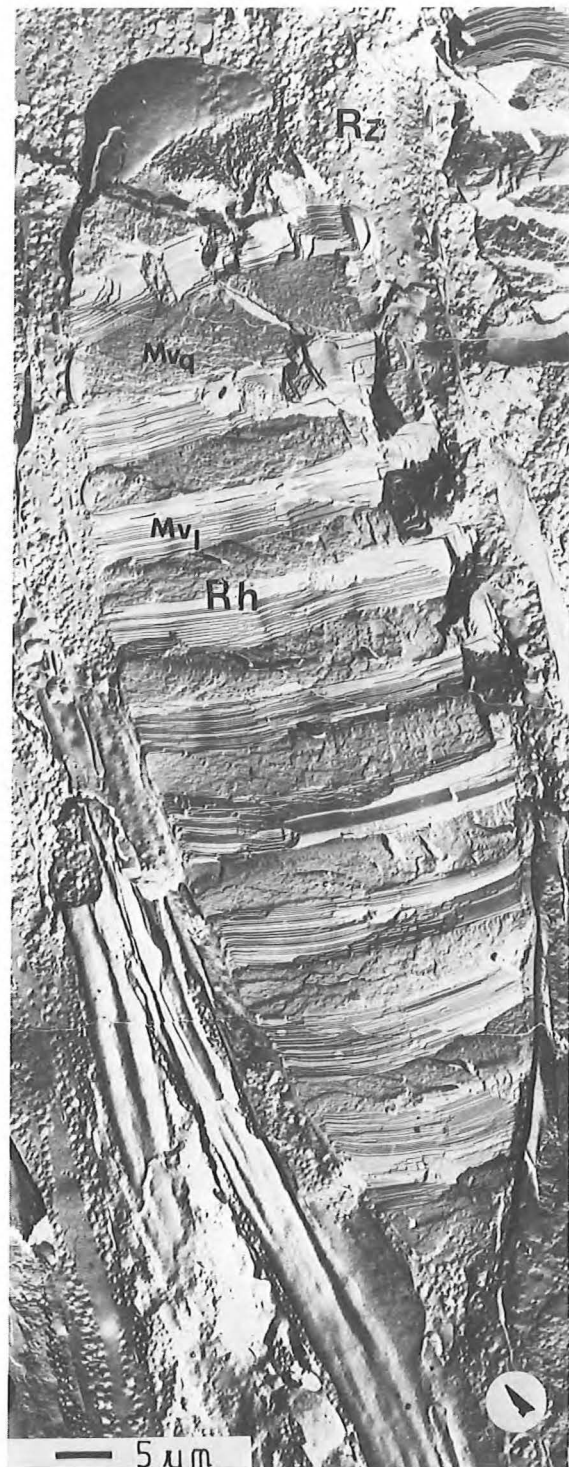


Abb. 7: Überblick über ein gefriergebrochenes Rhabdom (Längsbruch) (Rh) mit angrenzenden Retinulazellen (Rz). Sichtbar sind die senkrecht zueinanderstehenden Mikrovillipakete, wodurch die Mikrovilli einmal in Längs- (Mv_l) und zum anderen im Querbruch (Mv_q) erscheinen. Die Bedampfungsrichtung wird durch folgendes Symbol  angezeigt.

Aufnahme G.Dahl , Siemens 101, 80kV

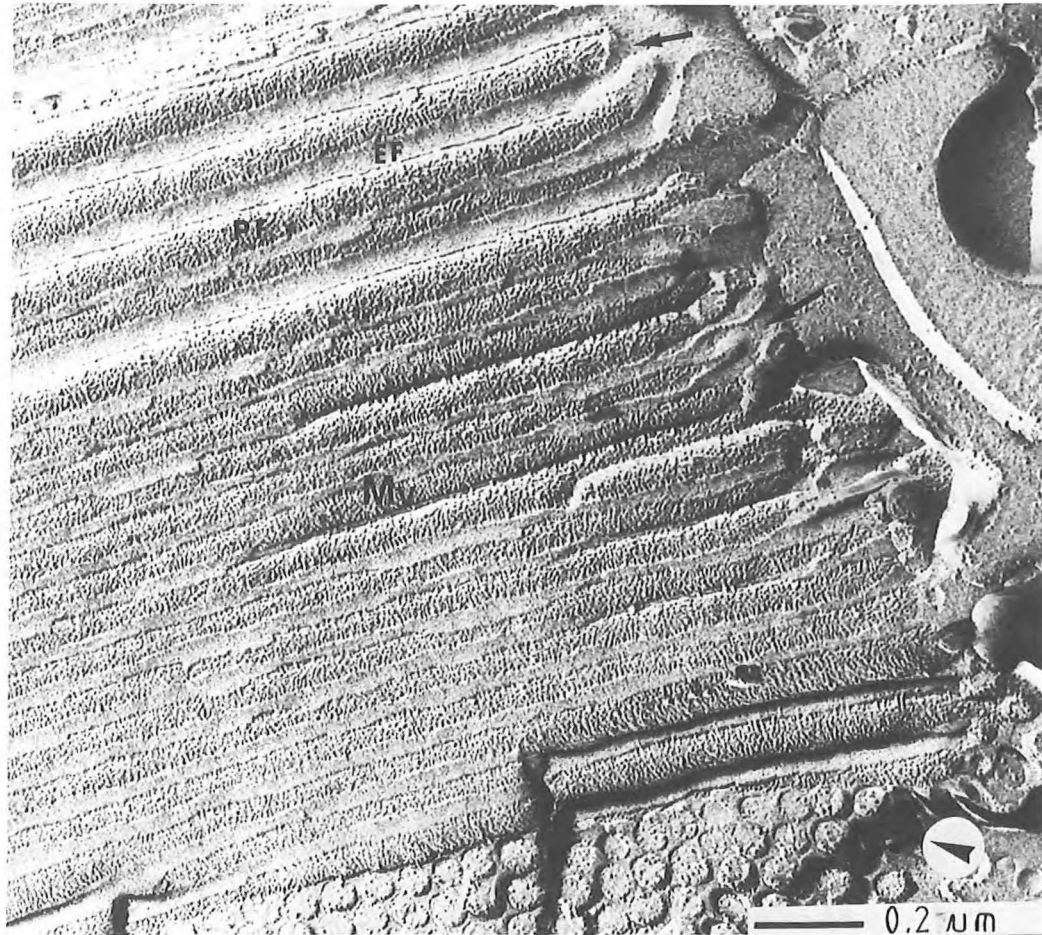


Abb. 8 : Längsgebrochene Mikrovilli (Mv), die sich an ihrer Basis aus einer gemeinsamen 'Wurzel' der Retinulazellmembran abzweigen ($\rightarrow$), wobei die Membran der Retinulazelle in die der Mikrovilli übergeht. Die Mikrovilli zeigen glatte, konkave EF-Flächen und konvexe PF-Flächen, die dicht mit statistisch verteilten Partikeln versehen sind. Im unteren Teil des Bildes sind Mikrovilli im Querbruch zu erkennen.
Philips 400, 80 kv

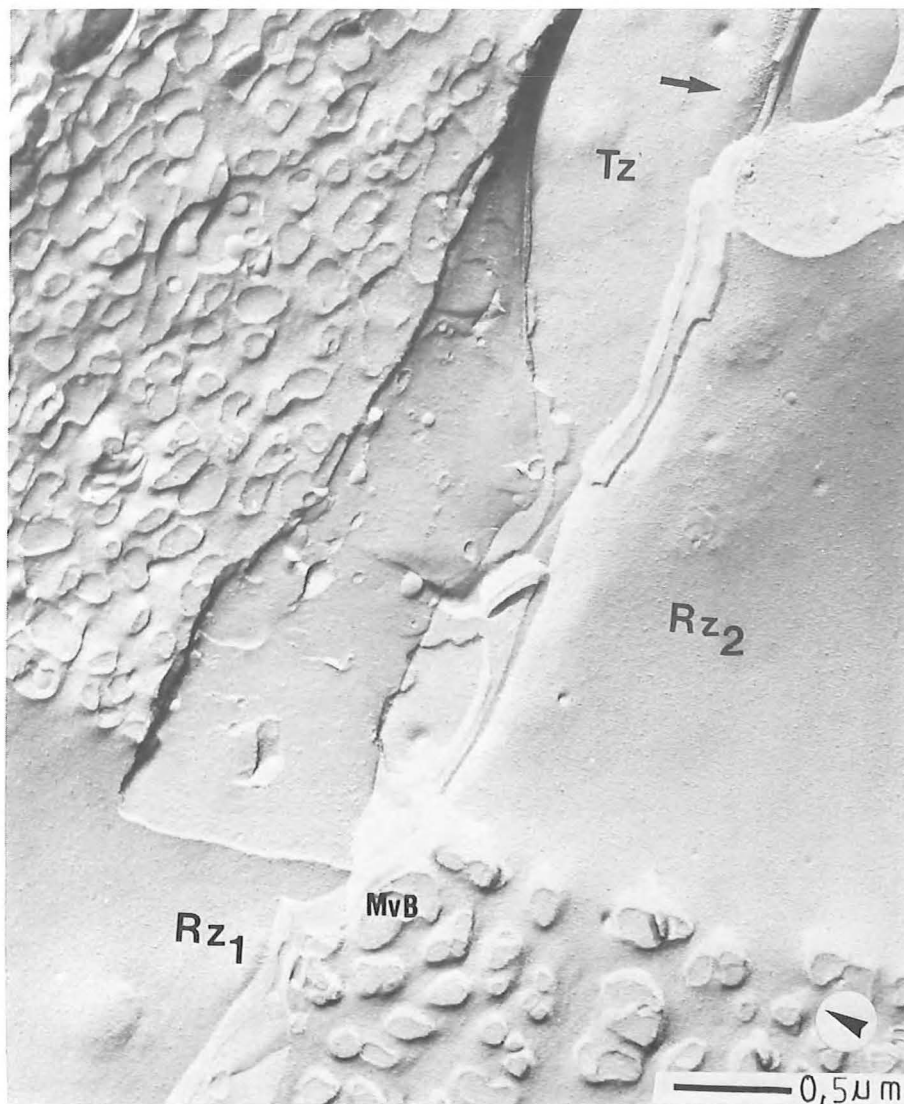


Abb. 9 : Bruchverlauf entlang der PF-Membranflächen zweier Retinulazellen (Rz_1 ; Rz_2), die alternierend Mikrovilli in die Mitte der Retinula ausstülpen. Der Durchmesser der angebrochenen Mikrovillusbasen (MvB) ist meist größer als derjenige eines Mikrovillus (ca. 72 nm). Im oberen Teil des Bildes schiebt sich keilförmig eine Tapetumzelle (Tz) zwischen die beiden Retinulazellen und ist mit diesen an mehreren Stellen anscheinend strukturell (ähnlich den 'gap junctions') verbunden ($\rightarrow$).
Jeol 100 C, 80 kV

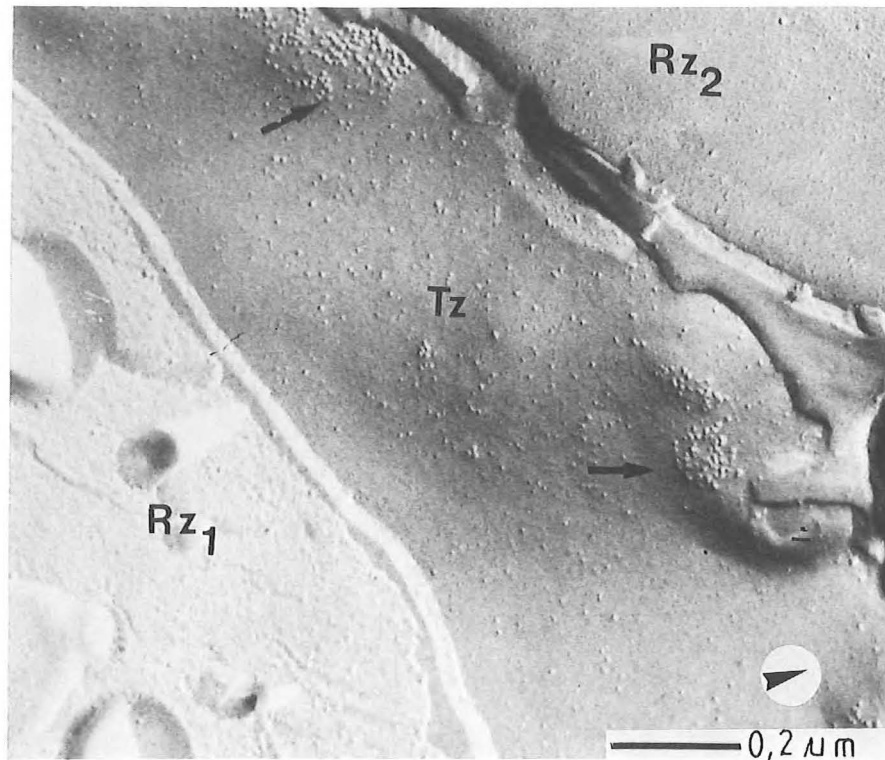


Abb. 10: Gefrierbruch zweier Retinulazellen (Rz_1 , Rz_2), zwischen die sich eine Tapetumzelle (Tz) geschoben hat. Auf der PF-Membranfläche finden sich Partikelanhäufungen ($\longrightarrow$) (ähnlich wie 'gap junctions', jedoch ungeordneter), die Verbindungsstrukturen zu den Retinulazellen darstellen könnten (vergl. Abb. 9).
Jeol 100 C, 80 kV

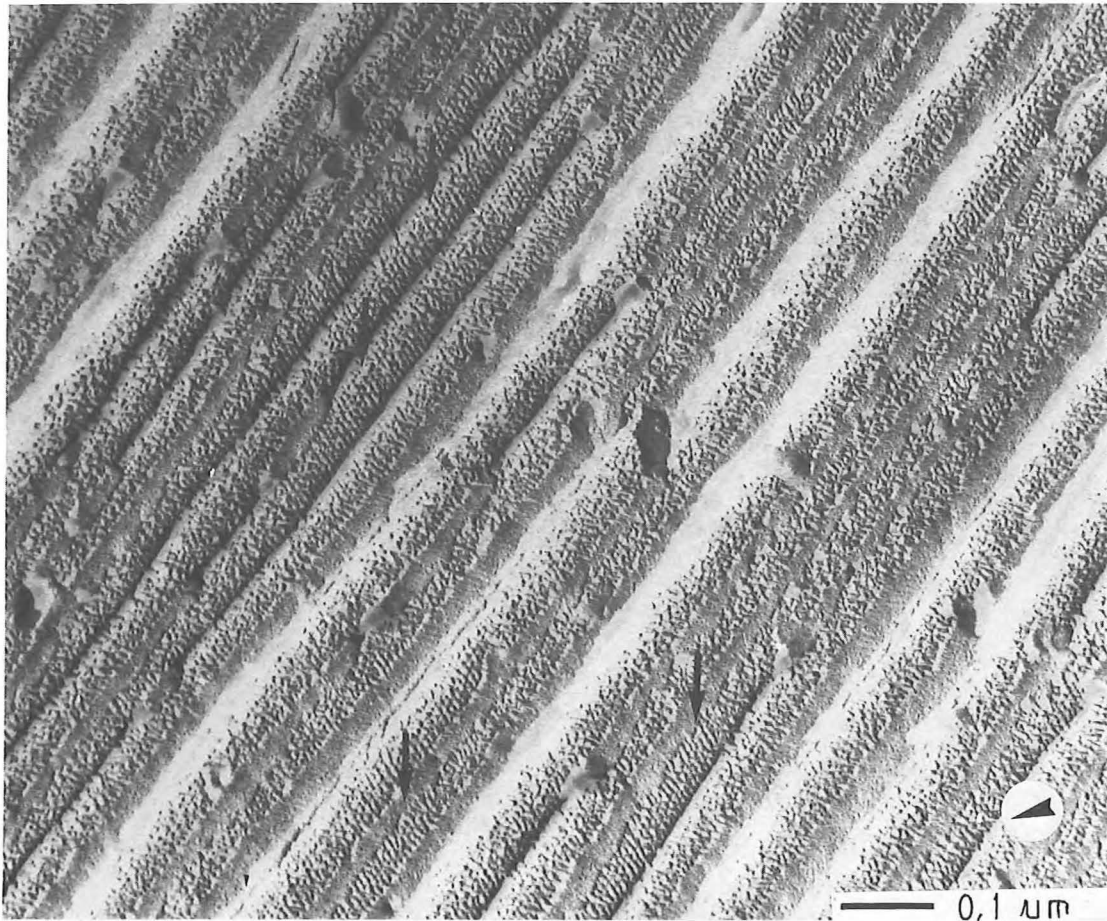


Abb. 11: Mikrovilli (Längsbruch) von Retinen, die 48 Stunden helladaptiert waren ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$).

Auf den PF-Flächen treten Areale mit Reihen geordneter Partikel auf ($\blackrightarrow$). Die Reihen verlaufen schräg zur Mikrovilluslängsachse und bilden einen Winkel von 22° mit der Mikrovillusbasis.

