



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Neurobiologie

Simultane Messungen des lichtinduzierten Ionenstroms in Abhängigkeit von der Membranspannung und der intrazellulären Calciumionen-Konzentrationsänderungen nach Injektion von Arsenazo III.

Messungen am Ventralnerv-Photorezeptor von Limulus polyphemus

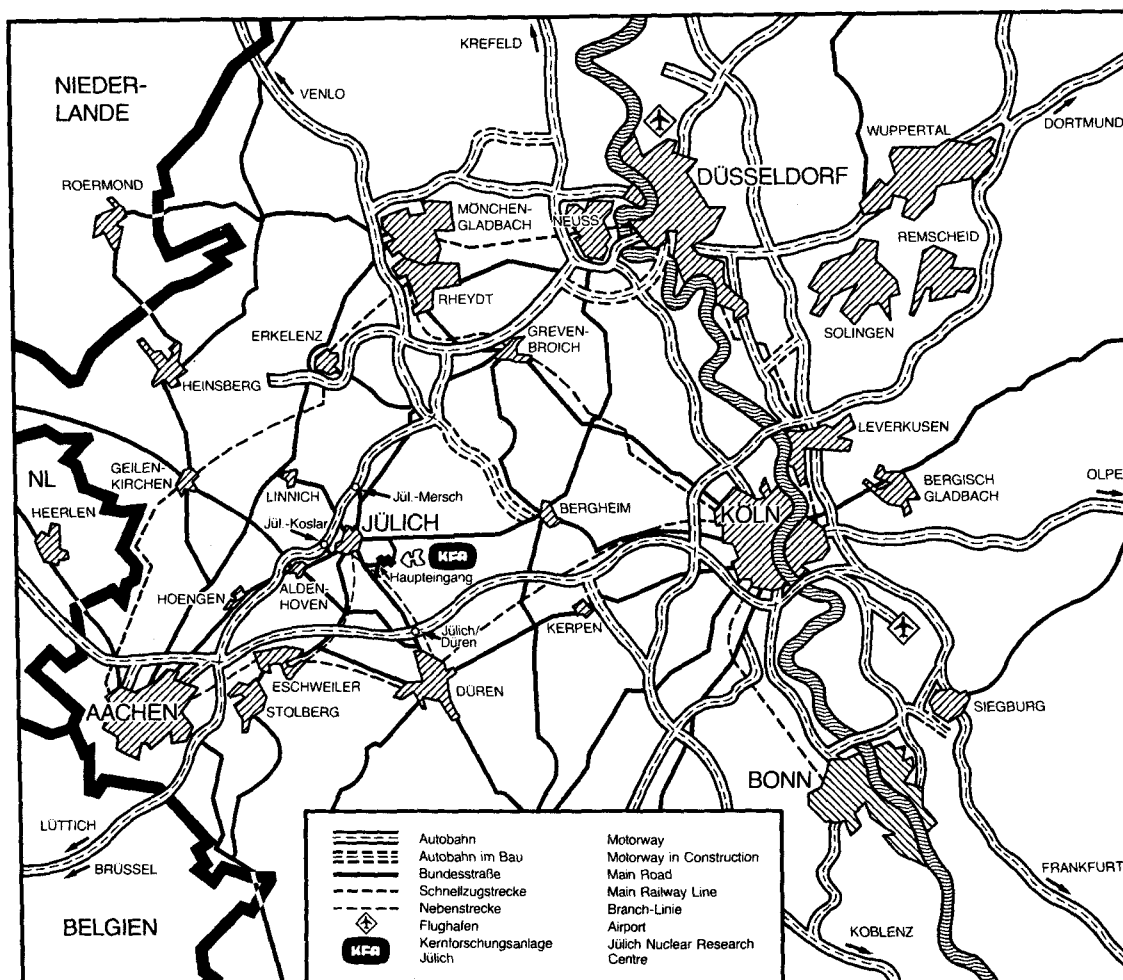
von

I. Ivens

Jül - 1794

Juli 1982

ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1794
 Institut für Neurobiologie Jül - 1794

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556 kfa d

**Simultane Messungen des lichtinduzierten
Ionenstroms in Abhängigkeit von der Mem-
branspannung und der intrazellulären
Calciumionen-Konzentrationsänderungen
nach Injektion von Arsenazo III.
Messungen am Ventralnerv-Photorezeptor
von Limulus polyphemus**

von

I. Ivens

INHALTSVERZEICHNIS:

Summary	
Abkürzungen und Definitionen	I
Kurzfassung	II
Einleitung	VI
1. <u>Material und Methoden</u>	1
1.1 Der Ventralnerv	1
1.2 Prinzip der Messungen	2
1.3 Apparatur	4
1.3.1 Voltage-Clamp	4
1.3.2 Das Photomultipliersignal	4
1.3.3 Signalaufzeichnung	6
1.3.4 Reiz- und Meßlicht	6
1.4 Versuchsgefäß	8
1.5 Konstante Parameter während der Versuche	9
1.5.1 Temperatur	9
1.5.2 Durchströmung	9
1.6 Elektroden	9
1.7 Versuchslösungen	10
1.8 Arsenazo III	10
1.9 Versuchsbeschreibung	13
1.9.1 Versuchsvorbereitung und Injektion	13
1.9.2 Versuchsablauf	13
2. <u>Versuchsergebnisse</u>	17
2.1 Das Arsenazosignal	17
2.1.1 Maximum des Arsenazosignals	17
2.1.2 Anstieg des Arsenazosignals	19
2.1.3 Die Latenzzeit	21
2.1.4 Diskussion	21
2.2 Voltage-Clamp Experimente mit Arsenazo	26
2.2.1 Einführung	26
2.2.2 Versuche in physiologischer Salzlösung	27
2.2.2.1 Maximum des Arsenazosignals (A'_{cl}) und Membranstrom J	27
2.2.2.2 Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A'_{CE}) und Zeit bis das Signal auf A/2 abgesunken ist (t'_2)	30
2.2.2.3 Zeit bei der das Arsenazosignal sein Maximum erreicht (t_{maxA})	33

2.2.3	Versuche mit reduzierter extrazellulärer Calciumionenkonzentration	36
2.2.3.1	Maximum des Arsenazosignals (A'_{Cl}) und Membranstrom J	26
2.2.3.2	Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A'_{CE})	39
2.2.4	Versuche mit erhöhter extrazellulärer Calciumionenkonzentration	39
2.2.4.1	Maximum des Arsenazosignals (A'_{Cl}) und Membranstrom J	41
2.2.4.2	Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A'_{CE})	41
2.2.5	Zusammenfassung	42
2.2.6	Abhängigkeit des Arsenazosignals von Lichtintensität und Reizabstand	44
2.2.7	Änderungen des Gleichlichtpegels I und der Höhe des Arsenazosignals A_{free} mit der Zeit	46
3.	<u>Diskussion</u>	47
4.	<u>Anhang</u>	59
4.1	Spannungsabhängige Ionenkanäle	59
	Literaturverzeichnis	65

SUMMARY

1. Methods

The light induced membrane current of the ventral photoreceptor cell of *Limulus polyphemus* was studied using the voltage clamp technique.

During the experiments transmission changes of the calcium sensitive dye Arsenazo III, which had been injected into the cells, was recorded at 645 nm.

2. Results

The level of free calcium ions in a ventral photoreceptor cell increases in response to light (Brown & Blinks, 1974; Brown et al., 1977).

After injection of Arsenazo III a decrease of the cell transmission at 645 nm (s. Fig. 7) can be seen in response to light both in the unclamped cell and when the membrane is held under voltage clamp. This transmission change is caused by the light induced increase in intracellular free calcium (Brown et al., 1977; Maaz & Stieve, 1980; Nagy & Stieve, 1982).

The voltage clamp experiments show that the light induced transmission changes depend on the membrane voltage of the photoreceptor cell.

I. The height of the Arsenazo signal* decreases with increasing clamp voltage (s. Fig. 11a).

In salines with reduced extracellular calcium (250 $\mu\text{mol/l}$) this effect is more pronounced. In salines with increased extracellular calcium concentration there is almost no change of the Arsenazo signal with the clamp voltage.

This indicates that there is a light induced influx of calcium ions from extracellular space through the cell membrane into the cytoplasm. However the data do not exclude the possibility that part of the calcium ions responsible for the Arsenazo signal is released from intracellular calcium stores (Walz, 1979; Carafoli, 1981).

*Arsenazo signal means the light induced transmission decrease with its 'maximum' ca. 200 ms after a short light flash. The 'maximum' is followed by a slower increase of transmission back to the value before the light flash.

There appears to be a linear decrease of the Arsenazo signal with increasing membrane voltage.

From plots of the clamp voltage versus relative amplitude of the Arsenazo signal a regression line was calculated to obtain the point of intersection with the abscissa by extrapolation. This point should correspond to the calcium reversal potential for the light induced calcium influx if all the calcium enters from the extracellular space.

The extrapolated reversal potential for the Arsenazo signal in physiological saline and in salines with increased calcium concentration are in each case far more positive than the values calculated from the Nernst equation.

In low extracellular calcium (250 $\mu\text{mol/l}$) the extrapolated value and the value calculated from the Nernst equation are nearly the same (+ 98 mV).

It may be that at normal and high extracellular calcium concentrations the behaviour of the cell membrane cannot be described by the Nernst equation.

II. The decline of the Arsenazo signal, i.e. the recovery of the transmission back to the value before the light flash is also influenced by the membrane voltage.

The recovery is faster when the cell is hyperpolarized under voltage clamp ($U_{cl} \leq \text{PMP}$) than it is in unclamped cells. It is slower when the cell is depolarized under clamp (s. Fig. 12).

The influence of the membrane voltage on the decrease of the intracellular free calcium shows that there may be an electrogenic calcium transport across the cell membrane. The direction of the measured effect suggests that at least 3 positive charges must enter per calcium ion transported out of the cell.

III. In voltage clamp experiments without light flashes the cells were clamped to a holding potential of -80 mV. From this holding potential the clamp voltage was increased in steps of +10 mV. After each step the clamp voltage was returned to -80 mV. Some milliseconds after each depolarizing step an inward current could be seen (s. Fig. 23).

Which probably corresponds to an influx of sodium and calcium ions through voltage sensitive ion channels in the photoreceptor cell membrane as first described by O'Day & Lisman (1980; 1981). These channels could be responsible for the regenerative spikes which are seen after periods of the hyperpolarization of the receptor cell membrane (Claßen-Linke, 1981).

Abkürzungen und Definitionen

$[Ca^{2+}]_i$:	intrazelluläre Calciumionen- konzentration
$[Ca^{2+}]_a$:	extrazelluläre Calciumionen- konzentration
Ca^{2+} :	Calciumionen
Voltage-Clamp:	Meßmethode zur Messung eines Membran- stroms bei konstant gehaltener Membran- spannung
U_{cl} :	Spannung auf die die Zellmembran geclamt ist (Clampspannung)
J:	lichtinduzierter Membranstrom
PMP:	Prästimulus-Membran-Potential oder Dunkelpotential des Photorezeptors
Depolarisation:	Erhöhung der Membranspannung aus- gehend vom PMP (die Spannung wird "positiver")
Hyperpolarisation:	Verringerung der Membranspannung aus- gehend vom PMP
Umkehrpotential:	Membranspannung, bei der sich die Richtung des Membranstroms umkehrt
Sensor:	Spannungsmessende Elektrode bei Voltage-Clamp
Driver:	Strominjizierende Elektrode bei Voltage-Clamp

ΔT : Arsenazosignal oder Transmissions-
änderung der Zelle nach einem Licht-
reiz

T: Transmission

I: Gleichlichtpegel vor dem Lichtreiz
(bzw. Lichtintensität des Meßlichts
nach Durchtritt durch die zu
messende Substanz)

PM: Photomultiplier

Abfall des Arsenazosignals: Verringerung der Zelltransmission
hervorgerufen durch die Erhöhung der
 $[Ca^{2+}]_i$

Anstieg des Arsenazosignals: Erhöhung der Zelltransmission
zurück auf den Wert vor dem Licht-
reiz, durch Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$

PS: physiologische Salzlösung

steigende Clampspannung: Die Clampspannung wird während des
Versuchs, beginnend bei den "negativsten"
Clampspannungen (z.B. -80 mV), bei jedem
Lichtreiz zu positiveren Werten verändert

KURZFASSUNG

1. Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde der lichtinduzierte Ioneneinstrom in den Photorezeptor (= Membranstrom) von *Limulus polyphemus* mit Hilfe der Voltage-Clamp Methode gemessen. Gleichzeitig konnten mikrophotometrisch die Transmissionsänderungen eines intrazellulär injizierten Calciumindikators (Arsenazo III) bei 645 nm beobachtet werden.

2. Ergebnisse

Bei Belichtung der Ventralnerv Photorezeptoren von *Limulus* kann eine intrazelluläre Erhöhung der Calciumionenkonzentration während des Rezeptorpotentials festgestellt werden (Brown & Blinks, 1974; Brown et al., 1977). Sowohl bei geclampten Photorezeptorzellen, als auch bei freien Zellen, in die Arsenazo III injiziert wurde, kann eine lichtinduzierte Abnahme der Zelltransmission bei 645 nm beobachtet werden (s. Fig. 7), die durch Bindung von Calciumionen an Arsenazo III hervorgerufen wird (Brown et al., 1977; Maaz & Stieve, 1980; Nagy & Stieve, 1982). Durch Voltage-Clamp Experimente wurde festgestellt, daß die Transmissionsänderung bei Belichtung von der Membranspannung des Photorezeptors abhängt:

I. Die Höhe des sogen. Arsenazosignals* nimmt mit steigender Clampspannung ab (s. Fig. 11a). In einer extrazellulären Salzlösung mit reduzierter Calciumionenkonzentration (250 $\mu\text{mol/l}$) nimmt die Höhe des Arsenazosignals mit steigender Membranspannung schneller ab als in physiologischer Salzlösung (10 mmol/l Ca^{2+}) und in einer Badlösung mit erhöhter Calciumionenkonzentration nimmt die Höhe kaum ab.

Aus beidem, der Abnahme der Höhe der Arsenazosignale mit steigender Membranspannung und ihrer Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumionenkonzentration, kann geschlossen werden, daß bei Belichtung des Photorezeptors Calciumionen aus extrazellulären Räumen durch die Zellmembran in das Zytoplasma einströmen.

* lichtinduzierte Transmissionsabnahme mit einem "Maximum" ca. 200 ms nach einem kurzen Lichtreiz, die gefolgt wird von einer langsameren Zunahme der Transmission zurück auf den Wert vor dem Lichtreiz.

Ob intrazelluläre Calciumspeicher an der lichtinduzierten Erhöhung der Calciumionen beteiligt sind, kann nicht ausgeschlossen werden (s. Walz, 1979; Carafoli, 1981).

Die Abnahme der Höhe mit steigender Membranspannung ist etwa linear. Von Regressionsgeraden wurde der Schnittpunkt* mit der Abszisse (Clampspannung) berechnet. Bei den Versuchen in physiologischer Salzlösung und erhöhter extrazellulärer Calciumionenkonzentration lagen die ermittelten Schnittpunkte weit über dem nach Nernst berechneten Umkehrpotential für Calciumionen (+145 mV bei $[Ca^{2+}]_a = 10^{-2} \text{ mol/l}$ und $[Ca^{2+}]_i = 10^{-7} \text{ mol/l}$).

In einer Badlösung mit erniedrigter extrazellulärer Calciumionenkonzentration (250 $\mu\text{mol/l}$) entsprechen die ermittelten Schnittpunkte der Regressionsgeraden etwa dem nach Nernst berechneten Umkehrpotential für Calciumionen (+98 mV).

II. Die Rückkehr des Arsenazosignals auf den Wert vor dem Lichtreiz (Anstieg der Transmission) ist ebenfalls von der Membranspannung abhängig.

Durch hyperpolarisierende Clampspannungen ($U_{cl} \leq \text{PMP}$) wird der Anstieg des Arsenazosignals beschleunigt, durch depolarisierende Clampspannungen ($U_{cl} \geq \text{PMP}$) verlangsamt (s. Fig. 12). Da der Anstieg des Arsenazosignals also durch die Clampspannung zu beeinflussen ist, wird die Abnahme der durch Belichtung erhöhten intrazellulären Calciumionenkonzentration vermutlich durch einen elektrogenen Calciumtransportmechanismus in der Zellmembran verursacht.

Durch die Richtung der gemessenen Effekte kann geschlossen werden, daß mindestens 3 positive Ladungen pro Calciumion, das nach außen transportiert wird, in die Zelle gelangen.

III. Bei Voltage-Clamp Experimenten ohne Belichtung wurden von einem Haltepotential (-80 mV) aus Clampsprünge zu positiveren Clampspannungen gemacht. Kurz nach einem Spannungssprung konnte ein Einstrom positiver Ionen beobachtet werden (s. Fig. 23)

* Der Schnittpunkt sollte der Membranspannung entsprechen, bei welcher keine Calciumionen bei Belichtung über die Zellmembran einströmen, weil die Richtung der Clampspannung ihrem Gradienten entgegengerichtet ist (= Umkehrpotential für Ca^{2+}).

Vermutlich handelt es sich hier um den von O'Day & Lisman (1980; 1981) beschriebenen Natrium/Calcium-Strom durch spannungsabhängige Ionenkanäle, der möglicherweise auch für die regenerativen "Spikes" nach Hyperpolarisation der Rezeptorzellmembran verantwortlich ist.

EINLEITUNG

Das Sehen beruht - abgesehen von den komplexen Vorgängen im Zentralnervensystem - auf chemisch/physikalischen Prozessen in den Photorezeptorzellen.

Die eigentliche Antenne zur Absorption der Photonen in den Sehzellen der Tiere ist der Sehfärbstoff Rhodopsin. Er setzt sich zusammen aus der Proteinkomponente Opsin, die je nach Species eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung hat, und dem Vitamin-A-Aldehyd Retinal, das bei Absorption eines Photons eine Konformationsänderung von 'cis' nach 'trans' durchläuft. Die Verbindung zwischen dieser Konformationsänderung und der Entstehung des meßbaren elektrischen Signals in der Photorezeptorzelle ist noch nicht genau bekannt.

Die Photorezeptorzellen übertragen die im Licht enthaltene Information auf einen anderen Informationsträger, das Membranpotential. Das dabei entstehende Rezeptorpotential enthält die Information in Form einer Amplitudenmodulation. Am Axonhals oder der Synapse der Sehzellen wird sie meist in eine Frequenzmodulation übertragen und ins Zentralnervensystem weitergeleitet.

Hat das auftreffende Licht eine geeignete Wellenlänge und Intensität, so entsteht an der Membran der Sehzelle ein Rezeptorpotential, das bei vielen Tierarten mit elektrophysiologischen Methoden untersucht wird. Dazu eignen sich besonders die Rezeptorzellen des Ventralnerven von *Limulus polyphemus*, da sie für Microelektroden leicht zugänglich und sehr groß (z.T. 150 µm lang und 50 µm breit) sind.

Wie bei allen Evertebraten entspricht das Rezeptorpotential bei *Limulus* einer Depolarisation der Somaregion des Photorezeptors. Sie entsteht, ähnlich wie Potentiale bei Nervenzellen, durch die Leitfähigkeitsänderungen der Zellmembran für verschiedene Ionenarten.

Im Dunkeln beträgt das Membranpotential des Photorezeptors von *Limulus* (= PMP) -40 bis -60 mV. Die Membran ist relativ permeabel für Kaliumionen (Permeabilität: $10^{-5} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2}$; Millecchia & Mauro, 1969), deren intrazelluläre Konzentration etwa 20fach höher ist als außen (ca. 10 mmol/l). Da die Membranspannung im Dunkeln etwas höher als das elektrochemische Gleichgewichtspotential für Kaliumionen liegt, ist die Membran vermutlich noch

für andere Ionenarten geringfügig permeabel.

Bei Belichtung des Photorezeptors ändert sich die Leitfähigkeit hauptsächlich für Natriumionen, indem sogen. "Lichtkanäle" in der Zellmembran lichtinduziert öffnen. Zusätzlich zu den Lichtkanälen vermutet man noch spannungsabhängige Kalium- und Natrium-Calcium-Ionenkanäle, welche die Depolarisation beim Rezeptorpotential verringern bzw. erhöhen können.

Das Rezeptorpotential des Limulus Photorezeptors ist keine "Alles-oder-Nichts" Antwort auf Belichtung, sondern Höhe, Form und Dauer sind abhängig von der Lichtintensität, dem Adaptationszustand der Zelle und der Dauer des Lichtreizes.

Durch Belichtung wird der Photorezeptor helladaptiert, d.h. seine Empfindlichkeit für Licht wird herabgesetzt und ein kurz nach dem ersten Lichtreiz applizierter zweiter Lichtreiz gleicher Dauer und Intensität wird mit einem kleineren und kürzeren Rezeptorpotential beantwortet.

Nach der Helladaptation setzen Dunkeladaptationsprozesse ein, die verschieden von den Helladaptationsvorgängen sind (Fein & DeVoe, 1973). Bei beiden, Hell- und Dunkeladaptationsprozessen, spielen Calciumionen eine wichtige Rolle im Ventralnerv Photorezeptor. Die Höhe der intrazellulären Calciumionenkonzentration scheint mit dem Helladaptationszustand des Photorezeptors korreliert zu sein, denn durch Erhöhung der extrazellulären Calciumionenkonzentration oder durch Injektion von Calciumionen in den Photorezeptor verändert sich das Rezeptorpotential ähnlich wie bei einer Helladaptation der Zelle (Lisman & Brown, 1972; 1975; Fein & Charlton, 1977; 1977b).

Während der Dunkeladaptation des Ventralnerv Photorezeptors wird die lichtinduziert erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration zuerst schnell, dann langsamer erniedrigt. Vermutlich laufen zwei voneinander verschiedene Prozesse während der Dunkeladaptation ab, von welchen der langsamere relativ unabhängig von der extrazellulären Calciumionenkonzentration ist (Claßen-Linke, 1981).

Der lichtinduzierte Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration des Ventralnerv Photorezeptors wurde bereits von Brown & Blinks (1974) mit Aequorin, einem bei Calciumbindung lumineszierenden Protein, und von Brown et al. (1977) nachgewiesen.

Brown & Blinks führten einige Voltage-Clamp Experimente mit Aequorin durch, die einen Abfall der Luminenszenz mit steigender Membranspannung ergaben. Aequorin bindet Calciumionen jedoch irreversibel, hat eine relativ langsame Kinetik und es bindet mehr als ein Calciumion pro Molekül.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß der Membranspannung auf die lichtinduzierten Änderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration mit dem Calciumindikator Arsenazo III zu untersuchen.

Dazu wurde die Membranspannung der Photorezeptorzellen durch die Methode der Voltage-Clamp variiert, während gleichzeitig die Transmissionsänderungen des intrazellulär injizierten Calciumindikators nach einem Lichtreiz gemessen wurde.

1. MATERIAL UND METHODEN

1.1 Der Ventralnerv

Die Experimente wurden an den primären Photorezeptorzellen des Ventralnerven von *Limulus polyphemus* durchgeführt (Fig. 1). Der Nerv besteht aus dünnen unmyelinisierten Axonen (Durchmesser 5 - 20 μm ; Clark et al., 1969). Eine primäre Rezeptorzelle setzt sich aus Axon und Zellsoma zusammen.* Der größte Teil der Rezeptorzellsomata ist in einem Endknoten am distalen Ende des Nerven angehäuft. Bisher ist nicht geklärt, ob jedes Axon des Nerven zu einer Photorezeptorzelle gehört.

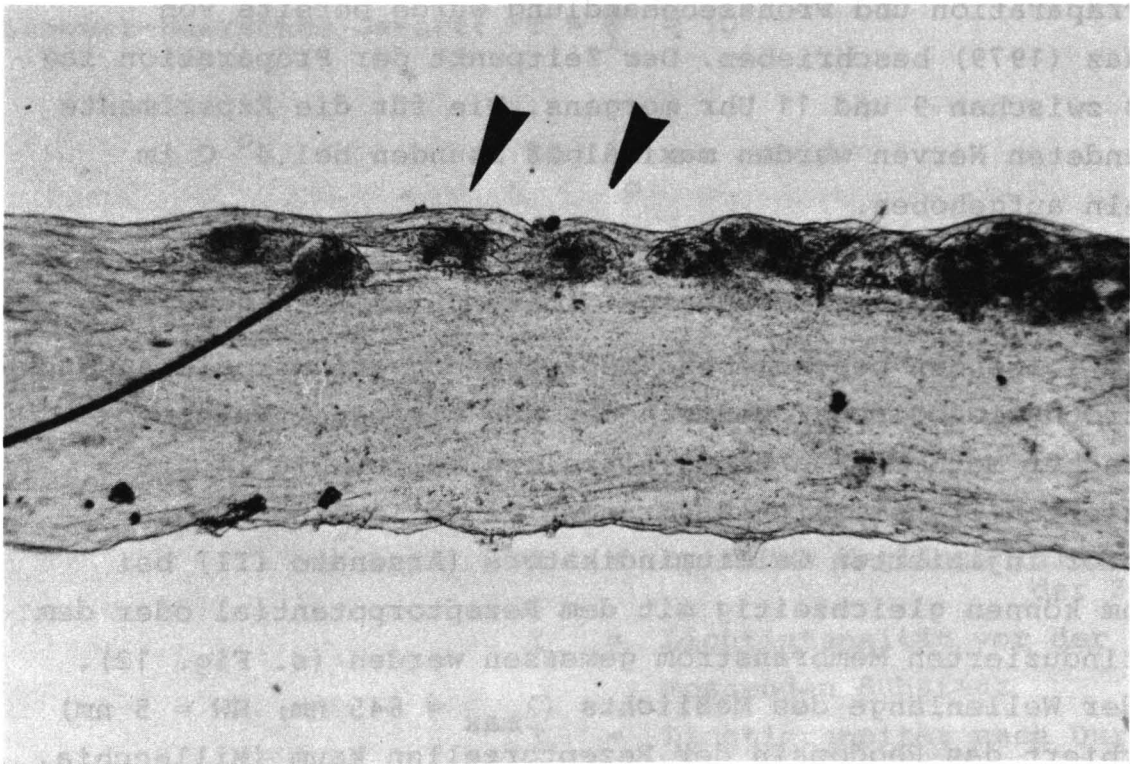


Fig. 1

Ausschnitt des Ventralnerven von *Limulus polyphemus* mit einzelnen Photorezeptorzellen (Pfeile). Die primären Rezeptorzellen liegen angehäuft im Endknoten am distalen Ende und einzeln entlang des Nerven.

*Im folgenden ist mit "Zelle" meistens nur das Zellsoma bezeichnet.

Für die Experimente können nur einzeln liegende Rezeptorzellen verwendet werden (Fig. 1), da zusätzlich zu Membranstrom und Membranspannung die Transmission der Zelle gemessen wird. Das Meßlicht (s. Kap. 1.3.4) darf nicht von anderen Zellsomata oder Axonen in der Umgebung der Rezeptorzelle gestreut werden. Diese Bedingung erfüllen nur Zellen, die einzeln entlang des Nerven liegen.

Für die Messungen wurde der Ventralnerv so im Versuchsgefäß orientiert, daß diese Zellen, die meist nur an einer Seite des Ventralnerven aufgereiht sind, nach oben weisen.

Die Präparation und Pronasebehandlung wurde bereits von G. Maaz (1979) beschrieben. Der Zeitpunkt der Präparation lag stets zwischen 9 und 11 Uhr morgens. Die für die Experimente verwendeten Nerven wurden maximal 28 Stunden bei 4° C im Dunkeln aufgehoben.

