



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

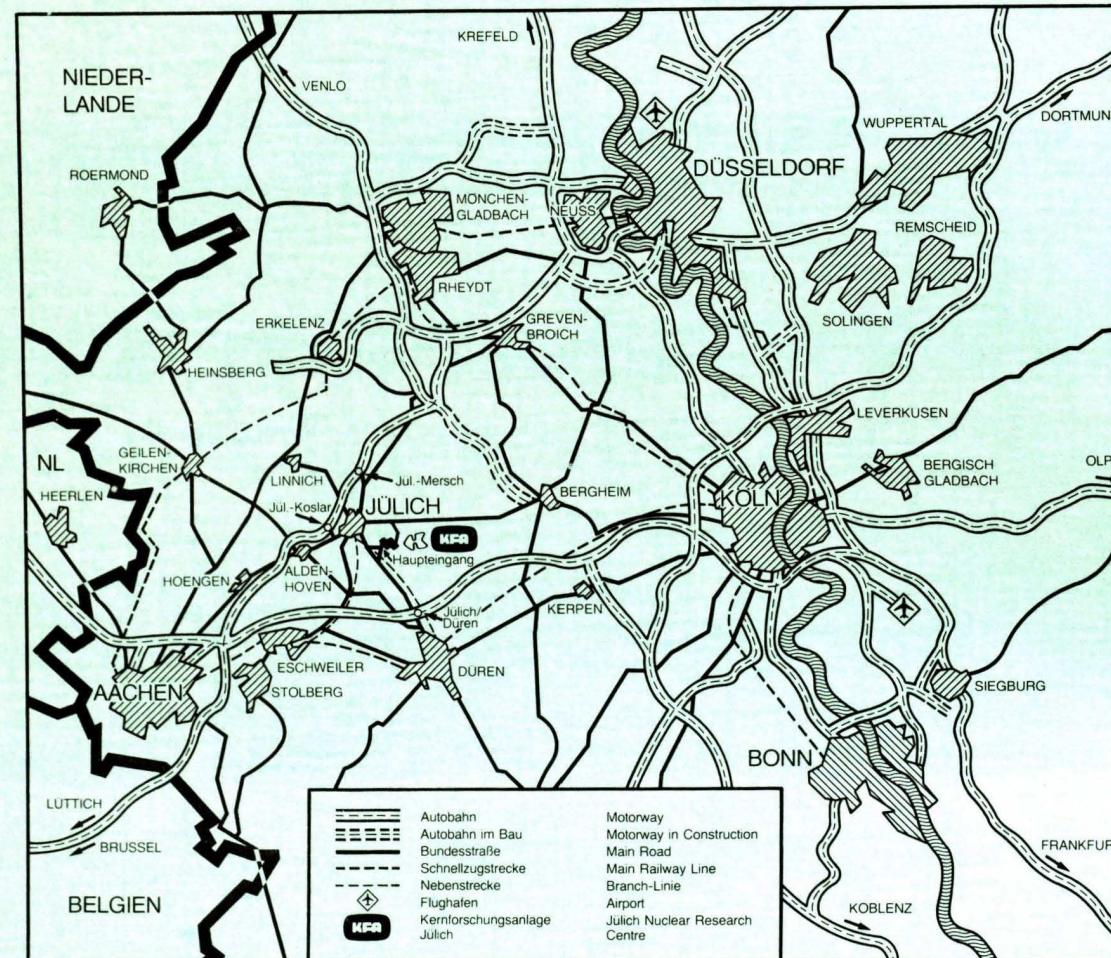
Institut für Neurobiologie

**Wechselwirkung
zwischen Kalzium-Haushalt
und Schirmpigmentwanderung
untersucht an den
Photorezeptorzellen des
Astacus Leptodactylus**

von

S. Antony

Jül-1944
August 1984
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1944
 Institut für Neurobiologie Jül-1944

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 19 13 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Wechselwirkung
zwischen Kalzium-Haushalt
und Schirmpigmentwanderung
untersucht an den
Photorezeptorzellen des
Astacus Leptodactylus**

von

S. Antony

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Vorwort	I
Abkürzungen	II
Summary	III
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Schirmpigmentwanderung	1
1.2. Mechanismus der Schirmpigmentwanderung	2
1.3. Regulation der Schirmpigmentwanderung	2
1.4. Fragestellung	3
1.5. Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} - Konzentration	4
1.6. Ca-Kanal-Blocker	4
2. <u>Material</u>	5
2.1. Chemikalien	5
2.2. Lösungen	7
2.3. <u>Centruoides noxius</u> -Toxin	9
2.4. Versuchsobjekte	10
2.4.1. <u>Astacus leptodactylus</u>	10
2.4.2. <u>Electrophorus electricus</u>	10
2.4.3. <u>Bufo marinus</u>	11

	<u>Seite</u>
3. <u>Methoden</u>	12
3.1. Entwässerung und Einbettung	12
3.2. Untersuchung der Wirkung von Vinblastin und Cytochalasin B sowie unterschied- licher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentra- tionen auf die Schirmpigmentwanderung	12
3.3. Untersuchung der Wirkung des Colchicins auf die Schirmpigmentwanderung	15
3.4. Untersuchung der Wirkung des Adapta- tionszustandes auf die Ca^{2+} -Pufferfunk- tion des Schirmpigments	17
3.5. Kopplung der Marker an Antikörper	17
3.5.1. Kopplung von Peroxidase an die spezi- fischen Antikörper	17
3.5.2. Kopplung von Ferretin an anti-Kaninchen IgG	20
3.6. Markierung des Toxinbindungsortes	23
3.6.1. Lokalisierung mittels HRP-AK am <u>Astacus</u>	25
3.6.2. Lokalisierung mittels F-AK am <u>Astacus</u>	27
3.6.3. Lokalisierung mittels HRP-AK am Aal	28
3.6.4. Lokalisierung mittels F-AK am Aal	30
3.6.5. Lokalisierung mittels HRP-AK an <u>Bufo</u> <u>marinus</u>	31
3.6.6. Lokalisierung mittels F-AK an <u>Bufo</u> <u>marinus</u>	32
3.7. Untersuchung der Wirkung der Skorpion- toxinfraktion FII-9 auf die Ca^{2+} -Puf- ferfunktion des Schirmpigments	34
3.8. Untersuchung der Wirkung der Skorpion- toxinfraktion FII-9 auf die Schirmpig- mentwanderung	34

	<u>Seite</u>
4. <u>Ergebnisse</u>	36
4.1. Morphologie des <u>Astacus</u> -Auges	36
4.2. Mechanismus der Schirmpigmentwanderung	39
4.3. Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Schirmpigmentwanderung	45
4.3.1. Dunkeladaptation	45
4.4. Wirkung des Adaptationszustandes der Schirmpigmente auf ihre Ca^{2+} -Pufferfunktion	48
4.5. Einfluß des Skorpiontoxins auf Ca^{2+} -Kanäle	50
4.5.1. Ca-Kanal-Blocker	50
4.5.2. Untersuchung des Toxin-Bindungsortes	52
4.5.3. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, an Stäbchen der Vertebraten-Retina (<u>Bufo marinus</u>)	57
4.5.4. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, am elektrischen Organ des elektrischen Aals (<u>Electrophorus electricus</u>)	62
4.5.5. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, in der Photorezeptorzelle von <u>Astacus</u>	70
4.6. Der Einfluß des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, auf die Ca^{2+} -Pufferfunktion der Schirmpigmente bei <u>Astacus</u>	73
4.7. Der Einfluß des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, auf die Schirmpigmentwanderung bei <u>Astacus</u>	75

	<u>Seite</u>
5. <u>Diskussion</u>	78
6. <u>Elektronenmikroskopische Abbildungen</u>	
- Anhang -	82
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	91

Vorwort

In dieser Arbeit dargestellte Messungen mit dem LAMMA-Gerät sind von Herrn Dr. Schröder (INB, KFA Jülich) durchgeführt worden. Die verwendeten gereinigten Toxinfraktionen und deren Antikörper stammen von Herrn Prof. Dr. Possani (Universidad Nacional Autonoma de Mexico) und Herrn Prof. Dr. Maelicke (Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund).

II. Abkürzungen

Ca	=	Kalzium
C.n.	=	<u>Centruoides noxi</u> s
HRP-AK	=	Peroxidase-gekoppelte Antikörper
F-AK	=	Ferretin-gekoppelte Antikörper
LAMMA	=	Laser Microprobe Mass Analyser
PBS	=	Phosphat-Buffered Saline
DAB	=	3,3' Diaminobenzidin * 4 HCl
SPI	=	Schirmpigmentindex

Summary:

In the compound eye of the crayfish, Astacus leptodactylus, adaptation to light and darkness involves massive redistribution of screening pigment granules within the cell of the photoreceptor. Apparently, the function of the pigment granules is to control the light flux in the photoreceptor, analog to the pupil mechanism of vertebrates. The explanation for this intracellular organelle transport and for the mechanisms that participate in the control of these pigmentary responses are to a large degree controversial.