Siemens 101, 80 kV

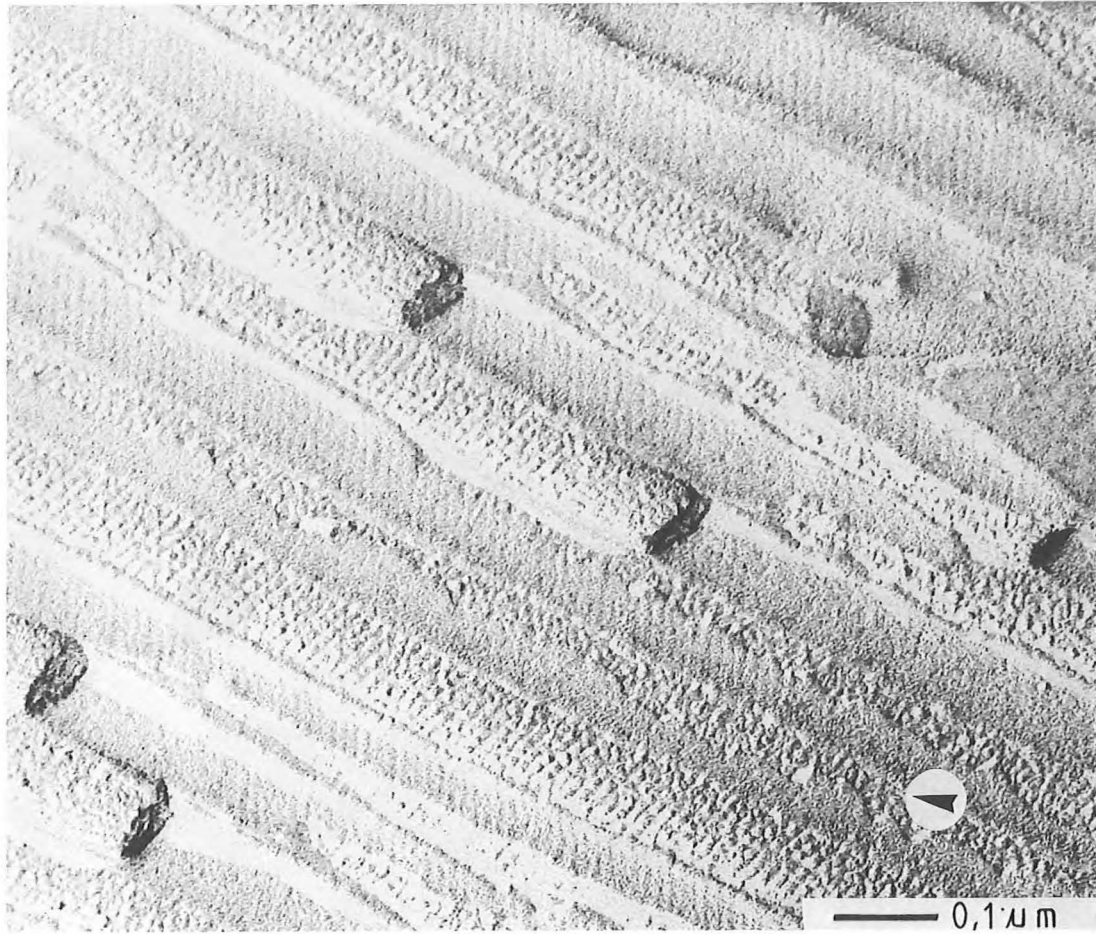


Abb. 12: Areale mit Reihenbildung. Die Reihen besitzen einen regelmäßigen Abstand von 11.1 nm (Laserdiffraktogramm, M. Hahn, Universität Düsseldorf, Institut für Elektronenmikroskopie und Biophysik). Auf den EF-Flächen sind als Abdruck der Reihen Riefen zu finden. Reihen und Riefen bilden einen Winkel von 136° (Laserdiffraktogramm) miteinander; dies läßt auf eine spiralige Anordnung der Partikelreihen um den Mikrovillus herum schließen.
Jeol 100 C, 80 kV

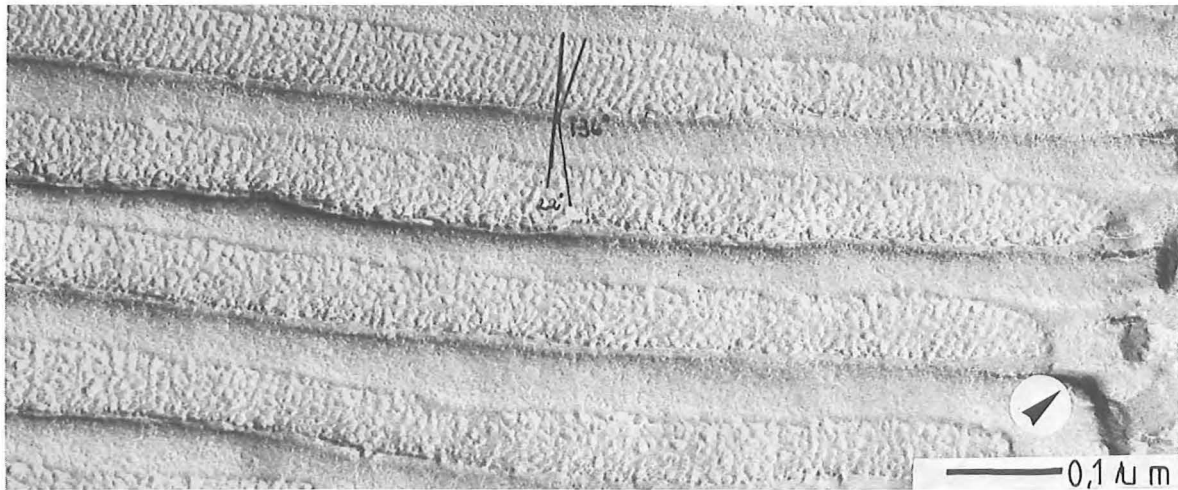


Abb. 13: Mikrovilli (Längsbruch) einer 48 h hell-adaptierten Retina. Eingezeichnet sind die Winkel, die die Reihen und Riefen zur Mikrovillusbasis bilden.
Jeol 100 C, 80 kV



Abb. 14: Längsgebrochene Mikrovilli mit Reihenbildung der Partikel. Der Ausschnitt zeigt das Bruchende eines Mikrovillus, wo die spiralförmige Anordnung angedeutet sichtbar wird (➡).
Philips 400, 80 kV

11.1 nm. Bei einem Winkel von 22° zur Mikrovillusbasis beträgt die Ganghöhe eines Stranges 55 - 65 nm; dies bedeutet aber, daß 5 - 6 Helices ineinander verdrillt sein müssen.

Gefrierätzuntersuchungen an der Retina des Flußkrebsses (Ruska 1974) zeigen z.T. auf den EF-Flächen der Mikrovilli eine Reihenstruktur mit einer Identitätsperiode von 8.1 nm (Laserdiffraktogramm, M. Hahn), die senkrecht zur Mikrovilluslängsachse angeordnet sind.

Aus dem Wert für die Identitätsperiode (11.1 nm) und der ausgezählten Partikelmenge pro Reihe läßt sich eine Dichte von 11000 ± 1000 Partikel pro μm^2 Membranfläche errechnen. Für die Areale mit statistisch verteilten Partikeln erhält man auf dem gleichen Präparat der Langzeit-helladaptierten Retina eine Dichte von 7000 ± 1400 Partikel pro μm^2 Mikrovillusmembranfläche. Die Mikrovillusmembran von 48 Std dunkeladaptierten Tieren weist dagegen nur eine Partikelanzahl von 5000 ± 500 pro μm^2 auf (Zusammenstellung s. Tab. 1).

Fernandez und Nickel (1976) finden für *Procambarus clarkii* 6600 Partikel pro μm^2 Mikrovillusmembranfläche - wobei über den Adaptationszustand keine Angaben gemacht werden - und Eguchi und Waterman (1976) geben für die gleiche Species einen Wert von 8000 pro μm^2 Membranfläche bei 24 Std helladaptierten Tieren an. Die Partikelgrößen sind vermutlich nicht normalverteilt: Für die Partikelgröße auf den Mikrovilli von 48 Std helladaptierten Krebsen ergibt sich ein Maximum zwischen $70 - 80 \text{ \AA}$ Partikeldurchmesser und ein erhöhter Anteil an Partikeln mit $40 - 50 \text{ \AA}$ Durchmesser (s. Abb. 18 A). Auf den Mikrovillusmembranen von 48 Std dunkeladaptierten Tieren haben die meisten Partikel einen Durchmesser von $80 - 90 \text{ \AA}$, während der Anteil an kleineren Partikeln ($40 - 50 \text{ \AA}$) geringer als bei der helladaptierten Retina ist (Abb. 18 B).

3.1.2 Gefrierbrüche von Retinen im Ultrahochvakuum

In Zusammenarbeit mit H. Gross, ETH Zürich, wurden 6 Retinen, die ca. 6 Stud im Raumlicht (Leuchtstoffröhren) helladaptiert worden waren, in der Ultrahochvakuumanlage ($2 \cdot 10^{-9}$ Torr) bei -196°C gefriergebrochen. Abb. 15 zeigt die Mikrovillusmembranflächen einer solchen Retina. Die PF-Flächen weisen statistisch verteilte Partikel auf, die EF-Flächen eine feine Granulierung. Reihen oder Riefen, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, sind nicht zu finden. Die Partikeldichte liegt bei 7600 ± 800 pro μm^2 Membranfläche. Das Maximum der Größenverteilung der Partikel (Abb. 18 D) ist hier gegenüber den mit der konventionellen Methode gewonnenen Daten (Abb. 18 A) zu geringeren Partikeldurchmessern ($40 - 50 \text{ \AA}$) hin verschoben.

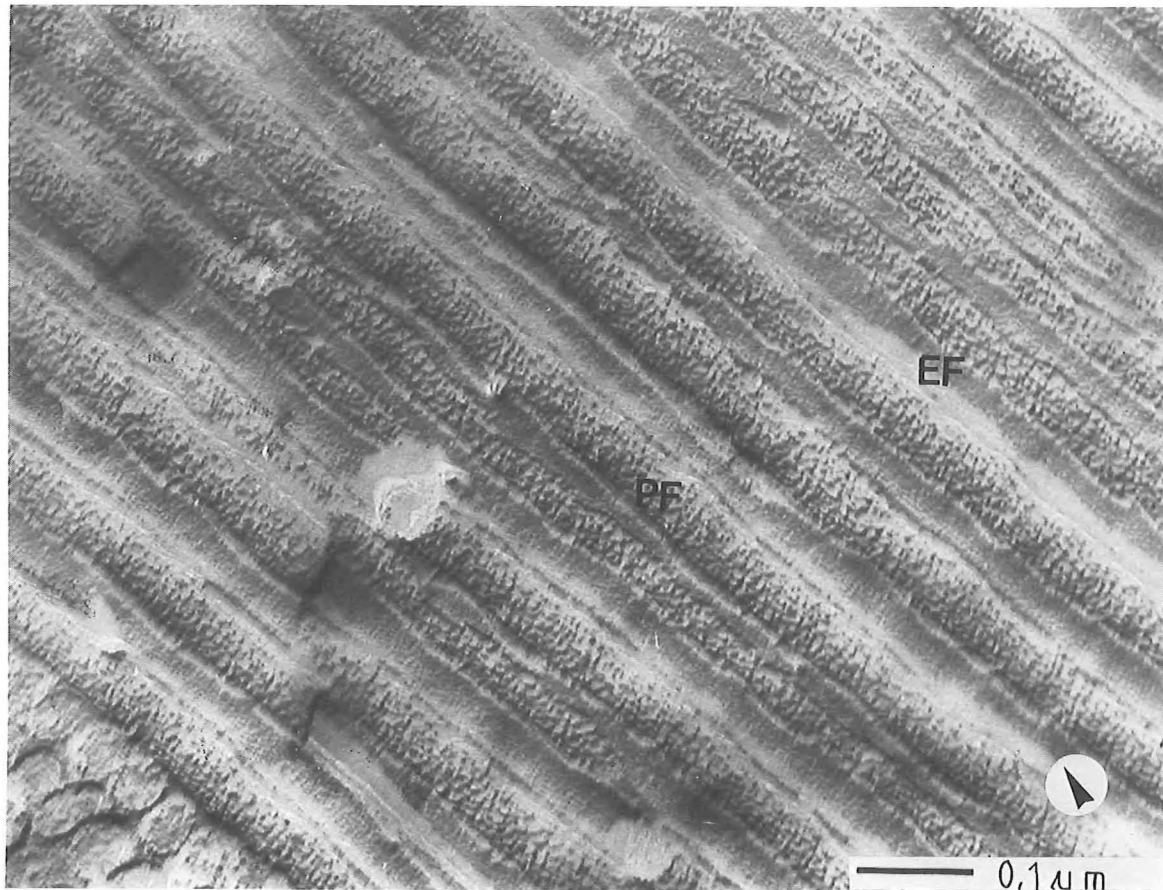


Abb. 15: Mikrovilli einer im Ultrahochvakuum (10^{-9} Torr) bei -196° C gebrochenen Retina (ca. 6 Std mit Raumlicht helladaptiert). Die PF-Flächen zeigen statistisch verteilte Partikel, die EF-Flächen sind fein granuliert.
Siemens 101, 60 kV

Tab. 1 : Übersicht über die Partikeldichte pro μm^2
Mikrovillusmembranfläche des Astacus-Rhab-
doms.

(Auswertungsmethode s. Anhang zu Material
und Methode)

Präparat	Adaptation	Partikeldichte/ μm^2
Retinen konventionell gefriergebro- chen	48 h HA	11000 $\pm$ 1000 (Partikel- reihen)
	48 h HA	7000 $\pm$ 1400
	48 h DA	5000 $\pm$ 500
Retinen im UHV gefrier- gebrochen	ca. 6 h HA	7600 $\pm$ 800

HA = helladaptiert

DA = dunkeladaptiert

3.1.3 Unfixierte gefrierengesprühte Rhabdome hell- und dunkeladaptierter Krebse

Um ausschließen zu können, daß die Reihen- und Riefenbildung auf eventuelle Einflüsse von Glutaraldehyd oder Glycerin zurückzuführen ist, wurden isolierte Rhabdome von Retinen dunkel- (12 Retinen) und helladaptierter (14 Retinen) Krebse gefrierengesprüht.

Abb. 16 gibt einen Überblick über ein gefrierengesprühtes Rhabdom. Die regelmäßige Anordnung des Mikrovillistapels geht vermutlich aufgrund der mechanischen Beanspruchung beim Isolations- und Sprühvorgang verloren, während die einzelnen Mikrovilli noch gut zu erkennen sind.

Rhabdome von 48 Std helladaptierten Retinen weisen im Gegensatz zu dunkeladaptierten auf den EF-Flächen ihrer Mikrovilli Riefen auf (Abb. 17). Partikelreihen sind indessen nicht auffindbar. Immerhin kann das Auftreten der Riefen als Indiz für ihr ursprüngliches Vorhandensein gelten, so daß folglich die Reihen- und Riefenbildung nicht auf Fixierungsartefakten beruht. Da die Mikrovilli in diesem Fall nicht mehr ausgerichtet, sondern wellenartig gebogen sind, konnte kein Laserdiffraktogramm erstellt werden; soweit es möglich war, wurde der Abstand der Riefen auf den Bildabzügen ausgemessen. Hierfür ergibt sich ebenfalls eine Periodizität von etwa 11 nm.

Die Größenverteilung der Partikel auf den Mikrovillimembranflächen gefrierengesprühter Rhabdome stimmt mit derjenigen gefrierengebrochener Rhabdome überein (Abb. 18A,C). Wegen der gedehnten bzw. gestauchten Mikrovillimembranflächen und dem zu geringen Anteil an auswertbaren Membranflächen ist eine Partikeldichtebestimmung mit großen Fehlern behaftet (für Abb. 17 ergibt sich eine Partikeldichte von $6249 \pm 2266 / \mu\text{m}^2$ Membranfläche).

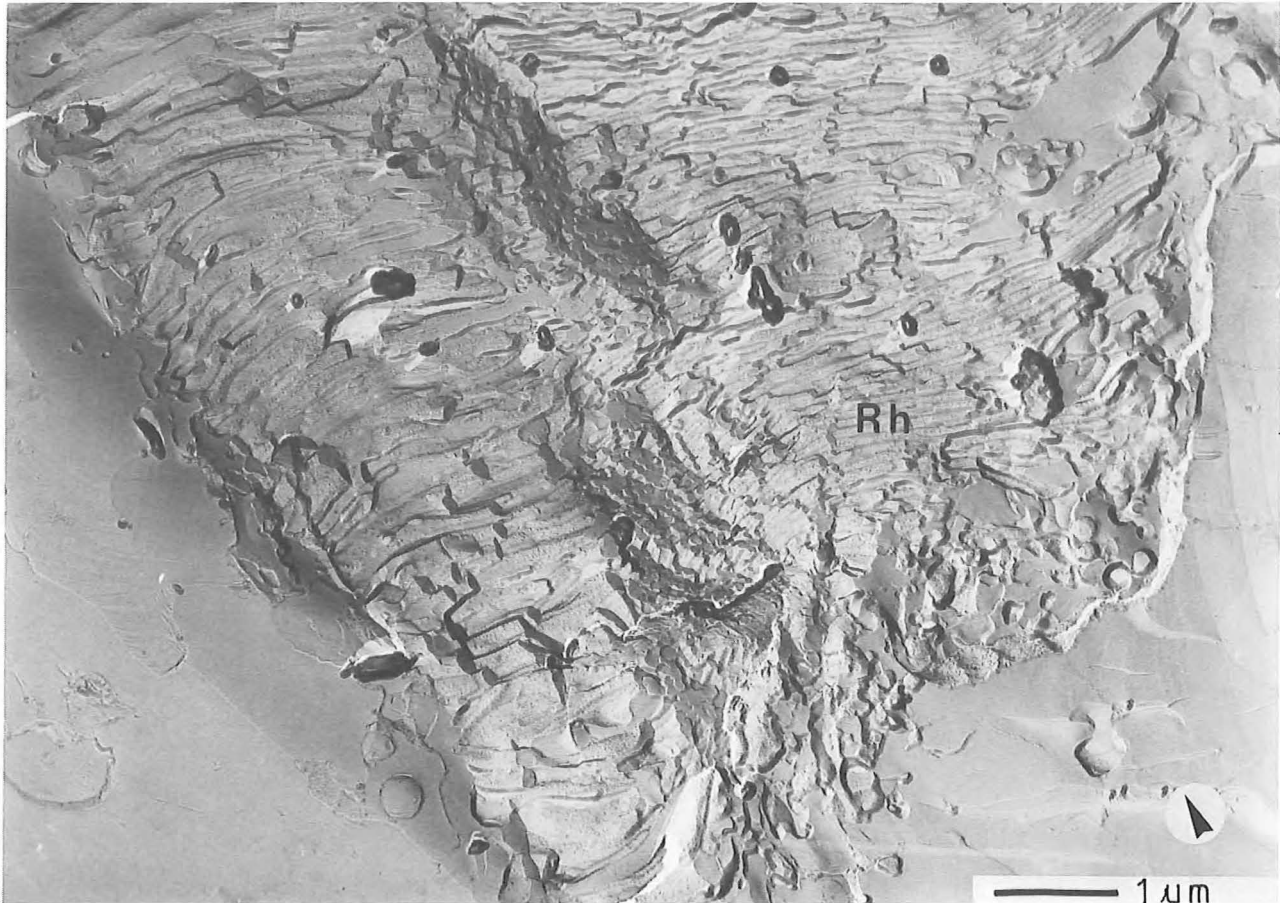


Abb. 16 Überblick (Längsbruch) über den Teil eines gefriergesprühten unfixierten Rhabdoms (Rh) eines 48 Std helladaptierten Krebses . Mikrovilli sind zu erkennen, jedoch ist die regelmäßige Anordnung von Mikrovillipaketen aufgehoben.
Jeol 100 C, 80 kV

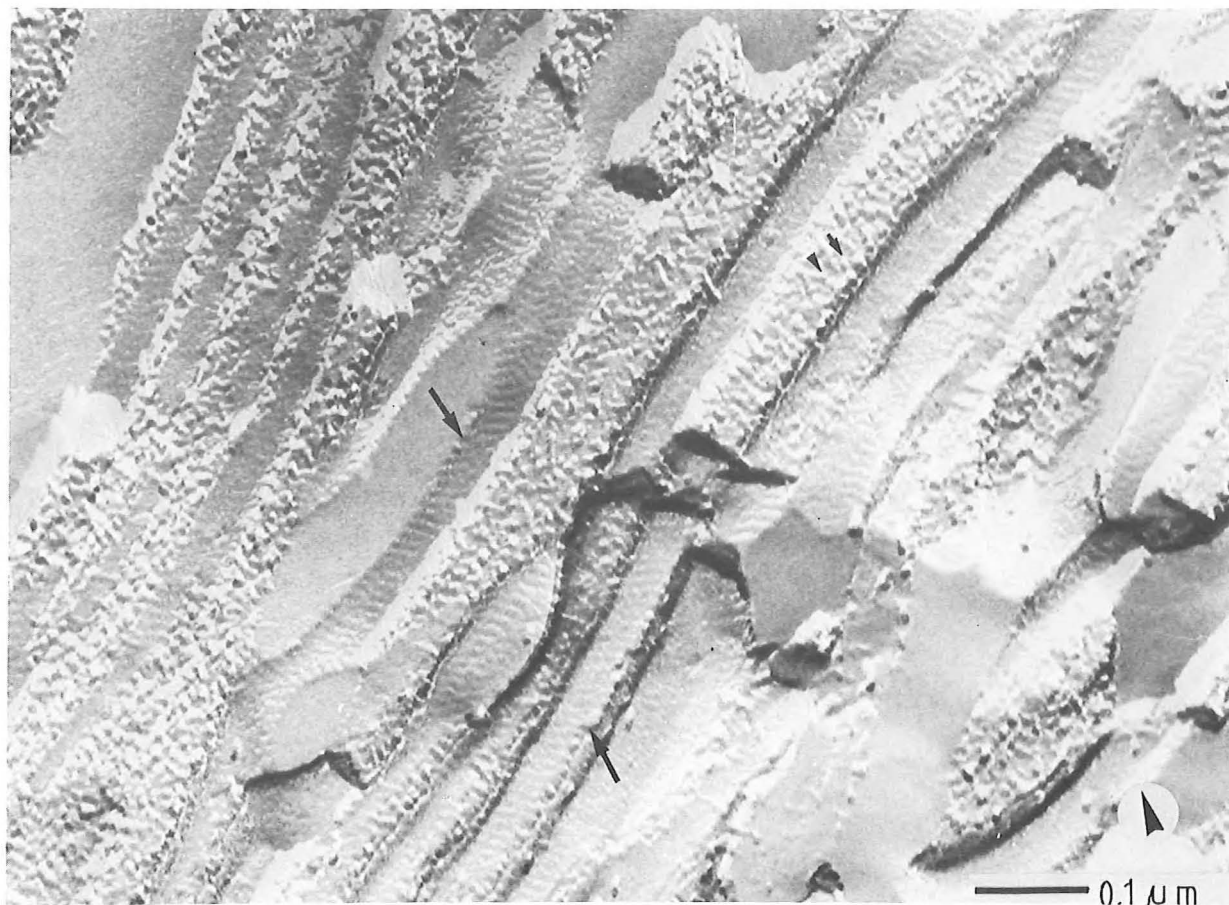


Abb. 17 Ausschnitt aus Abb. 16 . Auf den EF-Flächen sind deutlich Riefen (—→) zu erkennen; auf den PF-Flächen fehlen jedoch die Partikelreihen, auch tritt die Partikelstruktur weniger deutlich hervor.
Jeol 100 C, 80 kV