1.2 Prinzip der Messungen

Die im folgenden beschriebene Meßanordnung erlaubt die Anwendung elektrophysiologischer Meßmethoden und mikrospektralphotometrischer Methoden an einer einzelnen Zelle. Die lichtinduzierten Transmissionsänderungen eines in einen Photorezeptor injizierten Calciumindikators (Arsenazo III) bei 645 nm können gleichzeitig mit dem Rezeptorpotential oder dem lichtinduzierten Membranstrom gemessen werden (s. Fig. 12). Bei der Wellenlänge des Meßlichts ($\lambda_{\text{max}} = 645 \text{ nm}$; HW = 5 nm) absorbiert das Rhodopsin der Rezeptorzellen kaum (Millecchia, 1969).

Aus den Transmissionsänderungen des Farbstoffes in der Zelle können Rückschlüsse auf die intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen ($[\text{Ca}^{2+}]$) in der Zelle gezogen werden. Dabei wird angestrebt, daß die Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in den linearen Bereich der Calcium-Arsenazobindungskurve fallen (Brown et al., 1977; Maaz, 1979; Miledi & Parker, 1981).

Die Transmissionsänderung (ΔT) des Farbstoffs in der Zelle für Licht der Wellenlänge 645 nm werden mit einem Photomultiplier gemessen und auf Magnetband aufgezeichnet (s. Kap. 1.3.2). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration einer Substanz proportional dem negativen Logarithmus der Transmission. Somit müssen die gemessenen Transmissionswerte logarithmiert werden, um Aussagen über die Konzentration der Substanz zu erhalten. Da die gemessenen Transmissionsänderungen jedoch klein sind (stets kleiner als 2 % des Gleichlichtpegels: $\Delta T/I$) können sie, in guter Näherung, direkt proportional den Konzentrationsänderungen in der Zelle gesetzt werden.

Lambert-Beersches Gesetz: $T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$

$$\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon \cdot c \cdot d$$

für I ungefähr gleich I_0 gilt: $T \sim c$

- T = Transmission
- c = Konzentration
- ϵ = Extinktionskoeffizient
- d = optische Weglänge (hier Dicke der Zelle)
- I_0 = Lichtintensität vor der zu messenden Substanz
- I = Lichtintensität nach Durchtritt des Meßlichts durch die zu messende Substanz.

In den Experimenten können nur relative Calciumkonzentrationsänderungen gemessen werden, da zur Bestimmung der absoluten Calciumionenkonzentrationsänderung verschiedene Faktoren bekannt sein müssen: die injizierte Arsenazomenge, der Extinktionskoeffizient ϵ , die Zelldicke, die Lichtintensität des Meßlichtes vor und hinter der Zelle und die Lichtabsorption der Zelle ohne injiziertes Arsenazo.

1.3 Apparatur

Es wurde die bei G. Maaz (1979) beschriebene Apparatur zur Messung der Transmissionsänderungen von Arsenazo III bei 645 nm in einzelnen Photorezeptorzellen benutzt (Fig. 2a). Zusätzlich zur Apparatur von G. Maaz ist die Messung des Membranstroms unter Voltage-Clamp Bedingungen und die Kühlung der Badlösung möglich. Verändert wurde die Verarbeitung des Photomultipliersignals und die Aufzeichnung von Membranstrom, Membranspannung und Photomultipliersignal. Der Strahlengang des Meßlichts wurde modifiziert.

1.3.1 Voltage-Clamp

Zur Messung des Membranstroms der Rezeptorzelle bei konstanter Membranspannung wurde ein Voltage-Clamp Gerät (Eigenbau INB) mit PID-Regler verwendet (Fig. 2b). Die Membranspannung läßt sich damit zwischen +99 und -99 mV konstant halten. Der dabei auftretende Fehler beträgt maximal 5 % des Sollwertes. Der Regelvorgang vom Einschalten der Clampspannung bis zum Erreichen des Sollwertes dauert ca. 1 ms. Die obere Grenzfrequenz bei der Strommessung war 330 Hz.

1.3.2 Das Photomultipliersignal

Die Transmissionsänderungen der Arsenazo III enthaltenden Rezeptorzelle wurde mit einem Photomultiplier (EMI 9801 B) registriert (Fig. 2a). Der Photomultiplier wurde mit einer Kathodenspannung von 800 V betrieben. Ein Strom-Spannungskonverter wandelt den Anodenstrom entsprechend dem Verhältnis $100 \text{ pA} = 1 \text{ mV}$ in ein Spannungssignal um, das weiter verstärkt wird.

Eine Sekunde vor dem Lichtreiz, der das Rezeptorpotential auslöst, wird der Gleichlichtpegel des Meßlichts (I) für 10 bis 30 s digital gespeichert und angezeigt. Über einen Digital-Analogkonverter (DAC) liegt diese Spannung am negativen Eingang eines Differenzverstärkers (Ortec 4660) an (Fig. 2a). Der positive Eingang des Verstärkers ist direkt mit dem Ausgang des Strom-Spannungskonverters am Photomulti-

Die Transmissionsänderung (ΔT) des Farbstoffs in der Zelle für Licht der Wellenlänge 645 nm werden mit einem Photomultiplier gemessen und auf Magnetband aufgezeichnet (s. Kap. 1.3.2). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration einer Substanz proportional dem negativen Logarithmus der Transmission. Somit müssen die gemessenen Transmissionswerte logarithmiert werden, um Aussagen über die Konzentration der Substanz zu erhalten. Da die gemessenen Transmissionsänderungen jedoch klein sind (stets kleiner als 2 % des Gleichlichtpegels: $\Delta T/I$) können sie, in guter Näherung, direkt proportional den Konzentrationsänderungen in der Zelle gesetzt werden.

Lambert-Beersches Gesetz: $T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$

$$\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon \cdot c \cdot d$$

für I ungefähr gleich I_0 gilt: $T \sim c$

- T = Transmission
- c = Konzentration
- ϵ = Extinktionskoeffizient
- d = optische Weglänge (hier Dicke der Zelle)
- I_0 = Lichtintensität vor der zu messenden Substanz
- I = Lichtintensität nach Durchtritt des Meßlichts durch die zu messende Substanz.

In den Experimenten können nur relative Calciumkonzentrationsänderungen gemessen werden, da zur Bestimmung der absoluten Calciumionenkonzentrationsänderung verschiedene Faktoren bekannt sein müssen: die injizierte Arsenazomenge, der Extinktionskoeffizient ϵ , die Zelldicke, die Lichtintensität des Meßlichtes vor und hinter der Zelle und die Lichtabsorption der Zelle ohne injiziertes Arsenazo.

1.3 Apparatur

Es wurde die bei G. Maaz (1979) beschriebene Apparatur zur Messung der Transmissionsänderungen von Arsenazo III bei 645 nm in einzelnen Photorezeptorzellen benutzt (Fig. 2a). Zusätzlich zur Apparatur von G. Maaz ist die Messung des Membranstroms unter Voltage-Clamp Bedingungen und die Kühlung der Badlösung möglich. Verändert wurde die Verarbeitung des Photomultipliersignals und die Aufzeichnung von Membranstrom, Membranspannung und Photomultipliersignal. Der Strahlengang des Meßlichts wurde modifiziert.

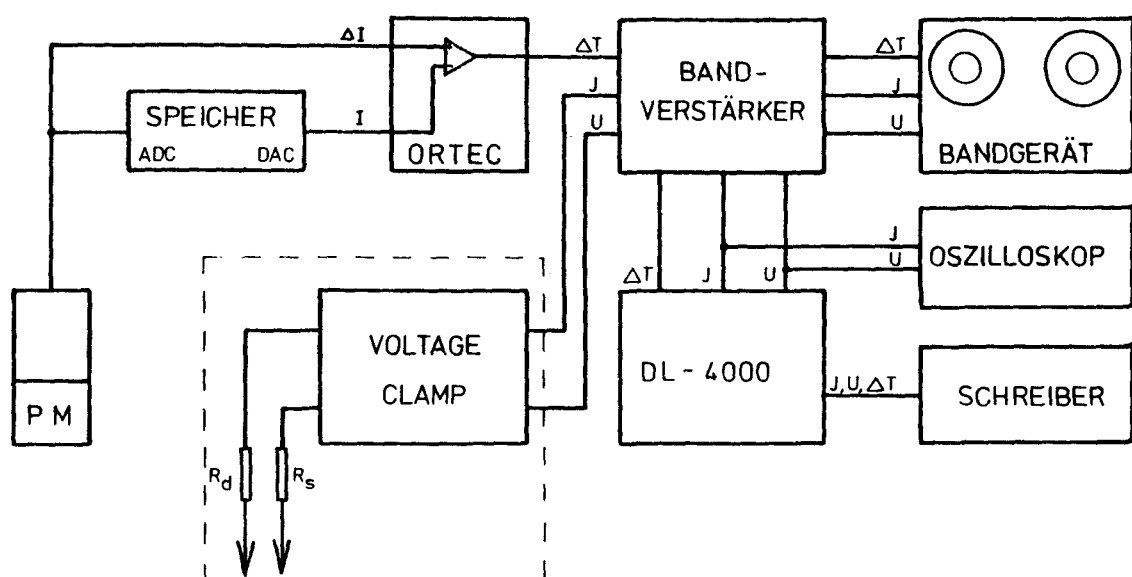
1.3.1 Voltage-Clamp

Zur Messung des Membranstroms der Rezeptorzelle bei konstanter Membranspannung wurde ein Voltage-Clamp Gerät (Eigenbau INB) mit PID-Regler verwendet (Fig. 2b). Die Membranspannung läßt sich damit zwischen +99 und -99 mV konstant halten. Der dabei auftretende Fehler beträgt maximal 5 % des Sollwertes. Der Regelvorgang vom Einschalten der Clampspannung bis zum Erreichen des Sollwertes dauert ca. 1 ms. Die obere Grenzfrequenz bei der Strommessung war 330 Hz.

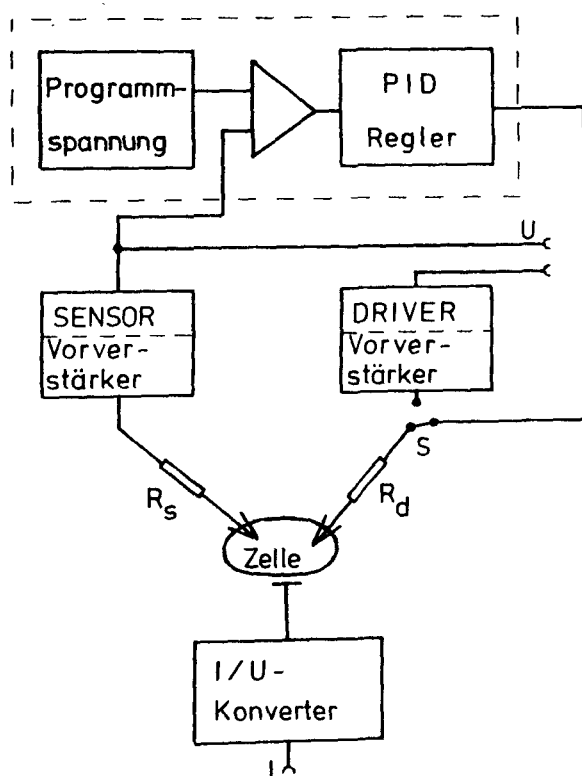
1.3.2 Das Photomultipliersignal

Die Transmissionsänderungen der Arsenazo III enthaltenden Rezeptorzelle wurde mit einem Photomultiplier (EMI 9801 B) registriert (Fig. 2a). Der Photomultiplier wurde mit einer Kathodenspannung von 800 V betrieben. Ein Strom-Spannungskonverter wandelt den Anodenstrom entsprechend dem Verhältnis $100 \text{ pA} = 1 \text{ mV}$ in ein Spannungssignal um, das weiter verstärkt wird.

Eine Sekunde vor dem Lichtreiz, der das Rezeptorpotential auslöst, wird der Gleichlichtpegel des Meßlichts (I) für 10 bis 30 s digital gespeichert und angezeigt. Über einen Digital-Analogkonverter (DAC) liegt diese Spannung am negativen Eingang eines Differenzverstärkers (Ortec 4660) an (Fig. 2a). Der positive Eingang des Verstärkers ist direkt mit dem Ausgang des Strom-Spannungskonverters am Photomulti-



a



b

Fig. 2

Blockschaltbild der Apparatur.

a: Gesamtbild der Apparatur mit Photomultiplier (PM), Voltage Clamp und Aufzeichnungsgeräten.

J = Membranstrom

U = Membranspannung

I = Gleichlichtpegel vor dem Lichtreiz

ΔI = PM - Signal nach dem Lichtreiz

ΔT = Arsenazosignal

b: Blockschaltbild der Voltage Clamp.

R_s = Widerstand des Sensors (Spannungselektrode)

R_d = Widerstand des Drivers (Stromelektrode)

S = Schalter

Ist der Vorverstärker des Drivers mit der Drivelektrode verbunden, wird mit beiden Elektroden die Membranspannung gemessen. Die zweite Stellung des Schalters erlaubt die Messung des Membranstroms über den J/U - Konverter.

plier verbunden. Das so erhaltene und 500fach verstärkte Arsenazosignal wird im folgenden mit ΔT -Signal oder Arsenazosignal bezeichnet.

1.3.3 Signalaufzeichnung

Die Transmissionsänderung der Zelle (ΔT) wird mit dem gleichzeitig gemessenen Membranstromsignal und dem Membranspannungssignal auf je einen Kanal eines Philips-Analogbandgerätes (Philips ANA-LOG 7) aufgezeichnet (Fig. 2a). Das Gerät hat eine Wiedergabegenauigkeit von 2 % bei Vollaussteuerung.

Die Signale können während des Versuchs auf einem Oscilloscop verfolgt werden. Nach dem Experiment werden die Signale vom Bandgerät auf einen Mittelwertrechner (DL 4000) überspielt und dort weiterverarbeitet (z.B. Mittelung). Mit einem XY-Schreiber können diese Kurven dann ausgeschrieben werden. Alle Signale wurden beim Überspielen auf den Mittelwertrechner gefiltert (obere Grenzfrequenz ca. 250 Hz: Filter Bessel Charakteristik). Die Signale werden nicht beeinflusst, da Arsenazosignal, Rezeptorpotential und Membranstrom keine steilen Anstiege haben (Anstiegszeit > 10 ms).

1.3.4 Reiz- und Meßlicht

Als Reizlichtquelle wurde die von G. Maaz (1979) beschriebene Quecksilber-Höchstdrucklampe verwendet. Die Reizlichtintensität an der Stelle des Nerven beträgt ca. $1,1 \text{ mW/cm}^2$. Der Lichtblitz dauerte 10 ms.

Die als Meßlichtquelle installierte Hallogen-Ellipsoid-Reflektorlampe (s. Maaz, 1979) wurde mit einer Spannung zwischen 9 und 12 V betrieben. In den Strahlengang wurde zwischen Lichtleiter und Objektiv eine Irisblende zur Reduzierung des Meßlichtdurchmessers eingefügt (s. Fig. 3). Der Durchmesser des Meßlichtstrahls in der Zelle konnte dadurch zwischen 30 und 200 μm variiert werden. Die Intensität des Meßlichts ($\lambda = 645 \text{ nm}$) an der Stelle der Rezeptorzelle liegt zwischen 0.1 und 0.01 μWatt . Zwischen Objektiv und Versuchsgefäß befindet sich eine Lochblende (Apertur) um die durch Beugung an der Irisblende entstandenen

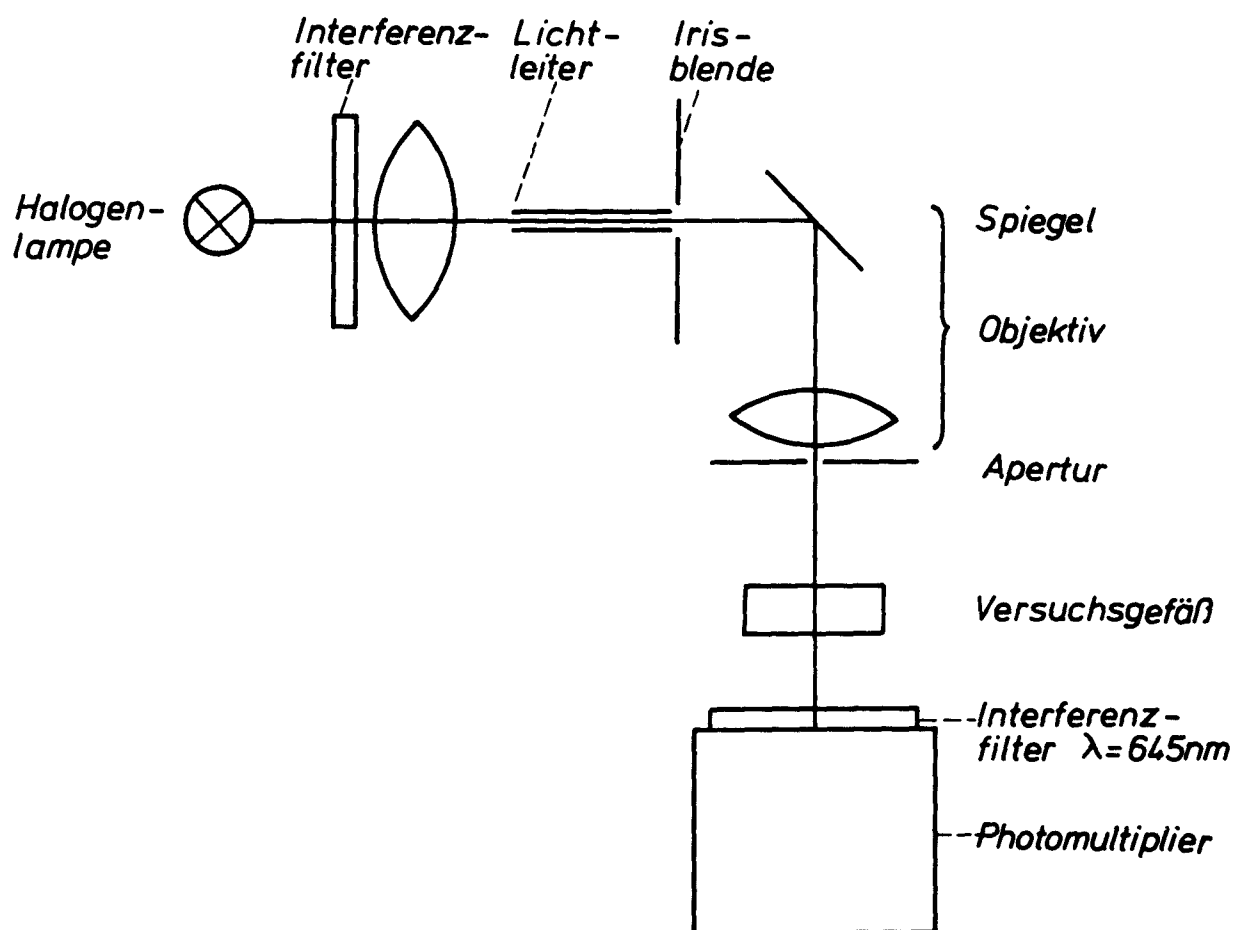


Fig. 3
Meßlichtstrahlengang

Nebenmaxima auszuschalten. Das Objektiv kann sowohl horizontal als auch vertikal mit Mikrometerschrauben bewegt werden. Dadurch ist es möglich, nach Einstich der Mikroelektroden in die Zelle die Position des Meßlichts zu verändern. Bei den Experimenten wurde der Durchmesser des Meßlichts so eingestellt, daß die ganze Zelle ausgeleuchtet ist.

Das Meßlicht beeinflusst das Dunkelpotential (PMP) des Photorezeptors kaum. In einigen Versuchen war bei Einschalten des Meßlichts eine maximale Depolarisation von 2 mV zu beobachten.

1.4 Versuchsgefäß

Das Versuchsgefäß besteht aus einer 0,5 cm breiten, 1 cm tiefen und 5 cm langen Glasküvette. An einem Ende fließt die Salzlösung durch ein Loch in der Seitenwand zu. Am anderen Ende wird sie über eine VA-Kanüle nach oben abgesaugt. Der Ventralnerv wird auf einem durchsichtigen Sylgardstreifen* (ca. 3 mm hoch), der auf dem Boden des Versuchsgefäßes aufliegt, mit Stahlnadeln befestigt.

Die Gegenelektrode für die elektrophysiologischen Messungen (Masse oder "virtuel ground") ist eine gesinterte Ag/AgCl-Elektrode (WP-Instruments). Sie liegt in einer 0.5 molaren KCl-Lösung in einer Plexiglaskammer. Von dort aus reicht eine KCl-Agar Brücke in die Lösung des Versuchsgefäßes.

Die Sinterung des Ag/AgCl und die KCl-Agar Brücke sollen Elektrodenpolarisationen, besonders bei Lösungswechsel, verhindern.

Die Gegenelektrode wird vor dem Versuch fest an das Versuchsgefäß montiert.

*(Sylgard curing agent 182, Dow corning corp.)

1.5 Konstante Parameter während der Versuche

1.5.1 Temperatur

Die Temperatur der durch das Versuchsgefäß fließenden Salzlösung wird während des Experiments konstant gehalten ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Die Lösung fließt durch die Kühlschlange unterhalb eines Peltierelements, deren Temperatur von einem Regler kontrolliert wird.

Von Versuch zu Versuch variierte die Temperatur zwischen 16 und 20°C .

1.5.2 Durchströmung

In allen Versuchen floß die Salzlösung mit einer Geschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute durch das Versuchsgefäß. Es enthält ca. 2 ml Lösung. Nach einem Lösungswechsel war der Austausch der Salzlösung im Versuchsgefäß nach ca. 4 Minuten beendet.

1.6 Elektroden

Für die Mikroelektroden wurden Theta-Borsilikatglasrohre (Durchmesser 1.6 mm *) erhitzt und so ausgezogen, daß ihr Widerstand zwischen 10 und 20 MOhm lag.

Die Glasspitzen von "Sensor" (Spannungselektrode) und "Driver" (Stromelektrode) wurden mit einer $0.5\text{ molaren KCl-Lösung}$ gefüllt. In der Salzlösung der Driverspitze befand sich zusätzlich noch $20\text{ mmol/l Arsenazo III}$.

*Hilgenberg, Malsfeld, A.Nr. 1401006

1.7 Versuchslösungen

Für die Experimente wurden folgende Salzlösungen verwendet.

Angaben in mmol/l

NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	NaOH	Hepes	Saccharose	
480.8	10	10	25	30	5	10	-	PS (1.166 osmol)
495.4	10	0,25	25	30	5	10	-	250 μ molar Ca ²⁺ (1,166 osmol)
495.4	10	1,7	25	30	5	10	-	1.7 m molar Ca ²⁺ (1,1809 osmol)
435.	10	10	25	30	5	10	270	PS für 100 m molar Ca ²⁺ (1,355 osmol)
435.	10	100	25	30	5	10	-	100 m molar Ca ²⁺ (1,355 osmol)
480.8	10	10	25	30	5	10	90	PS für 40 m molar Ca ²⁺ 1,267 osmol
480.8	10	40	25	30	5	10	-	40 m molar Ca ²⁺ (1,267 osmol)
480.8	10	10	25	30	5	10	-	PS für 50 m molar Ca ²⁺ (1,177 osmol)
480.8	10	50	25	30	5	10	-	50 m molar Ca ²⁺ (1,205 osmol)

Tab. 1

PS = physiologische Salzlösung

250 μ molar Ca²⁺ und 1,7 mmolar Ca²⁺ = erniedrigte [Ca²⁺]_a

40, 50 und 100 mmolar Ca²⁺ = erhöhte [Ca²⁺]_a

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7.5 eingestellt. Die Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen entspricht der bei I. Claßen-Linke (1981) beschriebenen.

1.8 Arsenazo III

Arsenazo III ist ein wasserlöslicher metallochromer Indikator für viele zweiwertige Ionen.

Arsenazo ist wegen seiner hohen Affinität für Calciumionen (Ca²⁺) (nahezu zwei Größenordnungen höher als die für Mg²⁺;

Chiv & Haynes, 1980), besonders für Messungen an biologischen Systemen mit schnellen intrazellulären Calciumkonzentrations-

änderungen geeignet.

Der apparente pk-Wert des Ca^{2+} -Arsenazokomplexes ist abhängig von der jeweiligen Ionenstärke der Lösung (Bauer, 1981). Er liegt bei 4,28 in Anwesenheit von KCl und MgCl_2 (Kendrick et al., 1977) bzw. 4.54 (Bauer, 1981). D.h. bei einer intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+}_i) von 0.1 μmolar und einer Arsenazokonzentration von 0.1 mmolar in Anwesenheit anderer Ionen liegt ca. 60 % des Calciums in Form des Ca^{2+} -Arsenazokomplexes vor. 40 % liegen noch frei vor; sofern nicht andere Ca^{2+} -bindende Systeme, wie Proteine oder Zellorganelle mit Arsenazo um Calciumionen konkurrieren (G. Maaz, 1979; Walz, 1979).

Die meisten Autoren (Savvini, 1961; Michaylova & Illkova, 1971; Kendrick et al., 1976, 1977; Scarpa et al., 1978; Chiu & Haynes, 1980; Bauer, 1981) nehmen eine Stoichiometrie des Ca^{2+} -Arsenazokomplex von 1 : 1 an. Nur Thomas & Gorman, 1978; Thomas, 1979; und Dorogi & Neumann, 1981 erwägen einen Ca^{2+} -Arsenazokomplex von 1 : 2 bei höheren Arsenazokonzentrationen (ca. 2 mmol/l).

Die Relaxationszeit des Ca^{2+} -Arsenazokomplexes liegt bei etwa 2.8 ms (Scarpa et al., 1978). Brown et al., 1977 schätzen ab, daß die Halbwertszeit der Bindung von Arsenazo mit Ca^{2+} 10 mal schneller als die von Aequorin (ca. 6 ms in vitro) sei.

Bei der Bindung von Ca^{2+} verändert sich das Absorptionsspektrum von Arsenazo besonders stark bei langen Wellenlängen ($\lambda = 652 \text{ nm}$; $\Delta\epsilon_{625} = 28\,000 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$, pH 7.5; Bauer, 1981).

Statt eines breiten Maximums bei 550 nm (freies Arsenazo III) hat der Ca^{2+} -Arsenazokomplex zwei Maxima bei 600 und 650 nm (Fig. 4). Bei etwa 580 nm zeigt das Absorptionsspektrum von Arsenazo bei Zugabe von Ca^{2+} keine Veränderungen.