The purpose of this paper was to determine which mechanism is responsible for the pigment granula transport and secondly to investigate the dependence of the screening pigment migration in the Astacus photoreceptor cells on the Ca-household.

Mechanism of the pigment granula transport

To determine whether cytoskeletal structures commonly thought of as involved in cell motility could bear a relationship to the pigment migration, two mitotic agents, Colchicine and Vinblastine, different in their proposed mode of action on microtubules, were tested for their effect on the movements of pigment granules. Although a partial blockage of the dark adaptation was caused by these two poisons, they had no effect on the normal light-induced response (light-adaptation) in previously dark-adapted eyes.

Cytochalasin B, a microfilament poison, was also tested for its effect on the pigment movement. It was found to have no effect on the pigment migration which occurred normally in both directions.

Ionic dependence

The interaction of the Ca-household with the screening pigment movement was first studied by varying the Ca-concentration in the bathing solution in which the isolated retina were light or dark adapted.

The pigment aggregation that normally occurs in the dark was inhibited by low (10^{-6} , 10^{-7} mmol/l) as well as by high (30 - 150 mmol/l) Ca ion concentrations.

The pigment dispersion induced by light is inhibited by low Ca ion concentrations (10^{-6} , 10^{-7} mmol/l) and is favoured in the presence of high calcium (30 - 150 mmol/l).

For a better understanding of the Ca-effect described above, the use of a Ca-channel-blocker seemed advisable. The FII-9 component of the poison Centruoides noxi was tested for its use as possible specific Ca-channel blocker. Because the biochemistry of the vertebrate cells is better known than that of the invertebrates, the binding site of the toxin was first localized in the electric organ (main organ) of the electric eel (Electrophorus electricus) and in the photoreceptor cells of the toad (Bufo marinus). Labelled antibodies (labelled with ferretin or horseradish peroxidase) were used to mark the distribution of the antigen (FII-9). In both cases, the toxin was found to bind in regions which are known to contain Ca-channels.

In the photoreceptor cells of the toad the toxin binds to the disc membrane of rod outer segments. In the electric organ (main organ) of the electric eel it was found that the FII-9 toxin binds to the synaptic vesicles and cisternae of the synapse.

The results of these experiments suggest that the FII-9 toxin is a possible Ca-channel blocker, a definite statement is not possible as the studies were not done on a molecular basis. With the presumption that this toxin actually acts on the Ca-channel, further studies were done with the photoreceptor cell of the crayfish.

In the first step, the binding site was localized. It was found that the membrane of the screening pigment granula contains binding sites for the FII-9 toxin. In the second step, the effect of this polypeptide on the Ca-buffering function of the screening pigment was studied.

After treatment with the toxin, isolated retina were incubated in $^{44}\text{Ca}^{+}$ physiological solutions. (In the control experiments the toxin step was omitted.) Results showed the ^{44}Ca -content of the toxin treated pigment to be less than in the control pigment. The toxin treated pigment contained about 50 % less ^{44}Ca than the control pigment.

The effect of the toxin on the screening pigment movement was then studied. It was determined that the pigment aggregation (dark adaptation) was inhibited by this toxin, although the light adaptation remained unaffected.

I suggest that a microtubule system is responsible for the dark adaptation. Ca-ions regulate the assembly or disassembly of this system. High calcium ion concentrations (which accompany for example the light response) cause a disassembly of the microtubules (which hold the pigment in a dark adapted state). This leads to a movement of the pigment to the light adapted state. Low Ca concentrations (dark adapted conditions) allow an assembly of this system and a movement of the pigment to the basal end of the cell.

1. Einleitung

1.1. Schirmpigmentwanderung

In den Photorezeptoren von Astacus ist die Hell- bzw. Dunkeladaptation verknüpft mit der Wanderung der Schirmpigmentgranula (distale Retinulapigmente) im Cytoplasma der Retinulazellen. Diese Bewegung wirkt anscheinend wie eine Art Pupille, entsprechend dem Pupillenmechanismus der Vertebraten (Vogt, 1980). Bei geringer Lichtintensität wird die optische Isolierung der einzelnen Augenkeile durch Pigmentwanderung aufgehoben. Es fallen mehrere, von verschiedenen Kristallkegeln entworfene Bilder eines bestimmten Objektpunktes auf ein und dasselbe Rhabdom. So kann durch Variation der Position der Pigmentgranula der auf die Rhabdome einfallende Lichtfluß reguliert werden. Diese Umverteilung der Pigmente ist direkt an der Augenfarbe des Tieres (rot bei dunkeladaptierten und schwarz bei helladaptierten Augen) erkennbar. Diese Erscheinung wird als "Pseudopupille" bezeichnet.

In Längsschnitten durch die Photorezeptorzelle sind sowohl im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop beim helladaptierten Auge die Schirmpigmente um die Retinulazellkerne deutlich zu sehen, bei den dunkeladaptierten Tieren sind die Schirmpigmente in der Gegend der Basalmembran zu beobachten.

1.2. Mechanismus der Schirmpigmentwanderung

Der Mechanismus der Schirmpigmentwanderung ist noch unbekannt. Von einigen anderen Zellen ist bekannt, daß Mikrotubuli- bzw. Mikrofilamente an der Bewegung von Pigmentgranula beteiligt sind (Mikrotubuli beim Killifisch, Fundulus heteroclitus; Bickle et al., 1966; Wikswo und Novales, 1972; Mikrofilamente in der Froschretina: Malawista, 1971).

Um zu entscheiden, ob ein Mikrotubuli- bzw. Mikrofilamentsystem auch hier eine Rolle spielt, sollen die Wirkungen der Mikrotubuli-Gifte Vinblastin und Colchicin sowie des Mikrofilament-Gifts Cytochalasin B auf die Pigmentwanderung untersucht werden.

1.3. Regulation der Schirmpigmentwanderung

Welche molekularen Mechanismen an der Kontrolle dieser Pigmentantwort beteiligt sind, ist kaum bekannt. Einige Autoren nehmen an, daß die Wanderung der Schirmpigmente in den Photorezeptoren von Krustaceen (Palaemonetes, Orconectes und Cambarus) unter humoraler Kontrolle steht (Welsh, 1939; Fingerman et al., 1962). Dies kann jedoch nicht allein zutreffen, da Versuche an isolierten Krustaceen-Retinen (Procambarus) überzeugende Beweise dafür liefern, daß die Schirmpigmente direkt auf Licht reagieren können (Olivio und Chrismer, 1980; Arechida, 1977; Frixione et al., 1979).

Bei der Fliege haben einige Autoren (Kirschfeld und Vogt, 1980; Stavenka, 1971) angedeutet, daß die Wanderung der Schirmpigmente durch eine Komponente der norma-

len Lichtantwort der Photorezeptorzelle ausgelöst wird. Um welche Komponente es sich handelt, ist bisher nicht eindeutig beantwortet. Kirschfeld und Vogt (1980) nehmen an, daß Kalziumionen die Pigmentwanderung regulieren.

Obwohl der Mechanismus der Pigmentwanderung bei der Fliege und bei Krustaceen sicher verschieden ist (Stavenga und Kujper, 1977), wird auch bei Krustaceen (Procamberus clarkii) die Regulation der Pigmentwanderung den Kalziumionen zugeschrieben. Nach dieser Hypothese soll Kalzium entweder ein Transportsystem aktivieren oder den Abbau eines existierenden Mikrotubuli-systems bewirken (Olivio und Larsen, 1978).

Dies scheint nicht unwahrscheinlich zu sein, da Ca-Ionen an der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt sind (Yoshikami und Hagins, 1971). So reguliert Ca^{2+} z.B. die Freisetzung des synaptischen Transmitters bei Vertebraten (Katz, 1969), die Membranpermeabilität für K-Ionen (Hagiwara und Byerly, 1981) sowie die Einstellung der Empfindlichkeit der Evertrebraten-Photorezeptoren (Stieve und Classen-Linke, 1980). Hinzu kommt, daß bei Belichtung die interne freie Ca-Ionen-Konzentration in den Photorezeptorzellen von Evertrebraten ansteigt.

1.4. Fragestellung

Ziel der Untersuchung war es, zu klären: Welche Faktoren beeinflussen die Regulation der Schirmpigmentwanderung bei Astacus leptodactylus, und gibt es eine Wechselwirkung zwischen dem Kalzium-Haushalt und der Wanderung der Schirmpigmente.

1.5. Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Um diese Fragen zu beantworten, soll zuerst untersucht werden, ob unterschiedliche extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (in der Inkubationslösung) einen Einfluß auf die Schirmpigmentwanderung haben.