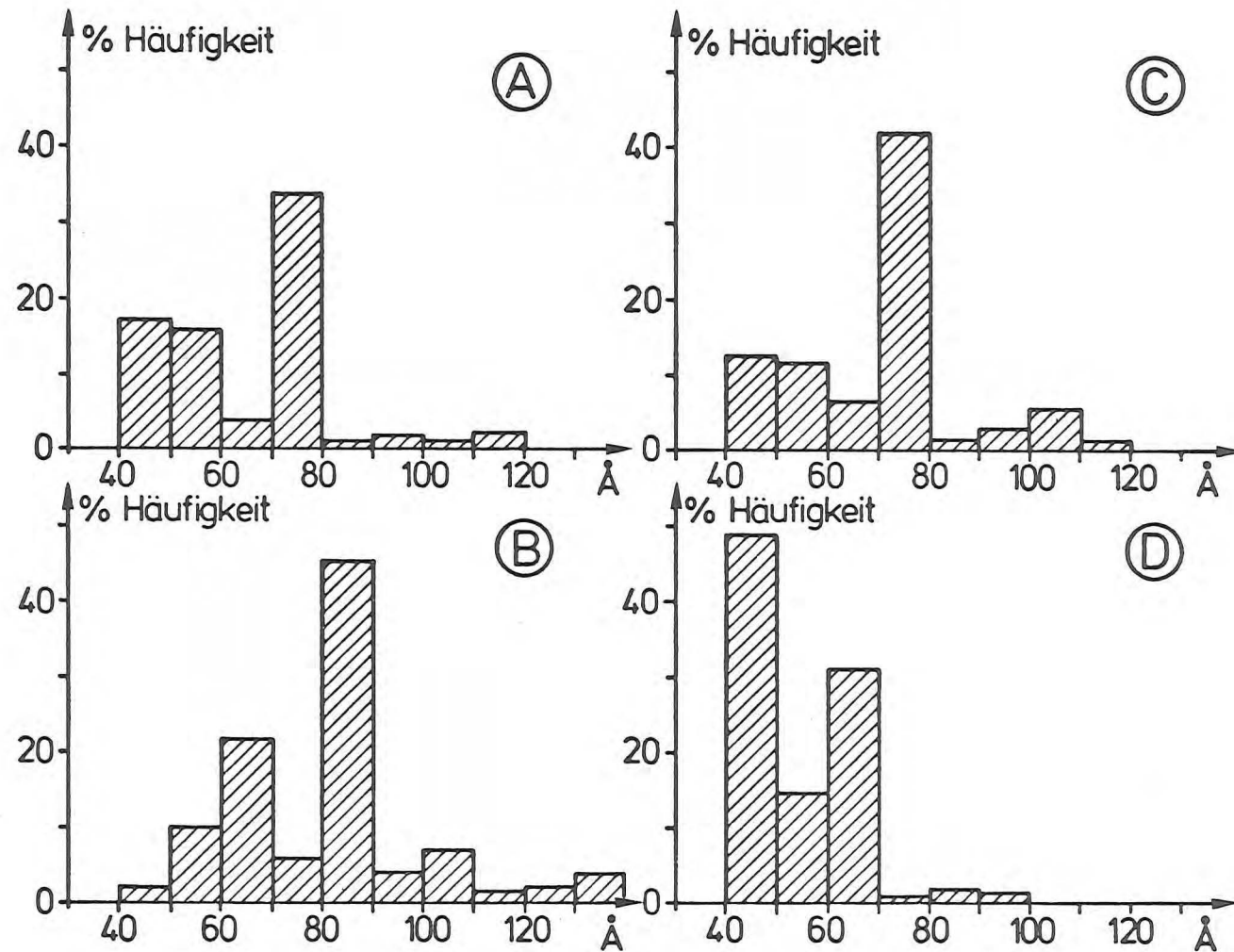


Abb. 18 Größenverteilung der Partikel auf den PF-Flächen der Mikrovilli von Astacus-Retinen.

A: 48 h HA ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$); Krebse	B: 48 h DA Krebse
C: 48 h HA ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$); Krebse (Rhabdome gefrieresprützt).	D: ca. 6 h HA Krebse (im UHV gefrierergebrochene Retinen)

3.1.4 Abhängigkeit der Reihenbildung der Partikel von der Dauer und Intensität des Adaptationslichtes

Mit zwei Gruppen von Krebsen wurden die folgenden Adaptationsreihen durchgeführt:

1. Helladaptation mit Raumlicht ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$) für 6, 12, 24 und 48 Std, sowie eine Dunkelkontrolle.
2. Helladaptation mit einer Halogenlampe ($1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$) für 1, 3, 4.5, 6, 12, 24, 36, 48 Std, sowie eine Dunkelkontrolle.

Zu jeder unterschiedlichen Adaptationsbedingung wurden mindestens 4 Retinen gefriergebrochen.

Innerhalb der ersten Serie treten nach 24stündiger Belichtung die ersten Areale von geordneten Partikeln auf, die sich auf wenige Mikrovilluspakete einiger Rhabdome beschränken; nach 48stündiger Helladaptation sind sie überall im Rhabdom zu finden.

Innerhalb der zweiten Adaptationsreihe mit hoher Lichtintensität ist eine wendelförmige Anordnung der Partikel schon nach 3-stündiger Belichtungsdauer vorhanden. Mit Fortdauer der Helladaptation nimmt die Häufigkeit der Arealbildung zu. Einher damit geht eine fortschreitende Zerstörung der Rhabdome, die nach 12 Std Belichtung mit der hohen Intensität auf dem elektronenmikroskopischen Bild erstmals sichtbar wird (Abb. 32) und nach 36 Stunden die ursprüngliche Mikrovillusstruktur (inbegriffen die Ultrastruktur) so verändert hat (s. Abb. 34 A), daß keine Aussagen mehr über die Partikelanordnungen gemacht werden können (näheres s. 3.1. 7).

Das Auftreten der Reihen- und Riefenstruktur auf den Mikrovillusmembranflächen hängt unter definierten Adaptationsbedingungen also sowohl von der Dauer als

auch von der Intensität des Adaptationslichtes ab.

3.1.5 Der Einfluß von Cycloheximid auf die Partikelreihenbildung auf den Mikrovillusmembranflächen bei Helladaptation des ganzen Krebsauges in vitro

Da die helicale Partikelanordnung mit der Dauer und Intensität des Adaptationslichtes korreliert ist, könnte sie mit dem lichtinduzierten Abbau (oder eventuell auch Aufbau) der Mikrovillusmembran zusammenhängen (s. Diskussion). Die Adaptationen wurden in vitro an ganzen Krebsaugen durchgeführt.

Dauer (6 Std) und Intensität ($1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$) des Adaptationslichtes wurden so gewählt, daß unter in vitro Bedingungen Reihen und Riefen aufträten (s. 3.1.4).

Wie Vorversuche zeigen, ist die Rhabdomstruktur von in vivo 6 Std dunkeladaptierten Augen und in vitro Augen, die 6 Std in van Harreveld-Lösung im Dunkeln verbrachten, auf dem elektronenmikroskopischen Bild nicht verschieden. Die Mikrovilli von in vitro 6 Std helladaptierten Tieren weisen auf ihren Membranflächen Reihen und Riefen auf (Abb. 19); aus der Anwesenheit von multivesikulären Körperchen läßt sich schließen, daß Membranabbau stattfindet.

Gibt man 30 min vor oder gleichzeitig mit Belichtungsbeginn Cycloheximid (1 mmolar) zu der physiologischen Lösung hinzu, bilden sich keine Reihen (s. Abb. 20).

Wird Cycloheximid jedoch 30 min nach dem Belichtungsbeginn zugefügt, so ist eine Reihenbildung in geringem Umfang zu beobachten.

Ultradünnschnitte der mit Cycloheximid behandelten Retina zeigen stark geschwollene Mitochondrien (s.

Abb. 21), ein Nebeneffekt von Cycloheximid, der in der Literatur beschrieben ist (Hwang et al. 1974). Es fällt auf, daß bei in vitro helladaptierten Retinen, unabhängig von der Cycloheximidzugabe, im Rhabdom große Lumina von der Breite mehrerer Mikrovilli (4 - 6) zu sehen sind (s. Abb. 19 und Abb. 20), die entweder durch Abbau oder Fusion mehrerer Mikrovilli entstanden sein könnten.

Tab. 2 Übersicht über die Versuchsserien von
in vitro hell- und dunkeladaptierten Augen

Adaptation	Inkubationslösung	Anzahl der Augen	Reihen und Riefen
6 h DA	v. Harreveld-Lsg.	6	-
6 h HA	v. Harreveld-Lsg.	6	++
1-2 mW cm ⁻²	v. Hv. + Cycloheximid bei Belichtungsbeginn	2	-
	v. Hv. + Cycloheximid 30' vor Belichtungs- beginn	6	-
	v. Hv. + Cycloheximid 30' nach Belichtungs- beginn	6	+

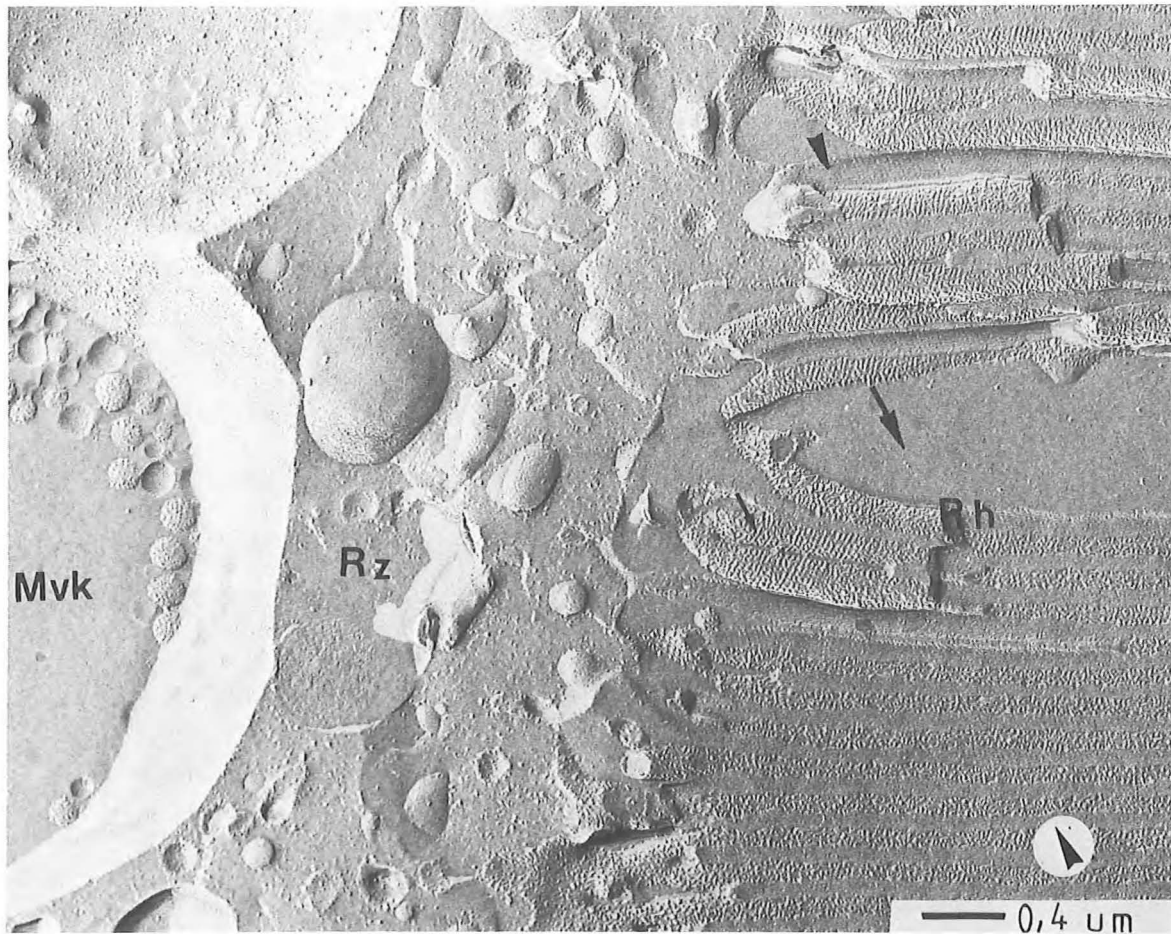


Abb. 19 Teil eines Rhabdoms (Rh) mit angrenzender Retinulazelle (Rz) eines in vitro hell₂ adaptierten (6 Std mit 1 - 2 mWatt cm⁻²) ganzen Auges. (→→) Areal ohne Mikrovilli. Auf den PF-Flächen der Mikrovilli sind Reihen (→), auf den EF-Flächen Riefen (▶) zu finden. Große multivesikuläre Körperchen (MvK) zeigen an, daß Mikrovillulusemembranabbau stattfindet. Jeol 100 C, 80 kV

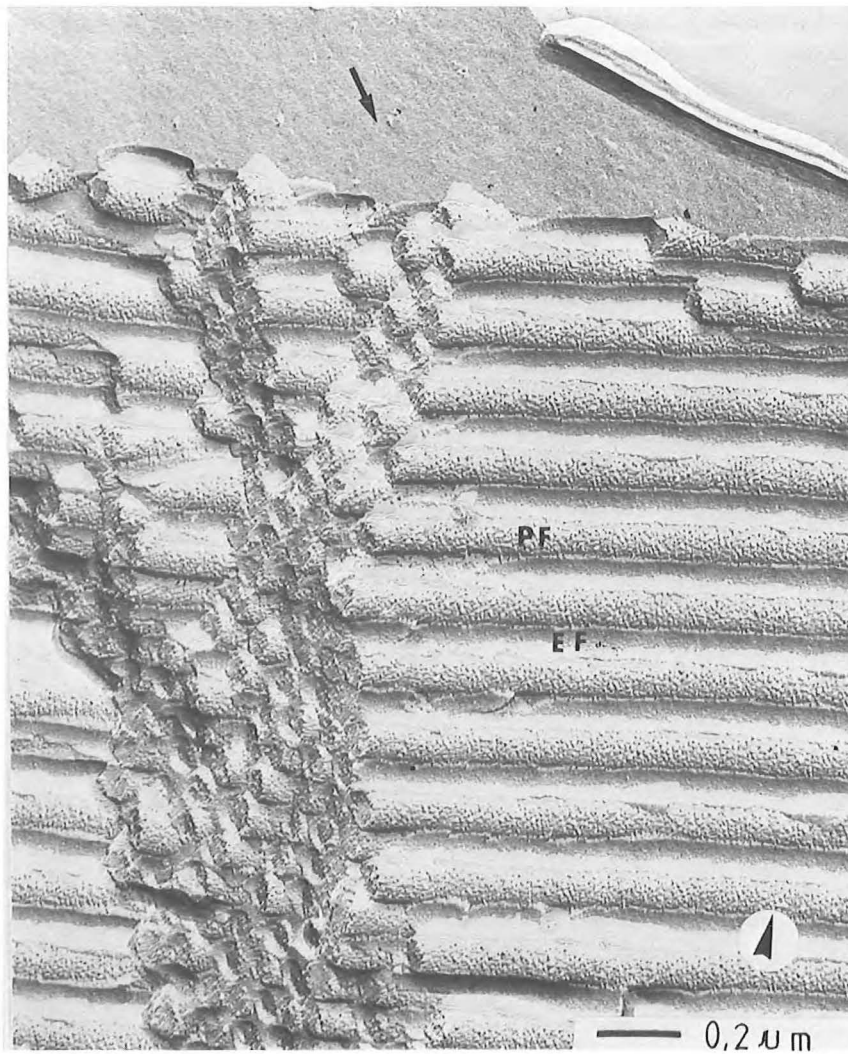


Abb. 20 Mikrovilli im Längsbruch von 6 Std hell-adaptierten (Raumlicht) Retinen mit Zusatz von Cycloheximid 30 min vor Belichtungsbeginn. Die PF-Flächen der Mikrovilli zeigen statistisch verteilte Partikel, die EF-Flächen erscheinen glatt. Im oberen Teil der Abbildung ist ein größeres Lumen innerhalb des Rhabdoms zu erkennen (→).

Jeol 100 C, 80 kV

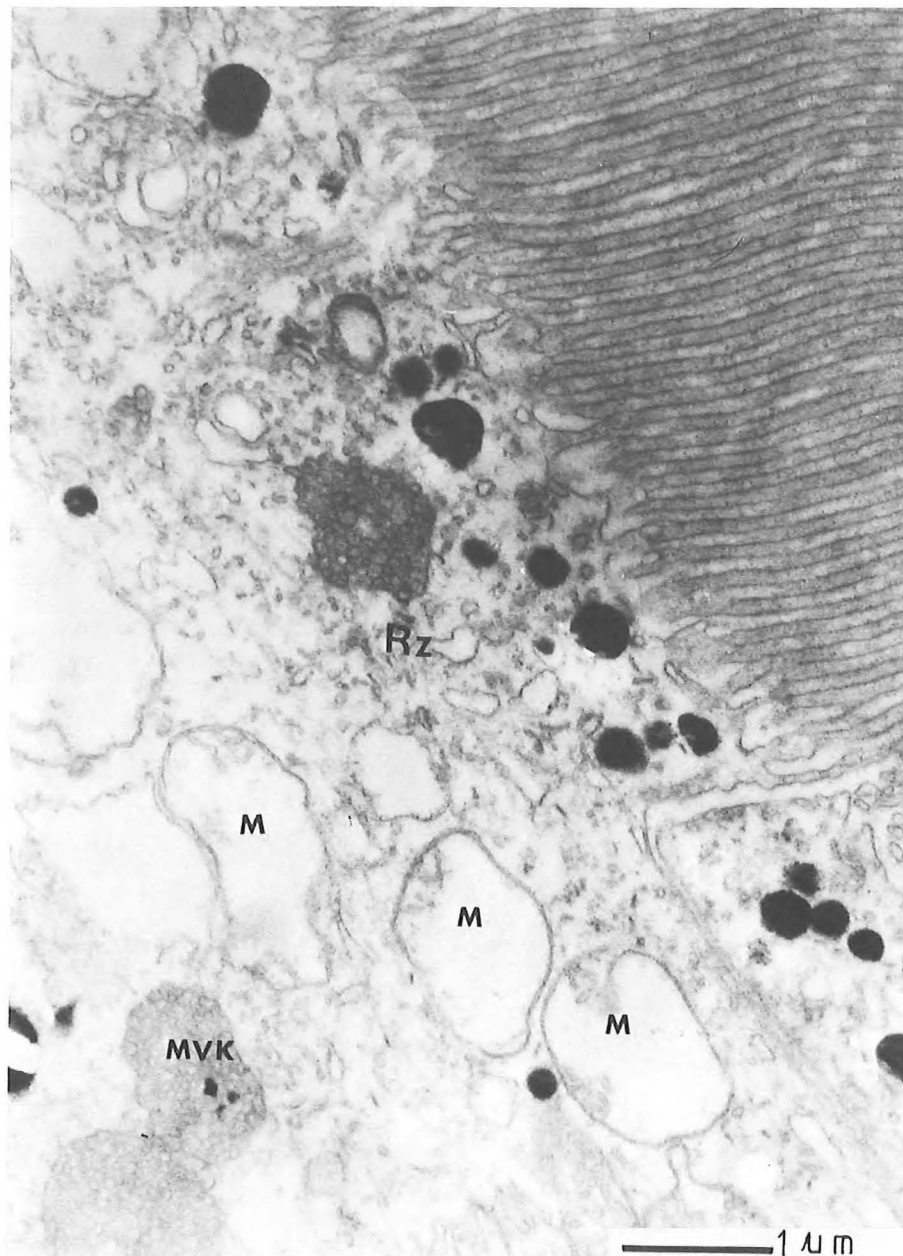


Abb. 21 Ultradünnschnitt durch Mikrovilli mit angrenzenden Retinulazellen (Rz) eines in vitro unter Zusatz von Cycloheximid helladaptierten Auges (6 Std mit $1 - 2 \text{ mW cm}^{-2}$).