Chiu & Haynes (1980) geben an, daß bei einer Arsenazokonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ noch eine Calciummenge von 0.08 bis 0.4 $\mu\text{mol/l}$ (Abhängig von der Empfindlichkeit des Gerätes) festgestellt werden kann. Bei höheren Arsenazokonzentrationen (10^{-4} bis 10^{-3} mol/l), wie sie bei der Messung an Axonen oder

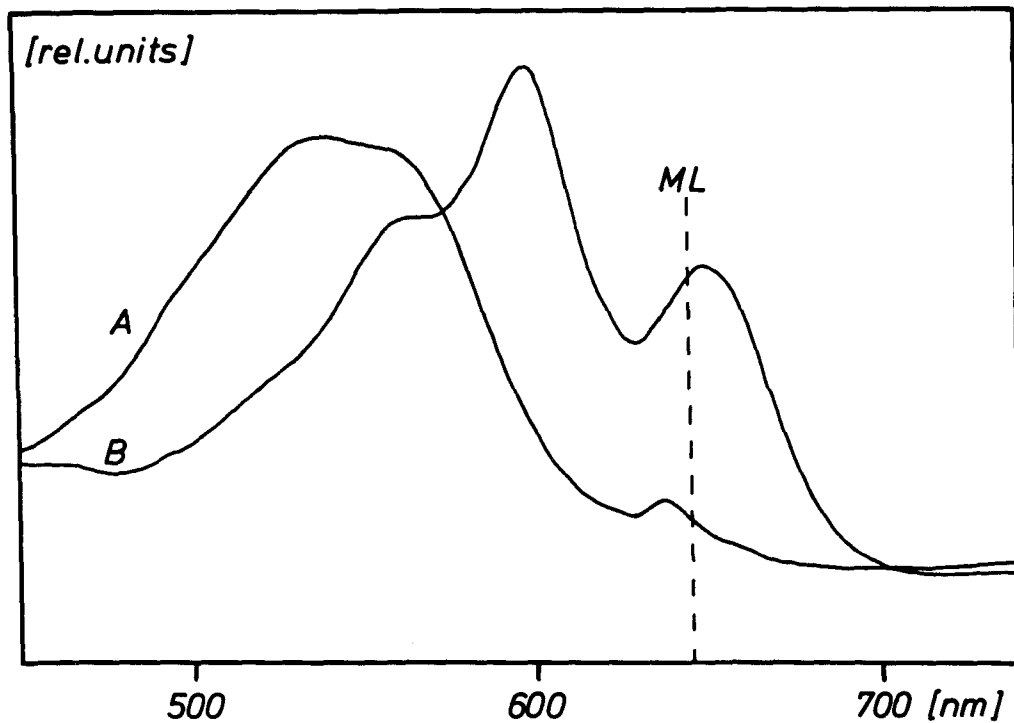


Fig. 4

- A: Absorptionsspektrum des in den Versuchen verwendeten Arsenazos nach der Reinigung (Methode nach Kendrick 1976, modifiziert von Bauer 1980), gelöst in 0.5 molarer KCl, pH 7.0. Die kleine Schulter bei ca. 640 nm bedeutet, daß das gereinigte Arsenazo geringe Mengen von Calciumionen enthält. Bei der Reinigung kommt es jedoch hauptsächlich darauf an, von Arsenazo (Fluka AG) andere, ebenfalls farbige Verunreinigungen abzutrennen.
- B: Spektrum einer mit Calciumionen gesättigten Arsenazolösung.
ML: Meßlichtwellenlänge

Muskeln verwendet werden, sollen noch geringere Mengen registriert werden können (Chiu & Haynes, 1980).

1.9 Versuchsbeschreibung

1.9.1 Versuchsvorbereitungen und Injektion

Um die Membranspannung konstant halten zu können, werden zwei Mikroelektroden in die Photorezeptorzelle eingestochen. Mit beiden wird zuerst das Rezeptorpotential über die Zellmembran gegen die äußere Elektrode gemessen. So kann kontrolliert werden, ob sich beide Mikroelektroden in der selben Zelle befinden.

In Abständen von einer Minute werden nun mit einem 10 ms langen Lichtblitz Rezeptorpotentiale ausgelöst. Für die Messung des lichtinduzierten Membranstromsignals wird der Driver in den Rückkopplungskreis der Voltage-Clamp eingeschaltet (Fig. 2b). Nach dem Einstich der Mikroelektroden und dem Testen der Zelle wird das Meßlicht auf die Zelle justiert. Der Durchmesser des Meßlichtstrahls wird so lange variiert, bis ein möglichst großer Teil der Zelle ausgeleuchtet ist. Nun wird kurz (ca. 1 s) ein Druck von 2-4 bar (je nach Elektrodenwiderstand) auf die Arsenazolösung in der Stromelektrode gegeben, um Arsenazo in die Zelle zu injizieren. 30 Minuten nach der Injektion kann der eigentliche Versuch begonnen werden, da sich das Arsenazo erst nach einiger Zeit homogen in der Zelle zu verteilen scheint.

1.9.2 Versuchsablauf

Die Rezeptorzelle wird jede Minute bei konstantem Meßlicht mit einem 10 ms langen Lichtblitz voller Intensität gereizt (Fig. 5). Jede zweite Minute wird die Zellmembran, beginnend 2 s vor dem Lichtblitz, für 9 s auf eine vorgegebene Spannung geclampt. Zwischen den Clampphasen wird jede zweite Minute das Rezeptorpotential gemessen um eine Aussage über den Zustand der Zelle zu erhalten. Außerdem kann die Zelle sich so von schädigenden Clampspannungen (z. B. Spannungen $> +20$ mV) erholen. Das Arsenazosignal wird sowohl bei der Strom- als auch bei der Rezeptorpotentialmessung registriert. Beginnend mit hyper-

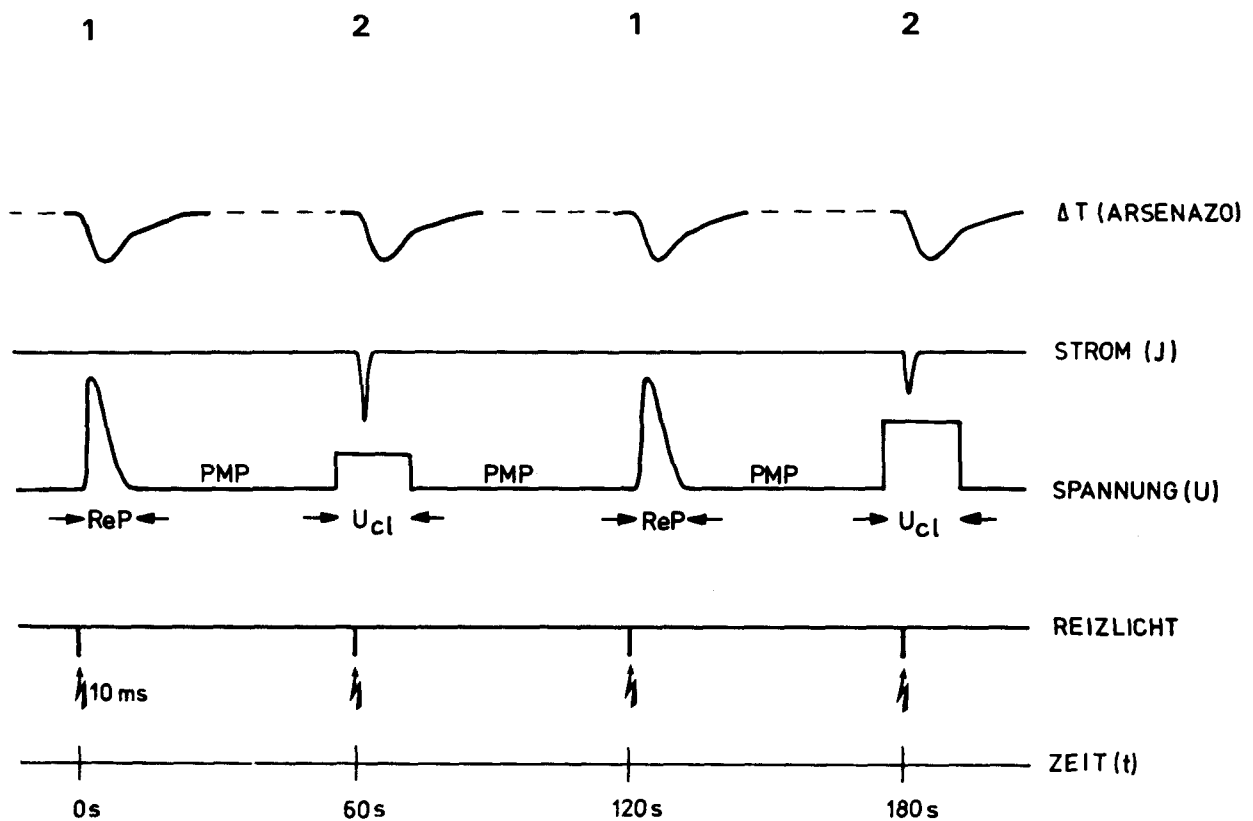


Fig. 5

Schema des Versuchsablaufs.

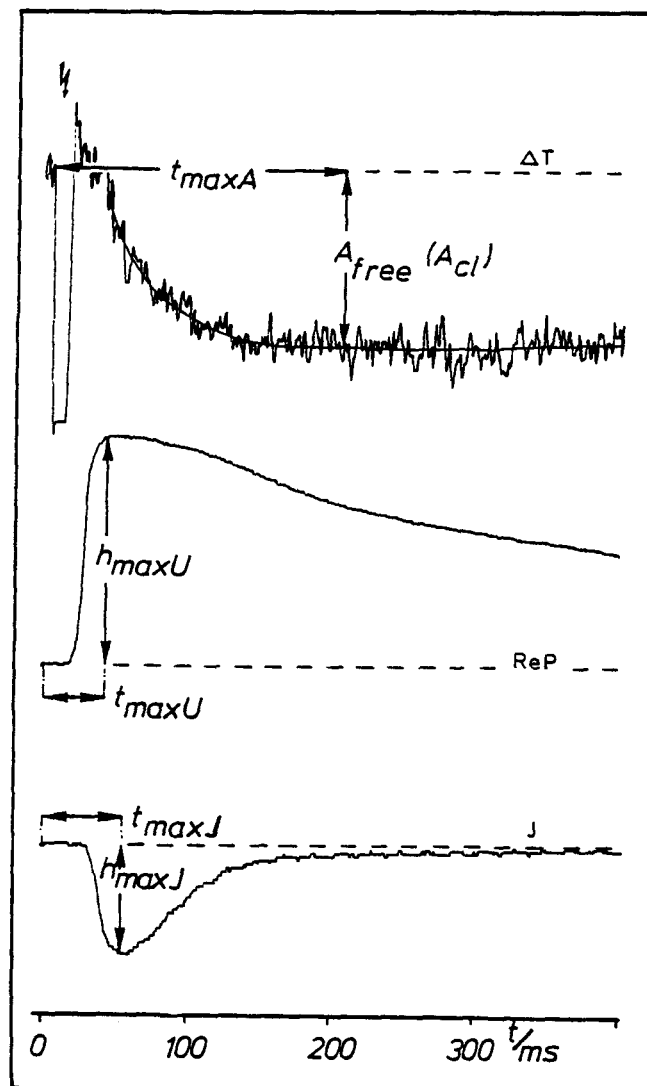
Jeweils nach 60 s wird ein 10 ms langer Lichtreiz ausgelöst. In Abständen von 180 s wird der lichtinduzierte Zusatzstrom J der Zellmembran gleichzeitig mit dem Arsenazosignal ΔT gemessen (2). Zwischen den Clampphasen wird das Rezeptorpotential ReP gleichzeitig mit dem Arsenazosignal gemessen (1).

U_{cl} = Clampspannung, die wie das Rezeptorpotential vom Sensor gemessen wird.

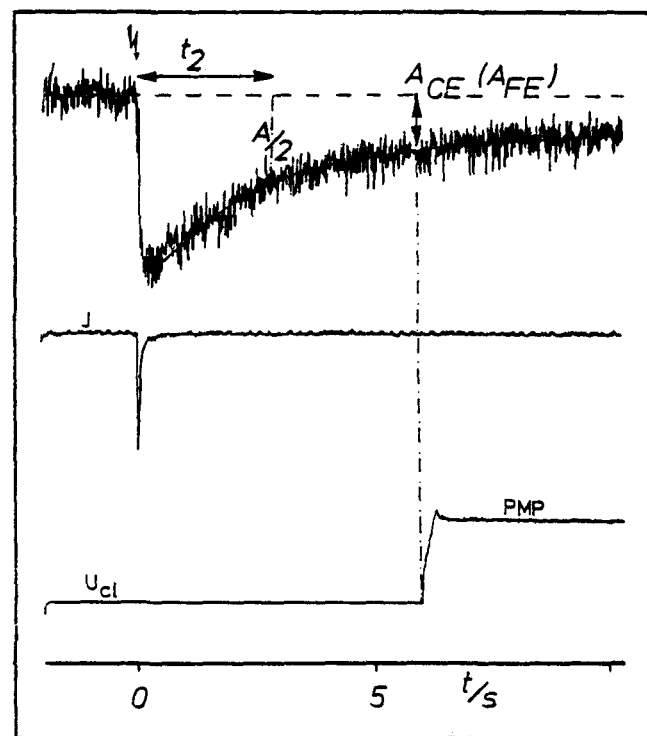
PMP = Prästimulus-Membran-Potential oder Membranspannung im Dunkeln

Fig.6

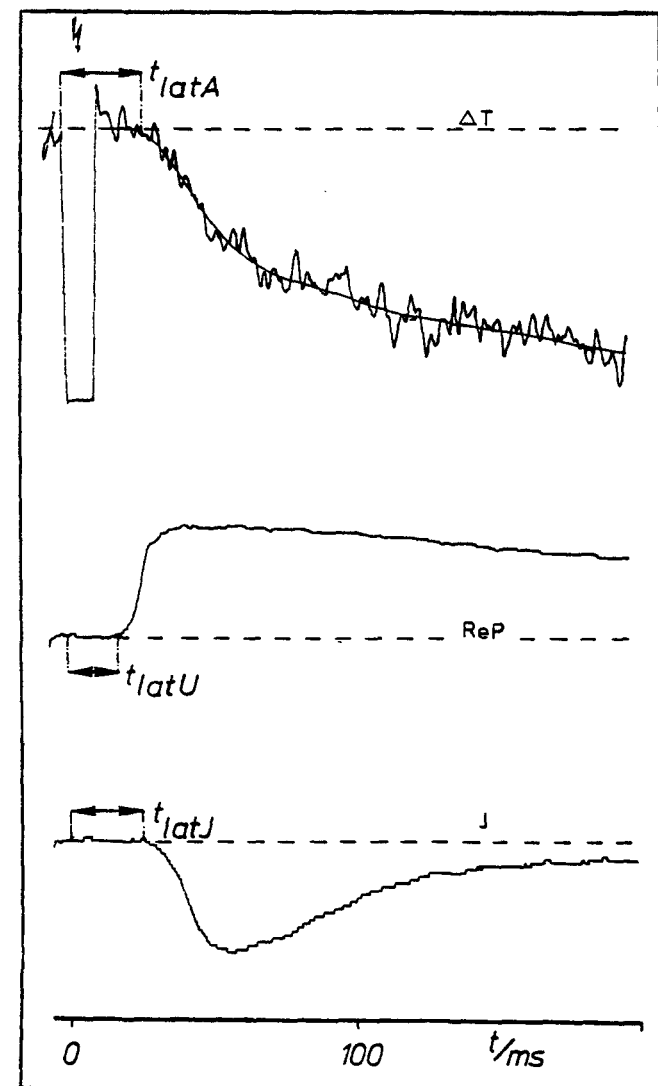
a



b



c



polarisierenden Clampspannungen (z. B. -80 mV) wird die Spannung in Schritten von 10 mV erhöht bis +20 oder +30 mV erreicht sind.

Bei den Versuchen mit Arsenazo wird jede Clampspannung ein zweites Mal wiederholt, um später bei der Auswertung die beiden Arsenazosignale mitteln zu können. Dadurch wird das Signal-Rauschverhältnis verbessert und das Auswerten der Signale erleichtert.

Nachdem der erste Clampzyklus in physiologischer Salzlösung (PS) beendet ist, wird die Badlösung gewechselt um den Einfluß veränderter Calciumaußenkonzentrationen $[Ca^{2+}]_a$ zu untersuchen.

Da die Zelle nach dem Lösungswechsel erfahrungsgemäß einige Zeit benötigt, bis die Höhe der Reizantwort wieder konstant ist, wird erst nach 30 Minuten mit dem zweiten Clampzyklus begonnen. Sein Ablauf ist der gleiche wie der erste.

Die Experimente dauerten zwischen 2 und 4 Stunden.

Fig. 6

Darstellung der ausgewerteten Parameter von Membranstrom J, Rezeptorpotential ReP und Arsenazosignal ΔT .

- a: Arsenazosignal ΔT : $t_{\max A}$ Zeit vom Beginn des Lichtreizes $\downarrow$ bis zum Maximum des Arsenazosignals.
- A_{free} Höhe des Maximums des ungeclampten Arsenazosignals
- A_{cl} Höhe des Maximums des Arsenazosignals bei Voltage Clamp.
- Rezeptorpotential ReP: $t_{\max U}$ Zeit vom Beginn des Lichtreizes bis zum Maximum des Rezeptorpotentials
- $h_{\max U}$ Maximum des Rezeptorpotentials
- Membranstrom J: $t_{\max J}$ Zeit vom Beginn des Lichtreizes bis zum Maximum des Stroms. (Die Abnahme des Stroms bedeutet einen Einstrom positiver Ionen.)
- $h_{\max J}$ Maximum des Membranstroms $\approx J$
- b: Arsenazosignal ΔT : $A/2$ Halbe maximale Amplitude des Arsenazosignals
- t_2 Zeit, bis das Arsenazosignal wieder auf $A/2$ angestiegen ist.
- A_{CE} Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (6 s nach dem Lichtblitz)
- A_{FE} Höhe des ungeclampten Arsenazosignals 6 s nach dem Lichtreiz.
- Membranspannung U_{cl} : Spannung, auf die die Zellmembran geclamt wird.
- PMP : Prästimulusmembranpotential, auf das die Zelle nach Clampende (gestrichelte Linie) wieder zurückkehrt.
- c: Arsenazosignal ΔT : $t_{\text{lat} A}$ Latenzzeit des Arsenazosignals vom Beginn des Lichtreizes bis zum Beginn der Transmissionsänderung.
- Rezeptorpotential ReP: $t_{\text{lat} U}$ Latenzzeit des Rezeptorpotentials
- Membranstrom J: $t_{\text{lat} J}$ Latenzzeit des Membranstroms

2. VERSUCHSERGEBNISSE

2.1 Das Arsenazosignal

Nach einem starken Lichtreiz verringert sich die Transmission des mit Arsenazo injizierten Photorezeptors. Das dabei gemessene Arsenazosignal (ΔT) ist in Fig. 6 mit den ausgewerteten Parametern dargestellt.

Ausgemessen wurden nur die Transmissionsänderungen. Der mit A_{free} (A_{cl}) bezeichnete Wert entspricht der maximalen Transmissionsabnahme. Mit "Abfall" des Arsenazosignals wird die Transmissionsabnahme von Lichtblitz bis zum "Maximum" und mit "Anstieg" die darauf folgende Transmissionszunahme zurück auf den Gleichlichtpegel vor dem Lichtreiz (I), bezeichnet. Zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses wurden nach dem Experiment zwei unter den gleichen Bedingungen induzierte Arsenazosignale gemittelt. Durch n Mittelungen verbessert sich das Signal-Rauschverhältnis um $\sqrt{n}$ (s. Fig. 7).

2.1.1 Maximum des Arsenazosignals

Rezeptorpotential und lichtinduzierter Membranstrom sind bei der Injektion größerer Mengen Arsenazolösung verbreitert (Fig. 8).

t_{maxA}^* (Zeit vom Beginn des Lichtblitzes bis zum Maximum des Arsenazosignals) hängt von der intrazellulären Arsenazokonzentration ab (Brown et al., 1977; Maaz, 1979; Stieve & Nagy, 1982). Enthält die Zelle viel Arsenazo, so ist t_{maxA} viel länger als t_{maxU}^* (Zeit vom Beginn des Lichtblitzes bis zum Maximum des Rezeptorpotentials). Bei den Experimenten wurde daher angestrebt, eine möglichst geringe Menge Arsenazo zu injizieren.

Ist nur so viel Arsenazo in der Zelle, daß das Rezeptorpotential noch keine Veränderung zeigt, so ist t_{maxA} nur etwa 50 bis 300 ms länger als t_{maxU}^* .

t_{maxA} liegt zwischen 150 und 500 ms (s. Tab. 2).

*s. Fig. 6a

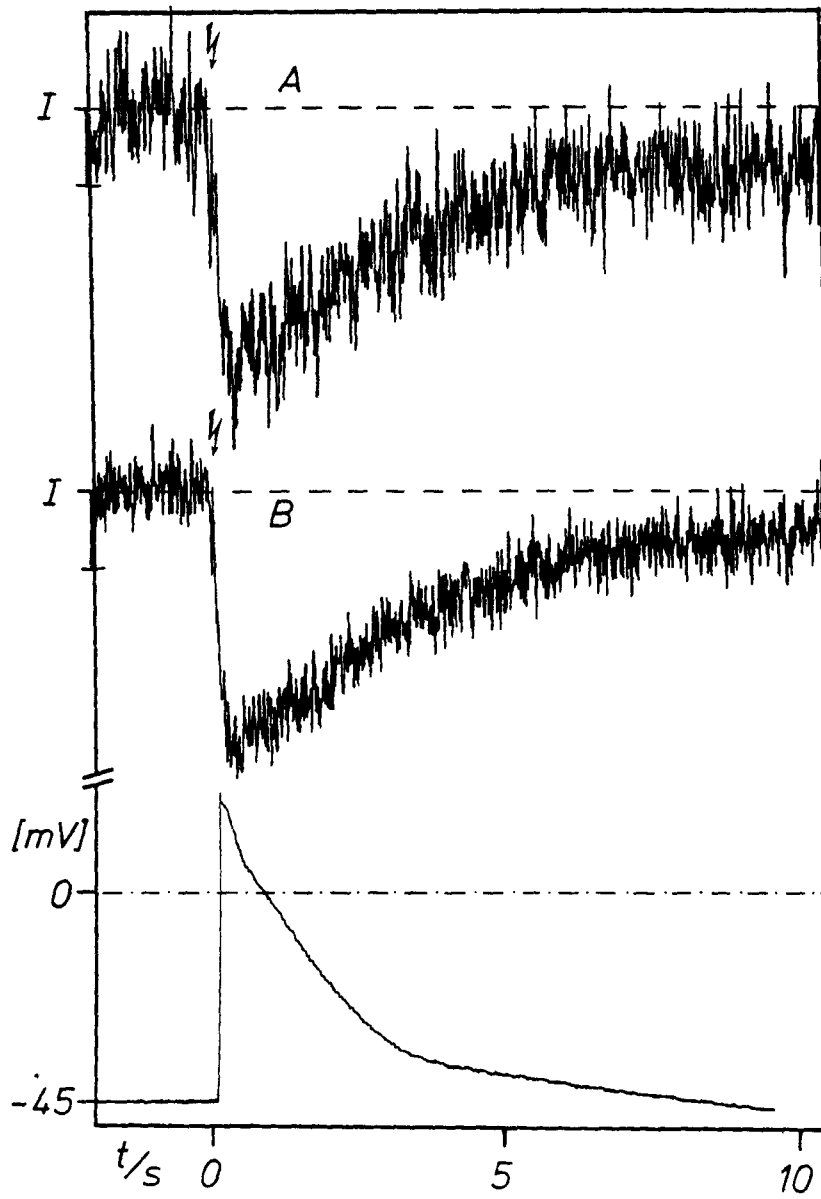


Fig. 7

A : Arsenazosignal. 1 cm entspricht einem Photomultiplierstrom von 57 pA.

B : gemittelttes Arsenazosignal aus zwei Einzelsignalen wie A.

Versuch	$\bar{x} t_{\max A}$ (ms)	$\bar{x} t_{\max J}$ (ms)	Lösung
AVC 6	422 $\pm$ 85 n = 11 1591 $\pm$ 327 n = 13	182.3 $\pm$ 16 n = 8 128.3 $\pm$ 19 n = 7	PS 250 μ molar Ca ²⁺
AVC 7	430 $\pm$ 67 n = 11 805 $\pm$ 280 n = 10	120.3 $\pm$ 8 n = 8 129 $\pm$ 17 n = 8	PS 250 μ molar Ca ²⁺
AVC 9	388 $\pm$ 66 n = 15	87 $\pm$ 18 n = 12	PS
AVC 12	313 $\pm$ 41 n = 11	55 $\pm$ 4 n = 9	PS
AVC 13	250 $\pm$ 65 n = 12	55 $\pm$ 9 n = 10	PS
AVC 14	213 $\pm$ 113 n = 11	62 $\pm$ 6 n = 9	PS

Tab. 2

$\bar{x}$ ist der Mittelwert der Signale eines Versuchsabschnitts in ms. Die Werte für $t_{\max A}$ streuen im Vergleich zu $t_{\max J}$ stark, da das Rauschen des Arsenazosignals die Auswertung erschwert.

2.1.2 Anstieg des Arsenazosignals

Die Rückkehr des Arsenazosignals auf den Wert vor dem Lichtreiz (Anstieg) ist gegenüber Rezeptorpotential und Stromsignal verlangsamt (Fig. 9 und 12). Der Gleichlichtpegel I ist erst wieder nach 30 bis 60 s erreicht. Strom und Rezeptorpotential hingegen haben schon nach 5 bis 10 s ihren Dunkelwert erreicht.

Die Halbwertszeit des Anstiegs der Arsenazoantwort (t_2) variiert von Versuch zu Versuch zwischen einer und 6 s (n = 5).

Der Anstieg des Signals scheint keinem einfach exponentiellen Verlauf zu folgen. Bei den meisten Versuchen waren zwei Phasen des Anstiegs zu unterscheiden (Fig. 9).