1.6. Ca-Kanal-Blocker

Um einen spezifischen Ca^{2+} -Effekt näher untersuchen zu können, wäre die Anwendung eines spezifischen Ca^{2+} -Kanal-Blockers notwendig. Es ist bekannt, daß Skorpion-Toxine als Neurotoxine spezifisch an Ionenkanälen wirken. Es erschien aussichtsreich, das Gift Centruoides noxius zu untersuchen. Die FII-10-Komponente des Toxins "Centruoides noxius Hoffman" bindet spezifisch an die spannungs-abhängige Komponente des Natriumkanals an dem Riesen-Axon von Loligo vulgaris. Die FII-11-Komponente bewirkt eine spezifische Reduzierung der Permeabilität des Kaliumflusses, ohne die spannungsabhängige Aktivierungs-Inaktivierungskinetik zu beeinflussen (Carbone et al., 1982). Die FII-9-Komponente macht die größte toxische Komponente dieses Gifts aus (Possani et al., 1981). Ihre Wirkung ist noch unbekannt. Hier sollte untersucht werden, ob die FII-9-Komponente einen Einfluß auf Kalzium-Kanäle hat, um die Annahme von Olivio und Larsen (1978) weiter zu überprüfen, daß Ca^{2+} die Schirmpigmentwanderung beeinflusst.

2. Material

2.1. Chemikalien

Äthanol: Merck pA

$^{44}\text{CaCl}_2$: Rohstoff-Einfuhr und Handels-
gesellschaft, Düsseldorf
 $^{44}\text{CaCl}_2$ wurde aus $^{44}\text{CaCO}_3$ hergestellt
$$^{44}\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCl} \longrightarrow ^{44}\text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$$

Lösung I

Lösung I wurde gefriergetrocknet, der
Rückstand wurde in Aqua bidest gelöst.

CNBr-Sepharose 4B: Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg

Colchicin: Sigma Chemie GmbH, München

Cytochalasin B; B grade: Calbiochem GmbH, Gießen

3, 3' Diaminobenzidin * 4 HCl (DAB), reinst.: Serva
Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

Einbettungslösung: 550 ml Dodecenylnbernsteinsäure-
anhydrid, Serva
250 ml Epon 812, Serva
200 ml Araldit Cy 212, Serva

1000 ml Stammlösung

Vor Gebrauch wurden 1,5 % (Gewicht-
prozent) an 2,4,6 Tri (dimethyl-
aminomethyl)phenol zugegeben, Serva

Goat Anti-Rabbit IgG (H + L Chain specific):
Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Ferretin, EM Grade: Polysciences Inc. Vertrieb über
Paesel KG, Frankfurt/M.
Ein großer Vorteil des von Polysciences hergestellten Ferretins ist, daß es ohne weitere Reinigung verarbeitet werden kann. Vor dem Einsatz wurde der Zustand des Ferretins untersucht, indem ein Tropfen der Lösung unter dem Elektronenmikroskop überprüft wurde (siehe Abb. 1).

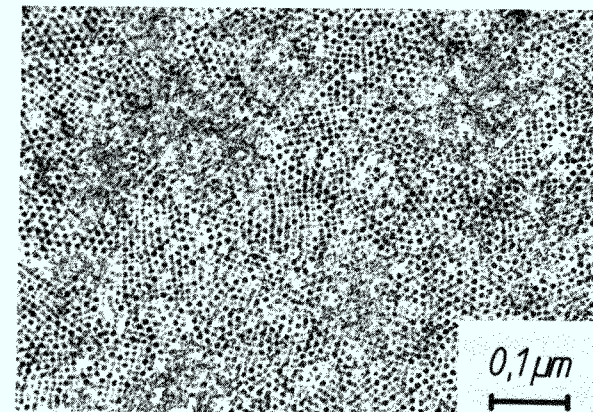


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Ferretin

Formaldehyd (35 %), pA: Merck

Glutaraldehyd (25 %), reinst.: Serva

Osmiumtetroxid: Merck

Peroxidase: Boehringer, Mannheim

Protein A gekoppelte Seharose 4B: Deutsche
Pharmacia GmbH

Propylenoxid, reinst.: Serva

Thomapor Dialyse Schläuche "Rapid" aus regenerierter
Cellulose, Trenngrenze 10 - 15,000: Reichelt Chemie-
technik GmbH & Co., Heidelberg

Uranylacetat: Merck

Vinblastin sulfat, krist., rein: Serva

2.2. Lösungen

Aal-Puffer: pH 7,0

KH ₂ PO ₄	116	mmol/l
KCl	5	mmol/l
MgCl ₂	0,1	mmol/l
NaCl	60	mmol/l

Na-Phosphat-Puffer: pH 7,2

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	100	mmol/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100	mmol/l

Frosch-Ringer:

NaCl	106	mmol/l
KCl	2,5	mmol/l
NaHCO_3	0,13	mmol/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,5	mmol/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,8	mmol/l
Glucose	5,6	mmol/l
Hepes	3,0	mmol/l

van Harreveld + Iris: pH 7,1

MgCl_2	3,0	mmol/l
KCl	5,0	mmol/l
CaCl_2	10,0	mmol/l
NaCl	203,3	mmol/l
Iris	10	mmol/l

Phosphat-Buffered Saline (PBS): pH 7,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8,1	mmol/l
NaCl	136,89	mmol/l
KCl	2,68	mmol/l
KH_2PO_4	1,47	mmol/l

2.3. *Centruoides noxi*-Toxin

Das Gift des Skorpions *Centruoides noxi* wurde an einer Sephadex G-50-Säule in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Die zweite Fraktion (FII) wurde als der toxische Teil des Gesamtgiftes charakterisiert (Abb. 2).

Diese zweite Fraktion (FII) wurde weiter aufgetrennt durch CM 32-Ionenaustausch-Chromatographie. So konnte die Fraktion (FII) in 14 weitere Unterfraktionen (FII-1 bis FII-14) aufgeteilt werden. Diese Reinigung erfolgte durch Herrn Professor Possani und Mitarbeiter (Abb. 3). Die FII-Fraktion und die Unterfraktion FII-9, sowie deren entsprechende Antikörper wurden bei der vorliegenden Arbeit verwendet. Diese Antikörper wurden durch Impfung von Kaninchen mit dem Toxin gewonnen.

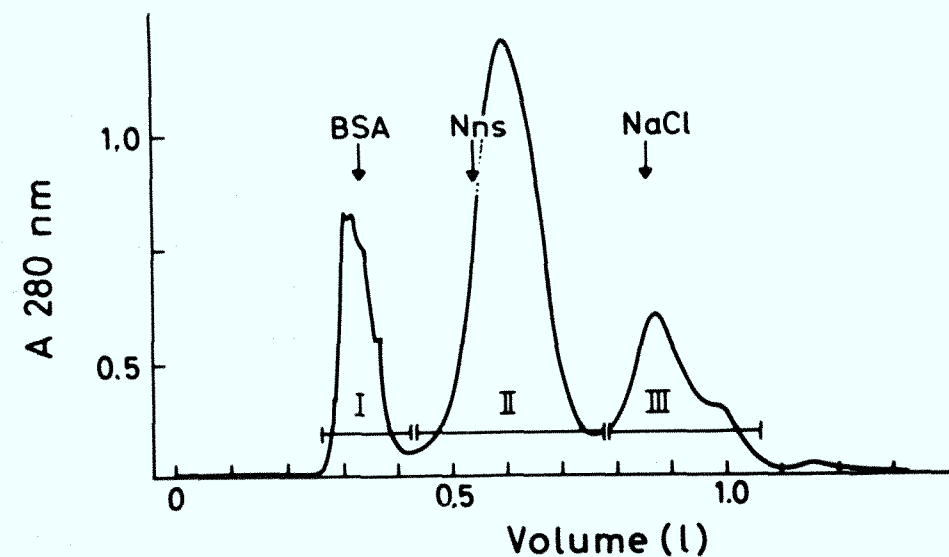


Abb. 2: Trennung des Giftes *Centruoides noxi* an einer Sephadex G-50-Säule. FI und FIII beinhalten die nicht toxischen Polypeptidkomponenten. FII ist die toxische Fraktion (nach Possani et al., 1981).

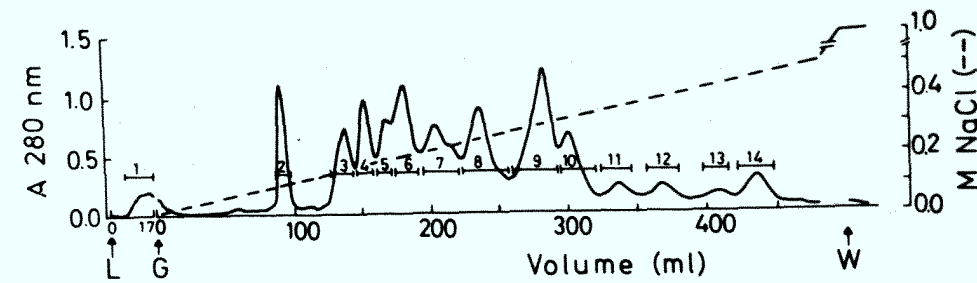


Abb. 3: Ionenaustauschchromatographie der Fraktion FII an einer Sephadex G-50-Säule (nach Possani et al., 1981).