Multivesikuläre Körperchen (MvK) sind ein Indiz für Membranabbauprozesse. Zahlreiche stark geschwollene Mitochondrien (M) deuten auf die Einwirkung von Cycloheximid hin.
Jeol 100 C, 80 kV

3.1.5.1 Messungen des Elektoretinogramms einer
isolierten Astacus-Retina unter Einwirkung
von Cycloheximid

Die Messungen wurden von U. Müller am Institut für
Neurobiologie der KFA Jülich durchgeführt.

Die Rezeptorantwort der Astacus-Retina auf einen
Lichtreiz (10 msec) wird weder in ihrer Höhe
noch in ihrer Latenz- oder Abfallzeit durch Cyclohex-
imid beeinträchtigt (s. Abb.22). Somit können Ef-
fekte des Proteinsynthesehemmers auf die Funktions-
eigenschaften der Photorezeptormembran über den Zeit-
raum des Versuches (2 Std) ausgeschlossen werden.

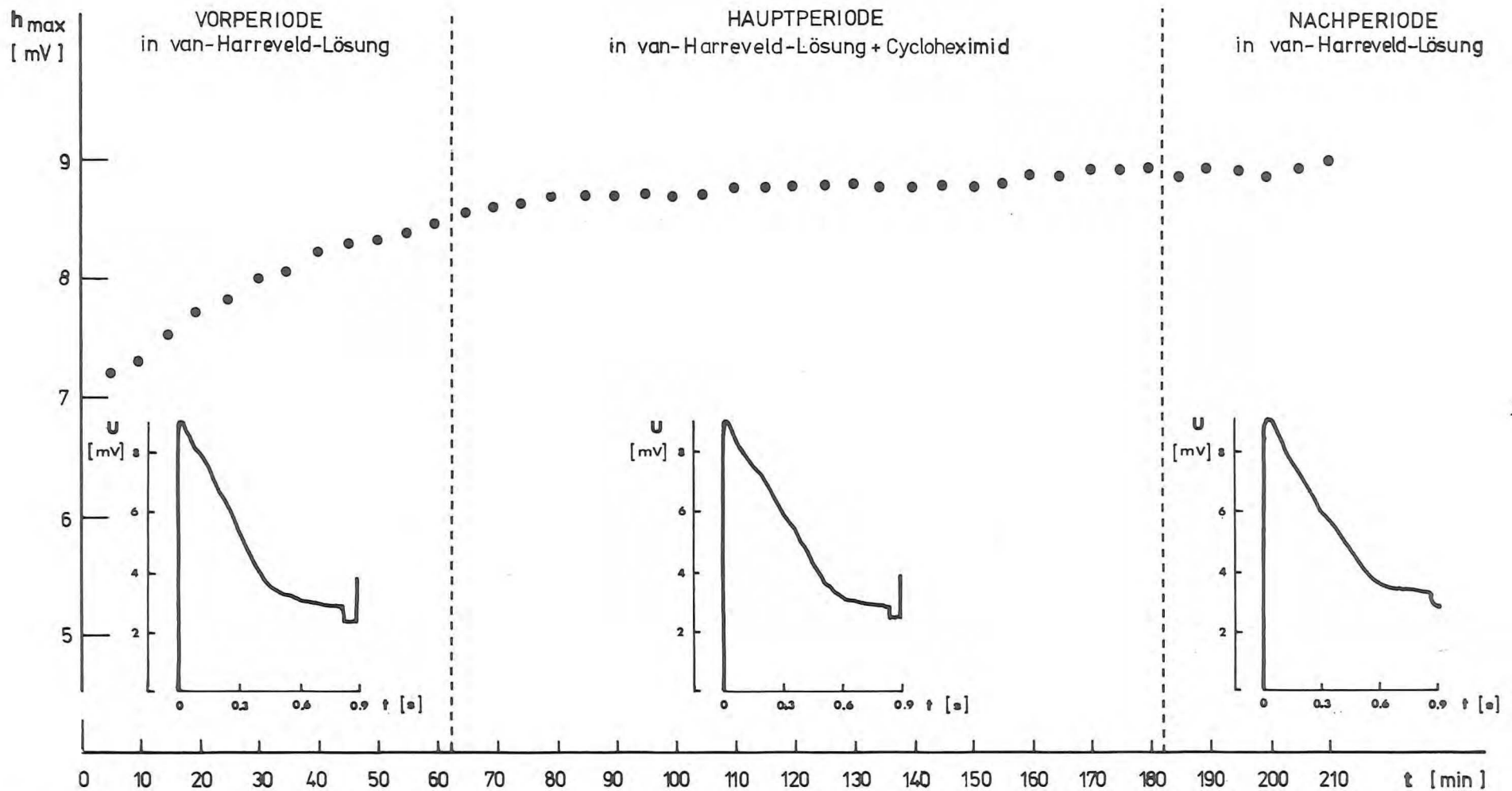


Abb. 22 Maximale Potentialhöhe ($h_{\max}$) des Elektoretinogramms einer isolierten Astacus-Retina unter Einwirkung von Cycloheximid. Zu jeder Testperiode ist der Verlauf eines typischen Elektoretinogramms eingezeichnet. Abszisse: Versuchsdauer in min - Ordinate: $h_{\max}$ in mV

3.1.6 Spektroskopische Messung der Metarhodopsin-
konzentration von Krebsen unter verschie-
denen Adaptationsbedingungen

Durch Belichtung stellt sich, abhängig von der spektralen Verteilung des eingestrahltten Lichtes, an isolierten Rhabdomen ein photostationärer Zustand zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin ein (Wilms 1977). Licht der Wellenlänge 565 nm verschiebt den photostationären Zustand weitgehend in Richtung Metarhodopsin (Abb. 5C), Licht der Wellenlänge 610 nm zum Rhodopsin hin (Abb. 5C). Es ist nicht auszuschließen, daß die bei Helladaptation auftretenden helical angeordneten Moleküle Metarhodopsin darstellen.

Um die Metarhodopsinkonzentration der in vivo helladaptierten Astacus-Retinen zu bestimmen, wurden in Zusammenarbeit mit K. Hamacher (INB, KFA Jülich) folgende spektralphotometrische Messungen durchgeführt:

Unter den gleichen Adaptationsbedingungen wie in Material und Methode (2.1.1) beschrieben, wurden Krebsaugen in vivo 24 und 48 Std mit Raumlicht ($70 \mu\text{W cm}^{-2}$) oder 4 und 6 Std mit der höheren Intensität ($1-2 \text{ mW cm}^{-2}$) adaptiert; anschließend wurden die daraus im Dunkeln isolierten Rhabdome im Spektralphotometer (Cary 118) auf die Metarhodopsinkonzentration untersucht.

Die Metarhodopsinkonzentration betrug in diesem Fall nach 24-stündiger Adaptation der Augen mit Zimmerbeleuchtung 4%, nach 48-stündiger Adaptation 15%; bei Adaptation mit höherer Intensität waren nach 4 Std 9% und nach 6 Std 14% Metarhodopsin entstanden.

Belichtet man jedoch diese isolierten Rhabdome mit

Zimmerbeleuchtung, so ist innerhalb von 10 min der photostationäre Zustand mit 70 - 75 % Metarhodopsin erreicht. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Krebsauge hell- oder dunkeladaptiert war. Licht mit der gleichen spektralen Verteilung wie das Adaptationslicht kann also an isolierten Rhabdomen, nicht aber an ganzen Retinen in vivo, das photochemische Gleichgewicht weitgehend zu Metarhodopsin hin verschieben.

Wie Tab. 3 zeigt, ist die Zunahme der Metarhodopsinkonzentration korreliert mit dem Auftreten der Reihen auf den PF-Flächen der Mikrovilli. Allerdings wäre dann der gebildete Anteil Metarhodopsin im Vergleich zu der Fläche der Areale mit Reihen relativ gering, denn ca. 25 % der Mikrovillusbinnenfläche von 48 Std helladaptierten ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$) Retinen weisen in Reihen angeordnete Partikel auf, während die Metarhodopsinkonzentration 15 % beträgt.

Tab. 3 Gegenüberstellung von Metarhodopsinkonzentration und Reihenbildung bei bestimmten Adaptationszuständen des Krebsauges

Helladaptationszeit (h)	Intensität ($\mu\text{Watt cm}^{-2}$)	Metarhodopsinkonz. (%)	Reihenbildung
24	70	4	+
48		15	++
4	1000-2000	9	+
6		14	++
Dunkeladaptation	-	?	-

3.1.7 Der lichtinduzierte Abbau der Photorezeptor- membran

Die Abbauvorgänge der Mikrovillusmembran während Helladaptation an *Procambarus*-Retinen sind von Eguchi und Waterman (1976) mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik untersucht worden. Ihre Ergebnisse über den lichtinduzierten Abbau der Photorezeptormembran können durch die vorliegende Arbeit im wesentlichen gestützt bzw. vertieft werden.

Die in den Retinulazellen helladaptierten Retinen auftretenden Organellen:

Ummantelte (coated) Vesikel (CV) (Abb. 24), multivesikuläre Körperchen (MvK) (Abb. 26), gemischt lamellar-vesikuläre Körperchen (LvK) (Abb. 27) und multilamellare Körperchen (MLK) (Abb. 28) werden mutmaßlich aus Abbauprodukten der photosensorischen Membran gebildet und wandeln sich wahrscheinlich in der oben genannten Reihenfolge ineinander um. Dafür spricht, daß die Membranen der Mikrovilli und der Organellen im wesentlichen die gleiche Ultrastruktur (Partikelgröße und Dichte) aufweisen (Eguchi und Waterman, 1976).

Abb. 24 zeigt die Vesikelbildung an der Basis der Mikrovilli; die Membran wird zwischen den Mikrovilli-ästen (Abb. 25) abgeschnürt.

Die entstehenden Vesikel sind auf ihren konkaven EF-Flächen mit Partikeln bedeckt und auf ihren PF-Flächen glatt; sie erscheinen demnach gegenüber der Mikrovillusmembran seitenvertauscht.

Diese Vesikel werden in die multivesikulären Körperchen aufgenommen. Da die Vesikel innerhalb der Umhüllung nun auf ihren konvexen Flächen Partikel aufweisen, läßt sich dieser Vorgang plausibel mit einer Einstülpung erklären (s. Abb. 23), von Eguchi und Waterman (1976) auch als sekundäre Endocytose bezeichnet.

Direkte Hinweise für diese von Eguchi und Waterman aufgestellte Theorie liefern die Abbildungen 29 und 30, auf denen man sieht, daß der Bruch entlang der Hüllmembran, also zwischen den beiden Membranhälften eines multivesikulären Körperchens, verläuft, und die das Verschmelzen der Vesikel und ihre Einstülpung sowohl von der konvexen als auch von der konkaven Seite zeigen.

Auf Abb. 23 (nach Eguchi) ist eine schematische zusammenfassende Darstellung des Mikrovillusabbaus wiedergegeben.

Die Umhüllung der multivesikulären Körperchen besitzt nicht die für die 'coated' Vesikel charakteristische Partikeldichte, sondern eine erheblich geringere (ca. 1000 Partikel/ μm^2) (Abb. 29). Deshalb ist es wenig wahrscheinlich, daß sie aus dem Zusammenschmelzen von 'coated' Vesikeln entstanden sind, wie es von Eguchi und Waterman (1976) angenommen wird.

Bei der Umgestaltung der Vesikel in lamellare Strukturen (Abb. 27) kommt es z.T. wieder zur Umkehrung der konkaven bzw. konvexen Flächen (Abb. 27).

Die Partikeldichte auf den Vesikeln in den multivesikulären Körperchen variiert erheblich (5000 bis 8000 Partikel/ μm^2 *; vgl. mit Eguchi (1976): 8000/ μm^2). Sie ist jedoch wesentlich höher als auf den übrigen Membranflächen der Retinulazelle (z.B. Retinulazellmembran mit ca. 1000 Partikel/ μm^2).

Bei den beschriebenen Adaptationsreihen (s. Kap. 3.1.4) nehmen mit Dauer der Helladaptation Zahl und Größe der multivesikulären Körperchen zu (Winterhager, unveröffentl. Material): bei 48 Std helladaptierten Retinen ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$) sind sie über die Basis eines ganzen

* Es wurden ca. 150 Vesikel aus verschiedenen Präparaten ausgezählt, die jeweilige Partikelanzahl wurde dann auf $1 \mu\text{m}^2$ Membranfläche hochgerechnet. Wegen der relativ hohen Schwankungsbreite wurde auf die Angabe von Mittelwert und Streuung verzichtet.

Mikrovillipaketes (4 - 5 μm) verbreitet (Abb. 31).

Trotz des großen Membranabbaus bleiben Mikrovillusdurchmesser und Größe des Extrazellularraumes bei diesem Präparat unverändert (s. Tab. 4).

Innerhalb der Serie mit Adaptationslicht hoher Intensität ist an den Rhabdomen von 12 Std helladaptierten Krebsen zu beobachten, daß sich die photosensorische Membran an der Mikrovillusbasis direkt zu einem Körper lamellarer Struktur aufgerollt hat (Abb. 32).

Nach 36- oder 48-stündiger Belichtung ist eine Orientierung im Gewebe kaum mehr möglich. In Gebieten, in denen Rhabdome vorhanden sein müßten, finden sich fast ausschließlich große Membranflächen (Abb. 33); einige wenige noch halbwegs geordnete Rhabdomstrukturen zeigen Mikrovilli mit undeutlicher Ultrastruktur (Abb. 34 A), sowie im Querbruch (Abb. 34 B) z.T. vergrößerte Mikrovilli.

Diese Phänomene könnten so gedeutet werden, daß Licht hoher Intensität einen zusätzlichen Abbauprozess - neben dem normalen Weg über MvK, LvK, MlK - induziert, bei dem die Photorezeptormembran durch direkte Bildung multilamellarer Körper und durch eventuelle Fusion der Mikrovillimembranen zerstört wird.

Auch bei dieser Adaptationsserie bleibt der Durchmesser der Mikrovilli konstant (Tab. 4).

Mit Beginn der Zerstörung und der Bildung vergrößerter Mikrovilli wurden weitere Auswertungen als nicht sinnvoll angesehen.

Tab. 4 Mikrovillusburchmesser bei verschiedenen
Adaptationszuständen des Auges

Adaptationszustand des Krebsauges		Anzahl der ausgemessenen Mikrovilli	Durchmesser (nm)
Zeit (Std)	Belichtung ($\mu\text{Watt cm}^{-2}$)		
48	-	240	78 ± 3
48	70	130	75 ± 7
1	1000 - 2000	180	70 ± 2
3	1000 - 2000	240	76 ± 2
6	1000 - 2000	96	74 ± 8

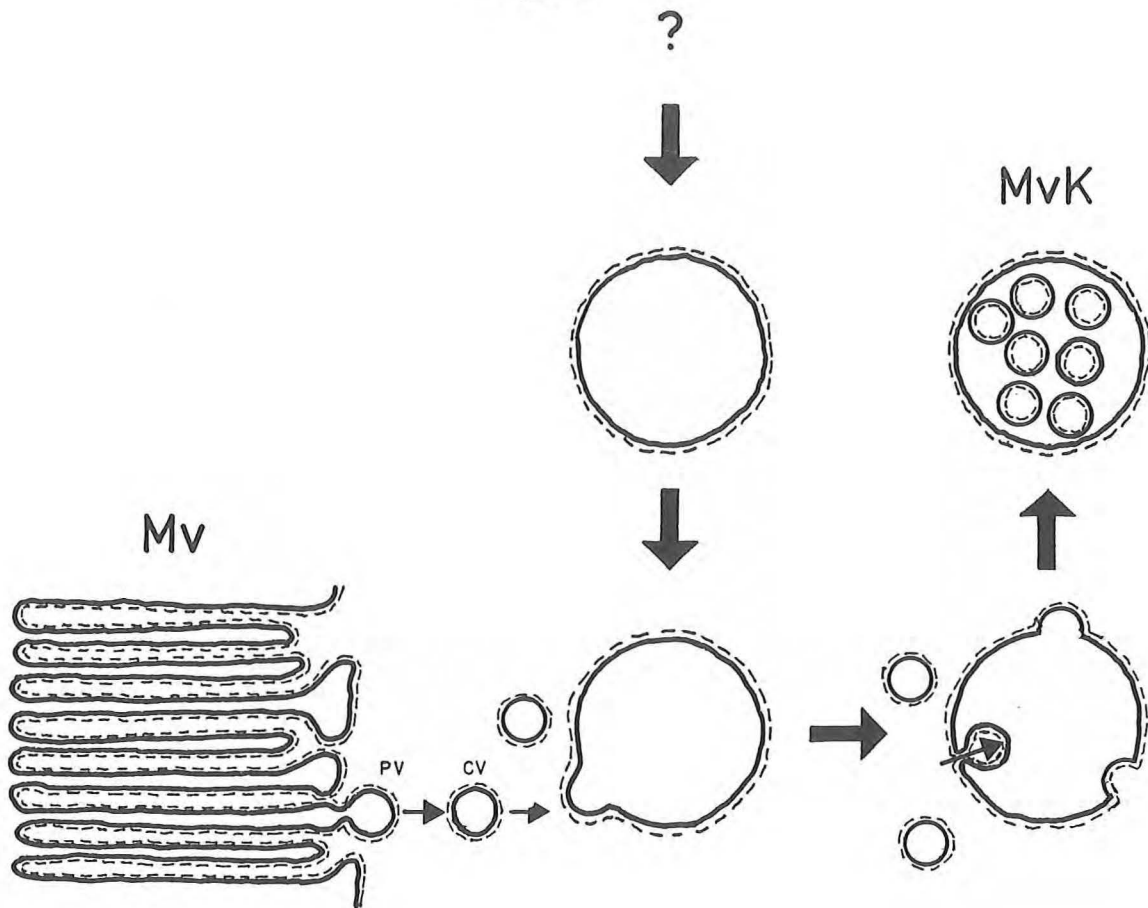


Abb. 23 Zusammenfassende Darstellung des Mikrovillusmembranabbaus (abgeändert nach Eguchi und Waterman 1976): Abschnürung von Vesikeln (pinocytotische Vesikel PV) an der Basis der Mikrovilli zwischen den Mikrovilliästen. Dadurch entstehen 'coated' Vesikel (CV) im Cytoplasma; diese fusionieren mit der Membran größerer Vesikel unbekannter Herkunft, werden durch sekundäre 'Endocytose' aufgenommen und bilden Vesikel innerhalb der multivesikulären Körperchen (MvK).