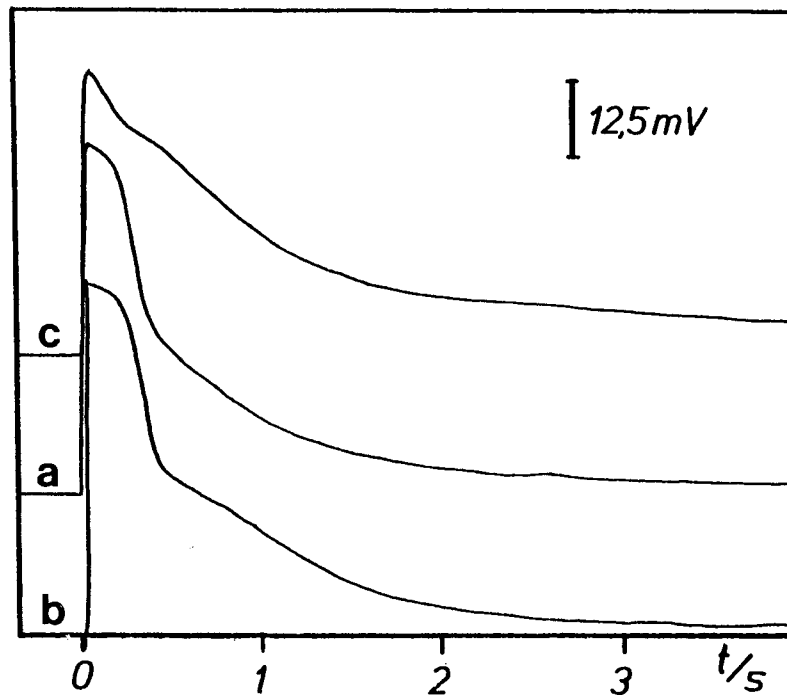


Fig. 8
 Rezeptorpotentiale einer Zelle. (Die Potentiale sind versetzt gezeichnet)
 a: ohne Arsenazoinjektion
 b: nach einmaliger Injektion (ca. 1 s lang injiziert)
 c: nach dreimaliger Injektion

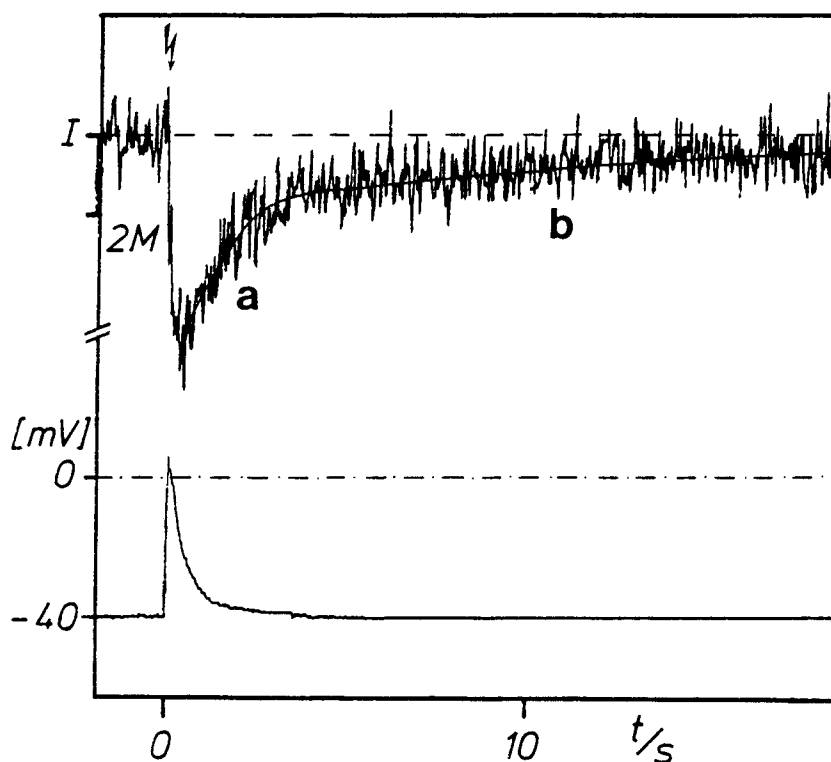


Fig 9
 Anstieg des Arsenazosignals a: erste Phase
 b: zweite Phase

Bei den meisten Rezeptorzellen lassen sich beim Anstieg der Arsenazoantwort zwei Phasen unterscheiden, zuerst eine schnelle Phase, die dann nach einigen Sekunden (ca. 3-10 s) in eine langsamere übergeht. Das Arsenazosignal ist nach ca. 30 bis 60 s wieder auf dem Lichtpegel vor dem Lichtreiz zurückgekehrt.

2.1.3 Die Latenzzeit

Wie bei Strom und Spannung konnte auch beim Arsenazosignal eine Latenzzeit (t_{latA}) zwischen dem Beginn des Lichtreizes und dem Beginn des Signals beobachtet werden (s. Fig. 10). Das Rauschen des Photomultipliers erschwert es jedoch, genaue Werte zu bestimmen. Es kann nur gesagt werden, daß die Latenzzeit t_{latA} im Bereich der Latenzzeiten von Strom- und Spannungssignal, also zwischen 20 und 60 ms liegt.

2.1.4 Diskussion

I. Wird das lichtinduzierte Arsenazosignal von intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen hervorgerufen?

Das Absorptionsspektrum von Arsenazo III ist nicht nur abhängig von der Calciumionenkonzentration, sondern ändert sich auch mit dem pH-Wert. Arsenazo III bindet außer Calciumionen noch viele andere zweiwertiger Ionen (s. Kap. 1.8 und Russel & Martonosi, 1978; Chiu & Haynes, 1980; Bauer, 1981).

Alkaliionen werden von Arsenazo schwach gebunden und millimolare Konzentrationen, wie sie in lebenden Zellen vorkommen, verringern die apparente Affinitätskonstante für Calciumionen ($pK_{\text{Ca}^{2+}}$) (Bauer, 1981).

Da beim Limulus-Photorezeptor extra- und intrazellulär Magnesiumionen (Mg^{2+}) vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, daß das Arsenazosignal durch eine lichtinduzierte intrazelluläre Mg^{2+} -Erhöhung entstehen könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, injizierten Brown et al., 1977 Mg^{2+} und Ca^{2+} in den Limulus-Photorezeptor. Das im Limulus-Photorezeptor nach Mg^{2+} -Injektion gemessene Arsenazospektrum unterscheidet sich deutlich von dem nach Ca^{2+} -Injektion und Lichtadaptation (Brown et al., 1977). Das Absorptionsmaximum des Mg^{2+} -Arsenazokomplexes hat nur ein Maximum bei 620 nm. Die Spektren nach Ca^{2+} -Injektion und Lichtadaptation entsprechen einander und haben 2 Maxima. Die Affinität von Arsenazo III für Mg^{2+} ist im neutralen pH-Bereich relativ gering (s. Kap. 1.8). Die Calciumaffinität von Arsenazo bei pH 7.0 wird durch Mg^{2+} -Konzentrationen bis 2 mmol/l auch nicht wesentlich beeinflusst (Bauer, 1981).

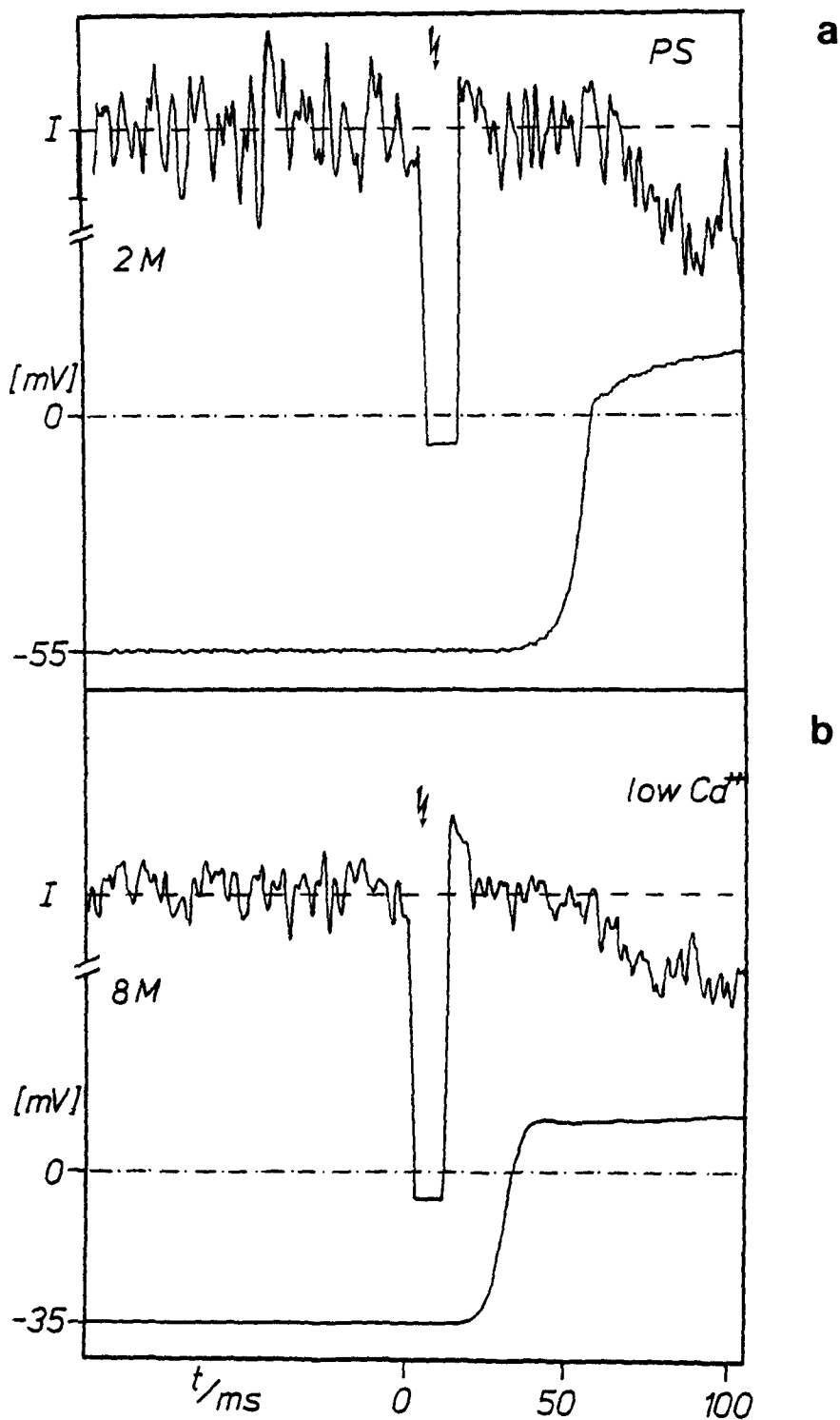


Fig. 10

Latenzzeit des Arsenazosignals

Nach dem 10 ms langen Lichtblitz (⚡) ist ein Abfall des Arsenazosignals erst nach einigen Millisekunden zu erkennen. Die genaue Latenzzeit lässt sich auf Grund des Photomultiplierauschens nicht bestimmen.

a: Arsenazosignal nach zweimaliger Mittelung (2M) einer Zelle in PS

b: Arsenazosignal nach achtmaliger Mittelung (8M) einer Zelle in einer Badlösung mit erniedrigter Calciumkonzentration (250 μmolar)

Unterhalb der Arsenazosignale ist das Rezeptorpotential eingezeichnet.

Andere zweiwertige Ionen, außer Mg^{2+} und Ca^{2+} , sind im Photorezeptor von Limulus nicht in nennenswerten Konzentrationen vorhanden.

Intrazelluläre pH-Änderungen des Limulus-Photorezeptors bei sättigenden Lichtreizen sind kleiner als 0.1 pH-Einheiten (Brown et al., 1977). Die Autoren stellten keinen Einfluß auf das Arsenazosignal fest.

Die lichtinduzierte Transmissionsänderung im Arsenazo III enthaltenden Photorezeptor wird nicht durch andere intrazellulär vorkommende Substanzen hervorgerufen, da Zellen ohne Arsenazo III bei 645 nm keine Transmissionsänderung zeigten. Somit kann davon ausgegangen werden, daß das lichtinduzierte Arsenazosignal auf eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zurückzuführen ist.

Ein Teil des injizierten Arsenazos wird auch im Dunkeln, vor dem Lichtreiz, Ca^{2+} und andere intrazellulär vorhandene Ionen entsprechend dem Massenwirkungsgesetz, binden. Es steht somit nicht das gesamte injizierte Arsenazo zur Bindung der Calciumionen bei Belichtung zur Verfügung.

II. Von welchen Faktoren werden Abfall und Anstieg des lichtinduzierten Arsenazosignals bestimmt?

Die nach der Injektion in den Photorezeptorzellen erreichte Arsenazokonzentration wurde von Nagy & Stieve (1982) zwischen 0.5 und 3 mmol/l abgeschätzt.

Die Zeit, bis das Arsenazosignal sein Maximum erreicht (t_{maxA} ; s. Fig. 6) nimmt mit der Menge des injizierten Arsenazos zu (s. Kap. 2.1.1). Bei der Injektion zu großer Farbstoffmengen (größer 1-3 mmol/l) wird zudem die Rückkehr des Rezeptorpotentials auf den Wert des PMP verlangsamt (Fig. 8). Ein ähnliches Verhalten zeigt der Photorezeptor nach der Injektion von EGTA, das z. B. die Helladaptation des Photorezeptors verhindert (Lisman & Brown, 1975). Das Arsenazo wirkt in der Zelle als Calciumpuffer (Brown et al., 1977; Maaz, 1979) und beeinflusst dadurch Ca^{2+} -gesteuerte Vorgänge abhängig von seiner Konzentration.

Unabhängig von der injizierten Substanz schädigen injizierte Lösungsmengen größer als 20 % des Zellvolumens die elektrische Lichtantwort der Zelle (Brown & Blinks, 1974; Brown et al., 1977).

Um die beschriebenen unerwünschten Nebeneffekte der Arsenazoinjektion gering zu halten, wurden so kleine Mengen Arsenazo injiziert, daß noch keine Veränderungen des Rezeptorpotentials zu sehen waren.

Auch bei der Injektion sehr geringer Arsenazomengen liegt das Maximum des Arsenazosignals stets 50 bis 140 ms später als das Maximum des Rezeptorpotentials (s. auch Nagy & Stieve, 1982). Dafür kann es verschiedene Gründe geben:

- a) Die injizierte Arsenazomenge ist zu groß, so daß die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch die Pufferkapazität des Arsenazos beeinflusst ist.
- b) Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher tragen zum Arsenazosignal bei.
- c) Diffusion beeinflusst das Arsenazosignal.

Wie von Nagy & Stieve (1982) beobachtet wurde, scheint es besonders aktive Bereiche in der Photorezeptorzelle zu geben, wo das Arsenazosignal größer als an anderen Stellen der Zelle ist. Das bedeutet, daß die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung bei Belichtung in der Zelle lokal verschieden ist.

Da das Meßlicht zumeist nicht nur diese aktiven Bereiche trifft, könnte Ca^{2+} , daß von diesen Stellen in die Umgebung diffundiert (Fein & Lisman, 1974), noch zum Arsenazosignal beitragen, nachdem die eigentliche, schnelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung bereits beendet ist. Dadurch ist es möglich, daß das Maximum des Arsenazosignals zeitlich nicht mit der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung übereinstimmt.

Tillotson & Gorman (1980) zeigten, daß nach Ca^{2+} -Injektion in einen Tropfen Arsenazolösung die Absorption erst nach einigen Sekunden überall gleich ist.

Messungen im Spektralphotometer, bei welchen in eine Küvette, gefüllt mit Ca^{2+} -freier Arsenazolösung, plötzlich eine konzentrierte Calciumlösung zugegeben wird, zeigten, daß das Maximum des Absorptionsanstiegs erst nach 1 - 2 s auftritt.

Walz (1979) beschreibt ein glattes endoplasmatisches Retikulum (glattes ER), beim Hirudo-Photorezeptor, welches Ca^{2+} aus dem Cytoplasma aufnehmen und speichern kann. Ähnliche intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher (glattes ER oder Mitochondrien) könnten das Arsenazosignal bei Limulus beeinflussen (Ca^{2+} abgeben oder aufnehmen).

Durch die zeitliche Differenz zwischen dem Maximum des Arsenazosignals und dem Maximum von Rezeptorpotential und Strom kann der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bisher auch keiner Komponente der elektrischen Antwort zugeordnet werden (Maaz, 1979; Maaz et al., 1981; Nagy & Stieve, 1982).

Die von Nagy & Stieve (1982) durchgeführten Experimente mit Doppellichtreizen und Arsenazoinjektion zeigten, daß es wahrscheinlich zwei verschiedene Dunkeladaptationsmechanismen im Limulus-Photorezeptor gibt.

Die beiden Phasen des Anstiegs des Arsenazosignals (Fig. 9) scheinen mit den beiden Dunkeladaptationsphasen (Maaz, 1980; Claßen-Linke, 1981; Nagy & Stieve, 1982) zeitlich übereinzustimmen.

Der erste Dunkeladaptationsmechanismus (bis etwa 4 s nach einem starken Lichtreiz) fällt in den Bereich, in dem die $[Ca^{2+}]_i$ noch hoch ist (s. Fig. 9: erste Phase des Anstiegs des Arsenazosignals). Die erste Komponente des Rezeptorpotentials bestimmt das Maximum beim zweiten Lichtreiz.

In der zweiten Adaptationsphase ist das $[Ca^{2+}]_i$ wieder gesunken (zweite Phase des Arsenazosignals), die zweite Komponente des Rezeptorpotentials bestimmt das Maximum des Rezeptorpotentials.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Arsenazosignal die lichtinduzierten, intrazellulären Änderungen der für Licht- und Dunkeladaptation wichtigen Calciumionen wiedergibt. Wie die Diffusionsvorgänge in der Rezeptorzelle die Form des Abfalls des Arsenazosignals beeinflussen, ist nicht genau zu sagen.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Calciumionen, die das Arsenazosignal hervorrufen, bei Belichtung aus intrazellulären Speichern (z.B. ER oder Mitochondrien) oder durch die äußere Zellmembran in das Cytoplasma der Photorezeptorzelle gelangen.

2.2 Voltage-Clamp Experimente mit Arsenazo

2.2.1 Einführung

Mit den im folgenden beschriebenen Experimenten soll untersucht werden, ob die lichtinduzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (s. Brown et al., 1977; Brown & Blinks, 1974) des Ventralnerv-Photorezeptors von der Spannung über der äußeren Zellmembran abhängig ist.

Da die Membranspannung in den Voltage-Clamp Experimenten während des Lichtreizes konstant ist, wird nur der lichtinduzierte Zusatzstrom (J) gemessen. Durch Spannungsänderungen hervorgerufene Ionenströme sind dadurch ausgeschlossen.*

Das Arsenazosignal entspricht direkt den Calciumkonzentrationsänderungen in der Zelle, während das Membranstromsignal dem momentanen Ionenstrom durch die Zellmembran entspricht (s. Millecchia & Mauro, 1969). Dabei kann zwischen dem Einstrom positiver Ionen (z.B. Na^+ oder Ca^{2+}) und dem Ausstrom negativer Ionen (z.B. Cl^-) nicht bei der Strommessung unterschieden werden.

Das meßbare Stromsignal kann schon beendet sein, während weiterhin Natriumionen in die Zelle einströmen, aber gleichzeitig eine gleichgroße Anzahl Kaliumionen aus der Zelle hinausfließen (Schmidt & Fein, 1979). Das gemessene Stromsignal entspricht somit dem Nettoladungsfluß über die Zellmembran.**

Das Rezeptorpotential ist die Änderung der Membranspannung der freien Zelle, verursacht durch die lichtinduzierten Ionenflüsse durch die Zellmembran.

*Bis auf die bei Depolarisation ständig offenen Kanäle z. B. K^+ -Kanäle gehen alle durch Spannungssprünge geöffneten Kanäle innerhalb kurzer Zeit (< 1 s) wieder zu.

**Der Einstrom positiver Ionen (oder Ausstrom negativer) wird im Folgenden als Abnahme des Stromsignals dargestellt und trägt ein negatives Vorzeichen.

2.2.2 Versuche in physiologischer Salzlösung

2.2.2.1 Maximum des Arsenazosignals (A'_{Cl}) und Membranstrom J

Da in manchen Versuchen die Höhe des Maximums des Arsenazosignals mit der Zeit abnahm (max. 20 % pro Stunde) war es nötig, zu jedem Arsenazosignal bei geclampter Membranspannung (A_{Cl}) einen Bezugswert (A_{free}) der freien Zelle zu messen. A_{Cl} und A_{free} wurden jeweils zweimal bei der gleichen Clampspannung registriert, um bei der Auswertung die Signale zu mitteln (s. Kap. 1.9.2). 60 s nach jeder Clampphase wurde das Arsenazosignal während des Rezeptorpotentials (A_{free}) bestimmt und mit A_{Cl} verrechnet.

$$\frac{A_{Cl}}{A_{free}} = A'_{Cl}$$

Das Arsenazosignal A_{free} wurde immer unter gleichen äußeren Bedingungen ausgelöst und ist nur vom Zustand der Rezeptorzelle abhängig.

Fig. 11a zeigt A'_{Cl} aufgetragen gegen die Clampspannung U_{Cl} . In Fig. 11b und c ist der gleichzeitig gemessene lichtinduzierte Membranstrom bzw. das Zeitintegral des Membranstroms dargestellt. Für die Werte aus Fig. 11a wurde eine Regressionsgerade mit negativer Steigung bestimmt.*

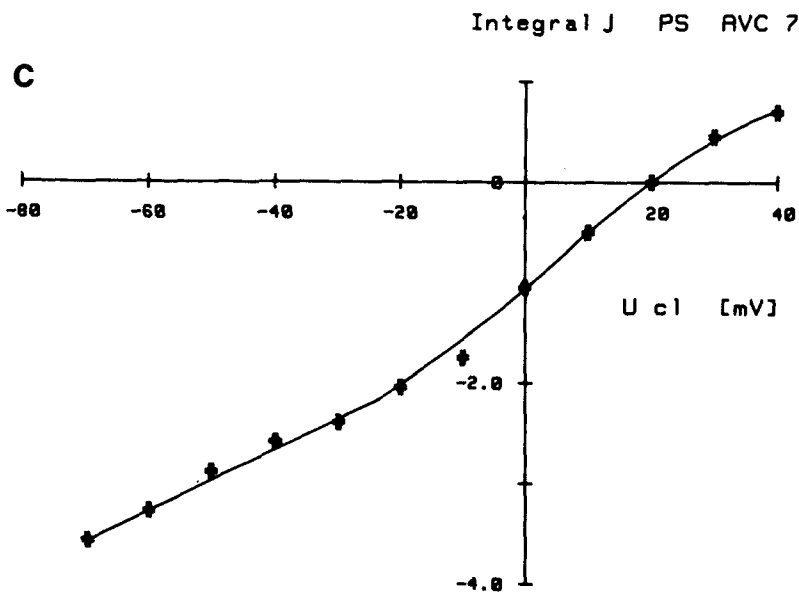
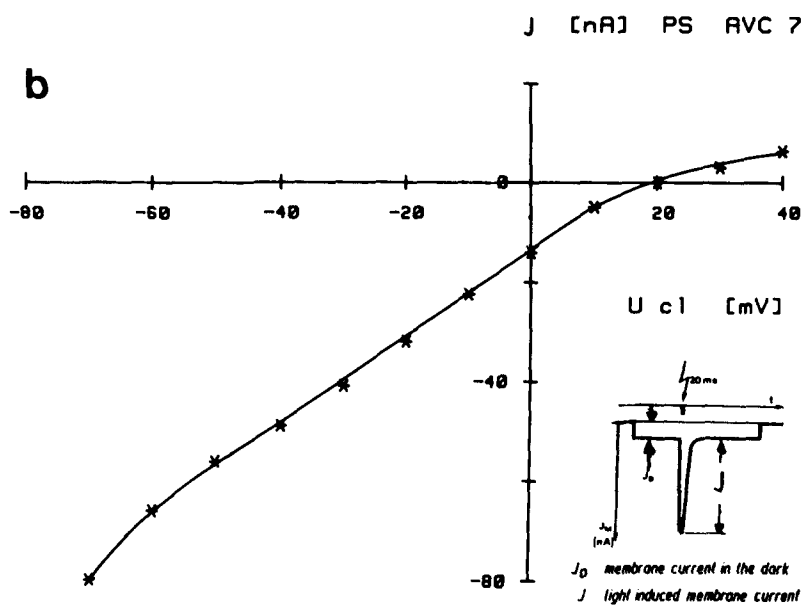
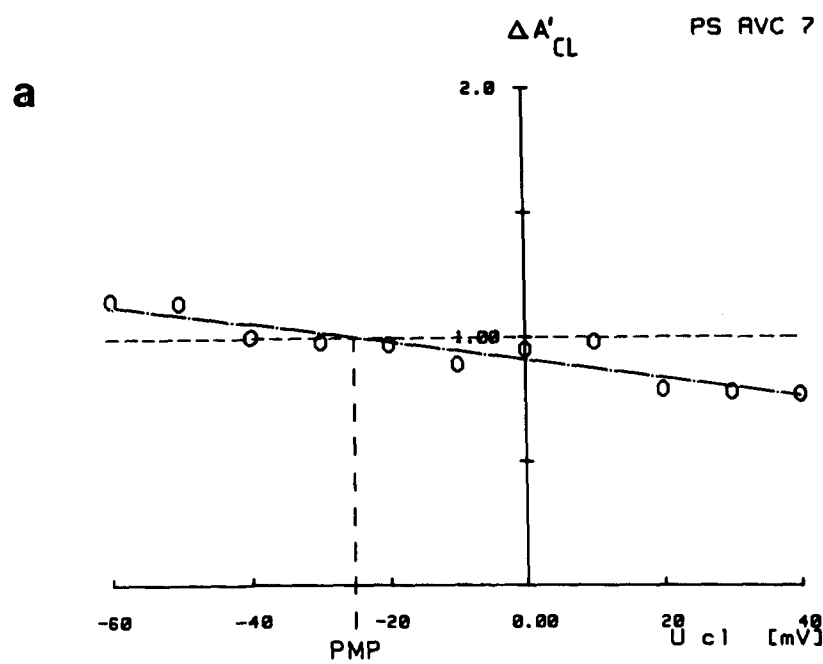
Wie aus Fig. 11a hervorgeht, wird das Maximum der Arsenazosignale mit steigender Clampspannung kleiner. Bei hyperpolarisierenden Clampspannungen (U_{Cl} kleiner PMP) ist A'_{Cl} größer als 1, denn das geclampte Arsenazosignal A_{Cl} ist höher als der Bezugswert A_{free} .

Bei depolarisierenden Clampspannungen (U_{Cl} größer PMP) ist A_{Cl} kleiner als A_{free} .

Der extrapolierte Schnittpunkt der Regressionsgeraden in Fig. 11a mit der Abszisse liegt bei +250 mV. Er entspricht der

*Die Regressionsgerade wurde mit einem Programm von HP für einen HP 9845B nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt.

Fig.11 a



Membranspannung, bei der keine lichtinduzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ausgelöst werden kann.

In 12 Versuchen hatte die Regressionsgerade für A'_{Cl} eine negative Steigung. In einem Versuch verlief die Gerade parallel zur Abszisse.

Bestimmt man den Mittelwert der Schnittpunkte der extrapolierten Regressionsgeraden, so erhält man einen Wert von $+640\text{ mV} \pm 305, n = 12$. Auf Grund der Streuung der Meßwerte (das verrauschte Arsenazosignal erschwerte die genaue Bestimmung von A, s. Kap. 2.2.5) haben die meisten Regressionsgeraden einen Regressionskoeffizienten kleiner als 0.98.

In allen Versuchen fallen die Meßpunkte mit steigender Clampspannung ab und die berechneten Regressionsgeraden schneiden die Abszisse bei Spannungen größer als $+250\text{ mV}$ (Tab. 3).

Membranstrom J (Fig. 11b) und das Zeitintegral des Membranstroms (Fig. 11c) zeigen eine vergleichbare Abhängigkeit von U_{Cl} . Das Umkehrpotential für den Strom liegt bei $+20\text{ mV}$. Der Mittelwert der Umkehrpotentiale von 14 Versuchen liegt bei $+20\text{ mV} \pm 5\text{ mV}$.

Versuch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
mv	396	726	288	576	-	987	250	468	774	-	334	961	-	1196	721

Tab. 3

In der Tabelle sind die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Abszisse der einzelnen Versuche in PS angegeben.

Fig. 11

- a: Die normierte Höhe des Arsenazosignals A'_{Cl} (siehe Text) ist aufgetragen gegen die jeweilige Clampspannung U_{Cl} .
Die Regressionsgerade schneidet den Wert 1 im Bereich des PMP's der Rezeptorzelle und die Abszisse bei ca. $+250\text{ mV}$.
- b: lichtinduzierter Membranstrom J aufgetragen gegen die Clampspannung U_{Cl} .
- c: Zeitintegral des lichtinduzierten Membranstroms J aufgetragen gegen die Clampspannung U_{Cl} .

2.2.2.2 Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A_{CE}') und Zeit bis das Signal auf $A/2$ angestiegen ist (t_2')

Nicht nur die Höhe A_{cl} des Arsenazosignals, sondern auch sein Anstieg zurück auf den Wert vor dem Lichtreiz ist abhängig von der Membranspannung (s. Fig. 12). Der Anstieg ist bei hyperpolarisierenden Clampspannungen schneller als in der freien Zelle und bei depolarisierenden Clampspannungen langsamer.