2.4. Versuchsobjekte

2.4.1. Astacus leptodactylus

Die in den Versuchen verwendeten Astacus leptodactylus wurden durch lokale Händler bezogen und anschließend mindestens zwei Wochen in Glasgefäßen bei 12 - 14 °C aufbewahrt, um eventuelle kranke Tiere zu erkennen und an einen diurnalen Rhythmus anzupassen. Die Tiere lebten in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 10 Stunden in Fluoreszenzlicht und 14 Stunden in der Dunkelheit.

2.4.2. Electrophorus electricus

Lebende elektrische Aale wurden von World Wide Scientific Animals (Ardley, New York) gekauft. Sie wurden in Glasaquarien aufbewahrt. Die Präparation der elektrischen Organe erfolgte bei 0 °C.

2.4.3. Bufo marinus

Die in den Versuchen verwendeten Bufo marinus wurden von Amphibians of North America (Nashville, Tennessee) bezogen. Die Tiere lebten in einem Tag/Nacht/Rhythmus von 10 Stunden in Fluoreszenzlicht und 14 Stunden in der Dunkelheit.

3. Methoden

3.1. Entwässerung und Einbettung

Bei der Entwässerungsreihe wurden die Präparate in einer Äthanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 % je 15 Minuten und 3 x 15 Minuten in 100 %) entwässert. Anschließend wurden die Präparate in Propylenoxid gelegt (1 x 15 Minuten in Propylenoxid + 100 % Äthanol (1 : 1 V : V) und 3 x 15 Minuten in Propylenoxid), danach wurden die Präparate in einer Propylenoxid + Epon-Lösung (1 : 1 V : V) über Nacht inkubiert. Die Präparate wurden dann 1 x 6 Stunden und 1 x 17 Stunden bei Raumtemperatur in Eponlösung inkubiert. Danach wurden die Präparate bei 70 °C eingebettet.

3.2. Untersuchung der Wirkung von Vinblastin und Cytochalasin B sowie unterschiedlicher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf die Schirmpigmentwanderung

Die Versuche wurden sowohl bei hell- als auch bei dunkeladaptierten Tieren durchgeführt.

Augen helladaptierter bzw. dunkeladaptierter Tiere wurden abgeschnitten und die Retina aus dem Augenbecher herauspräpariert. Die Cornea, die Kristallkegel und ein Teil des optischen Ganglion blieben am Augensiel zurück (Stieve und Wirth, 1971). Bei dunkeladaptierten Tieren wurde die Präparation unter Rotlicht durchgeführt (Lichtintensität 50 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ bei einer Wellenlänge > 620 nm).

Die Durchführung dieser Versuchsreihe erfolgte unter Anwendung mehrerer Inkubationslösungen. Die Zusammensetzung der angewendeten Lösungen ist in Tabelle I zusammengefaßt. Die Inkubationszeit bei den Versuchen zur Ermittlung der Wirkung der Kalziumionen-Konzentration betrug 15 Minuten. Bei der Untersuchung der Wirkung von Vinblastin und Cytochalasin B war die Inkubationszeit 20 Minuten. Nach dieser Einwirkzeit erfolgte die "Trigge- rung" der Schirmpigmente, indem die helladaptierten Präparate 60 Minuten lang im Dunkeln und die dunkeladaptierten in einem hellen Raum aufbewahrt wurden.

Dem folgte eine Vorfixierung in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) über Nacht bei 4 °C.

Für den weiteren Verlauf von Fixierung und Einbettung siehe Kapitel 3.3.

Um Komplikationen, die durch den inneren diurnalen Rhythmus der Schirmpigmente auftreten können, zu vermeiden, wurden die Versuche immer spät nachmittags durchgeführt.

Tabelle I. Aufgeführt sind die verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzung. Die Kontrollversuche wurden in einer modifizierten von Harreveld-Lösung durchgeführt. Die pH-Werte der Lösungen betrugen 7,1 - 7,3.

	Na-PP	EDTA	EGTA	FII-9	in mmol/l		KCl	CaCl ₂	MgCl	NaCl	Tris	Vin- blastin	Cyto- chalasin B	⁴⁴ Ca ⁺	Col
v. Harreveld	-	-	-	-	5	10	3	203,3	10	-	-	-	-	-	-
150 mol/l Ca	-	-	-	-	5	150	3	-	10	-	-	-	-	-	-
150 mmol/l Ca	-	-	-	-	5	150	3	50	10	-	-	-	-	-	-
50 mmol/l Ca	-	-	-	-	5	50	3	128,3	10	-	-	-	-	-	-
30 mmol/l Ca	-	-	-	-	5	30	3	158	10	-	-	-	-	-	-
20 mmol/l Ca	-	-	-	-	5	20	3	173,3	10	-	-	-	-	-	-
0,5 mmol/l EDTA	-	-	-	-	5	10 ⁻⁶	-	203,3	10	-	-	-	-	-	-
1,0 mmol/l EDTA	-	-	-	-	5	10 ⁻⁶	-	203,3	10	-	-	-	-	-	-
10 mmol/l EGTA	-	-	-	-	5	10 ⁻⁶	-	203,3	10	-	-	-	-	-	-
20 mmol/l EGTA	-	-	-	-	5	10 ⁻⁷	3	203,3	10	-	-	-	-	-	-
50 mmol/l EGTA	-	-	-	-	5	10 ⁻⁷	3	203,3	10	-	-	-	-	-	-
⁴⁴ Ca	-	-	-	-	5	-	3	203,3	10	-	-	-	-	10	-
FII-9 (Centr. nox.)	100	-	-	10 umol/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vinblastin	-	-	-	-	5	10	3	203,3	10	0,4	-	-	-	-	-
Cytochalasin B*	-	-	-	-	5	10	3	203,3	10	-	0,1	-	-	-	-
Colchicin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20

* Die Testsubstanzen Vinblastin und Cytochalasin B wurden erst in reinem Alkohol gelöst und dann mit van Harreveld-Lösung bis zur Endkonzentration verdünnt. Die Alkohol-Endkonzentration blieb unter 2 %. Kontrollversuche zeigten, daß diese Alkoholkonzentration keinen merkbaren Einfluß auf die Pigmentwanderung hatte.

3.3. Untersuchung der Wirkung des Colchicins auf die Schirmpigmentwanderung

Lebenden hell- bzw. dunkeladaptierten Tieren wurde 0,1 ml Colchicininlösung injiziert. Die Lösung bestand aus 0,8 mg Colchicin in 0,1 ml 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2. Die Kanüle wurde im flachen Winkel in die Gelenkhaut zwischen Thorax und erstem abdominalen Segment angesetzt und bis in Herznähe eingeführt. Die Dunkeladaptation der Tiere betrug mindestens 4 Stunden.

Der zeitliche Verlauf der Versuchsdurchführung bis zur Präparation der Retina (das heißt, Injizieren und Adaptation) ist in Tabelle II schematisch dargestellt.

Nach der Präparation wurde die Retina vorfixiert.

Fixierung

Fixierung und Kontrastierung aller Präparate erfolgte nach einem Standardverfahren.

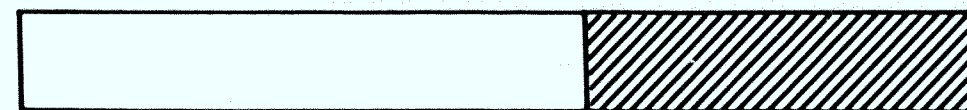
Die Zusammensetzung der ersten Fixierlösung ist 2 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2). Die Fixierung der Präparate erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Die zweite Fixierlösung bestand aus 1,5 % Osmiumtetroxid in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, und die Fixierzeit betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach jeder Fixierstufe erfolgte ein Waschprozeß (3 x 15 Minuten) in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2.

Zur Kontrastierung wurden 2 % Uranylacetat in Maleatpuffer, pH 6,5, verwendet. Die Kontrastierung dauerte 90 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate entwässert und eingebettet.

Tabelle II: Verlauf der Versuchsdurchführung

Dunkeladaptation



Injektion
9⁰⁰

14⁰⁰

Präparation
17⁰⁰

Hell

Helladaption



Dunkel

12⁰⁰

Injektion
16⁰⁰

Präparation
10⁰⁰

3.4. Untersuchung der Wirkung des Adaptationszustandes auf die Ca^{2+} -Pufferfunktion des Schirmpigments

Die Durchführung der ^{44}K kalzium-Aufnahme-Versuche ist bis auf die Fixierung identisch mit der im Kapitel 3.2. beschriebenen. Die Präparate wurden aber ohne vorherige Inkubation in der Testlösung behandelt. Die Fixierung in diesem Fall wurde wie folgt ausgeführt:

Die Präparate wurden in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,6) über Nacht fixiert. Hier wurde eine weitere Fixierung mittels OsO_4 nicht durchgeführt, da die Gefahr bestand, daß durch den Fixierungsprozeß (OsO_4 *fixiert über eine Diol-Verbindung) der pH-Wert der umgebenden Gewebe saurer wird, was dazu führen könnte, daß das $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3$ *wieder gelöst wird.