Abb. 24 Dieser Gefrierbruch zeigt die Abschnürvorgänge von Vesikeln an der Mikrovillusbasis zwischen zwei Mikrovillusbündeln (s. auch Abb. 25). Es entstehen Vesikel (V), davon eines vermutlich in Abschnürung (➡) begriffen, die glatte, konvexe PF-Flächen und partikelreiche EF-Flächen aufweisen (▶), genau umgekehrt wie bei der Mikrovillusmembran.
Jeol 100 C, 80 kV

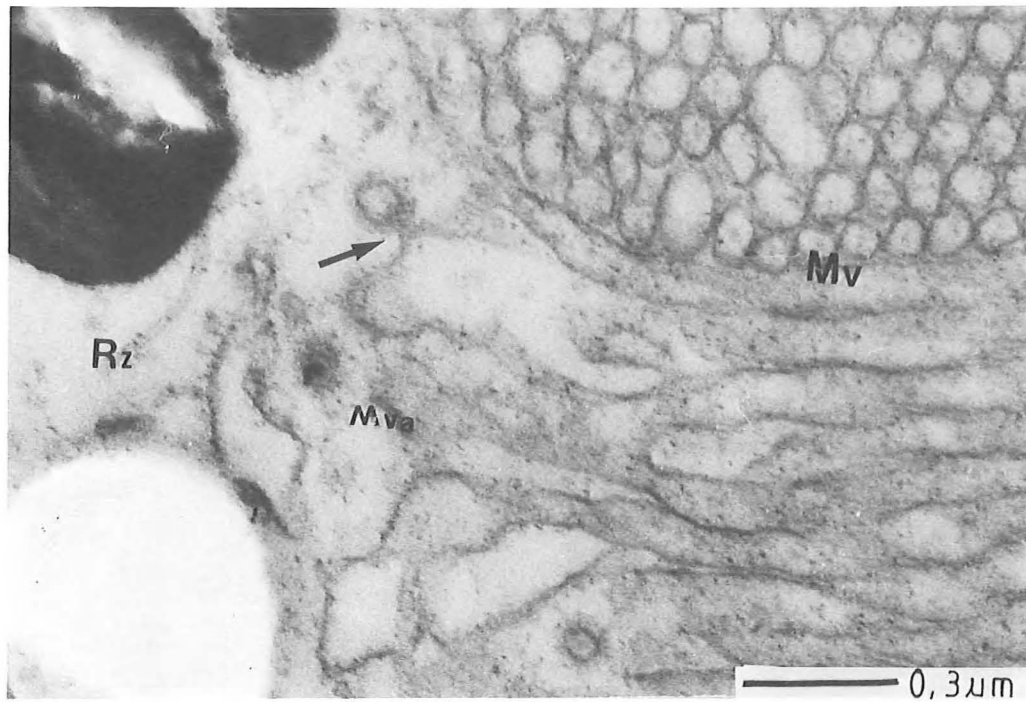


Abb. 25 Ultradünnschnitt eines 6 Std in vitro hell-
adaptierten Auges mit längs und quer ge-
schnittenen Mikrovilli (Mv) und angrenzen-
der Retinulazelle (Rz). Die 'coated' Vesi-
kel schnüren sich zwischen den Mikrovilli-
ästen (Mv) ab (→).
Jeol 100 C, 60 kV

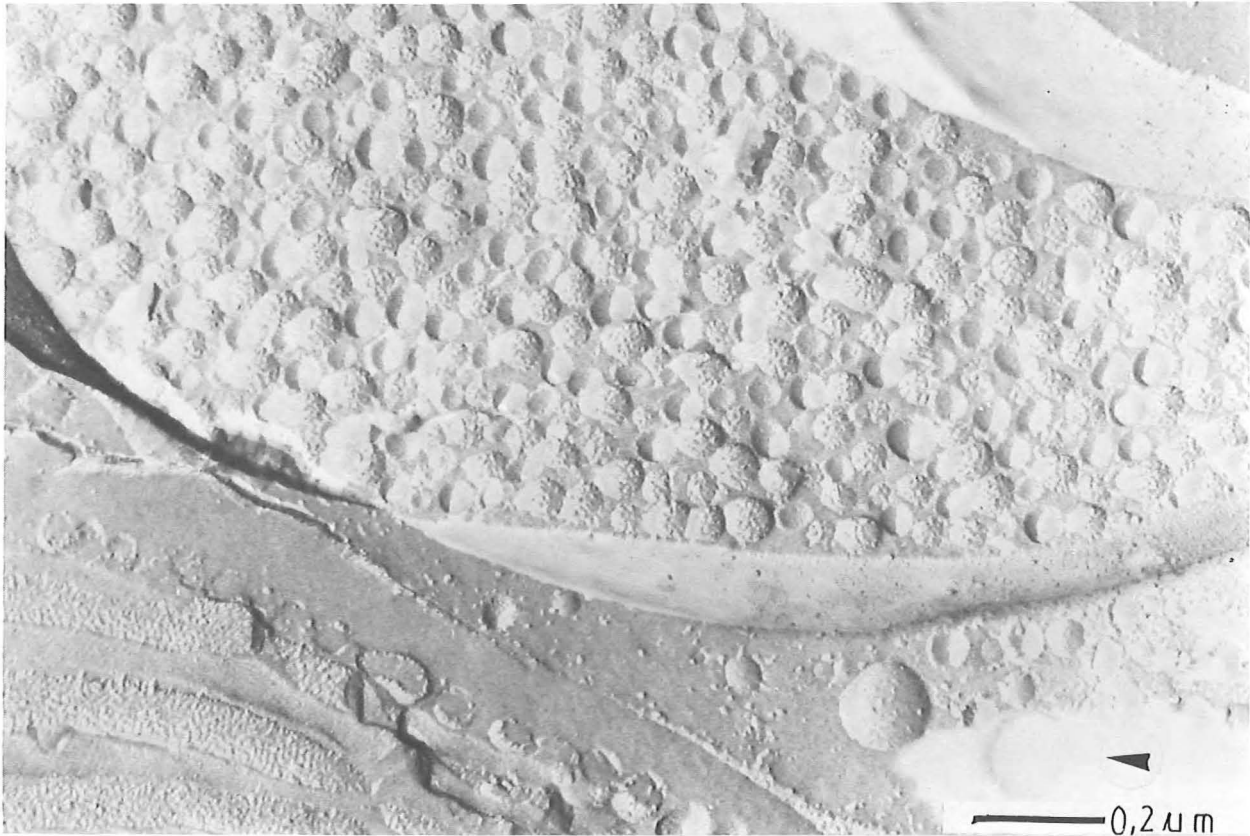


Abb. 26 Multivesikuläres Körperchen mit Vesikeln,
die auf den konvexen PF-Flächen zahlreiche
Partikel aufweisen.
Siemens 101, Aufnahme G. Dahl.

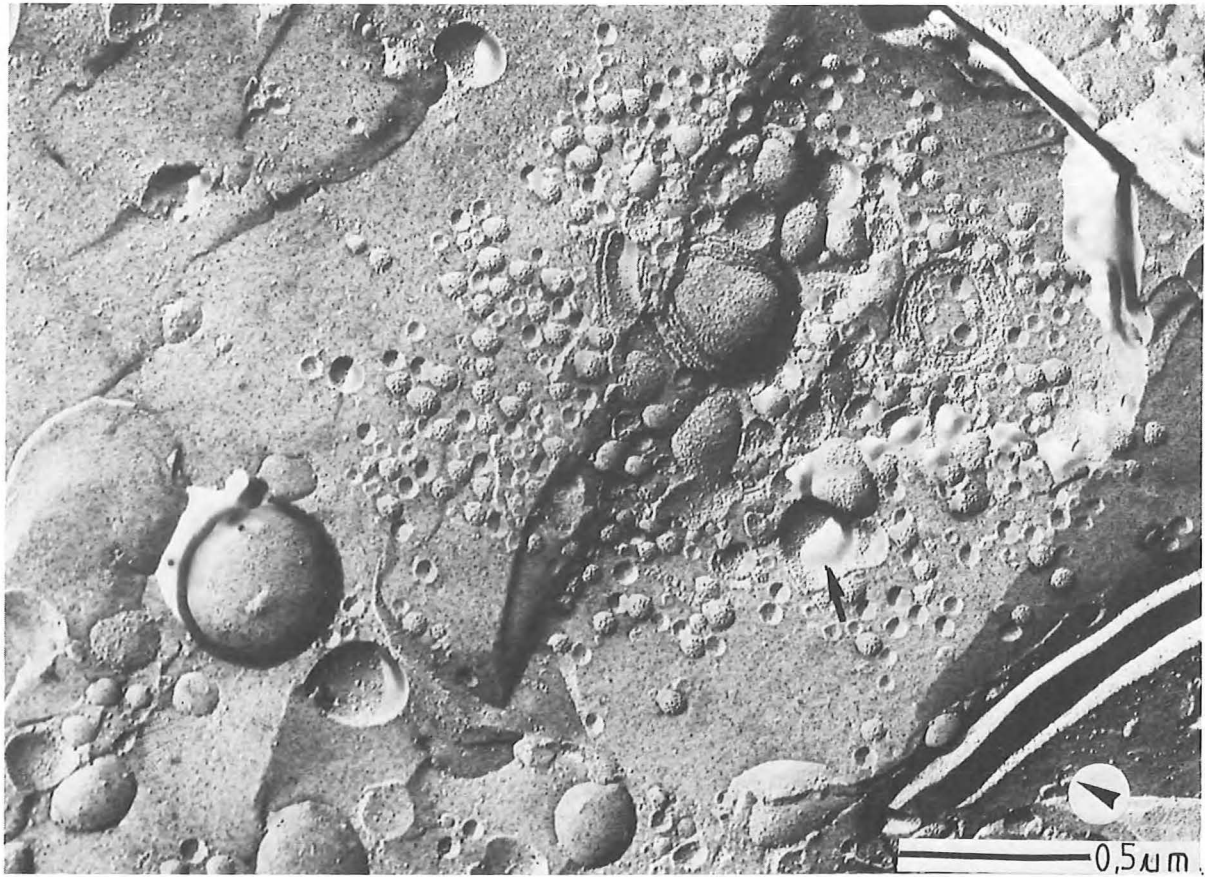


Abb. 27 Ein gemischt-lamellar-vesikuläres Körperchen. Bei der Umwandlung der Vesikel in lamellare Strukturen kommt es zum Teil zur Umkehrung der Membranhälften (→).
Jeol 100 C, 80 kV

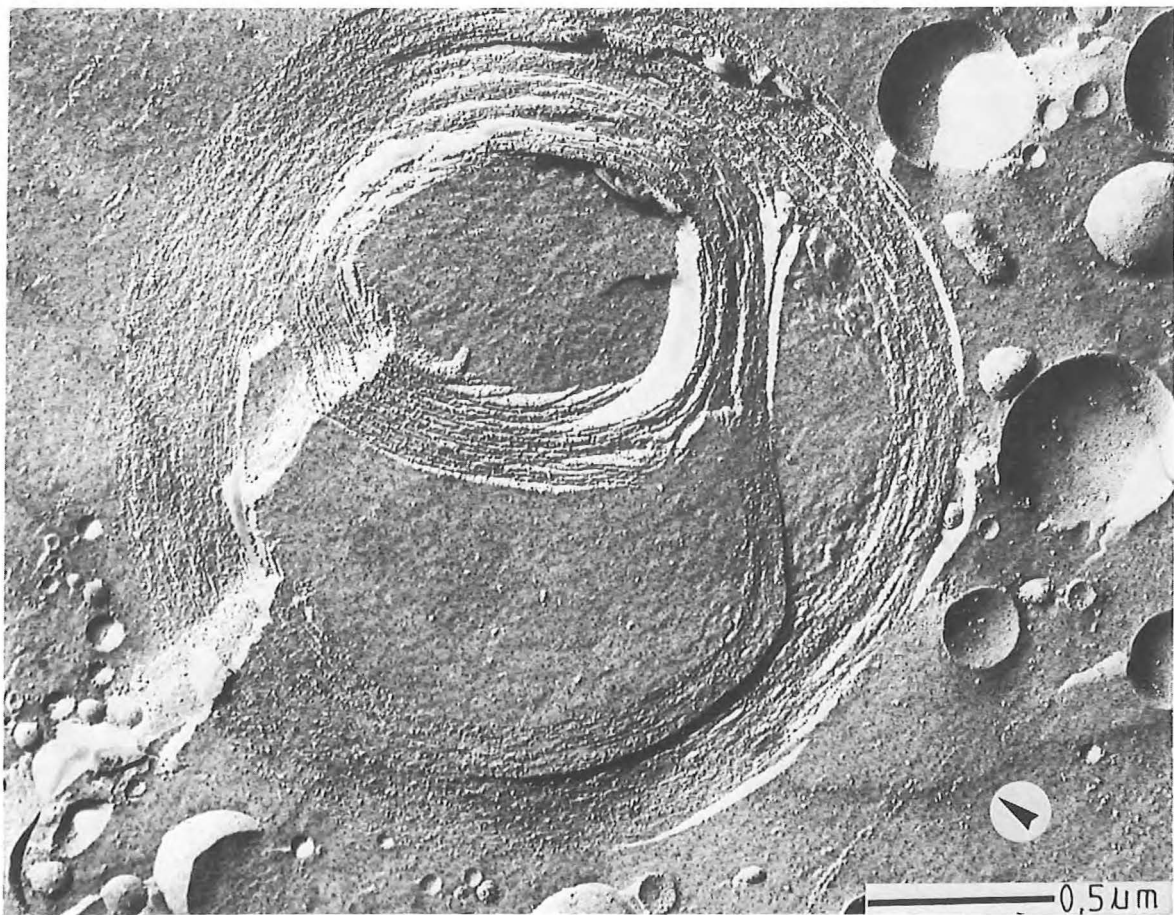


Abb. 28 Querbruch durch ein multilamellares Körper-
chen mit zahlreichen aufgerollten Membranen.
Jeol 100 C, 80 kV

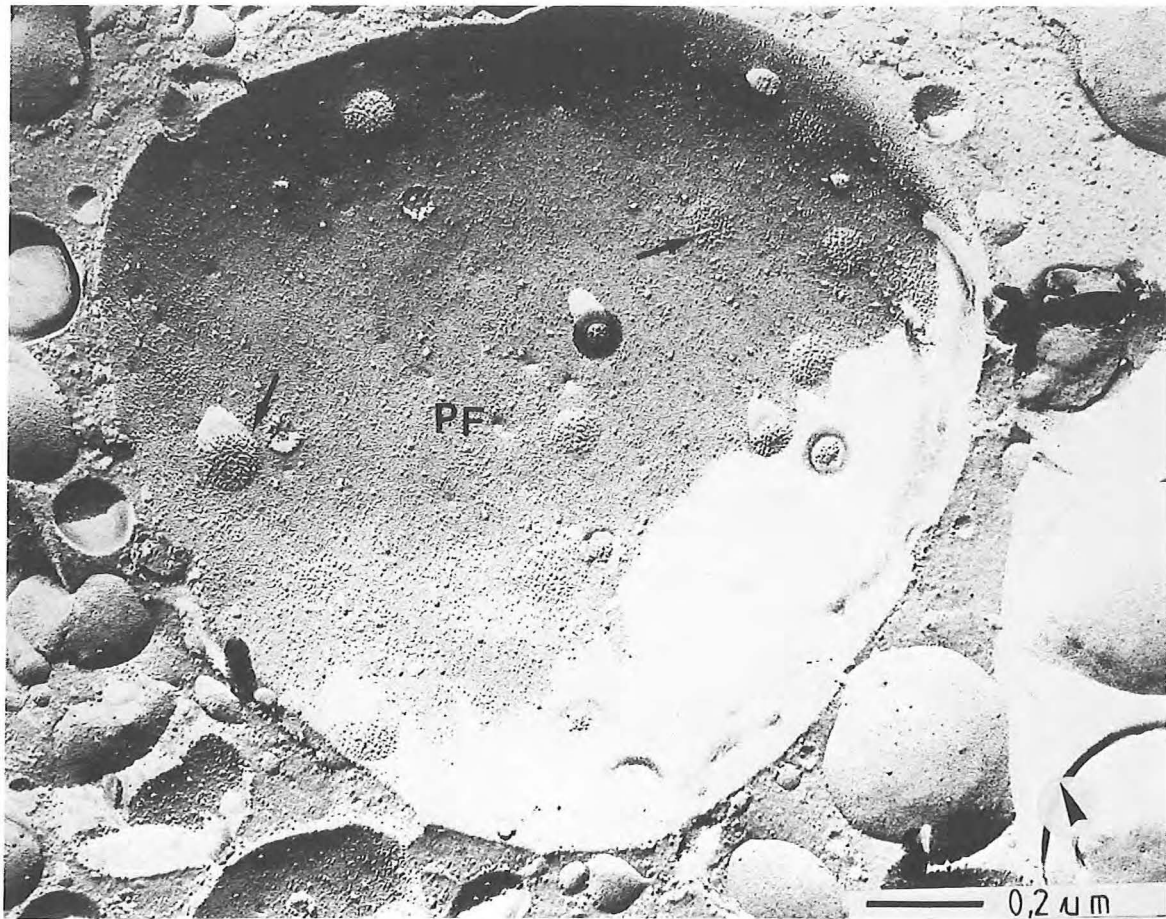


Abb. 29: Konkave Hüllmembranhälfte (PF) eines multivesikulären Körperchens, an das Plasma einer Retinulazelle grenzend, von einem 12 Std helladaptierten ($1 - 2 \text{ mW cm}^{-2}$) Krebs. Mehrere Phasen des sekundären 'Endocytoseprozesses' sind sichtbar ($\rightarrow$). Die partikelreiche Membranfläche des ehemaligen Vesikels ist bei der Verschmelzung und Einstülpung dem Inneren des multivesikulären Körperchens zugewandt.
Philips 400, 80 kV

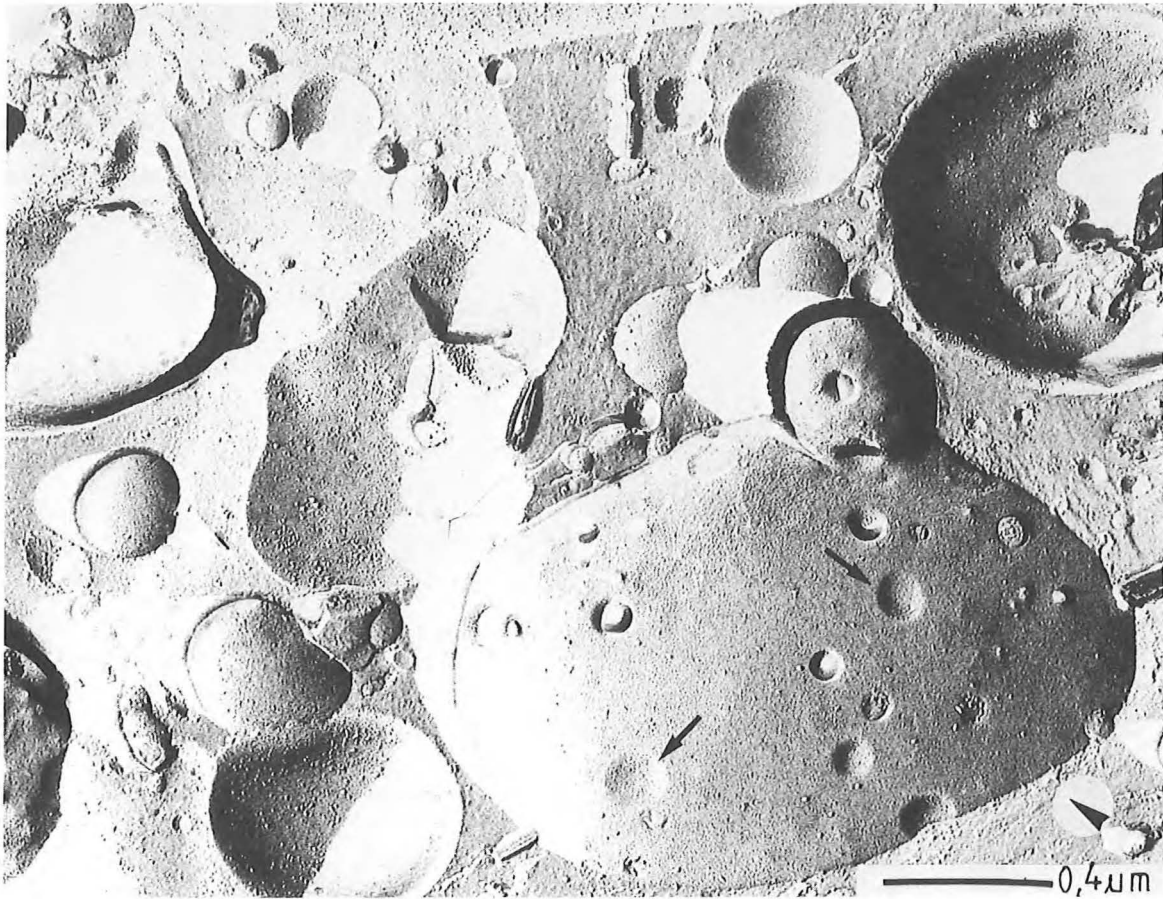


Abb. 30: Bruch durch die Hüllmembran eines multivesikulären Körperchens, der entlang der konvexen EF-Flächen verläuft, so daß man die Einstülpungen von außen sieht (→). Gleiches Präparat wie auf Abb. 29. Die glatten konkaven (eingestülpten) Membranflächen werden zu den EF-Flächen der Vesikel innerhalb der MvK (s. Abb. 29). Philips 400, 80 kV