Um ein Maß für den Anstieg zu erhalten, wurde die Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes A_{CE} (6 s nach dem Reizlicht) gemessen. Die Höhe des darauffolgenden, ungeclampton Arsenazosignals (A_{FE}) zur selben Zeit wurde dann mit A_{CE} verrechnet.

$$\frac{A_{CE}}{A_{FE}} = A_{CE}'$$

Trägt man A_{CE}' gegen die Clampspannung auf (Fig. 13 a, b), so ergibt sich in 8 Versuchen eine nichtlineare Abhängigkeit der Werte von U_{cl} (Fig. 13 a). In 4 Versuchen steigt A_{CE}' zuerst langsam etwa linear an, um dann im Bereich depolarisierender Clampspannungen schnell sehr groß zu werden (Fig. 13 b). In beiden Fällen beginnt A_{CE}' bei Clampspannungen im Bereich -30 bis +10 mV stark zu steigen.

Der Anstieg des Arsenazosignals wurde durch depolarisierende Clampspannungen zunehmend verlangsamt. Das Arsenazosignal stieg bei einigen Versuchen während hoher positiver Clampspannungen (+20 bis +40 mV) nicht mehr an, z. T. fiel es sogar noch weiter langsam ab (s. Fig. 12 und 14).

Zu ähnlichen Ergebnissen wie bei A_{CE}' gelangt man, wenn man die Zeit, nach der das Arsenazosignal wieder auf $A/2$ angestiegen ist (t_2'), bestimmt. Es wurden für die Punkte von Fig. 13c der Wert des geclampton Arsenazosignals durch den Wert des ungeclampton dividiert. In Fig. 13c ist t_2' gegen die Clampspannung aufgetragen.

7 Versuche wurden auf diese Art ausgewertet. 5 zeigen einen

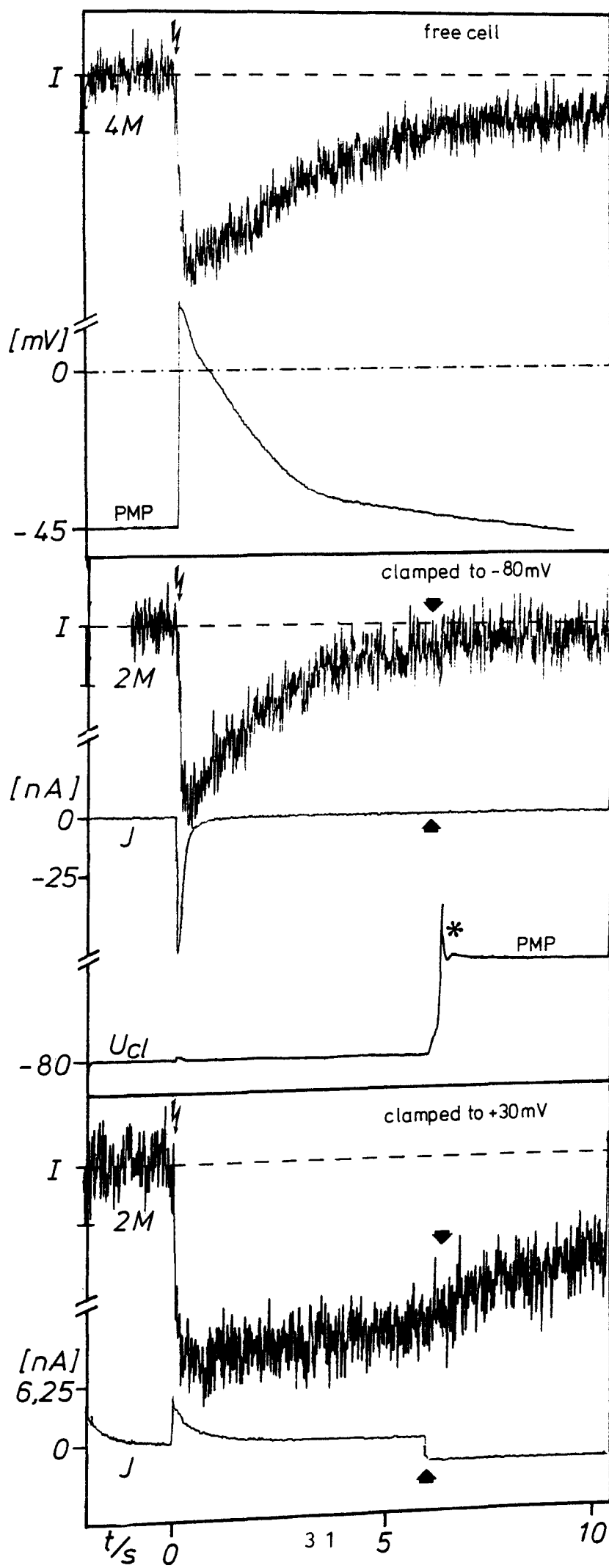
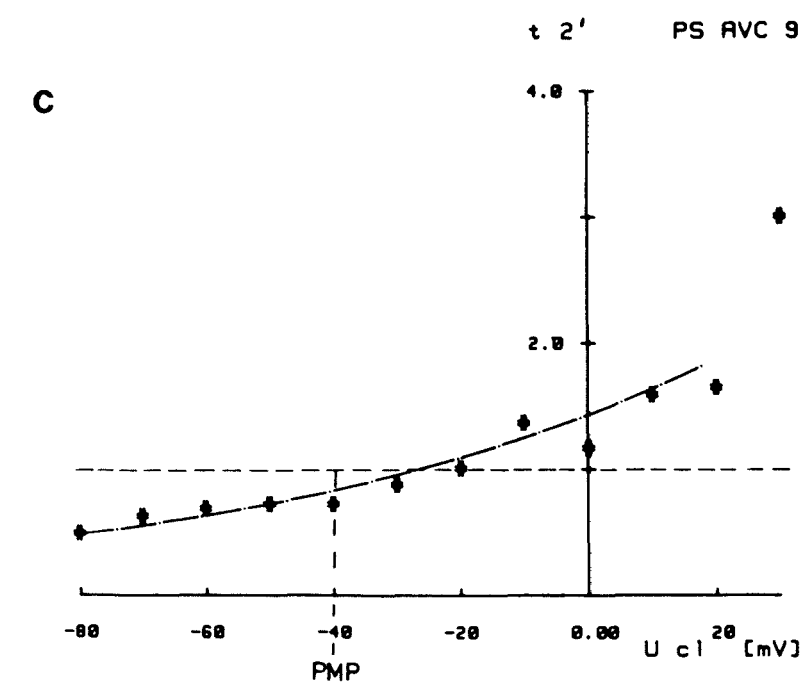
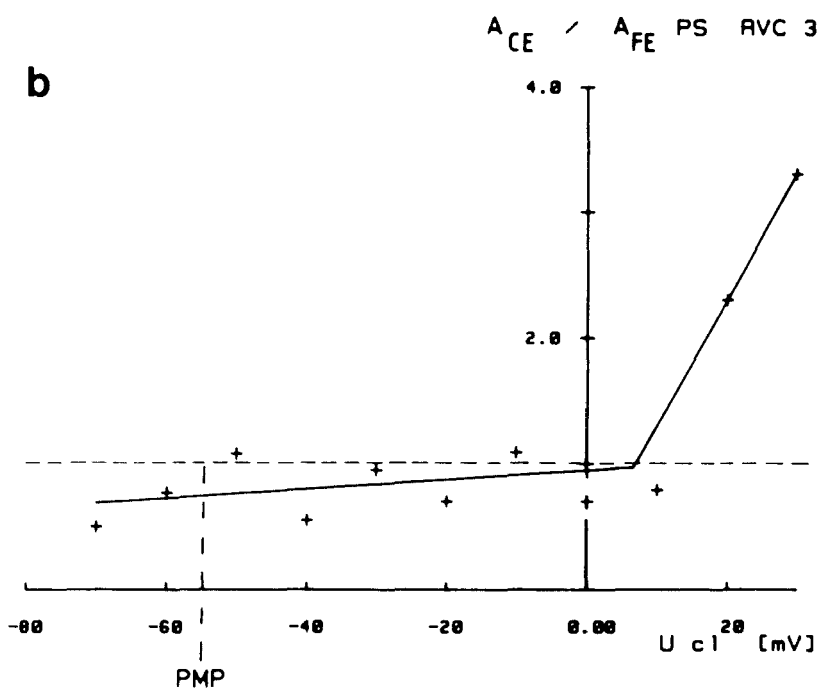
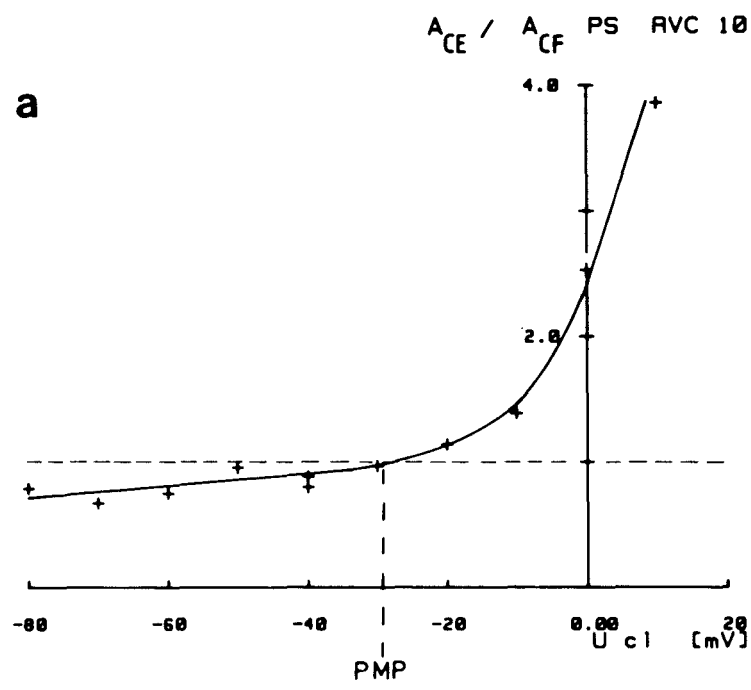


Fig.12
a

b

c

Fig.13 a



nichtlinearen Anstieg von t_2' mit U_{cl} , zwei einen linearen Verlauf.

War bei einem Versuch die Abhängigkeit von t_2' von U_{cl} nichtlinear, so war beim gleichen Versuch auch A_{CE}' nichtlinear.

2.2.2.3 Zeit bei der das Arsenazosignal sein Maximum erreicht (t_{maxA})

Um zu sehen, ob der Abfall des Arsenazosignals ebenfalls abhängig von der Clampspeisung ist, wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (t_{maxA}) bestimmt. Es zeigte sich, daß t_{maxA} unabhängig von der Membranspannung ist.

Fig. 12

- a: Arsenazosignal (4M) und Rezeptorpotential der ungeclampton Zelle.
- b: Arsenazosignal, Membranstrom J und Membranspannung U_{cl} der auf -80 mV geclampton Zelle (2M). Die Pfeile deuten die Zeit des Clampendes an. Die Membranspannung zeigt nach Abschalten der Clampspeisung einen Spike (* Stern), der durch den Spannungssprung bei der Rückkehr der Membranspannung auf das PMP ausgelöst wurde.
- c: Arsenazosignal und Membranstrom J der auf +30 mV geclampton Zelle. Die Pfeile deuten wieder das Clampende an.

Fig. 13

- a: Die normierte Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes A_{CE}/A_{FE} ist gegen die Clampspeisung U_{cl} aufgetragen. Bei Hyperpolarisation der Membranspannung ist A_{CE}/A_{FE} kleiner als 1, bei depolarisierenden Clampspeisungen größer als 1.
- b: Wie in 13a ist A_{CE}/A_{FE} gegen die Clampspeisung U_{cl} aufgetragen. Manche Zellen zeigen (anders als 13a) zuerst einen langsamen Anstieg von A_{CE}/A_{FE} bis in Bereiche positiver Clampspeisungen, um erst dann steil anzusteigen.
- c: t_2' , die normierte Zeit bis das Arsenazosignal wieder um die Hälfte angestiegen ist, wurde gegen die Clampspeisung U_{cl} aufgetragen. Die gestrichelte Linie entspricht einer einfach exponentiellen Kurve.

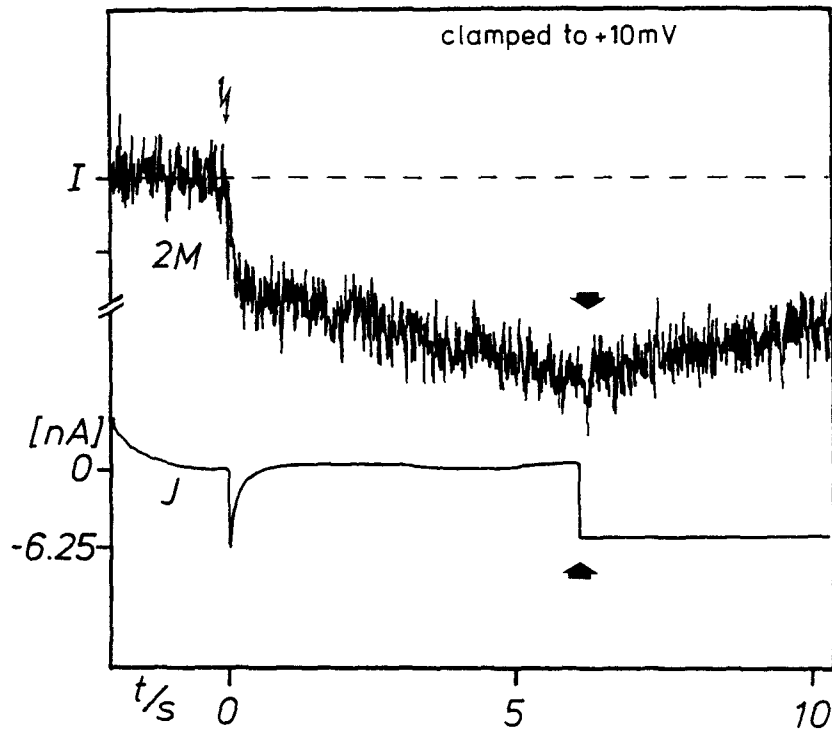


Fig. 14

Der Anstieg des Arsenazosignals wird durch die Clampspannung beeinflusst (vergleiche Fig. 12). In manchen Zellen fiel das Arsenazosignal bei positiven Clampspannungen während der Dauer des Clamps weiter langsam ab, um nach Abschalten der Clampspannung auf den Lichtpegel vor dem Lichtreiz zurückzukehren.

J: Lichtinduzierter Membranstrom

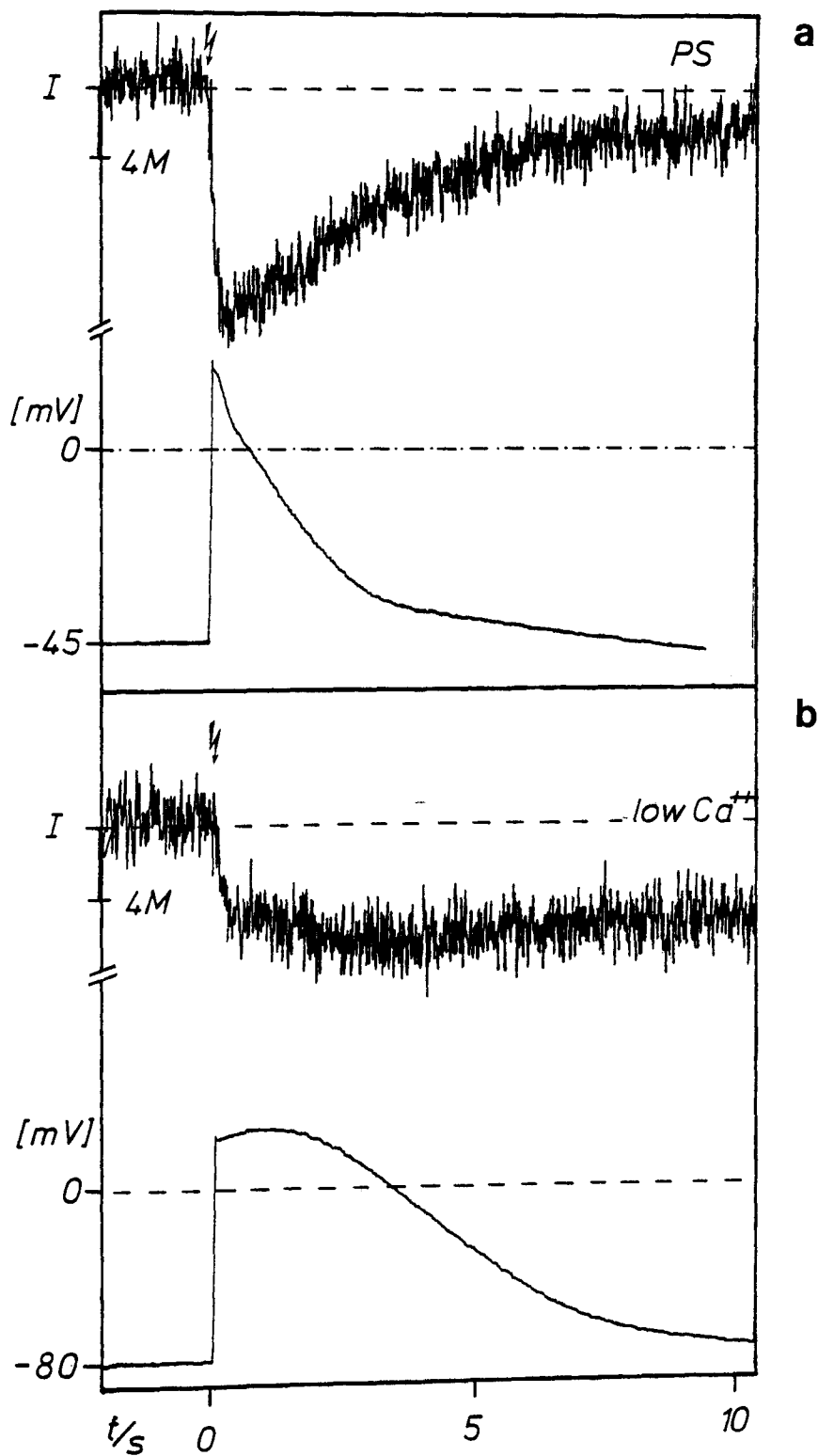


Fig. 15

In einer Außenlösung mit erniedrigter Calciumkonzentration (250 μ molar) verändert sich das Arsenazosignal ähnlich wie Rezeptorpotential oder Membranstrom.

a: 4fach gemitteltes Arsenazosignal einer Zelle in PS.

b: Arsenazosignal (4M) der selben Zelle in einer Lösung mit erniedrigter Calciumionenkonzentration. Das Arsenazosignal ist kleiner und der Anstieg ist verlangsamt.

2.2.3 Versuche mit reduzierter extrazellulärer Calcium- ionenkonzentration

Um den Einfluß der äußeren Calciumionenkonzentration auf die lichtinduzierten Änderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ zu messen, wurden die Calciumionen in der Badlösung in 4 Versuchen auf 250 $\mu\text{mol/l}$ und in einem Versuch auf 1.7 mmol/l reduziert (s. Tab. 1).

Ein Versuch konnte nicht ausgewertet werden, da in der Lösung mit 250 $\mu\text{mol/l}$ Ca^{2+} das Arsenazosignal sehr klein wurde und dann nicht mehr zu messen war. Die elektrische Antwort der Zelle verhielt sich wie in den anderen Versuchen mit erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$.

In den Experimenten sinkt A_{free} in reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ auf durchschnittlich 65 % (± 13 %, $n = 4$) des Wertes in physiologischer Salzlösung ab.

t_2 kann in reduziertem $[Ca^{2+}]_a$ nicht ausgewertet werden, da der Anstieg des Arsenazosignals stark verlangsamt ist (s. Fig. 15b) (t_2 größer 10 s) und nicht ausreichend lange aufgezeichnet wurde.

2.2.3.1 Maximum des Arsenazosignals (A'_{cl}) und Membranstrom J

Der Abfall der Höhe des Maximums der Arsenazosignale A_{cl} mit steigender Clampspannung ist in reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ größer als in PS (Fig. 16a, b).

Der Punkt, an dem A_{cl} gleich A_{free} ist ($A'_{cl} = 1$) stimmt nicht mehr mit dem PMP überein, wie in PS, sondern liegt bei positiveren Clampspannungen.

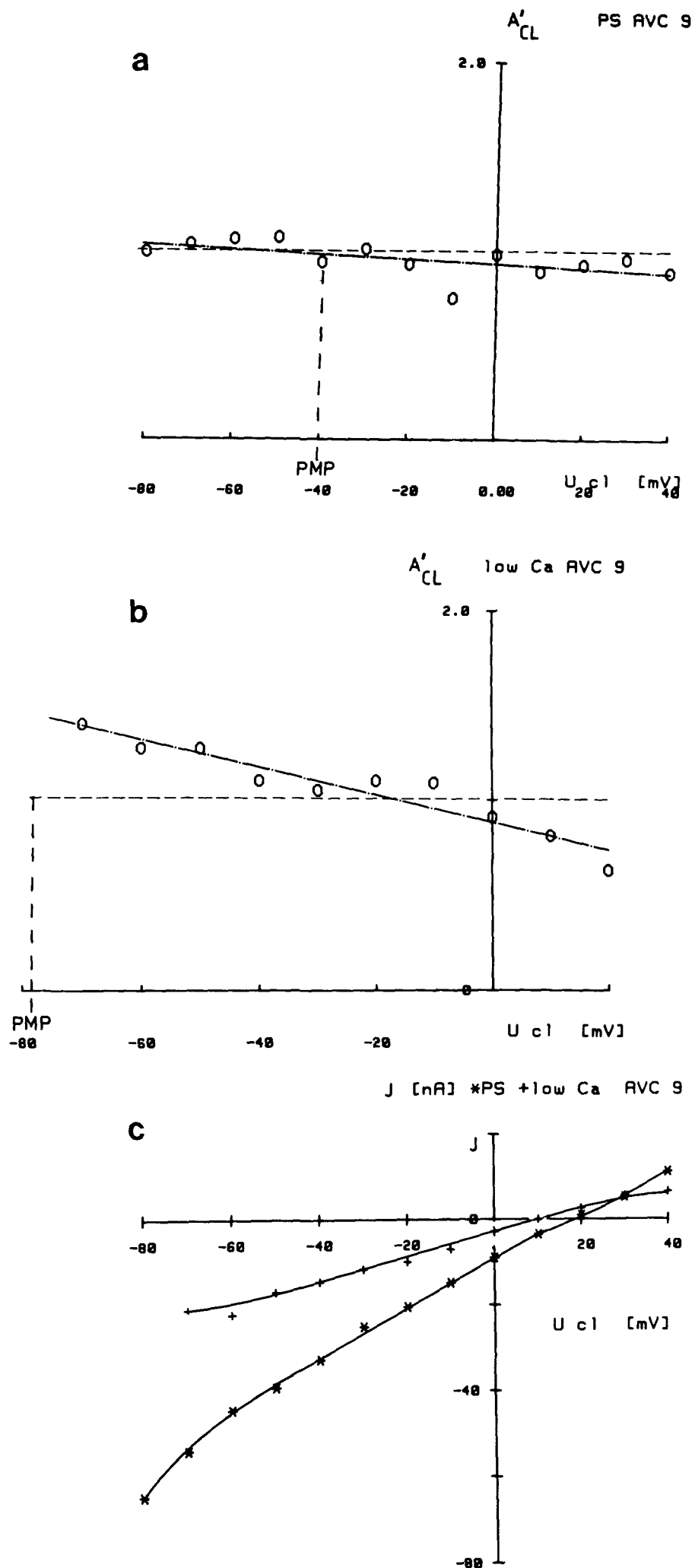
Die ermittelten Regressionsgeraden der 4 Versuche schneiden die Abszisse bei Spannungen zwischen +82 und +130 mV ($\bar{x} = 110$ mV ± 21 mV, $n = 4$). Das Arsenazosignal verändert sich also in erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ stärker mit steigender Clampspannung, als in PS.

Der lichtinduzierte Membranstrom ist, wie das Arsenazo-

Fig. 16

- a: A'_{cl} einer Zelle in PS ist aufgetragen gegen die Clampspannung U_{cl} . Die Regressionsgerade schneidet die Abszisse bei ca. + 770 mV.
- b: A'_{cl} einer Zelle in erniedrigter Calciumaußenkonzentration, aufgetragen gegen die Clampspannung U_{cl} . Die Regressionsgerade schneidet die Abszisse bei ca. +122 mV.
- c: Der lichtinduzierte Membranstrom der Rezeptorzelle in PS (✱ Stern) ist zusammen mit dem lichtinduzierten Membranstrom der Zelle in erniedrigter Calciumaußenkonzentration (+ Kreuze) gegen die Clampspannung U_{cl} aufgetragen.

Fig.16



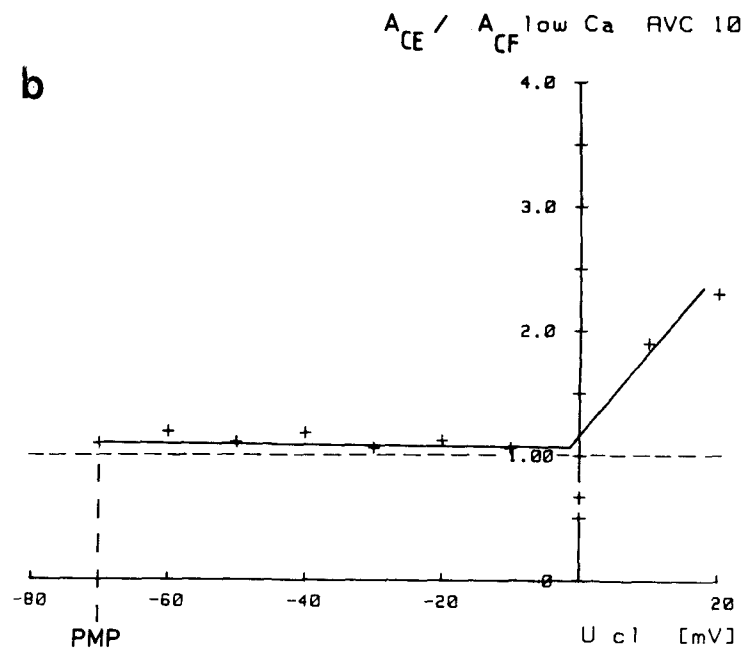
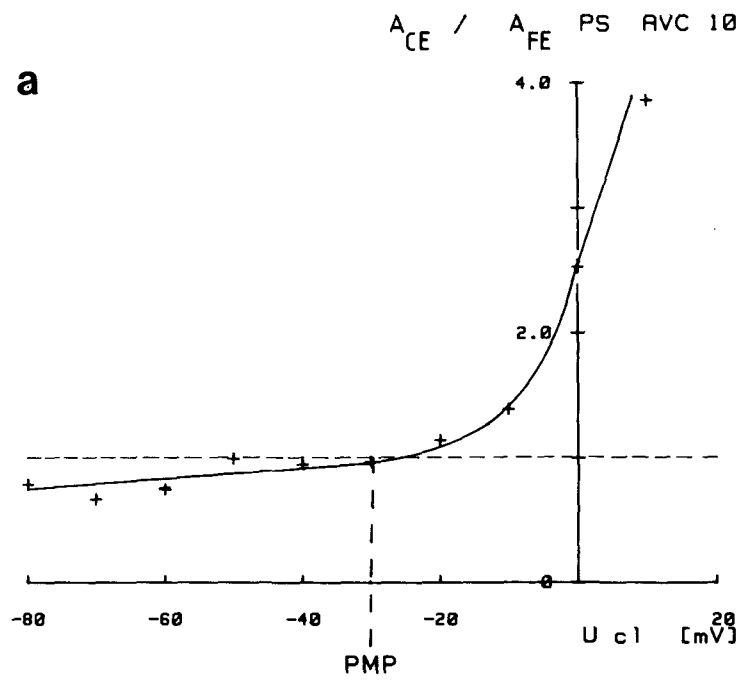


Fig. 17

A_{CE}/A_{FE} ist aufgetragen gegen die Clamps Spannung U_{Cl} .

a: Zelle in PS

b: Zelle in erniedrigter Calciumaußenkonzentration.

signal, kleiner als in PS (Fig. 16c). Sein Umkehrpotential lag im Mittel bei +14 mV (± 7 mV, $n = 4$) und war stets kleiner als das Umkehrpotential der Zelle in PS.