Danach wurden die Präparate entwässert und eingebettet. Siehe Tabelle I für ^{44}K kalzium-Konzentrationsangaben.

3.5. Kopplung der Marker an Antikörper

3.5.1. Kopplung von Peroxidase an die spezifischen Antikörper

Der Verlauf der Markierungsversuche mit Peroxidase an anti-FII und anti-FII-9 ist prinzipiell gleich. Er unterscheidet sich nur durch die Konzentration der verwendeten Chemikalien.

Markierung von anti-FII

Zu der anti-FII-Lösung, bestehend aus 10 mg anti-FII in 1,9 ml einer 100 mmol/l KH_2PO_4 -Pufferlösung, pH 7,0, werden 23,72 mg Horseradish Peroxidase gegeben. Unter Rühren wird 0,1 ml einer 1 %igen Glutaraldehydlösung tropfenweise zugegeben. Die Lösung läßt man (ohne weiteres Rühren) eine Stunde bei Raumtemperatur reagieren. Das Kopplungsprodukt wurde dann gegen 100 mmol/l KH_2PO_4 , pH 7,0, für 1,5 Stunden dialysiert (Dialyse-Schläuche Spektrum Medical Supplies, Porengröße 12,000 MG). Das Kopplungsprodukt wurde wiederholt 15 Minuten bei Raumtemperatur dialysiert gegen 100 mmol/l Tris * HCl, pH 7,95.

Die Kopplungsprodukte wurden an Affinitätssäulen gereinigt.

Spezifische Angaben der Affinitätssäule:

Säule	Querschnitt	1,5 cm
	Länge	15 cm
Gel	CNBr-Sepharose 4B gekoppelt mit FII	
	Toxin: 1 mg FII-Toxin/ml Gel	

Beladungspuffer 100 mmol/l Tris * HCl, pH 7,95

Eluationspuffer 50 mmol/l Glycin * HCl, pH 2,9

Mit dem Beladungspuffer werden die überschüssige Peroxidase und die ungebundenen Antikörper (Antikörper, die durch die Anwendung von Glutaraldehyd aneinander gebunden sind und dadurch ihre Fähigkeit, an das FII-Toxin zu binden, verloren haben) eluiert.

Die zweite Fraktion, bestehend aus mit Peroxidase gekoppelten Antikörpern und eventuell nicht gekoppelten Antikörpern, wird mit dem Elutionspuffer getrennt. Die zweite Fraktion wurde in mit 200 μ l einer 1 mmol/l Tris* HCl-Lösung, pH 7,95, gefüllten Reagenzgläsern aufgefangen (Auffangvolumen 1,5 ml), um das Kopplungsprodukt sofort zu neutralisieren. Anschließend wurde diese Fraktion über Nacht gefriergetrocknet und anschließend im Aalpuffer resuspendiert.

Dieser Trennungsprozeß wird schematisch in Abb. 4 dargestellt.

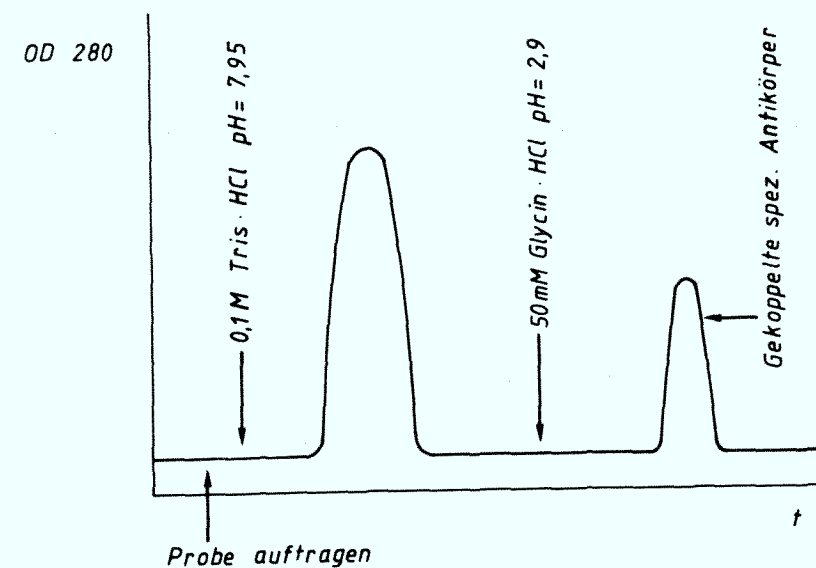


Abb. 4: Trennung von gekoppelten Antikörpern an einer Affinitätssäule

Um ein Antikörper : Peroxidase-Molarverhältnis von 1 : 10 zu erhalten, wird bei der Markierung der anti-FII-9 statt 23,72 mg Horseradish Peroxidase 5,36 mg benutzt. Die anti-FII-9-Lösung bestand aus 2,2 mg anti-FII-9 in 0,95 ml 100 mmol/l KH_2PO_4 -Puffer, pH 7,0.

3.5.2. Kopplung von Ferretin an anti-Kaninchen IgG

Die Kopplung von Ferretin an anti-Kaninchen IgG erfolgte bei der hier verwendeten Methode in drei Stufen. In der ersten Stufe wurde die anti-Kaninchen IgG-Lösung (Flow Laboratories) gereinigt. In der zweiten Stufe erfolgte die Aktivierung des Ferretins und schließlich wurden die in den zwei vorangegangenen Stufen erstellte Substanzen vereinigt.

Die Reinigung der anti-Kaninchen IgG-Lösung erfolgte mittels einer Protein A-Säule.

Spezifische Angaben der Säule:

Säule	Querschnitt	1 cm
	Länge	8 cm
Beladungspuffer	PBS (Phosphat Buffered Saline) (siehe Kapitel 2.2. für Zusammensetzung)	
Elutionspuffer	100 mmol/l Glycin * HCl, pH 3,0	

Die erste Fraktion wurde nicht weiter verwendet. Die mit dem zweiten Puffer eluierte Fraktion beinhaltet die gereinigten anti-Kaninchen IgG-Antikörper. Es erfolgte

eine sofortige Neutralisierung mit einer 1 mol/l Tris * HCl-Lösung, pH 7,0. Anschließend wurde die Fraktion über Nacht bei 4 °C gegen 50 mmol/l Na-Phosphatpuffer dialysiert. Dieser Puffer wurde zweimal gewechselt.

Das Ferretin wurde zur Kopplung an gereinigter anti-Kaninchen IgG aktiviert. Für die Aktivierung wurde zu der Ferretinlösung, bestehend aus 50 mg Ferretin in 0,5 ml 50 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,0 (Gesamtvolumen = 1 ml), 0,2 ml einer 25 %igen Glutaraldehydlösung zugefügt. Die so entstandene Lösung ließ man 45 Minuten bei Raumtemperatur reagieren. Danach wurde sie unter gleichen Bedingungen wie das gereinigte anti-Kaninchen IgG dialysiert.

Im letzten Schritt erfolgte die eigentliche Kopplung der gereinigten anti-Kaninchen IgG an das aktivierte Ferretin, indem zu der gereinigten anti-Kaninchen IgG-Lösung (1,6 mg anti-Kaninchen IgG in 1,5 ml 50 mmol/l Na-Phosphatpuffer) 0,6 ml der aktivierten Ferretinlösung zugefügt wurde. Unter ständigem Rühren ließ man die Lösung 5 Stunden bei Raumtemperatur reagieren. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 130 µl 1 mol/l Glycinlösung gestoppt. Die Dialyse des gekoppelten Produktes gegen PBS erfolgte über Nacht bei 4 °C unter zweimaligem Wechsel des Puffers.

Die Kopplungsprodukte wurden anschließend an einer Protein A-Säule gereinigt (siehe OD Trace, Abb. 5).

Spezifische Angaben der Säule:

Säule	Querschnitt	1 cm
	Länge	8 cm
Beladungspuffer	PBS	
Eluationspuffer	50 mmol/l Glycin * HCl, pH 3,0	

Mit dem Beladungspuffer wird das überschüssige Ferretin eluiert.

Die zweite Fraktion, bestehend aus Ferretin-gekoppelten Antikörpern, wurde mit Hilfe des Eluationspuffer getrennt. Es erfolgte eine sofortige Neutralisierung mit einer 1 mol/l Tris * HCl-Lösung, pH 7,0. Anschließend wurde die Fraktion über Nacht bei 4 °C gegen Frosch-Ringer dialysiert. Dieser Puffer wurde zweimal gewechselt.