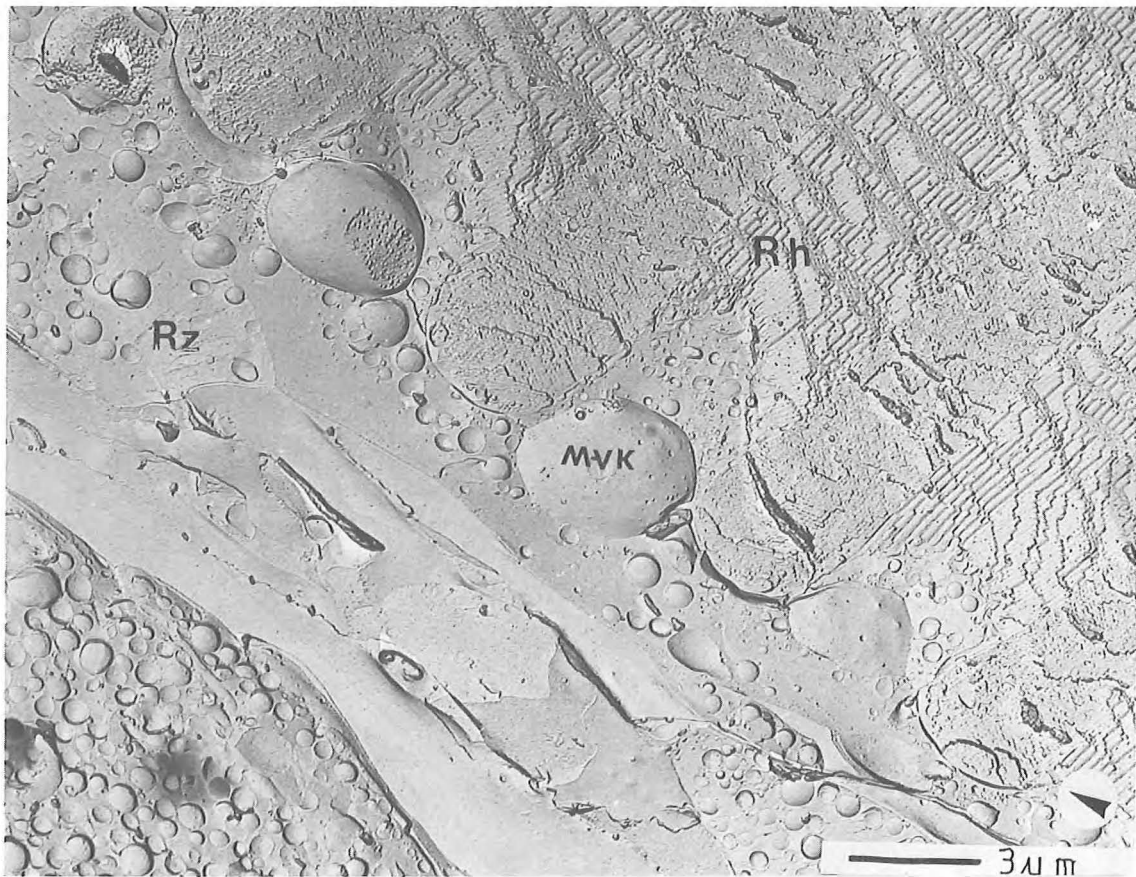


Abb. 31 Längsbruch durch ein Rhabdom (Rh) mit angrenzender Retinulazelle (Rz) eines 48 Std helladaptierten ($70 \mu\text{Watt cm}^{-2}$) Krebses. Im Cytoplasma fallen die großen multivesikulären Körperchen auf (MvK), die direkt an der Basis des zur Retinulazelle gehörigen Mikrovilluspaketes liegen.
Jeol 100C, 80 kV

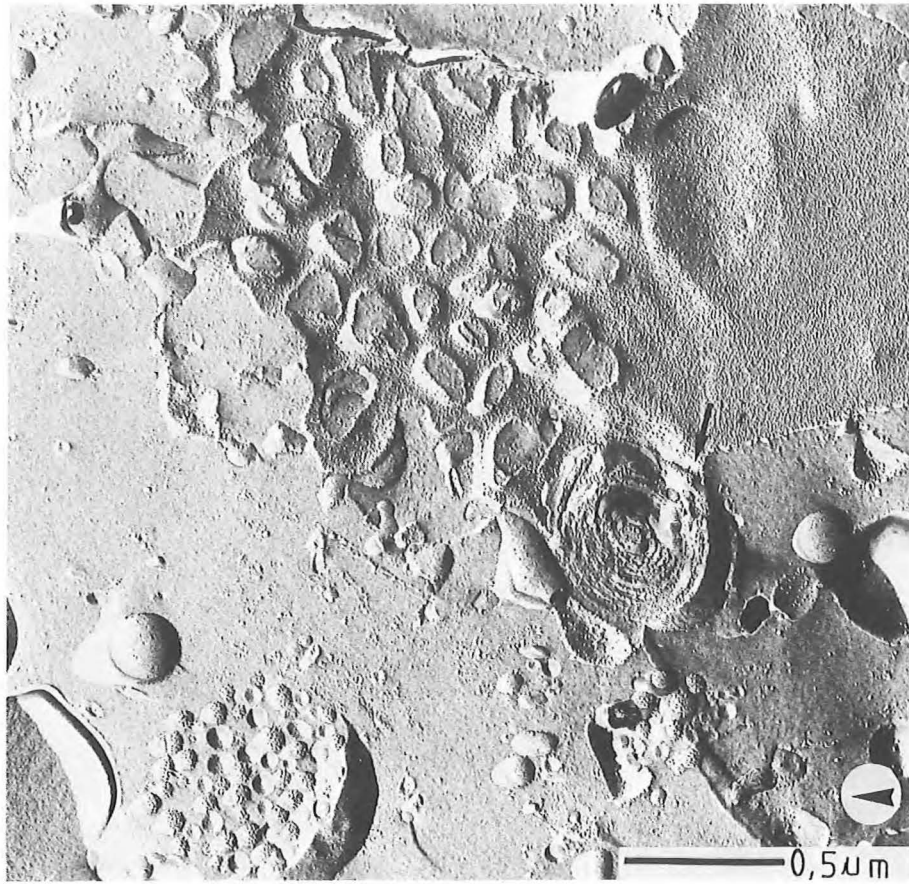


Abb. 32 Aufgerollte photosensorische Membran eines
12 Std helladaptierten ($1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$)
Krebse ($\rightarrow$).
Philips 400, 80 kV

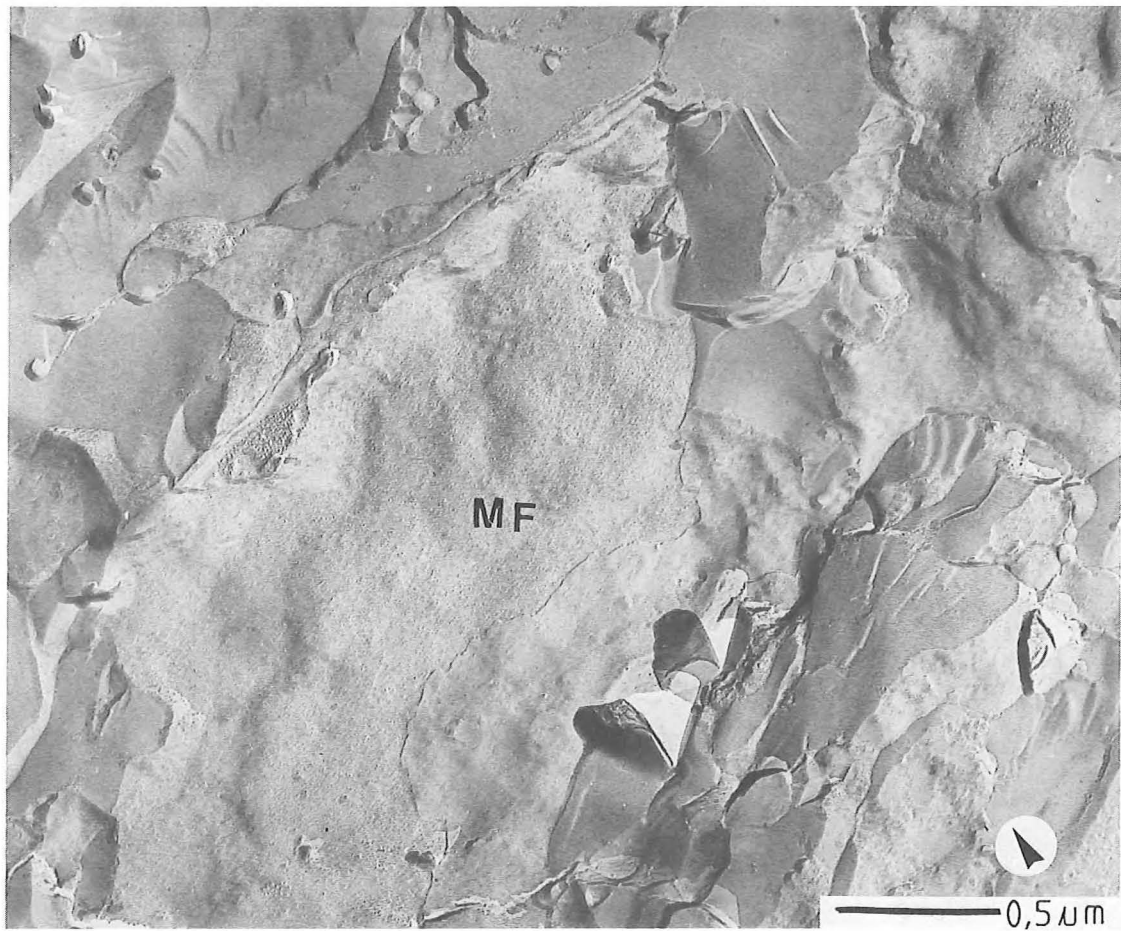


Abb. 33 Membranflächen (MF) im Gebiet der Rhabdome nach 36-oder 48-stündiger Belichtung des Krebses mit $1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$.

Jeol 100C, 80 kV

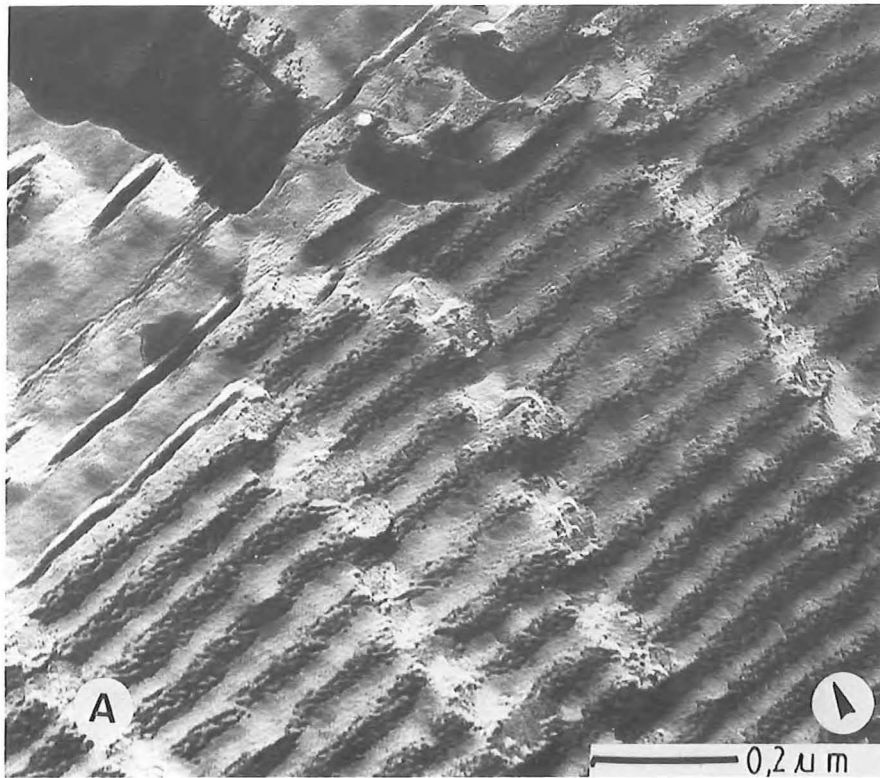


Abb. 34 A Reste von Rhabdomstrukturen eines 36 Std mit $1 - 2 \text{ mWatt cm}^{-2}$ helladaptierten Krebses. Die Mikrovillusmembranen im Längsbruch zeigen eine glatte EF-Fläche und eine partikelreiche PF-Fläche; die Partikelstruktur ist jedoch nur undeutlich zu erkennen.
Jeol 100 C, 80 kV

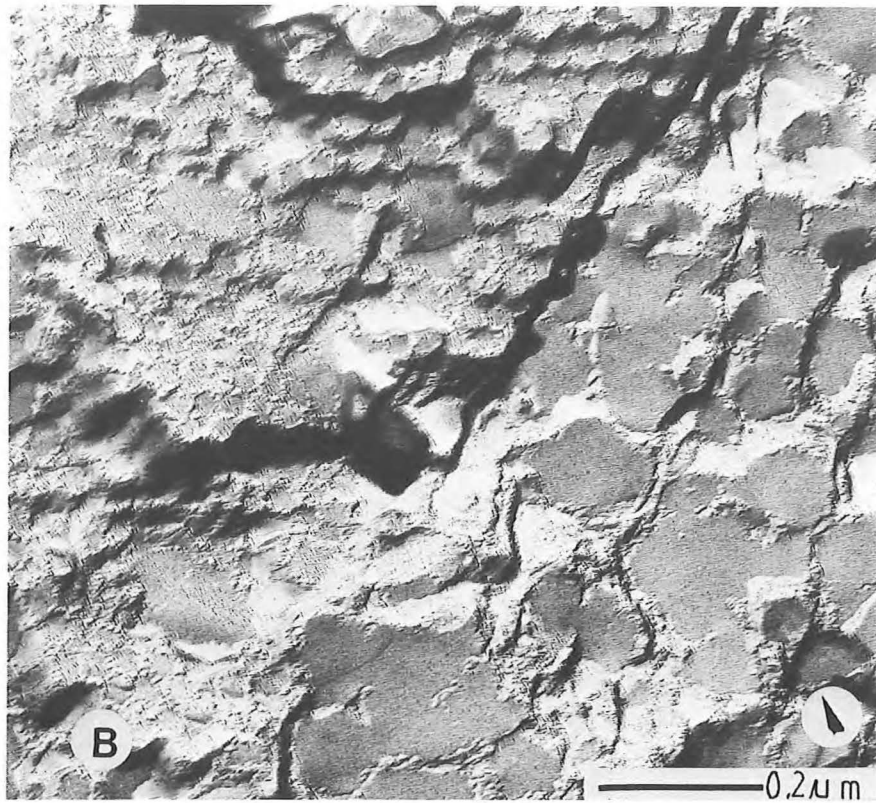


Abb. 34 B Querbruch durch die Mikrovilli des gleichen Rhabdoms wie auf Abb. 34 A. Die Gestalt der vergrößerten Mikrovilli (Mv_g) deutet darauf hin, daß die Mikrovillusmembranen miteinander fusioniert sein könnten.

Jeol 100 C, 80kV

3.1.8 Anhang zu den Ergebnissen

Experimente zum Einfluß von Cycloheximid auf die Aufnahme Tritium-markierter Aminosäuren an isolierten Astacus-Augen bzw. Retinen.

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit J. Winterhager (Institut für Neurobiologie, KFA-Jülich) durchgeführt.

Da bei Zugabe von Cycloheximid zu isolierten Krebsaugen vor Belichtungsbeginn die Reihenbildung der Partikel auf den PF-Flächen der Mikrovilli unterdrückt wird (3.1.5), sollte geprüft werden, ob an isolierten Augen oder Retinen eine Proteinneusynthese stattfindet, und ob diese durch Cycloheximid gehemmt wird.

Dazu wurden 2 - 4 ganze Augen oder isolierte Retinen in glucosehaltiger van Harreveld-Lösung mit H^3 -Leucin oder einem H^3 -Aminosäure-Gemisch 3 - 15 Std lang inkubiert.

Jeweils der Hälfte der Proben wurde Cycloheximid (1 mmolar/l) zugesetzt und zwar stets 30 min vor der Zugabe des radioaktiven Markers, damit der Hemmstoff von dem Gewebe aufgenommen werden konnte. Während dieser 30-minütigen Vorperiode verblieben die Hemmstoff-freien Kontrollproben in normaler van Harreveld-Lösung. Die spezifische Aktivität der Inkubationslösung schwankte je nach Versuch zwischen 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ und 35 $\mu\text{Ci/ml}$, der Leucin- bzw. Aminosäuregehalt zwischen 0.2 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l.*

Die Proben wurden unter einer O_2/CO_2 -Atmosphäre meist bei Zimmertemperatur (22 °C) inkubiert; es wurden jedoch einige Experimente bei 1 °C gemacht, um einen Vergleichswert für den Aminosäureeinbau bei stark verlangsamter Syntheserate zu erhalten.

*Bei einigen Versuchen war neben H^3 -Leucin ein Gemisch nicht aktiver Aminosäuren (Konzentration 0.5 - 1 mmol/l) der Inkubationslösung zugegeben. (Zusammensetzung des Aminosäuregemisches s. Tran-Thi 1977).

Die Lichtbedingungen wurden mehrfach variiert:

Die meisten Krebse waren vor der Präparation der Augen dunkeladaptiert, einige an Raumlicht (Leuchtstoffröhren, gleiche Bedingungen wie in Material und Methode beschrieben) adaptiert.

Die 30-minütige Vorperiode der Inkubation (von der Cycloheximidzugabe bis zur Zugabe des Isotops), sowie die Hauptperiode wurden bei Licht (Lichtleiter, s. Material und Methode) als auch in Dunkelheit durchgeführt, so daß vier verschiedene Ansätze resultierten.

Diese Variationen waren geboten, da einige Autoren (Hafner und Bok 1975, Burnel et al. 1970) eine Abhängigkeit der H^3 -Leucin-Markierung des Rhabdoms von den Adaptationsbedingungen finden.