2.2.3.2 Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A'_{CE})

Da in reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ das Arsenazosignal, ähnlich wie das Rezeptorpotential oder der lichtinduzierte Membranstrom, verbreitert ist (Fig. 15b), konnte A'_{CE} nur in zwei Experimenten bestimmt werden.

In reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ ist A_{CE} schon bei hyperpolarisierenden Clampspannungen höher als A_{FE} (Fig. 17), d.h. A'_{CE} ist bei allen Clampspannungen größer als 1.

Beide Versuche zeigen einen nichtlinearen Anstieg von A'_{CE} mit steigender Clampspannung.

t_{maxA} scheint auch in reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ unabhängig von der Clampspannung zu sein.

2.2.4 Versuche mit erhöhter extrazellulärer Calciumionenkonzentration

Mit erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ wurden insgesamt 9 Versuche durchgeführt, davon 3 mit einer $[Ca^{2+}]_a$ von 100 mmol/l (s. Tab. 1).

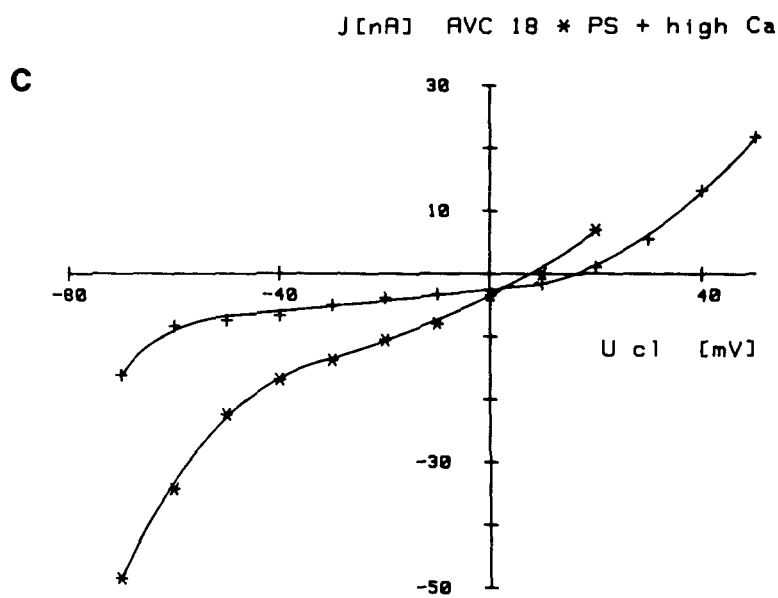
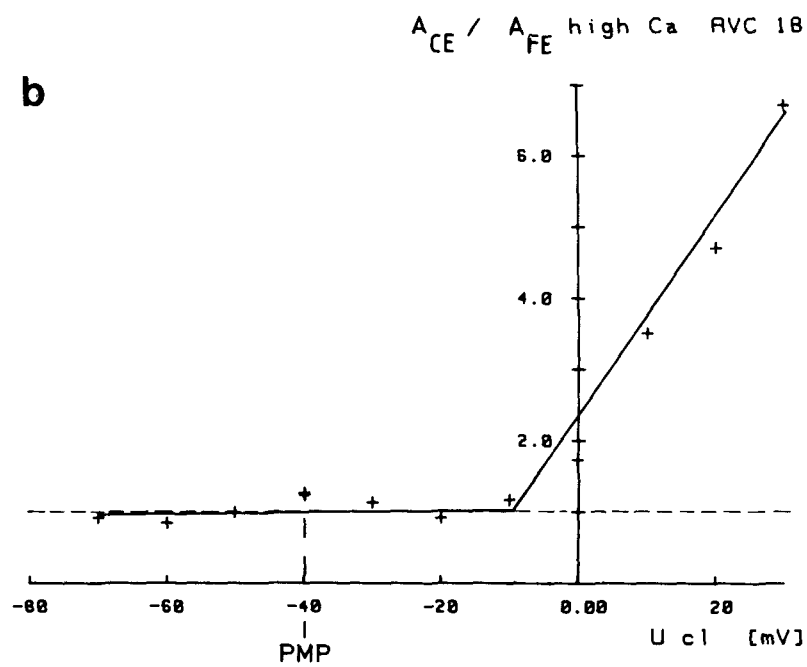
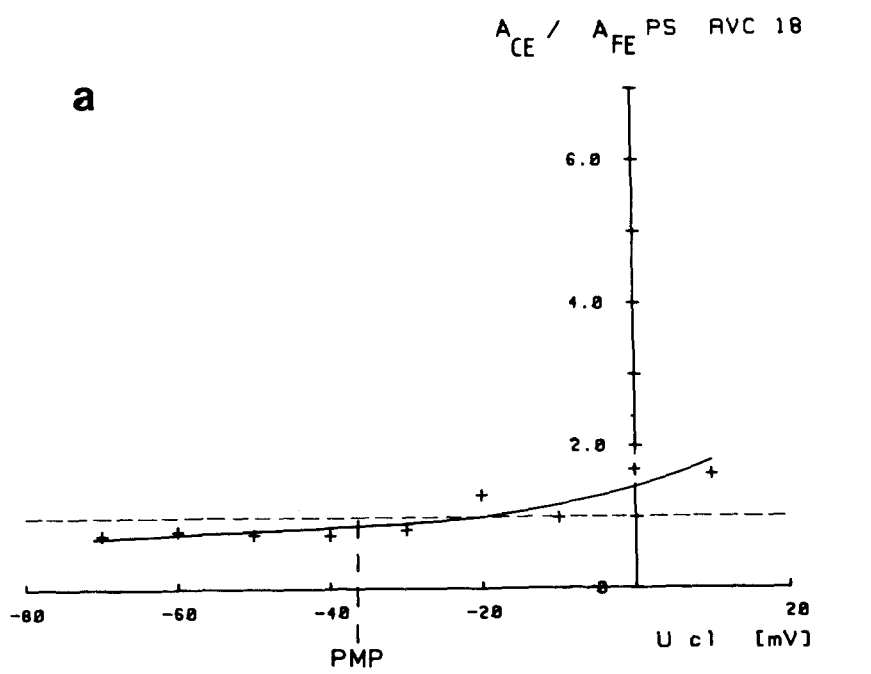
In einem Versuch mit 100 mmolarer Calciumionenkonzentration sank die Höhe des Arsenazosignals (A_{free}) auf 91 % des Wertes in PS, in zwei weiteren war nach 30 Minuten kein meßbares Arsenazosignal mehr vorhanden. Das Rezeptorpotential war entsprechend der erhöhten $[Ca^{2+}]_a$ verändert (s. Stieve et al., 1978). Nachdem in einem Versuch die Zelle erneut mit PS überströmt worden war, konnte wieder ein kleines Arsenazosignal gemessen werden.

Von 3 Versuchen in einer 50 mmolaren $[Ca^{2+}]_a$ war nur bei einem ein Arsenazosignal in erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ zu messen. Es hatte ca. 88 % der Höhe in PS.

In einer Lösung mit 40 mmol/l Calciumionen wurden ebenfalls 3 Versuche durchgeführt. Dabei sank A_{free} auf ca. 65 % (± 4 %, $n = 3$) des Wertes in PS ab.

Da alle Versuche mit erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ ein ähnliches Verhalten

Fig.18



zeigten, werden sie im folgenden zusammengefaßt beschrieben.

2.2.4.1 Maximum des Arsenazosignals (A'_{Cl}) und Membranstrom J

Von 4 Versuchen konnte A_{Cl} ausgewertet werden. 3 Versuche davon wurden in einer physiologischen Salzlösung mit erhöhter Osmolarität begonnen (s. Tab. 1). Die Werte streuten sehr stark. Diese Versuche werden im folgenden nicht berücksichtigt. Ein Versuch wurde in normaler PS und 100 mmol/l $[Ca^{2+}]_a$ durchgeführt. A'_{Cl} fiel in PS mit steigender Clampspannung, während die Werte für A'_{Cl} in erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ nahezu parallel zur Abszisse verlaufen.

Der lichtinduzierte Membranstrom J (Fig. 18c) in erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ ist kleiner als in PS. Sein Umkehrpotential liegt immer höher als das derselben Zelle in PS.

2.2.4.2 Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes (A'_{CE})

A'_{CE} konnte nur in 2 Versuchen ausgewertet werden. Die Werte steigen, bei Clampspannungen größer als -20 mV steil an (Fig. 18b).

Fig. 18

- a: A_{CE}/A_{FE} einer Rezeptorzelle in PS ist aufgetragen gegen die Clampspannung U_{Cl} .
- b: A_{CE}/A_{FE} einer Zelle in erhöhter Calciumaußenkonzentration (40 μ molar) ist aufgetragen gegen die Clampspannung U_{Cl} .
- c: Der lichtinduzierte Membranstrom der Zelle in PS (* Stern) ist zusammen mit dem lichtinduzierten Membranstrom in erhöhter Calciumaußenkonzentration gegen die Clampspannung U_{Cl} aufgetragen.

2.2.5 Zusammenfassung und Bemerkungen

In Fig. 19 ist schematisch der Kurvenverlauf der bisher beschriebenen Meßergebnisse zusammengestellt.

A'_{Cl} , die normierte Höhe des geclampeden Arsenazosignals nimmt in PS mit steigender Membranspannung U_{Cl} ab. Diese Abnahme ist abhängig von der extrazellulären Calciumionenkonzentration: in erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ nimmt A'_{Cl} mit steigender Clampspannung schneller ab als in PS. In erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ nimmt A'_{Cl} kaum ab.

Die Höhe des lichtinduzierten Membranstroms $\underline{J}$ ist abhängig von der Membranspannung U_{Cl} und der extrazellulären Calciumkonzentration. Das Umkehrpotential des Membranstroms wird bei den jeweiligen Rezeptorzellen in erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ kleiner als in PS und in erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ größer als in PS. Im Mittel ist das Umkehrpotential in Lösungen mit veränderter $[Ca^{2+}]_a$ jedoch nicht signifikant verschieden vom mittleren Umkehrpotential der Zellen in PS (Maaz et al., 1981).

A_{CE}/A_{FE} , die normierte Höhe des Arsenazosignals zur Zeit des Clampendes wird mit steigender Clampspannung größer. In PS ist A_{CE} bei hyperpolarisierenden Clampspannungen kleiner als A_{FE} , bei depolarisierenden Clampspannungen größer als A_{FE} , d.h. das geclampete Arsenazosignal kehrt hier langsamer auf den Wert vor dem Lichtreiz zurück als das ungeclampete.

In erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ ist A_{CE} stets größer als A_{FE} . Von den beiden auswertbaren Experimenten mit erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ kann nur gesagt werden, daß A_{CE}/A_{FE} ähnlich wie in PS mit steigender Clampspannung ansteigt.

t'_2 , die normierte Halbwertszeit des Anstiegs des Arsenazosignals wird mit steigender Clampspannung größer.

Da das Arsenazosignal meist ein relativ breites Maximum im Vergleich zur Anstiegszeit hat und die Signale zudem stark verrauscht sind, ist die Bestimmung von t_{maxA} erschwert. Es ist jedoch keine meßbare Abhängigkeit t_{maxA} von der Membranspannung festzustellen.

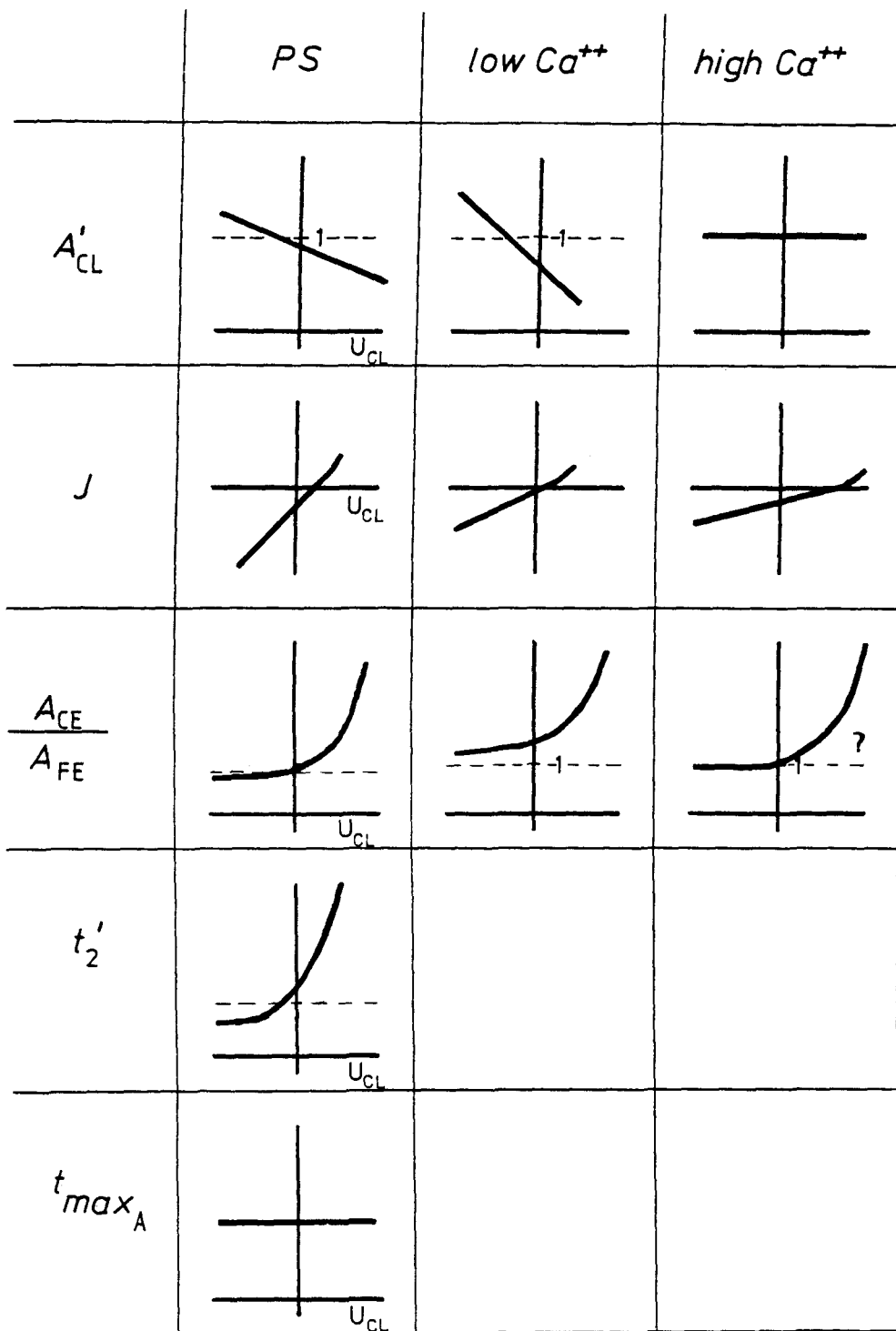


Fig. 19

Zusammenfassung der bisher beschriebenen Versuchsergebnisse in den verschiedenen Calciumaußenkonzentrationen.

Das Signalrauschverhältnis bei den Experimenten lag zwischen 2 : 1 und 10 : 1. Die Meßwerte sind alle mit einem relativ großen Fehler behaftet, der vom Signal-Rauschverhältnis abhängt. Bedingt durch diesen großen Fehler, war es nicht möglich, Experimente mit anderen Calciumaußenkonzentrationen als die beschriebenen, durchzuführen, da die Unterschiede in den Ergebnissen statistisch nicht abzusichern sind.

z. B. verschiebt sich das Umkehrpotential der Zellmembran für Calciumionen bei einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_a$ von 10 mmol/l (PS) auf 100 mmol/l, nach Nernst nur um +29 mV. Bei einer Reduktion von $[Ca^{2+}]_a$ von 10 mmol/l auf 250 μ mol/l wird das Umkehrpotential nach Nernst um 46.5 mV verkleinert. Bei $[Ca^{2+}]_a$ kleiner als 250 μ mol/l ist kaum noch ein Arsenazosignal meßbar (Maaz, 1979), Calciumaußenkonzentrationen größer als 100 mmolar schädigen die Zellen zu stark.

2.2.6 Abhängigkeit des Arsenazosignals von Lichtintensität und Reizabstand

Da das Arsenazosignal stark von der Reizlichtintensität abhängt, wurde sein Maximum A_{free} in 4 Versuchen bei verschiedenen Lichtintensitäten gemessen.

Mit Graufiltern wurde das Reizlicht jeweils um den Faktor 2 reduziert. Von Rezeptorpotential bzw. Stromsignal und Arsenazosignal wurde jeweils die Höhe der Maxima ausgemessen (h_{maxU} , h_{maxJ} , A_{free} ; Fig. 20 a, b).

In Fig. 20 a ist zu sehen, daß h_{maxU} kaum noch größer wird, während A_{free} noch steil ansteigt. Alle Versuche zeigten das gleiche Verhalten. Mißt man den lichtinduzierten Membranstrom J bei konstanter Clampspannung aber verschiedenen Lichtintensitäten, so sättigt der Membranstrom noch nicht, während das Rezeptorpotential seine maximale Höhe erreicht hat (Fig. 20 b). Membranstrom J und Arsenazosignal A_{free} haben bei der höchsten verwendeten Lichtintensität I_0 noch nicht ihre maximale Höhe.

Verändert man den Abstand der Lichtreize zueinander, bei konstanter Lichtintensität, so wird A_{free} mit kürzeren Reizabständen, d.h. größerer Helladaptation, kleiner (Fig. 21).

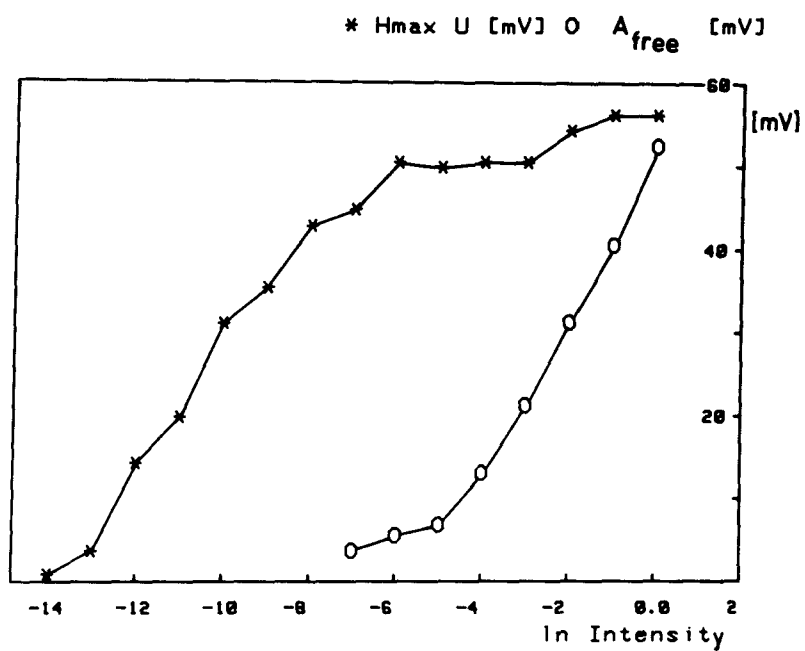
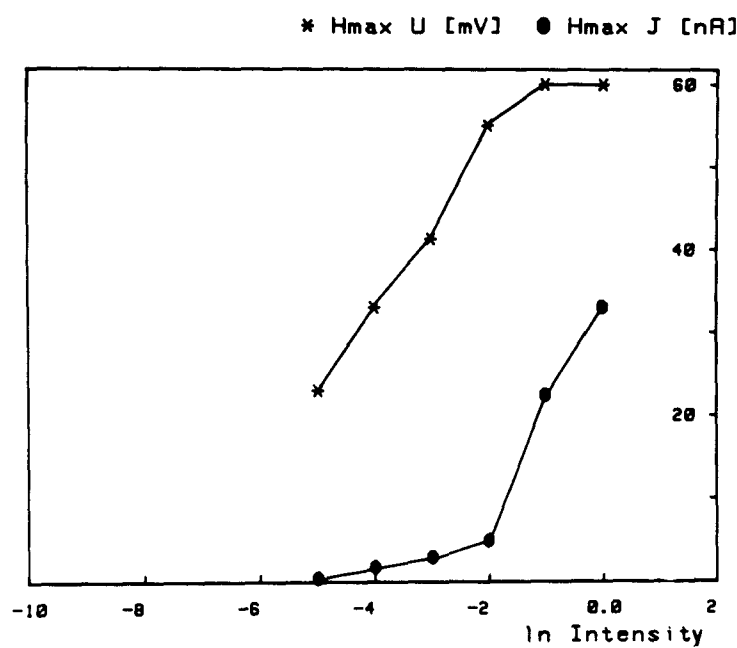


Fig. 20a



b

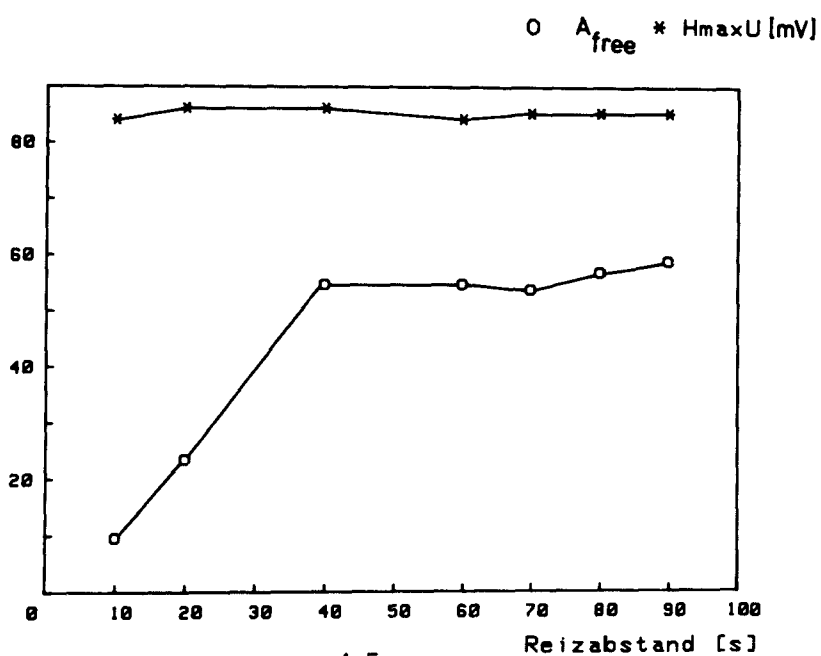


Fig. 21

Bei Reizabständen von 40 s (Voltage-Clamp Versuche: 60 s) hat das Arsenazosignal schon seine maximale Höhe erreicht.

2.2.7 Änderungen des Gleichlichtpegels I und der Höhe des Arsenazosignals A_{free} mit der Zeit

Während der Versuche nahm die Transmission der Arsenazo enthaltenden Zellen durchschnittlich um 10 % pro Stunde ab. In Lösungen mit veränderter Calciumaußenkonzentration war die Transmissionsabnahme in den selben Versuchen etwas geringer.

PS: $\bar{x} = 10 \quad \% \quad n = 7$

erniedrigte $[Ca^{2+}]_a$: $\bar{x} = 3.2 \quad \% \quad n = 3$

erhöhte $[Ca^{2+}]_a$ $\bar{x} = 7.7 \quad \% \quad n = 5$

Die Höhe des Arsenazosignals (A_{free}) blieb in 5 Versuchen in PS konstant. In 12 Versuchen nahm sie langsam über die Versuchszeit ab (5 bis 20 %) (s. Maaz, 1979).

Nach dem Lösungswechsel im zweiten Teil des Versuchs wurde der Abfall in den 12 Versuchen sowohl in einer Badlösung mit erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ als auch in einer Lösung mit reduzierter $[Ca^{2+}]_a$ geringer.

Fig. 20

a: * h_{maxU} ist aufgetragen gegen den $\ln$ der Reizlichtintensität.
($I^0 = 1.1 \text{ mWatt/cm}^2 \cdot \text{s}$)

○ A_{free} , Höhe des Maximums des ungeclamped Arsenazosignals der selben Zelle ist aufgetragen gegen $\ln$ Intensität.

b: * h_{maxU} einer anderen Zelle aufgetragen gegen $\ln$ Intensität.

● h_{maxJ} der selben Zelle aufgetragen gegen $\ln$ Intensität.

Fig. 21

Relative Höhe des Maximums der Arsenazosignale (○ Kreise) und Höhe des Rezeptorpotentials in mV (✱ Sterne) als Funktion des Reizabstandes.

A_{free} sinkt schon bei leichter Helladaptation der Zelle (Reizabstand 30 bis 40 s) während h_{maxU} noch konstant ist.

3. DISKUSSION

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Belichtung spielt eine wichtige Rolle bei der Helladaptation des Ventralnerv-Photorezeptors von *Limulus*.*

Brown & Blinks (1974) wiesen als erste direkt die lichtinduzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch den Anstieg der Lumineszenz intrazellulär injizierten Aequorins nach.

Durch Lichtadaptation und $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung wird die Empfindlichkeit des Photorezeptors herabgesetzt, die Rezeptorpotentiale werden kürzer und bei stärkerer Helladaptation auch kleiner.

Nach Helladaptation setzen Dunkeladaptationsprozesse ein.

Fein & DeVoe (1973) stellten fest, daß beide, Helladaptation und Dunkeladaptation, grundsätzlich verschiedene Vorgänge sind. Maaz et al. (1981), Claßen-Linke (1981) und Stieve & Nagy (1982) unterscheiden zwischen zwei unterschiedlich schnellen Dunkeladaptationsprozessen:

Einige Sekunden nach einem helladaptierenden starken Lichtreiz ist die intrazelluläre Calciumkonzentration hoch (Fig. 9a) und ein $[Ca^{2+}]_a$ -abhängiger Dunkeladaptationsprozeß ist meßbar (Stieve & Pflaum, 1978; Stieve & Bruns, 1980). Nach einigen Sekunden, wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration wieder stärker erniedrigt ist (Fig. 9b) überwiegt ein zweiter Dunkeladaptationsmechanismus, der relativ Ca^{2+} -unabhängig ist (Claßen-Linke, 1981).