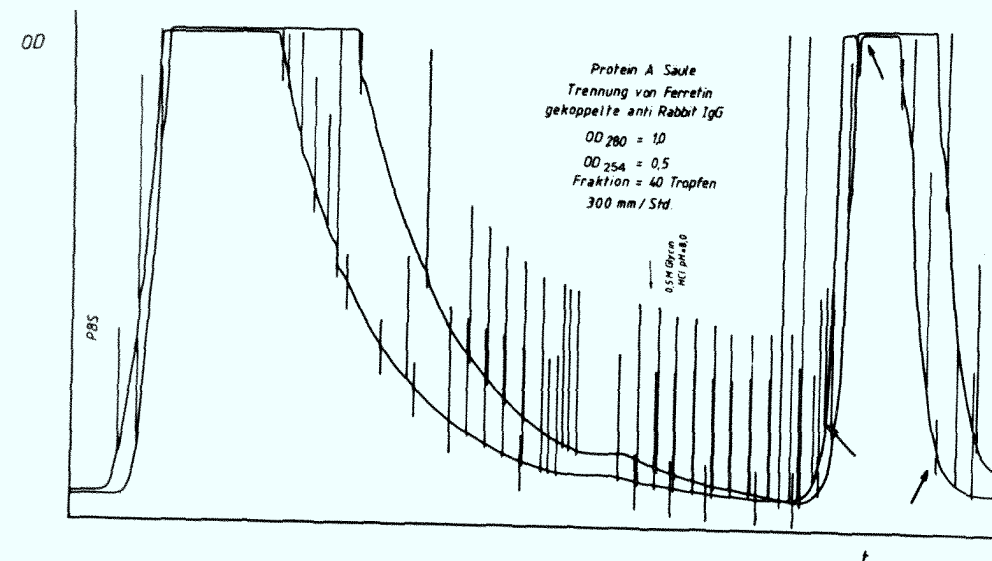


Abb. 5: Trennung von Ferretin gekoppelter anti-Kaninchen IgG an einer Protein-A-Säule. Die zweite Fraktion, bestehend aus Ferretin gekoppelten Antikörpern, wurde verwendet.

3.6. Markierung des Toxinbindungsortes

Der Ablauf dieser Versuche ist in den untenstehenden Fließdiagrammen dargestellt. Die Hauptarbeitsgänge sind in vier Stufen eingeteilt. Im folgenden werden die Versuche entsprechend dieser Einteilung detaillierter geschildert.