Am Ende der Inkubation wurden die Retinen, falls das ganze Auge inkubiert worden war, freipräpariert, dann in Phosphatpuffer oder v. Harreveld-Lösung (mit oder ohne "kaltem" Leucin bzw. Aminosäuren) gewaschen und anschließend homogenisiert (s. Kap. 2.1.2). Die Suspension wurde entweder abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge; der Vorgang wurde wegen der großen Menge auswaschbarer Radioaktivität 3 - 5 mal wiederholt) oder über ein Nuclepore-Filter (5 μ m Porendurchmesser) abgenutscht und anschließend perfundiert (v.Hv. + As-Gemisch + Leucin (1mmol/l)), oder aber auf den Dichtegradienten zur Isolierung der Rhabdome (K. Hamacher, Dissertation in Vorbereitung) übertragen. Das Pellet des Retinagewebes, das in 1 ml-Fraktionen abgesammelte Superfusat (sowie das Nuclepore-Filter mit dem darauf befindlichen Gewebsresten), bzw. die vom Dichtegradienten stammende Rhabdomsuspension wurden mit Scintillator (Instagel) versetzt und im Zähler (Betaszint 5000, Fa. Berthold) gemessen. Aus der spezifischen Aktivität der Inkubationslösung (cpm/mol Leucin bzw. Aminosäuren) und der Aktivität der Probe läßt sich dann die Menge der ausgewaschenen bzw. noch im Gewebe befindlichen Aminosäuren berechnen.

Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 5 sind die Ergebnisse der wichtigsten Versuche zusammengefaßt.

1. Der Einbau von H^3 -Leucin (bzw. H^3 -Aminosäuren) variiert stark (s. Tab. 5). Um eindeutige über der Hintergrundsaktivität (ca. 15 pCi unter den gewählten Meßbedingungen) liegende Meßwerte zu erhalten, muß man für die Inkubationslösung relativ hohe spezifische Aktivitäten ($\geq 10 \mu\text{Ci/ml}$) wählen. Darüber hinaus ist es nötig, die dem Gewebe anhaftende Radioaktivität gründlich auszuwaschen (erst nach 40-minütiger Superperfusion ist die Rate der H^3 -Abgabe annähernd konstant. Der Leucin-Gehalt beträgt dann nur noch ca. 10 % des Anfangsgehaltes nach einmaligem Waschen).

2. Eine signifikante Abhängigkeit des Leucin-Einbaus von der Leucin-Konzentration des umgebenden Mediums konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Es besteht allerdings die Tendenz, daß der Einbau mit steigender Außenkonzentration zunimmt (Tab. 5 vergl. Reihe 1 - 3 mit 4a, 5a, b und 6).

3. Die höchste Aufnahme ist bei einer Konzentration von ca. 10^{-3} mol Leucin/l Inkubationslösung meßbar. Unter diesen Bedingungen werden bis zu 0.1 - 0.2 nmol Leucin (Aminosäuren) pro Retina gefunden (s. Tab. 5 Reihe 1 - 3). Bei einer Gesamtproteinmenge von 1 μg /Retina (K.Hamacher 1977) mit einem mittleren Molekulargewicht von 40 000 d und unter der Annahme, daß in 1 mol Protein im allgemeinen 20 - 40 mol Leucin enthalten sind (Schimz, pers. Mitteilung), kommt man auf einen Leucin-Gehalt von ca. 0.5 - 1 nmol/Retina.

Demnach entspräche die o.a. in vitro-Aufnahme einer Neusynthese bzw. einem Austausch von etwa 20 %

des Gesamtproteins.

Daten über Syntheseraten (Turnover) der Photorezeptormembran von Crustaceen sind in der Literatur nicht vorhanden und diejenigen von anderen Evertibraten (White und Lord 1975, Brammer und Stein 1978) variieren zu sehr, als daß man sie als Vergleichswerte heranziehen könnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine gewisse Leucinfraction an spezifische Zellstrukturen, z. B. Pigmentgranula, relativ fest gebunden ist, so daß ein Membranprotein-Umsatz von 20 % durchaus zu hoch bemessen sein mag (diese Bindung müßte dann temperaturabhängig sein, s. Punkt 7).

4. Die H^3 -Leucin Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist nicht untersucht worden. Nach ca. 5 Std scheint jedoch ein konstanter Wert erreicht zu sein, der sich auch nach 15-stündiger Inkubation nicht verändert hat (Reihe 3 und Reihe 2), d. h. nach 5 Std könnte der Aminosäure-Einbau sistieren bzw. Ein- und Abbau sich im Gleichgewicht befinden.

Hafner und Bok (1977) finden bei autoradiographischen Untersuchungen an der *Procambarus*-Retina ein Maximum der Rhabdommarkierung (H^3 -Leucin) nach 12 Std. Diese Versuche wurden in vivo durchgeführt, indem dem Krebs radioaktiv markiertes Leucin injiziert wurde.

5. Cycloheximid scheint keinen Einfluß auf den Leucin-Einbau zu haben; die Meßdaten für die mit Cycloheximid behandelten und die Cycloheximid-freien Proben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Dies mag z. T. daran liegen, daß unter gleichen Bedingungen gewonnene Werte untereinander schon große Schwankungen zeigen können (s. Reihe 1, in der 4 Retinen einzeln gemessen worden sind; in allen anderen Versuchen mit 4 Retinen sind je 2 Retinen zusammengefaßt worden). Dadurch wäre eine durch Cyclo-

heximid verursachte Proteinsynthesehemmung von ca. 30 % ohne eine große Zahl von Versuchen nicht nachzuweisen.

6. Aus den Ergebnissen läßt sich kein Belichtungseffekt auf den Aminosäureeinbau ablesen, gleichgültig ob die Augen in vivo (Reihe 4), während der 30 minütigen Vorperiode (Reihe 1, vergl. mit Reihe 2 und 3) oder der Hauptperiode (Reihe 2, vergl. mit Reihe 3 ; Reihe 6, vergl. mit Reihe 5a, b) der Inkubation belichtet worden sind. Hafner und Bok (1977, an *Procambarus*) sowie Burnel et al. (1970, an *Limulus*) finden nach H^3 -Leucin-Injektion ins lebende Tier auf autoradiographischen Wege eine stärkere Markierung des Rhabdoms von dunkeladaptierten Tieren als von helladaptierten. Die Markierung des *Limulus*-Rhabdoms nimmt noch zu, wenn die Augen vor der Dunkeladaptation belichtet worden sind. Krauhs et al. (1977) zeigen, daß die Photorezeptorzellen isolierter Augen von *Limulus* im Hellen stärker als im Dunkeln markiert werden.

7. Bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur von 22 auf 2 °C wird die Einbaurrate um mehrere Zehnerpotenzen verringert (Reihe 4a, 4b; bzw. 7a, 7b).

8. Retinen, die während der Inkubation im Augenbecher belassen wurden, zeigen gegenüber isolierten Retinen bei sonst gleichen Bedingungen einen verringerten Einbau (vergl. Reihe 5a mit 5b). Das ganze Auge bildet also eine Diffusionsbarriere gegenüber Aminosäuren, offenbar weil es im Gegensatz zu isolierten Retinen nur von der proximalen Seite her zugänglich ist.

Tabelle 5: Zusammenstellung der Experimente zum Einfluß von Cycloheximid auf die Aufnahme Tritium markierter Aminosäuren an isolierten Astacus-Augen bzw. Retinen

Nr.	Inkubationsobjekt	Inkubationslsg.		Inkubationsbedingungen			Nachbehandlung	Einbau von Aminosäuren			
		spez. Akt. $\mu\text{Ci/ml}$	Leu-Geh. mmol/ml	Zeit *) h	Licht	Temp $^{\circ}\text{C}$		Normal mol/Ret	rel.E *)	Cycloheximid mol/Ret	rel.E *)
1	4 Augen	11	$0.5 \cdot 10^{-3}$	0.5 +5.5	hell dunkel	22	Retinen isoliert + gewaschen	$0.20 \cdot 10^{-9}$ $0.12 \cdot 10^{-9}$	100 60	$0.14 \cdot 10^{-9}$ $0.16 \cdot 10^{-9}$	70 80
2	4 Retinen	20	10^{-3}	0.5 +5	① dunkel dunkel	22	Retinen homogeni- siert + Perfusion	$0.10 \cdot 10^{-9}$	50	$0.12 \cdot 10^{-9}$	60
3	4 Retinen	20	10^{-3}	0.5 +15	dunkel dunkel	22	Retinen homogeni- siert + Perfusion	$0.09 \cdot 10^{-9}$	45	$0.12 \cdot 10^{-9}$	60
4a	4 Retinen (Krebse an Zimmerbel.adap- tiert)	30	$0.7 \cdot 10^{-6}$	0.5 +6	dunkel dunkel	22	Retinen gewaschen	$0.46 \cdot 10^{-12}$	0.23	$0.42 \cdot 10^{-12}$	0.21
4b	dto.	30	$0.7 \cdot 10^{-6}$	0.5 +6	dunkel dunkel	<u>2</u>	Retinen gewaschen	$9 \cdot 10^{-15}$	$4.5 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-15}$	$2 \cdot 10^{-3}$
5a	2 Retinen	1	$0.5 \cdot 10^{-3}$ ($\text{H}^3\text{-AS}$)	0.5 +4	dunkel dunkel	22	Retinen gewaschen	$18 \cdot 10^{-12}$	9.0	$13.5 \cdot 10^{-12}$	6.8
5b	2 Augen	1	dto.	0.5 +4	dunkel	22	Retinen isoliert + gewaschen	$9 \cdot 10^{-12}$	4.5	$7.9 \cdot 10^{-12}$	4.0
6	2 Augen	1	dto.	0.5	dunkel	22	Retinen isoliert + gewaschen	$5 \cdot 10^{-12}$	2.5	$7.2 \cdot 10^{-12}$	3.6
7a	4 Augen	3	$0.2 \cdot 10^{-6}$	0.5 +4	dunkel hell	22	Rhabdome isoliert + gewaschen	② $4 \cdot 10^{-12}$	②	② $2.1 \cdot 10^{-12}$	1.1
7b	4 Augen	3	$0.2 \cdot 10^{-6}$	0.5 +4	dunkel hell	<u>2</u>	dto.	$0.8 \cdot 10^{-15}$	$0.4 \cdot 10^{-3}$	$10 \cdot 10^{-15}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$
Nr. 4a bis 7b: nur H^3 -Leucin bzw. H^3 -Aminosäure in der Lösung (keine inak- tive Aminosäure)				*) 30 min Vorperiode + Cycloheximid Hauptperiode + Tracer ① alle 90 min je 5 min hell			*) relative Einheiten $\Rightarrow$ normiert auf den höchst vorkommenden Wert = 100 % ② Rhabdome von 1 Retina				

4 Diskussion

Ultrastrukturänderungen des Rhabdoms und der umgebenden Retinulazellen in Abhängigkeit vom Adaptationszustand

I. Charakterisierung der Partikel auf den Mikrovillusmembranflächen

Die Partikel , die nach dem Gefrierbruch ausschließlich in der plasmatischen Hälfte der Mikrovillusmembran zu finden sind , stellen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit das Photopigment Rhodopsin dar.

Aufgrund von Versuchen (Gefrierätzung bzw. spektralphotometrische Messungen) an Rhabdomen von Fliegen, die mit einer Vitamin A-Mangeldiät aufgezogen worden sind (s. auch Einleitung), finden Schwemer (1979) sowie Boschek und Hamdorf (1976) in der Photorezeptormembran von Calliphora einen Rhodopsinanteil von fast 100% am Gesamtprotein; Larrivee et al. (1979) bei Drosophila einen solchen von 70-80% . Für Astacus ermittelt Hamacher (pers. Mitteilung) dagegen einen Rhodopsinanteil von nur 50% der im Rhabdom vorkommenden Proteine . In diesem Fall würde die tatsächliche Rhodopsindichte auf den Mikrovillusmembranflächen nur die Hälfte der Partikeldichte betragen.

Durch Helladaptation hervorgerufene Ultrastrukturänderungen auf den Mikrovillusmembranflächen des Astacus-Rhabdoms (Änderung der Partikeldichte und -anordnung) sind bislang noch nicht beschrieben worden.

Sowohl in der Partikelanzahl als auch in ihrer Größenverteilung (s. Abb.18) ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen Langzeit-helladaptierten (7000 ± 1400 Partikel μm^{-2} bei statistischer

Verteilung; 11000 ± 1000 Partikel μm^{-2} bei Reihenanordnung) und Langzeit-dunkeladaptierten Retinen (5000 ± 600 Partikel μm^{-2}).

Möglicherweise werden mit der Dauer der Helladaptation zunehmend Rhodopsinmoleküle in die Photorezeptormembrane eingebaut, die sich dann ab einer bestimmten Menge zwangsläufig zu einer dichteren Packung - hier Reihenstruktur- umorientieren würden. Durch Zugabe von Cycloheximid würde die Rhodopsin-neusynthese eventuell so verringert, daß damit auch die Bildung von Partikelreihen ausbleibt (s.u., II).

Während der Dunkeladaptation scheint sich die Partikelanzahl auf den Mikrovillusflächen zu reduzieren und der Anteil an größeren Partikel zuzunehmen.

Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den Angaben von Eguchi und Waterman (1979) über Langzeit-dunkeladaptierte Krebse überein, die innerhalb der ersten Woche einen Anstieg der Partikeldichte von 4000 Partikel μm^{-2} * auf 6000 Partikel μm^{-2} * und nach 1-monatiger Dunkelheit eine Abnahme bis auf 2000 Partikel μm^{-2} aufweisen.

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß einerseits die Auszählung von Partikeldichten - abgesehen von der aus den Reihen ermittelten Dichte- individuellen Fehlern unterworfen ist, zum anderen Unterschiede in der Qualität der Bedampfung und im Ausmaß der Kontamination eine Rolle spielen können, so daß die Werte nicht allein auf den physiologischen Zustand der Photorezeptormembran zurückzuführen sind.

Daß unterschiedliche Werte für die Partikelgröße durchaus methodischer Art sein können, zeigen die Ergebnisse der im UHV gebrochenen Mikrovillusmembranen:

* ohne Angabe der Fehlergrenzen

Hier liegt das Maximum der Partikelgrößenverteilung bei 40-50 Å , wogegen auf den mit der konventionellen Gefrierbruchtechnik erhaltenen Membranflächen die meisten Proteine als Partikel von 70-90 Å Durchmesser erscheinen.

Unter der Annahme , daß Rhodopsin eine globuläre (kugelige) Gestalt hat, kann man aus dem Molekulargewicht (40000 d) eine Rhodopsingröße von 40 Å errechnen (zitiert nach Stieve 1974). Sardet (1975) weist nach, daß Vertebratenrhodopsin in langgestreckter ellipsoider Form vorliegt und das Verhältnis der Achsen 30 Å : 60 Å beträgt.

Hamacher (unveröffentlicht) gibt für Astacus-Rhodopsin ein Molekulargewicht von ca. 35000 d an , ähnlich dem für Vertebraten gefundenen Wert. Somit entspräche die Größe des Astacus-Rhodopsins derjenigen des Vertebratenrhodopsins.

Vermutlich kommen die im Gefrierbruch nachgewiesenen, für Rhodopsinmoleküle relativ zu großen Partikel (70-80 Å) (Boschek und Hamdorf 1976, Fernandez und Nickel 1976, Uebags 1976, Eguchi und Waterman 1978) dadurch zustande, daß Wasserdampf bevorzugt an den erhabenen Strukturen kondensiert (Gross 1978) . Ein Aggregieren der Partikel während des Brechvorgangs bei Temperaturen von - 100 °C bis -150 °C ist weniger wahrscheinlich, da die Partikel auf den im UHV aufgebrochenen Mikrovillusmembranflächen bei wesentlich kleinerem Durchmesser etwa die gleiche Dichte aufweisen.

Mit dem im UHV erhaltenen Partikeldurchmesser ist die Diskrepanz zwischen der theoretisch geforderten Größe für Rhodopsin und den im Gefrierätzbild normalerweise gefundenen Partikelgrößen hinreichend beseitigt.

II. Reihenbildung und Adaptationszustand:

Korrelation zur Metarhodopsinkonzentration und Cycloheximidwirkung

Da die Bildung der Areale mit strukturierter Anordnung der Proteinmoleküle von der Adaptationszeit und der Intensität des Adaptationslichtes abhängt, ist anzunehmen, daß den Molekülumorientierungen licht-induzierte Vorgänge im Photorezeptor zugrunde liegen. Die Partikelumorientierung auf den PF-Flächen der Mikrovilli ist kein methodisches Artefakt; dies kann nach den aus Gefriersprühverfahren und Gefrierbruch im UHV gewonnenen Ergebnissen weitgehend ausgeschlossen werden.

Weil nun - wie bei anderen Evertebraten-Photorezeptoren (Moskito-Larvalauge, White 1967; Limulus-Lateralauge, Behrens 1976) - auch die Photorezeptormembran des Sumpfkrebsses sich vermehrt im Licht abbaut, und dieser Abbau mit einer Membranneusynthese im Gleichgewicht zu stehen scheint, da das Rhabdomvolumen sich nur wenig verändert*, könnte die helicale Anordnung der Partikel mit dem Membranabbau oder / und dem - aufbau korreliert sein. Unter der Voraussetzung, daß der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid auch bei der Astacus-Retina die Neusynthese von Proteinen und damit bis zu einem gewissen Grade auch den Proteineinbau in die Photorezeptormembran hemmt, könnten nach den Helladaptationsergebnissen mit Cycloheximid (s. Tab. 2) die Ultrastrukturänderungen aus folgenden Gründen mit der Neusynthese der Membran in Zusammenhang stehen:

Die Reihenbildung bleibt aus, wenn Cycloheximid zu Beginn der Helladaptation in vitro im Inkubationsmedium zugegen ist. Der Abbau der photosensorischen Membran läuft jedoch weiter, z.B. daran

* Hafner (in Vorbereitung) findet während des diurnalen Rhythmus 6 Std nach Belichtungsbeginn eine Volumenabnahme des Rhabdoms um maximal 25 %.

erkenntlich , daß multivesikuläre Körperchen im Plasma auftreten (s. Abb. 21). Allerdings läßt sich nicht abschätzen , ob dieser Abbau noch im gleichen Umfang wie bei einer Cycloheximid-freien Kontrollretina stattfindet.

Helladaptationsversuche am Moskito-Auge nach Puromycin-Injektion zeigen, daß der Abbau der Rhabdommembran fortschreitet , während die Membranneusynthese verringert ist oder sistiert, so daß es zu einer Volumenabnahme des Rhabdoms kommt (Brammer et al. 1978) .

Da nun Cycloheximid die Reihenbildung , abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe, mehr oder minder zu unterdrücken vermag, der Membranabbau aber nach der hier angewandten Untersuchungsmethode offenbar nicht sehr beeinflusst wird, ist die Annahme berechtigt, daß das Auftreten von geordneten Reihenstrukturen mit dem Proteineinbau korreliert ist.

Die Messungen der Cycloheximidwirkung auf den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Krebsretina (s. Anhang zu den Ergebnissen, 3.1.8) lassen indes keine Schlüsse zu , ob und in welchem Maße Cycloheximid die Proteinsynthese hemmt.

Da die Reihenbildung vollständig unterbunden werden kann , scheint die Hemmung relativ groß zu sein, worauf auch die aus der Literatur entnommenen Daten (s. Anhang zu den Ergebnissen, 3.1.8) hinweisen. Es läßt sich allerdings nicht ausschließen , daß Cycloheximid auch eine andere - unbekannte - Wirkung auf die Astacus-Retina hat, durch die eine Molekülorientierung auf den Mikrovillusmembranflächen verhindert wird.

Es ist empfehlenswert, die Helladaptationsexperimente an Krebsaugen in vitro unter Zusatz von Puromycin, dessen Wirkung auf das Moskitoauge bekannt ist (s.o.), zu wiederholen.

Da eine gewisse Korrelation zwischen der spektralphotometrisch gemessenen Metarhodopsinkonzentration und dem Auftreten von Arealen mit Partikelreihen bei verschiedenen Adaptationszuständen besteht (s.Tab. 3), könnte es sich um Areale von Metarhodopsinmolekülen handeln. Allerdings scheint die jeweils gemessene Metarhodopsinkonzentration (maximal 15 %) relativ zu gering zu sein im Vergleich zu der Arealfläche (ca. 25 % der Gesamtfläche, bei einer Helladaptation von 48 Std mit Raumlicht), die zudem noch eine höhere Packungsdichte der Moleküle als die restliche Membranfläche aufweist.