Diese verschiedenen Adaptationsmechanismen erlauben der Photorezeptorzelle einen großen Spielraum der Reaktion auf Lichtreize. Das Rezeptorpotential der Zellen ist dadurch auch abhängig von Prozessen, die bis zum Zeitpunkt des Reizes abgelaufen sind.

*(Lisman & Brown, 1972; Stieve & Pflaum, 1974; Brown & Blinks, 1974; Brown & Lisman, 1975; Fein & Lisman, 1975; Lisman, 1976; Stieve, 1976; Brown, 1977; Fein & Charlton, 1977; Brown et al., 1977; Stieve & Pflaum, 1978; Stieve et al., 1978; Wulf & Fahy, 1979; Lisman & Brown, 1975; Stieve, 1980; 1981).

Die Zellmembran des Ventralnerv-Photorezeptors trennt zwei Räume mit sehr verschiedenen Calciumionenkonzentrationen voneinander. Die extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ liegt (in PS) bei 10 mmol/l.*

Brown et al. schätzt die intrazelluläre Calciumkonzentration eines dunkeladaptierten Photorezeptors auf etwa 10^{-7} mol/l und sagt, daß die $[Ca^{2+}]_i$ bei starken Lichtreizen bis auf 10^{-4} mol/l ansteigt.

Im Limulus Photorezeptor, wie in den meisten erregbaren Zellen, besteht somit ein hoher Konzentrationsgradient für Calciumionen über der Zellmembran. Das Umkehrpotential für Calciumionen im Dunkeln ist weit höher als das für Natriumionen. Setzt man eine $[Ca^{2+}]_i$ von 10^{-7} mol/l und eine $[Ca^{2+}]_a$ von 10^{-2} mol/l voraus, so liegt das Ca^{2+} -Umkehrpotential nach Nernst** bei +145 mV.

$$U_{Rev} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Ca^{2+}]_a}{[Ca^{2+}]_i} = + 145 \text{ mV}$$

Ändert sich die Calciumkonzentration extra- oder intrazellulär, um den Faktor 10, so sinkt oder steigt U_{Rev} (nach Nernst) nur um 29 mV.

Es ist jedoch fraglich, ob das Verhalten der Calciumionen mit einer einfachen Gleichung zu beschreiben ist, da Calciumionen in der Zelle nicht nur als Ladungsträger fungieren. Sie haben u.a. einen stabilisierenden Einfluß auf Zellmembranen, lagern sich daran an (Stieve et al., 1978) und spielen z.B. über das Protein Calmodulin eine Rolle in der Regulation von Zellvorgängen (Carafoli, 1981).

*Da die Photorezeptorzelle noch von Gliazellen umgeben ist (Clark et al., 1969), deren Funktionen nicht alle bekannt sind, kann sich die Calciumkonzentration an der Zellmembran des Rezeptors noch etwas von der Calciumkonzentration der Badlösung unterscheiden. Daher muß bei Lösungswechsel einige Zeit gewartet werden, um sicherzustellen, daß die veränderte Ionenkonzentration die Rezeptorzelle erreicht hat.

**Gültig nur für ideale, selektiv calciumionenpermeable Membranen.

Wie wird die intrazelluläre Calciumionenkonzentration des Photorezeptors erhöht?

Durch die Experimente mit Arsenazo III wird deutlich, daß in der Limulus-Photorezeptorzelle die intrazelluläre Calciumionenkonzentration bei Belichtung ansteigt und an der Helladaptation beteiligt ist (Maaz & Stieve, 1980). Dieser Ca^{2+} -Anstieg kann durch verschiedene Mechanismen bewirkt werden:

- I. Nach dem lichtinduzierten Na^+ -Einstrom werden einge-strömte Na^+ -Ionen gegen extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen ausgetauscht.
- II. Calciumionen können von außen als Teil des lichtinduzierten Ionenstroms durch die Zellmembran einströmen.
- III. Nach Belichtung des Photorezeptors geben intrazelluläre Speicher (z.B. ER oder Mitochondrien) Calciumionen ab, möglicherweise im Austausch gegen Natriumionen.

Zu I. Fein & Charlton (1977b) stellten durch Na^+ -Injektion fest, daß einige Effekte der Helladaptation hervorgerufen werden. Insgesamt soll die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration jedoch einer relativ geringen Einfluß (ca. 5 %) auf die Helladaptation haben.

Lisman & Brown (1972) injizierten Na^+ in den Ventralnerv Photorezeptor von Limulus. Bei Versuchen mit erhöhter und reduzierter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und Na^+ -Injektion schlossen sie aus der Form der Rezeptorpotentiale, daß eine Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$ bei Belichtung eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorruft. Es wäre zu erwarten, daß diese $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch den Na^+ -Einstrom membranspannungsabhängig ist. Das Umkehrpotential der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung müßte identisch mit dem Umkehrpotential des lichtinduzierten Na^+ -Einstroms sein (ca. +60 mV; Brown & Mote, 1974). Bei Membranspannungen größer als das Na^+ -Umkehrpotential sollte keine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung mehr meßbar sein. Das durch die Voltage-Clamp Experimente mit Arsenazo ermittelte "Umkehrpotential" der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung (s. Tab. 3) liegt jedoch erheblich über dem Umkehrpotential für

Natriumionen. Da zudem bei Membranspannungen größer als +40 mV noch hohe Arsenazosignale gemessen wurden, kann eine Beteiligung des von Lisman & Brown postulierten Mechanismus an der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung weitgehend ausgeschlossen werden.

Zu II. Strömen Calciumionen als Teil des lichtinduzierten Ionenstroms von außen in die Zelle ein, ist die Höhe des Einstroms von der Membranspannung abhängig, d.h. der Einstrom nimmt mit steigender Membranspannung ab. In den Voltage-Clamp Experimenten mit Arsenazo wird A'_{Cl} mit steigender Clampspannung kleiner (Fig. 11 und 16). Das Umkehrpotential, das über den Abfall von A'_{Cl} mit der Clampspannung bestimmt werden kann, ist in PS in allen Versuchen größer als 250 mV. In erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ liegt es im Mittel bei 110 mV (± 21 mV). In erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ fällt A'_{Cl} mit steigender Clampspannung kaum ab. Die Höhe des Arsenazosignals und damit die $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung ist also abhängig von der Membranspannung.

Das in den Versuchen ermittelte Umkehrpotential in PS liegt weit über dem nach Nernst berechneten Wert (145 mV bei $[Ca^{2+}]_i = 10^{-7}$ mol/l), während der gemessene Wert in erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ mit dem nach Nernst zu erwartenden (98,5 mV) gut übereinstimmt. Für die Abweichungen der Werte in PS sind verschiedene Gründe denkbar, zwischen denen jedoch nicht unterschieden werden kann:

- a) in relativ hohen $[Ca^{2+}]_a$ ($\geq$ PS) läßt sich das Verhalten der Calciumionen nicht mit einer einfachen Gleichung beschreiben.
- b) Die $[Ca^{2+}]_i$ -Abnahme, die während der Dunkeladaptation des Photorezeptors deutlich wird (Fig. 9), setzt schon während des lichtinduzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ ein und verringert die Höhe des Maximums des Arsenazosignals.
- c) Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher tragen zum Arsenazosignal bei und geben lichtinduziert Ca^{2+} ab (s. Walz, 1979).

a: Ca^{2+} lagert sich an Membranen an, stabilisiert sie und wirkt z.B. modulierend auf den Ca^{2+} -Transport in Erythrocyten- und Sarcoplasmamembranen (Carafoli, 1981). In erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ist der Einfluß der Calciumionen reduziert und der Ca^{2+} -Einstrom läßt sich mit der Nernstgleichung beschreiben.

b: Der Anstieg des Arsenazosignals entspricht einer Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Dunkeladaptation der Rezeptorzelle und wird wahrscheinlich durch einen Ca^{2+} -Transportmechanismus in der Zellmembran oder der Membran intrazellulärer Speicher hervorgerufen (s. S. 54).

Beginnt dieser Mechanismus bei Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sofort damit, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu reduzieren, so entspricht das gemessene Maximum des Arsenazosignals nicht der durch die Belichtung freigesetzten Zahl von Calciumionen. Das Maximum entspricht vielmehr der Zahl der freigesetzten Calciumionen minus den bis zum Zeitpunkt des Maximums wieder abtransportierten Ca^{2+} .

Wie in Fig. 12 zu sehen ist, hängt der Anstieg des Arsenazosignals von der Membranspannung ab, d.h. der vermutete Ca^{2+} -Transport scheint bei Membranspannungen, die größer als das PMP sind, verlangsamt und bei Membranspannungen, die kleiner als das PMP sind, erhöht zu werden.

Für einen Einfluß des Transportmechanismus auf das Maximum des Arsenazosignals spricht auch, daß bei den Versuchen in PS das Maximum bei hyperpolarisierenden Membranspannungen kürzer andauerte als bei depolarisierenden Membranspannungen; ein Effekt, der sonst nur schwer zu erklären ist.

Bei Hyperpolarisation wird $[\text{Ca}^{2+}]_i$ somit schneller reduziert als bei Depolarisation. Dadurch wird das Arsenazosignal bei hyperpolarisierenden Clampspannungen stärker beeinflusst als bei depolarisierenden. Die negative Steigung der ermittelten Regressionsgeraden für A'_{c1} ist größer (d.h. die ermittelte Regressionsgerade (Fig. 11a) verläuft zu flach) und das über die

Regressionsgerade bestimmte Umkehrpotential für Ca^{2+} -Ionen liegt zu hoch.

In erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ hat das Arsenazosignal ein sehr breites Maximum (Fig. 15). Der Anstieg des Signals setzt später ein. Das kann bedeuten, daß der Transportmechanismus hier langsamer arbeitet und das Maximum des Arsenazosignals weniger als in PS beeinflußt. Daher stimmt das über die Regressionsgeraden ermittelte Umkehrpotential für das Arsenazosignal fast mit dem nach Nernst errechneten überein. c: Die lichtinduzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch intrazelluläre Speicher sollte nicht spannungsabhängig sein. Es sei denn, die Ca^{2+} -Abgabe der Speicher wird durch den lichtinduzierten Einstrom von Ionen induziert (vgl. S.49 I).

Die in den Versuchen gemessene Abhängigkeit von A'_{Cl} von der Membranspannung schließt eine Beteiligung intrazellulärer Speicher (s. Walz, 1979) am Arsenazosignal nicht aus.

Da die Speicher, werden sie nicht vom lichtinduzierten Ioneneinstrom beeinflußt, bei jeder Membranspannung den gleichen Beitrag zum Arsenazosignal liefern können, werden die geclampten Arsenazosignale bei allen Clampspannungen um den gleichen, konstanten Betrag erhöht. Die Werte für A'_{Cl} werden parallelverschoben und der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse liegt bei zu hohen Spannungen. In reduzierter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ stimmt das ermittelte Umkehrpotential mit dem nach Nernst errechneten fast überein. Es besteht die Denkmöglichkeit, daß die intrazellulären Speicher erschöpft sind und kein Ca^{2+} abgeben, wenn sie im Austausch mit $[\text{Ca}^{2+}]_a$ stehen.

Durch Erhöhung oder Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wird das Umkehrpotential des lichtinduzierten Membranstroms in der jeweiligen Zelle größer bzw. kleiner (s. Kap. 2.2.2.1 und 2.2.3.1), wenn auch diese Veränderung nicht statistisch abzusichern ist (s. Kap. 2.2.5 und Maaz et al., 1981). Die

Verschiebung des Umkehrpotentials spricht für eine Beteiligung der Ca^{2+} -Ionen am lichtinduzierten Ionen-einstrom. Die Anzahl der Calciumionen ist jedoch vermutlich gering, im Vergleich zu der Anzahl der Na^{+} -Ionen.

Zu III. Walz (1979) beschreibt beim Photorezeptor des Blutegels *Hirudo* ein glattes endoplasmatisches Reticulum (ER), das aktiv Ca^{2+} aus dem Cytoplasma aufnehmen kann. Von der Erythrocytenmembran (Gopinath & Vincenzi, 1977; Jarret & Pennisto, 1977) und der Membran des sarcoplasmatischen Retikulums in Muskelzellen (s. Carafoli, 1981) ist ein Ca^{2+} -Transport seit längerem bekannt. Auch beim Photorezeptor von *Limulus* kann ein glattes ER beobachtet werden. Ob dort Ca^{2+} gespeichert wird, ist nicht bekannt (Schröder).

Da die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung von der Membranspannung abhängt, ist zu vermuten, daß Ca^{2+} über die äußere Membran strömt. Es kann jedoch zusätzlich zum Einstrom von Ca^{2+} durch die Zellmembran eine Beteiligung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher am Arsenazosignal nicht ausgeschlossen werden.

Wie gelangen Ca^{2+} -Ionen durch die Zellmembran des Photorezeptors?

Da zumindest ein Teil der Calciumionen, welche zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beitragen, durch die Zellmembran des Rezeptors fließt, stellt sich die Frage, durch welche Ionenkanäle Ca^{2+} gelangt.

Durch die Voltage-Clamp Experimente kann der Einstrom durch spannungsabhängige Ionenkanäle während des lichtinduzierten Ionenstroms ausgeschlossen werden. Da bei Clampspannungen, die gleich dem PMP der Zelle sind, das geclamppte Arsenazosignal A_{cl} etwa so groß ist wie das ungeclamppte A_{free} (s. Fig. 11: $A'_{cl} = 1$) kann zudem gesagt werden, daß beim ungeclampften Arsenazosignal während des Rezeptorpotentials keine größere Beteiligung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen vorhanden ist.

Für den lichtinduzierten Ca^{2+} -Einstrom bleiben zwei Möglichkeiten:

I. Ca^{2+} strömt durch die relativ unspezifischen Lichtkanäle

(Stieve, 1977) für Na^+ in die Zelle ein.

II. Lichtabhängige Calciumkanäle in der Zellmembran des Photorezeptors öffnen und Ca^{2+} strömt in die Zelle ein.

Einige Tatsachen weisen darauf hin, daß Na^+ und Ca^{2+} durch den selben Ionenkanal einströmen.

-Die Latenzzeit des Arsenazosignals liegt im gleichen Bereich wie die Latenzzeit von lichtinduziertem Membranstrom und Rezeptorpotential (Kap. 2.1.3).

-Der Membranstrom und das Arsenazosignal zeigen beide keine Sättigung bei hohen Lichtintensitäten, während das Rezeptorpotential schon sein Maximum erreicht hat (Kap. 2.2.6).

Vermutlich steigt die Anzahl der offenen Lichtkanäle noch an, während die Höhe des Rezeptorpotentials schon sättigt (Stieve & Klomfaß).

-Bei Rezeptorzellen mit großen lichtinduzierten Ionenströmen konnte häufig ein großes Arsenazosignal beobachtet werden.

Beim Tintenfischriesenaxon ist der Einstrom von Calciumionen durch einen spannungsabhängigen Natriumkanal schon seit 1970 bekannt (Baker et al., 1970; 1971; 1973; Baker, 1975). Dieser sog. "frühe" Ca^{2+} -Einstrom kann wie der Na^+ -Einstrom durch Tetrodotoxin (TTX) blockiert werden. Der Na^+ -Einstrom ist etwa 100 mal weniger permeabel für Calciumionen als für Natriumionen (Kuffler & Nicholls, 1977).

Der Acetylcholinrezeptor in Muskelzellen läßt ebenfalls eine geringe Menge Ca^{2+} passieren.

Für den Lichtkanal des Limulus-Photorezeptors ist bisher kein Kanalblocker, wie TTX für den Natriumkanal in Nervenmembranen, bekannt. Daher konnte der Ca^{2+} -Einstrom durch den Lichtkanal nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Wodurch wird der Anstieg des Arsenazosignals verursacht?

Nach der Helladaptation des Photorezeptors und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch den Lichtreiz beginnt die Dunkeladaptation, während der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf die Konzentration vor dem Lichtreiz reduziert wird.

Vermutlich wird der Anstieg des Arsenazosignals durch einen Transportmechanismus in der Zellmembran des Photorezeptors oder der Membran intrazellulärer Speicher (Zellorganelle) verursacht (s. 3.). Die Ergebnisse aus den Arsenazo-Voltage-Clamp Experimenten lassen vermuten, daß der Transportmechanismus in der äußeren Zellmembran liegt, da seine Aktivität abhängig von der Membranspannung ist (Kap. 2.2.2.2; 2.2.3.2; 2.2.4.2).

Wie in Fig. 13 zu sehen ist, wird der Anstieg des Arsenazosignals in PS durch Membranspannungen größer als das PMP der Zelle, verlangsamt; d.h. der Mechanismus transportiert weniger Ca^{2+} .

In einigen Zellen scheint er sogar, durch Clampspannungen größer als +20 bis +40 mV, umgekehrt zu werden. Das Arsenazosignal sinkt bis zum Abschalten der Clampspannung noch weiter langsam ab (Fig. 14).

Der Transport der Calciumionen wird wahrscheinlich durch eine Calciumpumpe unter ATP Verbrauch (s. Carafoli, 1981) oder durch eine Carrier, getrieben durch einen Ionengradienten über der Zellmembran, geschehen, da der Ca^{2+} -Transport gegen den Ca^{2+} -Gradienten verläuft.

Eine Calcium-ATPase, die nur Calciumionen pumpt, ist entweder unabhängig von der Membranspannung, oder wird durch Hyperpolarisation verlangsamt und durch Depolarisation beschleunigt. Ein elektrogener Transport, der wie in den hier beschriebenen Experimenten durch Hyperpolarisation beschleunigt und durch Depolarisation verlangsamt wird, muß einen Überschuß von positiven Ladungen in die Zelle hinein- (oder negative heraus-) transportieren.

Blaustein et al. (1974); Mullins & Brinkley (1975) und Mullins (1977) postulieren einen Einstrom von Na^+ -Ionen in das Tintenfischriesenaxon, der mit einem gegen den Ca^{2+} -Gradienten gerichteten Ca^{2+} -Transport aus der Zelle heraus (ohne ATP-Verbrauch) gekoppelt ist.

Vermutlich existiert ein ähnlicher Mechanismus auch beim Ventralnerv-Photorezeptor. Der Na^+ -Gradient über der Zellmembran könnte Energie für den Ca^{2+} -Transport gegen den Ca^{2+} -Gradienten liefern. Durch die Experimente wird deutlich, daß

der Transport der Ca^{2+} -Ionen elektrogen ist. Da Hyperpolarisation den Transport beschleunigt und Depolarisation ihn verlangsamt, müssen mindestens 3 Na^+ einströmen, damit ein Ca^{2+} heraustransportiert werden kann.*

Durch den Transportmechanismus gelangt wahrscheinlich pro Ca^{2+} mindestens eine positive Ladung in die Zelle. Der Transportmechanismus sollte einen schwach depolarisierenden Einfluß auf das PMP der Rezeptorzelle haben (s. Sjodin, 1980). Das durch den Transportmechanismus in die Zelle eingeströmte Na^+ kann durch die Na^+/K^+ -ATPase (s. Stieve, 1970; Lisman & Brown, 1972) wieder heraustransportiert werden.

Zeitlich hat der Transport des Ca^{2+} seine Hauptaktivität vermutlich nach dem Maximum des Rezeptorpotentials oder des Membranstroms (Fig. 9), so daß der $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Antiport kaum durch den lichtinduzierten Na^+ -Einstrom gestört werden kann. Andere Ionen wie K^+ oder Cl^- können nicht gegen Ca^{2+} ausgetauscht werden, da nur ein Ion mit positiver Ladung und einem von Außen nach Innen gerichteten Gradienten den beobachteten Effekt haben kann (Kap. 2.2.2.2). Cl^- scheidet aus, da die Zellmembran relativ permeabel für Cl^- ist (Stieve, 1977).

In den Experimenten mit erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ist der Anstieg des Arsenazosignals verlangsamt (Fig. 15). Vermutlich beeinflusst die ebenfalls reduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_a$ (verringertes lichtinduzierter Ca^{2+} -Einstrom) die Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Transportes. Zwischen den Experimenten in PS und erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ konnte im Anstieg des Arsenazosignals kein Unterschied festgestellt werden.

Zusammenfassung

Durch die Voltage-Clamp Experimente mit Arsenazoinjektion kann gesagt werden, daß lichtinduziert Ca^{2+} von außen in den Rezeptor einströmen und an der Helladaptation beteiligt ist. Ob aus intrazellulären Speichern bei Belichtung Ca^{2+} abgegeben wird, kann nicht ausgeschlossen werden (s. Fig. 24).

Die Calciumionen werden wahrscheinlich durch einen elektrogenen $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Antiport, besonders während der ersten Dunkeladaptationsphase, aus der Rezeptorzelle heraustransportiert.

*Wird nur ein Na^+ in die Zelle hinein- und gleichzeitig ein Ca^{2+} heraustransportiert, ist der Transport auch elektrogen, aber er würde wahrscheinlich durch Hyperpolarisation verlangsamt.

Literaturvergleich

Brown & Blinks (1974) führten am Ventralnerv Photorezeptor und am Balanusphotorezeptor Experimente mit intrazellulär injiziertem Aequorin durch. Aequorin bindet Ca^{2+} irreversibel und gibt dabei Lumineszenzlicht ab.

Wie bei den hier beschriebenen Experimenten, fiel auch das Aequorinsignal bei Voltage-Clamp mit steigender Clampspannung ab. Es konnte kein Umkehrpotential des Aequorinsignals gemessen werden.

Das Aequorinsignal ist in einer Lösung mit reduziertem Calcium kleiner. Es wird jedoch im Gegensatz zu den hier beschriebenen Experimenten in einer Lösung mit erhöhtem $[\text{Ca}^{2+}]_a$ größer. Das Maximum des Aequorinsignals liegt stets später als das Maximum des Rezeptorpotentials.

Brown & Blinks postulieren einen Calciumausstrom aus intrazellulären Speichern zusätzlich zu einem lichtinduzierten Calciumeinstrom über die Zellmembran.

1977 injizierten Brown et al. zum ersten mal Arsenazo in den Ventralnerv Photorezeptor.

Es wurden jedoch keine Voltage-Clamp Versuche durchgeführt. Sie stellten fest, daß die Kinetik des Anstiegs des Arsenazosignals von der Menge des injizierten Arsenazos abhängt und daß das Maximum des Arsenazosignals stets später als das Maximum des Rezeptorpotentials erreicht wird. In erniedrigtem $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wurde das Arsenazosignal kleiner, stieg jedoch in erhöhtem $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wie das Aequorinsignal (Brown & Blinks, 1974) an.

In den in Kap. 2 beschriebenen Experimenten (vgl. Stieve & Nagy, 1982) wird das Arsenazosignal in erniedrigter und erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ kleiner.

Durch Messung des Gleichlichtpegels I der Zellen im Dunkeln wurde festgestellt, daß I in erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ (im Vergleich zu PS) abnahm. Vermutlich verringert sich $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Der Ca^{2+} -Gradient über der Zellmembran in erniedrigter $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ist dadurch größer als bei konstanter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erwarten wäre. Bei Belichtung strömt weiter so viel Ca^{2+} ein, daß das Arsenazosignal nur auf ca. 65 % sinkt und nicht, wie bei einer Erniedrigung von 10 mmol/l Ca^{2+} auf 250 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten wäre, auf 2.5 %.

In erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ kann $[Ca^{2+}]_i$ durch verstärkten Ca^{2+} -Einstrom (Leckstrom oder lichtinduzierter Einstrom) ebenfalls erhöht sein. Der tatsächliche Gradient ist vermutlich kleiner als bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$.

Da das Arsenazosignal in erhöhter $[Ca^{2+}]_a$ sogar kleiner als in PS ist, scheint $[Ca^{2+}]_i$ erhöht zu werden.

In den Experimenten mit veränderter $[Ca^{2+}]_a$ von Brown & Blinks (1974) und Brown et al. (1977) wurde wahrscheinlich sofort nach dem Lösungswechsel gemessen (Stieve). In den hier beschriebenen Experimenten und den Experimenten von Maaz (1979) und Nagy & Stieve (1982) liegen zwischen dem Lösungswechsel und den Messungen ca. 30 Minuten.

Diese Zeit benötigt das Rezeptorpotential um wieder eine konstante Höhe nach dem Lösungswechsel zu erreichen.

Wird sofort nach dem Lösungswechsel gemessen, hat die $[Ca^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_a$ der Photorezeptorzelle wahrscheinlich noch kein Gleichgewicht erreicht und die Meßergebnisse können sich von den Werten nach längerer Wartezeit unterscheiden.

4. ANHANG

4.1 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Außer denlichtsensitiven Ionenkanälen findet man im Ventralnerv-Photorezeptor von Limulus zusätzlich noch spannungsabhängige Ionenkanäle.

Durch die von den Lichtkanälen während des Rezeptorpotentials hervorgerufene Membrandepolarisation können spannungsabhängige Kanäle aktiviert werden, die verstärkend oder modulierend auf das Rezeptorpotential einwirken.

Pepose & Lisman, 1978; Schmidt & Fein, 1979 und Leonhard & Lisman, 1981 fanden durch Voltage-Clamp Experimente spannungsabhängige Kaliumionenströme, die dem lichtinduzierten Natriumstrom durch die Lichtkanäle beim Rezeptorpotential entgegengerichtet sind. O'Day & Lisman (1980; 1981) beschreiben einen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen durch Depolarisation bei langen Lichtreizen.

Um den spannungsabhängigen Einstrom von Kationen (Na^+ , Ca^{2+}) im Dunkeln zu identifizieren, wurden Voltage-Clamp Experimente ohne Belichtung des Ventralnerv-Photorezeptors durchgeführt. Dazu wird die Zelle zuerst jede Minute einige Sekunden (2 bis 4 s) auf eine stark hyperpolarisierende Membranspannung geclampt (Haltepotential: -80 mV). Von diesem Haltepotential aus wird jede Minute ein Spannungssprung zu positiveren Clampspannungen (in Schritten von +10 mV) gemacht.

Dadurch werden spannungsabhängige Ionenkanäle geöffnet und es kann ein Einstrom positiver Ionen etwa 100 bis 200 ms nach dem Clampsprung beobachtet werden.*

Bei Spannungssprüngen von -80 mV auf -40 bis -20 mV war der beobachtete Einstrom besonders groß (Fig. 22). Da jedoch gleichzeitig zum Einstrom ein ebenfalls spannungs- und zeitabhängiger Ausstrom von positiven Ionen (wahrscheinlich K^+) einsetzt, kann die Höhe des Einstroms nur relativ zum Ausstrom gemessen werden (Fig. 23).

*Der Ausstrom negativer Ionen ist unwahrscheinlich, da nur Chlorionen als Ladungsträger in Frage kämen. Die Zellmembran ist aber auch im Ruhezustand permeabel für Chlorionen (Kuffler und Nicholls, 1977).