Lokalisation mittels Peroxidase

Flußdiagramm A

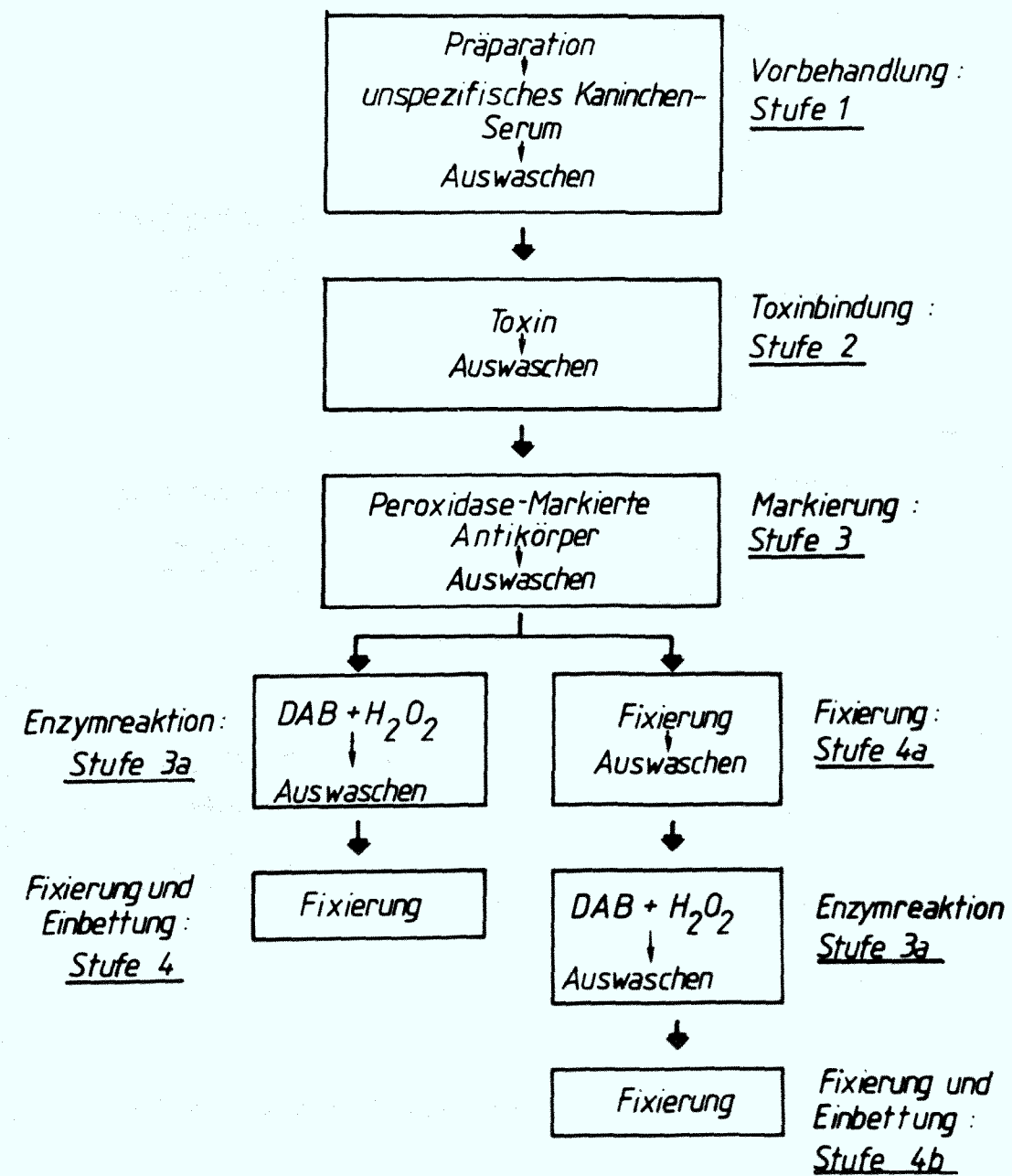


Abb. 6: Lokalisation mittels Peroxidase

Lokalisation mittels Ferretin

Flußdiagramm B

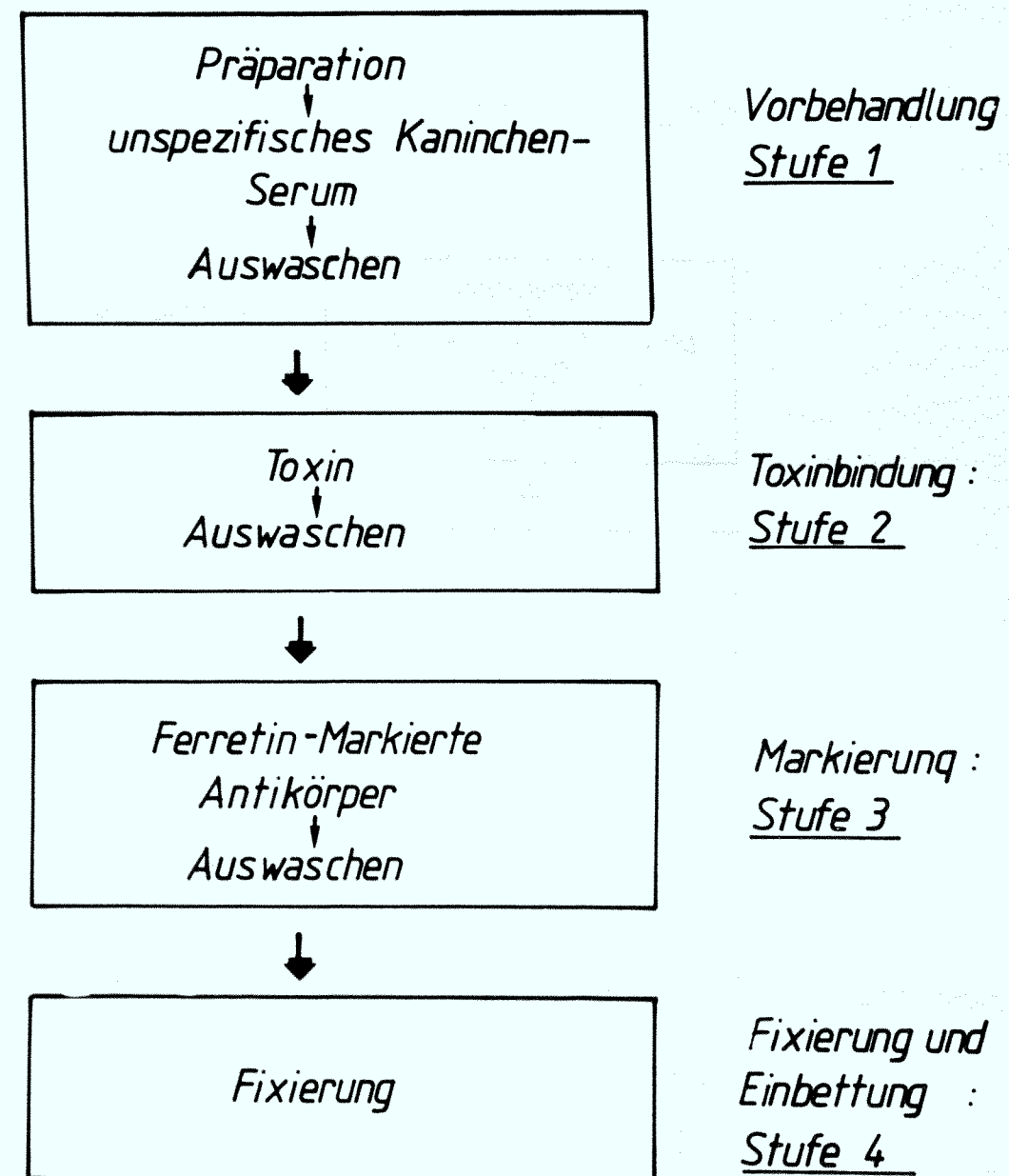


Abb. 7: Lokalisation mittels Ferretin-gekoppelter Antikörper

3.6.1. Lokalisierung mittels HRP-AK* am Astacus

Zur Orientierung über den experimentellen Ablauf verwende man das Flußdiagramm A.

Stufe 1: Vorbehandlung

Die Augen helladaptierter Tiere wurden abgeschnitten und die Retina aus dem Augenbecher herauspräpariert. Die Cornea, die Kristallkegel und ein Teil des optischen Ganglions blieben am Augenstiel zurück (Stieve und Wirth, 1971). Um die unspezifischen Bindungsorte der Antikörper zu blockieren, wurden die Retinen in einem Serum von nicht immunisierter Kaninchen ($OD_{280} = 18,4 \cdot 0,7 = \text{mg Antikörper/ml}$) für 10 Minuten inkubiert und anschließend in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 (3x 10 Minuten) ausgewaschen.

Stufe 2: Toxinbindung

Die Präparate wurden in der Skorpiontoxinlösung (Endkonzentration: 20 $\mu\text{mol/l}$ FII in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2; 10 $\mu\text{mol/l}$ FII-9 in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer) 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein wiederholtes Auswaschen (3 x 10 Minuten) in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2.

Bei den Kontrollversuchen wurde dieser Schritt ausgelassen.

* HRP-AK = Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Stufe 3: Markierung

In diesem Schritt wurden die Präparate 2 Stunden in eine Peroxidase-konjugierte anti-FII-Lösung gelegt ($OD_{280} = 0,823$). Die Lösung bestand aus anti-Toxin in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer. Die Präparate wurden anschließend in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer (1 x 30, 2 x 15 Minuten) ausgewaschen.

Stufe 4a: Fixierung

Die Präparate wurden in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) bei Raumtemperatur 2 Stunden vorfixiert, und dann in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 (5 x 15 Minuten) ausgewaschen.

Stufe 3a: Enzymreaktion

Die Präparate wurden zur Enzymreaktion bei Raumtemperatur über Nacht in eine frisch angesetzte 1 %ige Lösung von 3,3'-Diaminobenzidin * 4 HCl in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, gelegt. Nach einer Einwirkungszeit von ca. 12 Stunden wurde der DAB-Lösung eine 1 %ige H_2O_2 -Lösung zugegeben, so daß die Endkonzentration 0,05% H_2O_2 betrug. Die Lösung ließ man ca. 24 Stunden reagieren. Danach wurde ausgewaschen (3 x 15 Minuten) in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2.

Stufe 4b: Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung in dem gleichen Puffer bei Raumtemperatur 90 Minuten fixiert und danach in einer Äthanolreihe entwässert. Anschließend wurde die Retina in Propylenoxid gelegt und darauf in Eponlösung eingebettet.

3.6.2. Lokalisierung mittels F-AK* am Astacus

Siehe Flußdiagramm B.

Die Stufe 1 wurde bei diesen Versuchen in der gleichen Weise ausgeführt wie bei der Lokalisierung mittels Peroxidase am Astacus. Die Stufe 2 unterscheidet sich nur bezüglich der Inkubationszeit, die hier 15 Minuten betrug.

Stufe 3: Markierung

In diesem Schritt wurden die Präparate in einer Ferretin-konjugierten anti-FII-Lösung (400 µl einer Ferretin-Antikörperlösung $OD_{280} = 2,55$ in 600 µl eines 100 mmol/l Na-Phosphatpuffers) 30 Minuten inkubiert und 3 x 15 Minuten in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, ausgewaschen.

Stufe 4: Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) über Nacht bei 4 °C vorfixiert, gewaschen (3 x 15 Minuten in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) und in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung im gleichen Puffer bei Raumtemperatur 90 Minuten fixiert. Nach wiederholtem Auswaschen (3 x 15 Minuten) in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer wurden die Präparate in einer Äthanolreihe entwässert. Anschließend wurde die Retina in Propylenoxid gelegt und danach in Eponlösung eingebettet.

* F-AK = Ferretin-gekoppelte Antikörper

3.6.3. Lokalisierung mittels HRP-AK* am Aal

Siehe Flußdiagramm A.

Stufe 1: Vorbehandlung

Um die unspezifischen Bindungsorte der Antikörper zu blockieren, wurden 0,5 x 0,5 cm große Teile des Prinzipalorgans vom Aal, Electrophorus electricus, in einem unspezifischen Kaninchen-Serum ($OD_{280} = 18,4$) 1 Minute lang inkubiert und anschließend im Aalpuffer (2 x 1 Minute) ausgewaschen. (Es wäre besser, längere Zeiten zu nehmen, aber das Gewebe ist zu empfindlich dafür.)

Stufe 2: Toxinbindung

Die Präparate wurden in der Skorpiontoxinlösung (Endkonzentration: 20 $\mu\text{mol/l}$ FII in Aalpuffer, 10 $\mu\text{mol/l}$ FII-9 in Aalpuffer) für 10 Minuten inkubiert. Es folgte ein wiederholtes Auswaschen (5 x 2 Minuten) in Aalpuffer. Bei den Kontrollversuchen wurde auf diese Stufe verzichtet.

Stufe 3: Markierung

In diesem Schritt wurden die Gewebestücke in einer HRP-AK-Lösung ($OD_{280} = 0,823$ in Aalpuffer) 10 Minuten lang inkubiert.

Die Peroxidase-Reaktion wurde bei einigen Versuchen vor der Fixierung, bei den restlichen nach der Fixierung

* HRP-AK = Peroxidase-gekoppelte Antikörper

durchgeführt. Bei denjenigen Versuchen, wo die Peroxidas-Reaktion vor der Fixierung stattfand, war das Vorgehen bei der weiteren Bearbeitung wie folgt:

Stufe 3a: Enzymreaktion

Nach vorausgegangenem Auswaschen (5 x 1 Minute in Aal-puffer) wurden die Präparate zum Inkubieren in eine frisch angesetzte 1 %ige Lösung von 3,3'-Diaminobenzidin * 4 HCl (DAB) in Aalpuffer gelegt. Nach einer Einwirkungszeit von ca. 30 Minuten wurde der DAB-Lösung eine 1 %ige H_2O_2 -Lösung zugegeben, so daß die Endkonzentration 0,05 % H_2O_2 betrug. Die Lösung ließ man 2 Stunden reagieren.

Stufe 4: Fixierung und Einbettung

Hier wurden die Präparate in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in Aalpuffer) über Nacht bei 4 °C vorfixiert. Nach Auswaschen (3 x 15 Minuten in Aalpuffer) erfolgte im gleichen Puffer eine Fixierung von 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung. Anschließend wurden die Präparate in einer Äthanolreihe entwässert und eingebettet.

Bei den Versuchen, wo die Reaktion nach der Vorfixierung stattfand, erfolgte ein Rücksprung von der Fixierstufe zur Peroxidase-Reaktion mit DAB (Stufe 3a). Die Behandlung der Präparate in diesem Fall war wie folgt:

Nach dem Inkubieren in der spezifischen Antikörperlösung wurden die Präparate ausgewaschen (5 x 1 Minute in Aalpuffer) und im Anschluß in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in Aalpuffer) für 2,5 Stunden

den vorfixiert. Nach dem Auswaschen (1 x 340, 1 x 90, 2x 40, 2 x 15 Minuten und über Nacht bei 4 °C) wurden die Präparate in eine frisch angesetzte 1 %ige Lösung von 3,3'-DAB in Aalpuffer gelegt. Die Einwirkungszeit betrug 30 Minuten, und der DAB-Lösung wurde dann im Verlauf von 4 Stunden soviel einer 1 %igen H₂O₂-Lösung zugegeben, daß die Endkonzentration 0,2 % H₂O₂ betrug. Nach wiederholtem Auswaschen (3 x 40 Minuten in Aalpuffer) wurden die Präparate in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung in dem gleichen Puffer bei Raumtemperatur 90 Minuten fixiert. Der weitere Versuchsverlauf entspricht den Versuchen, bei denen die Peroxidase-Reaktion vor der Fixierung stattfand.