Die Ursache für die trotz Langzeit-Helladaptation und der z.T. unphysiologisch hohen Lichtintensität relativ geringe Bildung von Metarhodopsin liegt vor allem an der Abschirmung des Photorezeptors durch Pigmente, wie folgende Versuche von Hamacher (unveröffentlicht) zeigen:

Krebse wurden während der Hellphase, in der die Rhabdome durch die Pigmentgranula vom Licht weitgehend abgeschirmt werden, in Eiswasser gesetzt (um die Geschwindigkeit der metabolischen Prozesse zu reduzieren) und 3 Std mit Raumlicht ($70 \mu\text{W cm}^{-2}$) helladaptiert. Die spektroskopischen Untersuchungen ergaben einen Rhodopsinanteil von nicht unter 90%.

Dunkeladaptierte Krebse, deren Rhabdome weitgehend schirmpigmentfrei sind, enthalten nach der gleichen Belichtung in Eiswasser (durch die niedere Temperatur wird die Schirmpigmentwanderung wahrscheinlich unterbunden) jedoch nur noch 25-30% Rhodopsin (wie die belichteten isolierten Rhabdome, s.Kap.3.1.6).

Schwemer (1979) postuliert, daß der Metarhodopsin-gehalt der Photorezeptormembran von Calliphora die Geschwindigkeit des Rhodopsinabbaus bestimmt, der durch eine kontinuierliche Neusynthese wiederum kompensiert werden muß. Von den verschiedenen Möglichkeiten zur

Bildung des Rhodopsins : Neusynthese, Photoisomerisierung bzw. enzymatische Isomerisierung des all-trans Retinals , ist letztgenannte nach Schwemer nicht wahrscheinlich.

Da nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in der in vivo helladaptierten Astacus-Retina nur wenig Metarhodopsin gebildet wird, so müßte, wenn die Rhodopsin-neusynthese von der vorhandenen Metarhodopsinkonzentration abhängt, ebenfalls nur eine geringe Rhodopsin-Neubildung stattfinden und folglich auch der gesamte Turnover der Photorezeptormembranen relativ gering sein.

Diese Annahme kann durch die morphologischen Ergebnisse (Kap.3.1.7) nicht gestützt werden, die bei Helladaptation mit hoher Intensität einen großen Membranturnover* bzw. einen hohen Netto-Abbau der Photorezeptormembran zeigen. Es ist somit fraglich, ob in diesem Fall die Metarhodopsinkonzentration die Neusynthese von Rhodopsin reguliert .

Es bleibt ungeklärt, inwieweit die oben aufgeführten Ergebnisse und Interpretationsmöglichkeiten , die sich aus den Helladaptationsexperimenten ergeben - einmal im Zusammenhang mit Cycloheximid (Unterdrückung der Reihenbildung), zum anderen in Verbindung mit den spektroskopischen Untersuchungen (evtl. Reihenbildung durch erhöhte Metarhodopsinkonzentration) - miteinander vereinbar sind.

* Eine Abschätzung über die Geschwindigkeit des Membranturnovers ist aus den Gefrierätzuntersuchungen nicht möglich .

III. Zum Mechanismus des lichtinduzierten Abbaus der Photorezeptormembran

Der lichtinduzierte Abbau der Photorezeptormembran erfolgt bei Evertibraten in einer Art Phagocytose (über vesikuläre, gemischt-vesikulär-lamellare und lamellare Zustandsformen) (s. Kap. 3.1.7).

Eguchi und Waterman (1976) finden durch Gefrierätzuntersuchungen am Flußkrebsrhabdom auf den Mikrovillusmembranflächen und auf den Vesikelmembranflächen der multivesikulären Körperchen eine gleich hohe Partikeldichte, sowie eine geringere Partikeldichte auf den Lamellen der multilamellaren Körperchen. Sie schließen daraus, daß ein Proteinabbau erfolgt ist.

Die Gefrierbruchuntersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Partikeldichte auf den Vesikelmembranen der multivesikulären Körperchen sehr variiert ($5000-8000$ Partikel μm^{-2} , s. Kap. 3.1.7). Die schwankende Partikeldichte deutet darauf hin, daß der Abbau der in die Vesikelmembranen eingelagerten Proteine schon innerhalb der multivesikulären Körperchen beginnt.

Die multivesikulären Körperchen stellen wahrscheinlich eine Art Sammelbecken für die zum Abbau anstehenden Membranen dar, da sie, im Gegensatz zu den gemischt-vesikulär-lamellaren und lamellaren Körperchen, bei Langzeithelladaptation ihren Durchmesser erheblich (von $1 \mu\text{m}$ bis auf $5 \mu\text{m}$) vergrößern können (s. Abb. 31).

Es ist ungeklärt, wo und wie die äußere Hüllmembran der multivesikulären Körper gebildet wird.

Eguchi und Waterman (1976) nehmen an, daß sie durch Verschmelzen der 'coated' Vesikel miteinander entstehen. Dies ist jedoch weniger wahrscheinlich,

da die Hüllmembran der multivesikulären Körperchen im Vergleich zu den Vesikelmembranen mit wenig Partikeln besetzt ist (Abb. 29). Eventuell wird sie , wie das bei anderen Lysosomen der Fall ist, aus dem Golgi-Komplex gebildet.

Bei Helladaptation mit hohen Intensitäten tritt nach ca. 12 Std ein zusätzlicher Mechanismus des Membranabbaus auf. Neben der Vesikelbildung kommt es nun auch zu einem direkten Aufrollen der Membran an der Basis der Mikrovillusausstülpungen (s. Abb.32). Diese myelinartigen Membrankomplexe sind bei einigen Evertebraten, z.B. Limulus (Behrens und Krebs 1976) , Nauplius-Larve (Fahrenbach 1964) oder Moskito (Brammer und White 1969), nach längerer Belichtung vermehrt zu finden. Sie kommen auch bei der Anwendung von Proteinsynthesehemmstoffen (Cycloheximid, Emetin) in Leberzellen vor (Hwang et al. 1974). Nach Angabe dieser Autoren bilden sich solche Membrankomplexe immer dann, wenn entweder das Lipid : Protein-Verhältnis , die Synthese von Membranuntereinheiten (und damit die Turnover-Rate) oder auch die Funktion der Lysosomen gestört ist.

Die Photorezeptorzelle von Astacus wird also nach längerer Helladaptation mit hohen Intensitäten durch diesen neu einsetzenden Prozess zerstört. Eine Zerstörung der Rhabdomstruktur durch höhere Lichtintensitäten ist auch beim Moskito-Larvalauge (White und Lord 1975) beschrieben.

Bei Adaptation mit Raumlicht ist trotz der unphysiologisch langen Belichtungszeit keine auffällige Änderung der Rhabdomstruktur zu beobachten ; bei diesen Intensitäten kann entweder der Abbau der Photorezeptormembran durch den Aufbau kompensiert werden, oder aber sie wird durch das Schirmpigment hinreichend geschützt.

5 Literaturverzeichnis

- Anderson, R.E., R.M. Benolken, P.A. Kelleher,
M.B. Maude, R.D. Wiegand
Chemistry of photoreceptor membrane preparations
from Squid Retinas.
Biochem.Biophys.Acta 510, 316-326 (1978)
- Behrens, M., W. Krebs
The effect of light-dark adaptation on the ultra-
structure of Limulus lateral eye retinular cells.
J.Comp.Physiol. 107, 77-96 (1976)
- Bennett, J.R., L.L.D. Smithers, C.T. Ward
Inhibition of DNA synthesis in mammalian cells
by actidione.
Biochim.Biophys.Acta 87, 60-69 (1964)
- Bernhards, H.
Der Bau des Komplexauges von Astacus fluviatilis.
Z.wiss.Zool. 116, 649-707 (1916)
- Blest, A.D., K. Powell, L. Kao
Photoreceptor membrane breakdown in the spider
Dinopis GERL differentiation in the receptors.
Cell Tiss.Res. 195, 277-297 (1978)
- Boschek, C.B., K. Hamdorf
Rhodopsin particles in the photoreceptor membrane
of an insect.
Z.Naturforsch. 31c, 763 (1976)
- Brandenburger, J.L., R.M. Eakin, C.T. Reed
Effects of light- and dark-adaption on the photic
mikrovilli and photic vesicles of the pulmonata
snail Helix Aspersa.
Vision Res. 16, 1205-1210 (1976)
- Brammer, J.D., R.H. White
Vitamin a difiency: effect on mosquito eye ultra-
structure.
Science 163, 821-823 (1969)
- Brammer, J.D., P.J. Stein and R.A. Anderson
Effect of light and dark adaptation upon the
rhabdom in the compound eye of the mosquito.
J.Exp.Zool. 206, 151-156 (1978)
- Chamberlain, St.C., R.B. Barlow
Morphological correlates of efferent circadian
activity and light adaptation in the Limulus
lateral eye.
Papers presented at Marine Biological Laboratory (1979)
- Claßen-Linke, I.
Der Einfluß von Calciumionen auf die Erregbar-
barkeit der Astacus-Retina und ihr Konkurrenz-

verhalten zu Alkaliionen
Diplomarbeit an dem Institut für Neurobiologie
KFA-Jülich (1977)

- Cohen, A.I.
Electron microscope observations of form changes
in photoreceptor outer segments and their saccules
in response to osmotic stress.
J.Cell Biol. 48, 547-565 (1971)
- Eakin
Evolution of photoreceptors.
Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.
30, 363-370 (1966)
- Eguchi, E., K.-I. Naka, M. Kuwabara
The development of the rhabdom and the appearance
of the electrical response in the insect eye.
J.General Physiol. 46, 143-157 (1962)
- Eguchi, E.
Rhabdom structure and receptor potentials in single
crayfish retinular cells.
J.Cell Comp.Physiol. 66 (3), 411-430 (1965)
- Eguchi, E., T.H. Waterman
Fine structure patterns in crustacean rhabdoms.
Proc. of the Int. Symp. on the Functional Organi-
zation of the Compound Eye, Stockholm, Oct 1965
Pergamon Press 105-124 (1966)
- Eguchi, E., T.H. Waterman
Changes in retinal fine structure.
Induced in the crab *Libinia* by light and dark
adaption.
Z.Zellforsch. 79 , 209-229 (1966)
- Eguchi, E.
Orthogonal microvillus pattern in the eighth
rhabdomere of the rock crab *Grapsus*.
Z.Zellforsch. 137, 145-157 (1973)
- Eguchi, E., T.H. Waterman
Freeze-etch and histochemical evidence for
cycling in crayfish photoreceptor membranes.
Cell Tiss.Res. 169 (1976)
- Eguchi, E., T.H. Waterman
Longterm dark induced fine structural changes
in crayfish photoreceptor membrane.
J.Comp.Physiol. 1, 191-203 (1979)

- Fahrenbach, W.H.
The fine structure of a nauplius eye.
Z. Zellforsch. 62, 182-197 (1964)
- Fahrenbach, W.H.
The morphology of the eyes of Limulus: I. Cornea
and epidermis of the compound eye.
Z. Zellforsch. 87, 278-291 (1968)
- Fahrenbach, W.H.
The morphology of the eyes of Limulus:
II. Ommatidia of the compound eye.
Z. Zellforsch. 93, 451-483 (1969)
- Fernández, H.R., E. Nickel
Ultrastructural and molecular characteristics of
crayfish. Photoreceptor membranes.
J. Cell Biol. 69, 721-732 (1976)
- Fioravanti, R., M.G.F. Fuortes
Analysis of responses in visual cells of the
leech.
J. Physiol. 227, 173-191 (1972)
- Gross, H.
Gefrierätzung im Ultrahochvakuum (UHV) bei -196° C.
Dissertation an der Eidgenössischen Technischen
Hochschule Zürich.
Diss. ETH 5881 (1978)
- Hafner, G.S., D. Bok
The distribution of ³H-leucine labeled protein in
the retinula cells of the crayfish retina.
J. Comp. Neurol. 174, 3 (1977)
- Hafner, G.S.
Diurnal changes of Lysosome-Related bodies in
crayfish photoreceptor.
In Preparation
- Hagins, W.A.
The visual process: excitatory mechanism in the
primary receptor cells.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1, 131-158 (1972)
- Hamdorf, K., J. Schwemer
Photoregeneration and adaptation process in
insect photoreceptors. In: Photoreceptor Optics
Hrsg. A.W. Snyder und R. Menzel, Springer Berlin
- Harreveld, van, A.
A physiological solution for fresh-water
crustaceans.
Proc. Soc. Exp. Biol. 34, 428-432 (1936)

Hartung, K.

Experimente zum K^+ Transfer durch die Photo-
rezeptormembran des Krebses *Astacus leptodactylus*
im Dunkeln und bei Belichtung.
Eine Studie mit dem Isotop ^{86}Rb .
Interner Bericht der Kernforschungsanlage Jülich,
Institut für Neurobiologie, KFA-INB-IB 3 (1978)

Horridge, G.A., P.B.T. Barnard

Movement of palisade in locust retinula cells
when illuminated.
Quart.J.micr.Sci. 106, 131-135 (1965)

Hwang, K.M., L.C. Yang, C.K. Carrico, R.A. Schulz,

J.B. Schenkman, A.C. Sartorelli
Production of membrane whorls in rat liver by
some inhibitors of protein synthesis.
J.Cell Biol. 62, 20-31 (1974)

Jackson, I.G., G.B. Studzinski

Autoradiographic studies of the effects of
inhibitors of protein synthesis on RNA synthesis
in hela cells.
Exp.Cell Res. 52, 409-418 (1968)

Karnovsky, M.J.

The ultrastructural basis of capillary permeabi-
lity studied with peroxidase as a tracer.
J.Cell Biol. 35, 213 (1967)

Korenbrodt, J.X., R.A. Cone

Dark ionic flux and the effects of light in
isolated red outer segments.
J.Gen.Physiol. 60 (1), 20-45 (1972)

Korenbrodt, J.X., D.T. Brown, R.A. Cone

Membrane characteristics and osmotic behavior
of isolated red outer segments.
J.Cell Biol. 56 (2), 389-398 (1973)

Krebs, W.

The fine structure of the retinula of the compound
eye of *Astacus fluviatilis*.
Z.Zellforsch. 133, 399-414 (1972)

Krebs, W.

Area and volume relationship in the crayfish
retina.
Vision Res. 14, 441-442 (1974)

Larriavee, D.C., R.H. Schinz, S.E. Ostroy, W.L. Pak

Comparison of opsin levels and membrane particle
densities in the rhabdomeric membrane of *drosophila*
photoreceptors.
Arvo Abstract 4, 266-267 (1979)

- Lee, B.K., D. Wilkie
Sensitivity and resistance of yeast strains to
Actidione and Actidione derivatives.
Nature 206, April 3, 90-92 (1965)
- Menzel, R., R. Knaut
Pigment movement during light and chromatic
adaptation in the retinula cells of *Formica*
polyctena (Hymenoptera, Formicidae).
J.Comp.Physiol. 86, 125-138 (1973)
- Obrig, T.G., W.J. Culp, W.L. McKeehan, B. Hardesty
The mechanism by which cycloheximide and related
glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis
on reticulocytes ribosomes.
J. Biol.Chem. 246 (1), 174-181 (1971)
- O'Day, W., R.W. Young
Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes
by visual cells in the goldfish.
J.Cell.Biol. 76, 593-604 (1978)
- Perrelet, A., F. Baumann
Evidence for extracellular space in the rhabdome
of the honeybee drone eye.
J.Cell Biol. 40, 825-830 (1969)
- Perrelet, A.
Protein synthesis in the visual cells of the
honeybee drone as studied with electron
microscope radioautography.
J.Cell Biol. 55, 595-605 (1972)
- Poo, M.M., R. Cone
Lateral diffusion of rhodopsin in the photo-
receptor membrane.
Nature 247c, 428-441 (1974)
- Sardet, C., A. Tardieu
Characterization of rhodopsin detergent complexes.
5th International Biophysics Congress Copenhagen
- Schröder, W., H. Stieve, I. Classen-Linke
Accessibility of extracellular space in the
rhabdome of the living isolated retina of
crayfish.
Z.Naturforsch. 34c, 136-142 (1979)
- Schwemer, J.
Habilitationsschrift an der Universität Bochum.
- Siegel, M.R., H.D. Sisler
Site of action of cycloheximid in cells of
Saccharomyces pastorianus. I effect on the anti-
biotic on cellular metabolism.
Biochim.Biophys. Acta 87, 70-82 (1964a)

- Siegel, M.R., H.D. Sisler
Site on action of cycloheximid in cells of
Saccharomyces pastorianus. II The nature of
inhibition of protein synthesis in a cell-free
system.
Biochim.Biophys.Acta 87, 83-89 (1964b)
- Steinbeck, B.
Extra- und Intrazelluläre Ableitung von Rezeptor-
potentialen aus Schnitten der *Astacus* Retina.
Hausarbeit zur Prüfung für das Lehramt an Höheren
Schulen. Institut für Neurobiologie, KFA-Jülich
- Stieve, H.
Experiments on the ionic mechanism of the
receptor potential of *Limulus* and crayfish photo-
receptor. In: *Biochemistry and physiology of
visual pigments*, Hrsg. H. Langer, Springer Berlin
- Stieve, H.
Zur Biophysik des Sehvorgangs.
Naturwiss. 62, 425-433 (1976)
- Stieve, H.
On the mechanism of conductance control of the
arthropod visual cell membrane.
Biophys.Struct.Mechan. 3, 145-151 (1977)
- Stieve, H.
Vortrag auf dem Symposium: "Primärreaktionen von
Photorezeptoren".
Freiburg, unveröffentlicht
- Thon, F.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an
dünnen Kohlefolien.
Z.Naturforsch. 20a, 154-155 (1965)
- Tran-Thi, T.A.
Nucleotid-pyrophosphatase aus endoplasmatischem
Reticulum und Plasmamembran der Rattenleber.
Dissertation, Albert Ludwig Universität Freiburg
S. 24-25 (1977)
- Tuurala, O., A. Lethinen
Über die Wandlungen in der Feinstruktur der Licht-
sinneszellen bei der Hell- und Dunkeladaptation im
Auge einer Asselart.
*Annales Academiae Scientiarum Fennicae
Biologica* 177 (1967)

Uebags, E.

Ultrastrukturuntersuchungen am Rhabdom des
Sumpfkrebsses (*Astacus leptodactylus*) mit Hilfe
der Gefrierätztechnik.

Dipolomarbeit RWTH Aachen (1976)

Waterman, T.H., H.R. Fernández, T.H. Goldsmith

Dichroism of photosensitive pigment in rhabdoms
of the crayfish orconectes.

J.Gen.Physiol. 54, 415-430 (1969)

White, R.H., C.D. Sundeen

The effect of light and light deprivation upon the
ultrastructure of the larval mosquito eye.

1. Polyribosomes and endoplasmic reticulum.

J.Exp.Zool. 164, 461-478 (1967)

White, R.H.

The effect of light and light deprivation upon the
ultrastructure of the larval mosquito eye.

2. The rhabdom.

J.Exp.Zool. 166, 405-426 (1967)

3. Multivesicular bodies and protein uptake.

J.Exp.Zool. 169, 261-278 (1967)

White, R., E. Lord

Dinintion and enlargement of the mosquito rhabdom
in light and darkness.

J.Gen.Physiol. 65 , 583-598 (1975)

Wilms, M.

Statische und kinetische Untersuchungen an iso-
lierten Rhabdomen des Sumpfkrebsses mit Hilfe von
Mikrospektralphotometern.

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich

Institut für Neurobiologie JÜL - 1401 (1977)

Young, R.W.

Biogenesis and renewal of visual cell outer
segment membranes.

Exp.Eye Res. 18, 215-223 (1974)