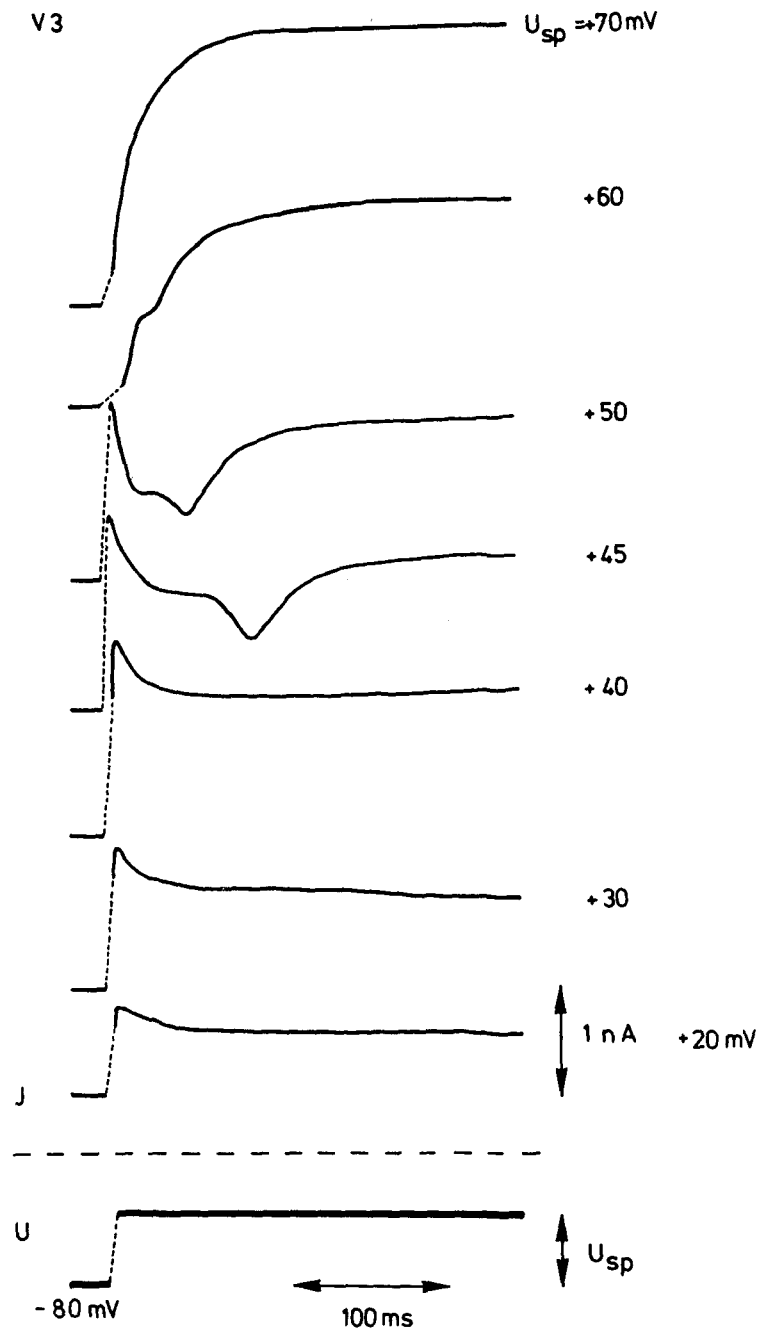


Fig. 22

Aufzeichnung des Stroms J zu Beginn des Clampsprungs U_{sp} der dem Dunkelstrom J_1 überlagert ist
 U_{sp} gibt die Größe des positiven Clampsprungs von -80 mV aus wieder.

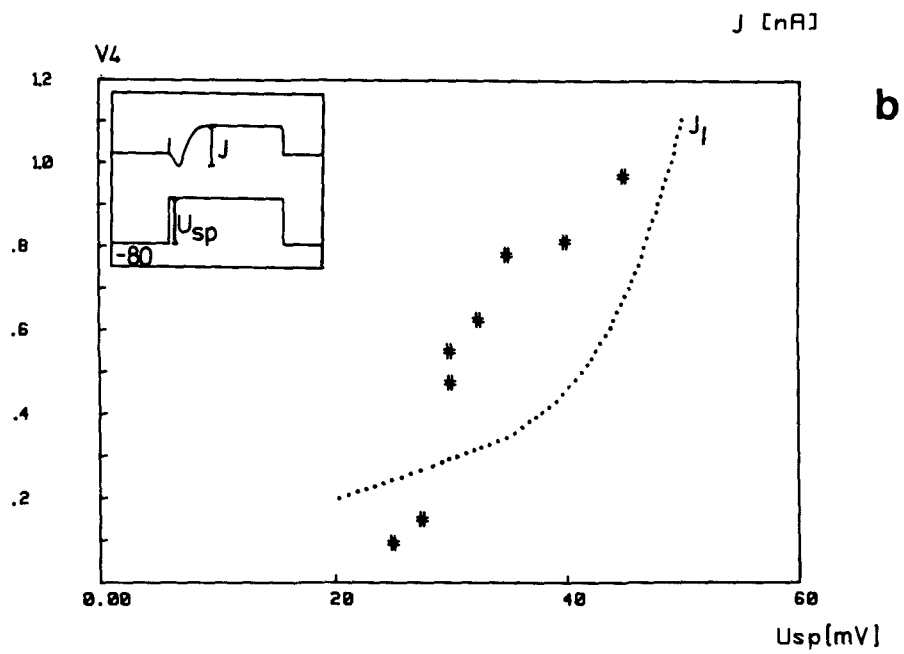
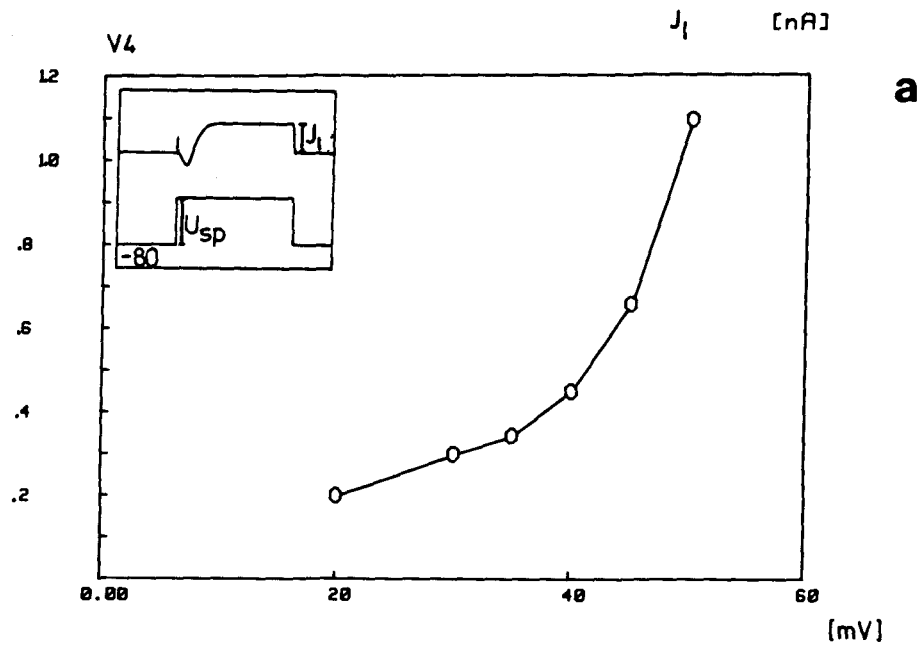


Fig. 23

- a: Dunkelstrom J_1 einer Rezeptorzelle aufgetragen gegen die positiven Clampsprünge (U_{sp}) von einem hyperpolarisierenden Haltepotential (-80 mV) aus. Der Dunkelstrom J_1 wird stets zum Ende des Clampsprungs gemessen.
- b: Einstrom positiver Ionen zu Beginn der Clampsprünge, der J_1 überlagert ist.

Fig. 23b zeigt die Höhe des Einstroms gemessen vom konstanten Dunkelstrom J_1 (Ende des Clampsprungs) in Abhängigkeit von der Höhe des Clampsprungs. Liegen die Werte des Einstroms über den Werten von J_1 , so ist der Einstrom positiver Ionen (Na^+ , Ca^{2+}) größer als der Ausstrom positiver Ionen (K^+).

Fig. 22 zeigt die Stromspuren eines anderen Versuchs bei verschiedenen Clampsprüngen.

O'Day & Lisman (1980; 1981) erwähnen einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu Beginn des Rezeptorpotentials während des, manchmal beim Rezeptorpotential auftretenden, sog. Spikes (s. Maaz, 1979 Diss.). Wahrscheinlich sind die selben Na^+ - und/oder Ca^{2+} -Ionenkanäle auch verantwortlich für die regenerativen Vorgänge (ebenfalls mit Spike bezeichnet), ausgelöst durch starke Hyperpolarisation der Zellmembran (Claßen-Linke, 1981)* (s. Fig. 12b). Die in den hier beschriebenen Experimenten durchgeführten Clampsprünge aktivieren wahrscheinlich die für den "Spike" verantwortlichen Ionenkanäle, so daß ein Einstrom positiver Ionen meßbar wird. Die Ionenkanäle sind durch Clampsprünge im selben Bereich, in dem auch der regenerative "Spike" ausgelöst wird, aktivierbar.

Der spannungssprunginduzierte Einstrom positiver Ionen und der "Spike" werden beide größer, wenn $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf 100 mmol/l erhöht wird.

In den Voltage-Clamp Experimenten mit Arsenazo III entstand durch hyperpolarisierende Clampspannungen und anschließendem Übergang zur "freien Zelle" häufig ein regenerativer Spike (s. Fig. 12b). Dabei konnte jedoch nie ein Arsenazosignal gemessen werden, das auf den spannungssprunginduzierten Einstrom von Ca^{2+} hingewiesen hätte. (Es konnten dabei maximal 8 Signale gemittelt werden.)

*Dieser "Spike" kann entweder durch Hyperpolarisation bei starker Belichtung oder durch Hyperpolarisation bei Voltage-Clamp und anschließendem Übergang zur "freien Zelle", ausgelöst werden.

Abschließende Bemerkungen:

Obwohl immer mehr Wege und Wirkungen von Calciumionen in den Photorezeptorzellen entdeckt werden (s. Fig. 24), ist ihr Eingreifen in die Vorgänge der Adaptation und Verstärkung nicht geklärt.

Ob, ähnlich wie bei Vertebraten vermutet wird, die Verstärkung und Adaptation bei Evertebraten über eine sogenannte "Enzymkaskade" unter Beteiligung von cyclischen Nucleotiden (Kühn, pers. comm.) gesteuert wird, ist nicht bekannt. Durch intrazelluläre Injektion von Enzymen oder cyclischen Nucleotiden könnte diese Frage möglicherweise beantwortet werden.

Calciumionen scheinen jedoch in den Photorezeptorzellen der Evertebraten eine größere Rolle, als in den Photorezeptorzellen der Vertebraten, zu spielen.

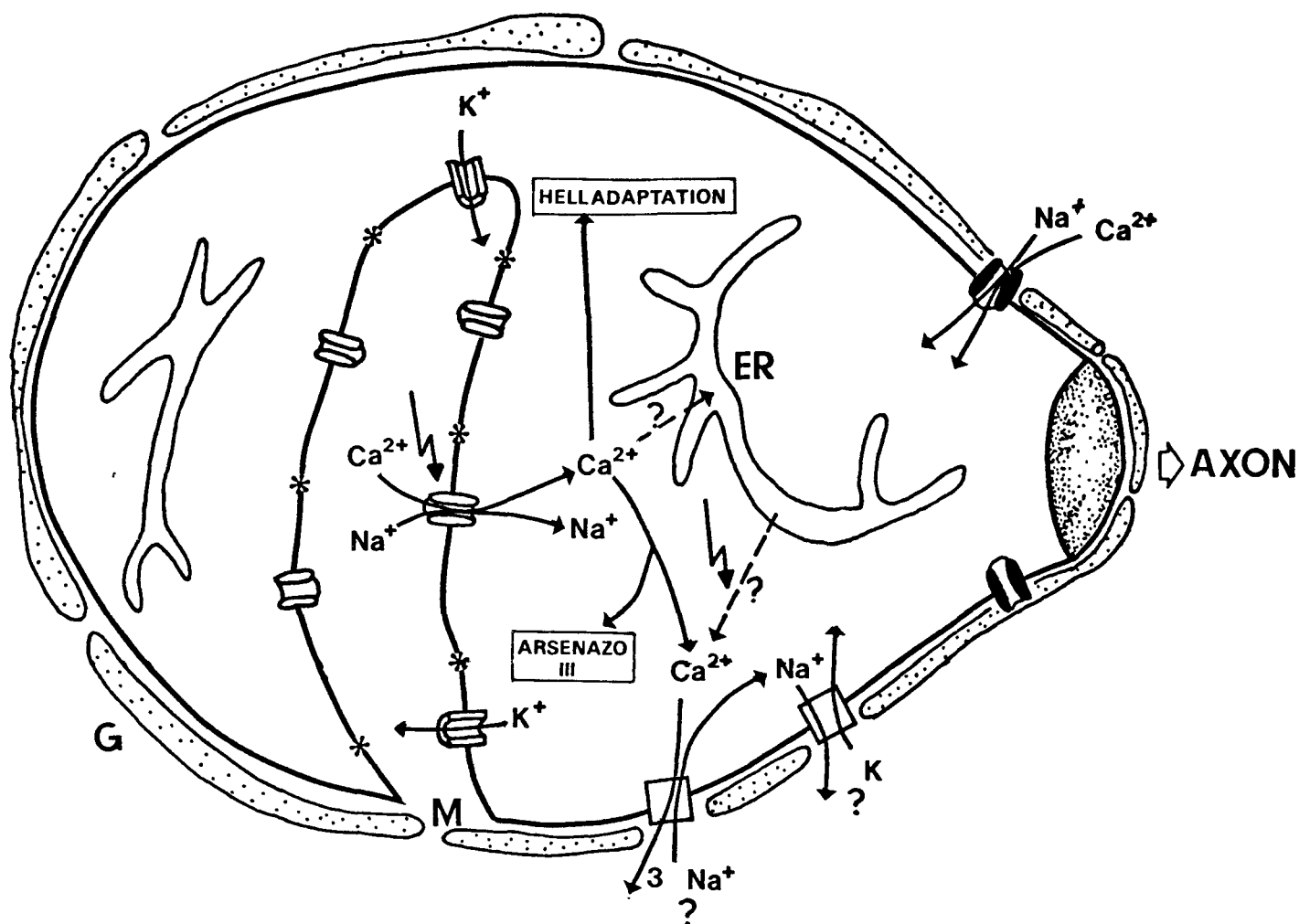


Fig. 24

Schema der möglichen Wege der Calciumionen in der Photorezeptorzelle. Abgebildet ist nur das Zellsoma (umgeben von Gliazellen), mit einer Einstülpung der Zellmembran (M = Microvillus) stellvertretend für alle Microvilli der Rezeptorzelle.

G = Gliazelle

M = Microvillus

* = Rhodopsin

 = Lichtkanal für Natriumionen (und Calciumionen ?)

 = Kaliumkanal

 = spannungsabhängiger Kanal für Na⁺ und/oder Ca²⁺ ? (möglicherweise nur am Axonhals)

 = Ionenpumpe

 = Beeinflussung durch Licht

Literaturverzeichnis

- Baker, P.F.; Hodgkin, A.L. & Ridgway, E.B. (1970)
Two phases of calcium entry during the action potential in giant axon of *Loligo*.
J. Physiol. Lond. 208, 809
- Baker, P.F.; Hodgkin, A.L. & Ridgway, E.B. (1971)
Depolarisation and calcium entry in squid giant-axons.
J. Physiol. Lond. 218, 709-755
- Baker, P.F.; Meves, H. & Ridgway, E.B. (1973)
Calcium entry in response to maintained depolarization of squid axons.
J. Physiol. Lond. 231, 527-548
- Baker, P.F. (1975)
Voltage-dependent changes in the permeability of nerve membranes to Ca^{++} and other divalent cations.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 270, 339-409
- Blaustein, M.P.; Russel, J.M., DeWeer, P. (1974)
Calcium efflux from internally dialysed squid axons: the influence of external and internal cations.
J. Supramol. Struct. 2, 558-581
- Brown, J.E. & Lisman, J.E. (1972)
An electrogenic sodium pump in *Limulus* ventral photoreceptor cells.
Journal of Gen. Physiol. 59, 720-733
- Brown, J.E. & Mote, M.I. (1974)
Ionic dependence of reversal voltage of the light response in *Limulus* ventral photoreceptors.
Journal of Gen. Physiol. Vol. 63, 337-350
- Brown, J.E. & Blinks, J.R. (1974)
Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors.
Journal of Gen. Physiol. 64, 643-665

- Brown, J.E. & Lisman, J.E. (1975)
Intracellular Ca^{2+} modulates sensitivity and
time scale in Limulus ventral photoreceptors.
Nature, Vol. 258, Nov. 20
- Brown, J.E.; Brown, P.K. & Pinto, L.H. (1977)
Detection of light-induced changes of intracellular
ionized calcium concentration in Limulus ventral
photoreceptors using Arsenazo III.
J. Physiol. 267, 229-320
- Brown, J.E. (1977)
Calcium ion, a putative intracellular messenger
for light adaptation in Limulus ventral photoreceptors.
Biophys. Struct. Mech. 3, 141
- Bauer, P.-J. (1981)
Affinity and stoichiometry of calcium binding
by Arsenazo III.
Anal. Biochem. 110, 61-72
- Carafoli, E. (1981)
Calmodulin in the membrane transport of Ca^{2+} .
Cell Calcium 2, 353-363
- Clark, A.W.; Millecchia, R. & Mauro, A. (1969)
The ventral photoreceptor cells of Limulus
I. The microanatomy.
J. Gen. Physiol. 54, 289-309
- Claßen-Linke, I. (1981)
Messungen der Hell-Dunkel-Adaptation und ihre
Beeinflussung durch die extrazelluläre Calcium-
konzentration.
Elektrophysiologische Messungen am Ventralnerv
Photorezeptor von Limulus polyphemus.
Dissertation, RWTH Aachen
- Chiv, V.C.K. & Haynes, D. (1980)
The pH dependence and the binding equilibria
of the calcium indikator - Arsenazo III.
Membrane Biochem. 3 (3)

- Dorogi, P.L.; Moss, K.; Neumann, E. & Chang, H.W. (1981)
Spectroscopic determination of reaction stiochiometry
and equilibrium constants of metallochromic indicators III.
Antipyrilazo III complexing with Ca^{2+} and acetylcholine
receptor protein.
Biophys. Chem.
- Fein, A. & DeVoe, R.D. (1973)
Adaptation in the ventral eye of *Limulus* is
functionally independent of the photochemical
cycle, membrane potential, and membrane resistance
J. Gen. Physiol. 61, 273-289
- Fein, A. & Lisman, J.E. (1975)
Localized desensitization of *Limulus* photoreceptors
produced by light or intracellular calcium ion
injection.
Science, 187
- Fein, A. & Charlton, J.S. (1977b)
Increased intracellular Sodium mimics some but
not all aspects of photoreceptor adaptations in the
ventral eye of *Limulus*.
J. Gen. Physiol. 70, 601-620
- Fein, A. & Charlton, J.S. (1977)
A quantitative comparison of the effects of
intracellular calcium injection and light adaptation
on the photoresponse of *Limulus* ventral photoreceptors.
J. Gen. Physiol. 70, 591-600
- Gopinath, R.M. & Vincenzi, F.F. (1977)
Biochem. Biophys.
Res. Commun., 1203-1209
- Hagiwara, S. & Bayerly, L. (1981)
Calcium Channel.
Ann. Rev. Neurosci. 4, 69-125
- Jarrett, H.W. & Pennisto, J.T. (1977)
Biochem. Biophys.
Res. Commun., 1210-1216

- Kendrick, N.C. (1976)
Purification of Arsenazo III, a Ca^{2+} -sensitive dye.
Anal. Biochem. 83, 433
- Kendrick, N.C.; Ratzlaff, R.W. & Blaustein, W.P. (1977)
Arsenazo III as an indicator for ionized calcium in physiological salt solutions:
Its use for determination of the $\text{CaA} + \text{P}$ dissociation constant.
Anal. Biochem. 83, 433-450
- Kragie, A.L. & Connor, J.A. (1980)
Stoichiometry and apparent dissociation constant of the calcium-Arsenazo III reaction under physiological conditions.
Biophys. J. 32, 307-320
- Kuffler, S.W. & Nicholls, J.G. (1977)
From neuron to brain.
Sinauer associates, INC, publishers: Sunderland, Massachusetts, 106-131
- Leonhard, R.J. & Lisman, J.E. (1981)
Light modulates voltage-dependent potassium channels in Limulus ventral photoreceptors.
Science, Vol. 212
- Lisman, J.E. & Brown, J.E. (1972)
The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of Limulus ventral photoreceptors.
J. Gen. Physiol. 59, 701-719
- Lisman, J.E. & Brown, J.E. (1975)
Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in Limulus ventral photoreceptors.
J. Gen. Physiol. 66, 489-506
- Lisman, J.E. (1976)
Effects of removing extracellular Ca^{2+} on excitation and adaptation in Limulus ventral photoreceptors.
Biophys. Journ. 16

Maaz, G. (1979)

Simultane Messungen von lichtinduzierten Membranpotentialänderungen und Calciumkonzentrationsänderungen in einzelnen Lichtsinneszellen.
Elektrophysiologische und mikrophotometrische Messungen am Ventralnerv Photorezeptor von *Limulus polyphemus*.
Dissertation, RWTH Aachen

Maaz, G. & Stieve, H. (1980)

The correlation of the receptorpotential with the light induced transient increase in intracellular calcium concentration measured by absorption change of Arsenazo III injected into *Limulus* ventral nerve photoreceptor cell.
Biophys. Struct. Mech. 6, 161-208

Maaz, G.; Nagy, K.; Stieve, H. & Klomfaß, J. (1981)

The electric light response of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor, a superposition of distinct components observable by variation of the state of light adaptation.
J. comp. Physiol. 141, 303-310

Michaylova, V. & Illkova, P. (1971)

Photometric determination of micro amounts of calcium with Arsenazo III.
Anal. Chim. Acta 53, 194

Miledi, R.R.S. & Parker, I. (1981)

Calcium transients recorded with Arsenazo III in the presynaptic terminals of the squid giant synapse.
Proc. R. Soc. Lond. B2 12

Millecchia, R. (1969)

The ventral photoreceptor of *Limulus*: An electrophysiological study.
Thesis, Rockefeller Univ. New York,

Millecchia, R. & Mauro, A. (1969)

The ventral photoreceptor cells of *Limulus*. III. A voltage-clamp study.
J. Gen. Physiol. 54, 331-351

- Nagy, K. & Stieve, H. (1982)
Intracellular calcium concentration change in
Limulus photoreceptors measured by Arsenazo III
Dark adaptation and voltage clamp study.
in Vorbereitung
- Mullins, L.J. & Brinkly, F.J. jr. (1975)
Sensitivity of calcium efflux from squid axons
to changes in membrane potential
J. Gen. Physiol. 65, 135-152
- Mullins, L.J. (1977)
A mechanism for Na/Ca transport.
J. Gen. Physiol. 70, 681-695
- O'Day, P.M. & Lisman, J.E. (1980)
Activation of a voltage-dependent calcium
conductance by depolarization produces light-
adaptation in Limulus ventral photoreceptors.
Aus: Abstract-Buch, Ann. Spring Meeting, ARVO, Orlando
- O'Day, P.M. & Lisman, J.E. (1981)
The influence of voltage-dependent conductance on
the receptor potential in Limulus ventral
photoreceptors.
Aus: Abstract-Buch, Ann. Spring Meeting, ARVO, Sarasota
- Pepose, J.S. & Lisman, J.E. (1978)
Voltagesensitive potassium channels in Limulus
ventral photoreceptors.
J. Gen. Physiol. 71, 110-120
- Russel, J.T. & Martonosi, A.N. (1978)
The influence of pH on the absorption spectrum of
Arsenazo III.
Biochim. et Biophys. Acta, 544, 418-429
- Savvini, S. (1961)
Analytical use of Arsenazo III. Determination of
thorium, Circonium, Uranium and rare earth elements.
Talanta 8, 673

- Scarpa, A.; Brinley, F.J.; Tiffert, T. & Dubyak, G.R. (1978)
Metallochromic indicators of ionized Ca^{++} Calcium
Transport and Cell function.
AVY AA 9, 307, 86-113
- Sjodini, R.A. (1980)
Contribution of Na/Ca transport to the resting
membrane potential.
J. Gen. Physiol. 76
- Schmidt, J.A. & Fein, A. (1979)
Effects of calcium blocking agents and phospho-
diesterase inhibitors on voltage-dependent
conductances in Limulus photoreceptors.
Brami Rex. 176, 369-374
- Schröder, W.
pers. comm.
- Stieve, H. (1970)
Die Bedeutung der Ionenpumpe für das Rezeptorpotential
der Lichtsinneszelle.
Verh. Deutsch. Zool. Ges. 64. Tagung, Gustav Fischer Verl.
- Stieve, H. & Pflaum, M. (1974)
Lowering the ratio of extracellular calcium to
sodium mimics the effect of light on the photo-
sensory membrane of Limulus ventral nerve photo-
receptor.
Vision Research, 18
- Stieve, H. (1976)
On the influence of calcium ions on the properties
of the Arthropod photoreceptor cell membrane-
experiments on Crayfish and Limulus visual cells.
Biochem. and Bioenerg. 3
- Stieve, H. (1977)
On the mechanism of conductance control of the arthropod
visual cell membrane.
Biophys. Struct. Mech. 3, 145-151

- Stieve, H.; Breuer, H.; Bruns, M. & Gaube, H. (1978)
 The receptor potential in dependence of the intracellular calcium, magnesium, and sodium concentration.
 Interner Bericht, KFA-INB-JB-2/78
- Stieve, H. & Pflaum, M. (1978)
 The response light versus stimulus intensity curve of the ventral nerve photoreceptor of *Limulus* depending on adaptation and external calcium concentration.
 Letter to the editors.
 Vision Research 18, 747-749
- Stieve, H. & Bruns, M. (1980)
 Die Empfindlichkeitsänderung des ventralen Photorezeptors von *Limulus* bei Helladaptation in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.
 Verh. Dtsch. Zool. Ges. 369, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Stieve, H. (1981)
 Roles of calcium in visual transduction in invertebrates.
 in: Sense Organs (ed. M.S. Laverack, D.J. Cosens), Blackie and Son Ltd., Glasgow and London, 163-185
- Stieve, H.
 pers. comm.
- Stieve, H. & Klomfaß, J.
 pers. comm.
- Thomas, M.V. & Gorman, A.L.F. (1978)
 Changes in the intracellular concentration of free calcium ions in a pace-maker neurone, measured with the metallochromic indicator dye Arsenazo III.
 J. Physiol. Lond. 275, 357-376
- Thomas, M.V. (1979)
 Stoichiometry of the calcium-arsenazo III complex.
 in: Detection and measurement of the free Ca^{2+} in cells. Ed.: Ashley, C.C. & Campbell, A.K.
 Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amst. 309-318

- Tillotson, D. & Gorman, A.L.F. (1980)
Non-uniform Ca^{2+} -buffer-distribution in a nerve
cell body.
Nature Vol. 286
- Walz, B. (1979)
Subcellular calcium localization and ATP-dependent
 Ca^{2+} -uptake by smooth endoplasmatic reticulum in a
invertebrate photoreceptor cell. An ultrastructural
cytochemical and x-ray microanalytical study.
Europ. Journal of Cell Biol. 20, 83-91
- Kühn H.
pers. comm.
- Wulff, V. & Fahy, J.L. (1979)
Influence of calcium on the Limulus photoreceptor
potential.
Brain Res. Bull. 4, 809-818

Herrn Prof. H. Stieve danke ich für die anregenden Diskussionen und die Betreuung dieser Arbeit. Allen Mitarbeitern des Institutes für Neurobiologie, besonders Frau Bruns, Herrn Backbier, Herrn Erkens, Herrn Klomfaß und Frau Claßen-Linke danke ich für ihre Unterstützung.