3.6.4. Lokalisierung mittels F-AK* am Aal

Siehe Flußdiagramm B.

Die Ausführung der Stufen 1 und 2 sind bei diesen Versuchen identisch mit denen der Lokalisierungsversuche mittels Peroxidase am Aal.

Stufe 3: Markierung

In diesem Schritt wurden die Versuchsobjekte in der Ferretin-konjugierten anti-FII-Lösung (Stammlösung OD₂₈₀* = 2,55. Die Stammlösung wurde 1 : 10 mit Aalpuffer verdünnt.) 30 Minuten lang inkubiert und 3 x 15 Minuten in Aalpuffer ausgewaschen.

* F-AK = Ferretin-gekoppelte Antikörper

Stufe 4: Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in Aalpuffer) über Nacht bei 4 °C vorfixiert, gewaschen (3 x 30 Minuten in Aalpuffer) und in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung im gleichen Puffer bei Raumtemperatur 90 Minuten fixiert. Nach einem weiteren Auswaschprozeß (3 x 60 Minuten in Aalpuffer) wurden die Prinzipalorganteile in einer Äthanolreihe entwässert und in Epon eingebettet.

3.6.5. Lokalisierung mittels HRP-AK* an Bufo marinus

Siehe Flußdiagramm A.

Stufe 1: Vorbehandlung

Die unter Rotlicht präparierte Retina der Kröte Bufo marinus wurde in vier Teile geschnitten und anschließend in einer unspezifischen Kaninchen-Serumlösung ($OD_{280} = 18,4$ in Frosch-Ringer) 5 Minuten inkubiert, um die unspezifischen Bindungsorte der Antikörper zu blockieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Präparate 3 x 15 Minuten in Frosch-Ringer ausgewaschen.

Stufe 2: Toxinbindung

In diesem Schritt wurden die Retina-Stücke in der Skorpiontoxinlösung (Endkonzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ FII-9 in Frosch-Ringer) 30 Minuten lang inkubiert und 3 x 15 Minuten in Frosch-Ringer ausgewaschen. Bei den Kontrollversuchen wurde auf diese Stufe verzichtet.

* HRP-AK = Peroxidase-gekoppelte Antikörper

Stufe 3: Markierung

Die Präparate ließ man in einer spezifischen anti-FII-9-Lösung (0,7 mg Antikörper/ml Frosch-Ringer) 30 Minuten lang inkubieren. Nach dem Auswaschen (3 x 5 Minuten) in Frosch-Ringer wurden die Retina-Stücke für 30 Minuten in die Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (H + L Chain spezifisch) gelegt. Diesem Schritt folgte wieder ein Auswaschprozeß in Frosch-Ringer, bevor die Stücke dann in eine frisch angesetzte 1 %ige Lösung von 3,3'-Diaminobenzidin * 4 HCl (DAB) in Frosch-Ringer gelegt wurden. Nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten wurde der DAB-Lösung eine 1 %ige H_2O_2 -Lösung zugegeben, so daß die Endkonzentration 0,05 % H_2O_2 betrug. Die Lösung ließ man 60 Minuten reagieren. Danach wurde 3 x 15 Minuten in Frosch-Ringer ausgewaschen.

Stufe 4: Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in Frosch-Ringer) bei Raumtemperatur 30 Minuten vorfixiert. Nach vorherigem Waschen (3 x 15 Minuten in Frosch-Ringer) wurden die Aldehyd-fixierten Präparate in einer 1,5 % Osmiumtetroxidlösung im gleichen Puffer bei Raumtemperatur 30 Minuten fixiert. Dem folgte eine Entwässerung in einer Äthanolreihe. Anschließend wurde die Retina eingebettet.

3.6.6. Lokalisierung mittels F-AK* an Bufo marinus

Siehe Flußdiagramm B.

* F-AK = Ferretin-gekoppelte Antikörper

Die Ausführungen der Stufen 1 und 2 sind bei diesen Versuchen identisch mit denen der Lokalisierungsversuche mittels Peroxidase an Bufo marinus.

Stufe 3: Markierung

Die Präparate wurden in der anti-FII-9-Lösung (0,7 mg Antikörper/ml Frosch-Ringer) 30 Minuten lang inkubiert und danach wiederholt gewaschen (3 x 5 Minuten in Frosch-Ringer). Im folgenden Schritt erfolgte die eigentliche Markierung, indem man die Präparate in der Ferretin-konjugierten anti-Kaninchen IgG-Lösung ($OD_{280} = 1,15$ in Frosch-Ringer) 30 Minuten lang inkubieren ließ. Dem folgte ein Auswaschen (3 x 5 Minuten) in Frosch-Ringer.

Stufe 4: Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden zweimal fixiert. Die erste Fixierung erfolgte 30 Minuten lang in einer Aldehyd-Lösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in Frosch-Ringer) bei Raumtemperatur. Die zweite Fixierung dauerte ebenfalls 30 Minuten, jedoch wurde eine 1,5 %ige Osmiumtetroxidlösung verwendet. Es folgte eine Entwässerung und Einbettung.

Die Stufen 1, 2 und 3 erfolgten bei ca. 1°C , und die Präparate wurden mit O_2 umspült.

3.7. Untersuchung der Wirkung der Skorpion- toxinfraktion FII-9 auf die Ca^{2+} -Puffer- funktion des Schirmpigments

Augen helladaptierter Tiere wurden abgeschnitten und die Retina aus dem Augenbecher herauspräpariert (Stieve und Wirth, 1971).

Die isolierte Retina wurde anschließend in einer Skorpiontoxidlösung (FII-9, Endkonzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ in einer van Harreveld-Lösung ohne Kalzium) 30 Minuten lang inkubiert. Nach dieser Einwirkungszeit wurde der Toxinlösung so viel $^{44}\text{Ca}^{2+}$ zugegeben, daß die Endkonzentration der $^{44}\text{Ca}^{2+}$ 50 mmol/l betrug. Die Retina ließ man eine weitere Stunde in dieser Lösung inkubieren. Nach Auswaschen (3 x 10 Minuten) in van Harreveld * Iris wurde die Retina in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,6) über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ vorfixiert und im gleichen Puffer ausgewaschen (3 x 15 Minuten) ausgewaschen. Die Präparate wurden dann in einer Äthanolreihe entwässert und anschließend eingebettet.

Bei den Kontrollversuchen war die Durchführung wie oben geschildert, jedoch ohne Inkubation in der Toxinlösung.

3.8. Untersuchung der Wirkung der Skorpiontoxin- Fraktion FII-9 auf die Schirmpigmentwanderung

Augen helladaptierter Tiere wurden abgeschnitten und die Retina aus dem Augenbecher herauspräpariert. Die Cornea, die Kristallkegel und ein Teil des optischen Ganglions blieben am Augensiel zurück (Stieve und Wirth, 1971).

Zur Ermittlung der Wirkung der Toxin-Fraktion FII-9 auf die Dunkeladaptation ließ man die Retina 20 Minuten bei Tageslicht und 1 Stunde im Dunkeln in der Toxinlösung inkubieren. Bei der Ermittlung der Wirkung auf die Helladaptation erfolgte das Inkubieren erst im Dunkeln (20 Minuten) und dann bei Tageslicht (1 Stunde).

Die Retina wurde anschließend vor bzw. nach Lichteinwirkung (je nach Versuchsmodus) in einer Aldehydlösung (2 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) über Nacht bei 4 °C vorfixiert. Nach Auswaschen (3 x 15 Minuten) in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer wurden die Präparate in einer 1,5 %igen Osmiumtetroxidlösung im gleichen Phosphatpuffer bei Raumtemperatur 90 Minuten fixiert. Nach nochmaligem Auswaschen (3 x 15 Minuten in 100 mmol/l Na-Phosphatpuffer, pH 7,2) wurden die Präparate mit 2 % Uranylacetat in Maleatpuffer, pH 6,5 (pH eingestellt mit NaOH) bei Raumtemperatur 90 Minuten kontrastiert. Die Präparate wurden in einer Äthanolreihe entwässert und anschließend eingebettet. Um Komplikationen, die durch den inneren diurnalen Rhythmus der Schirmpigmentwanderung auftreten können, zu vermeiden, wurden die Versuche immer spät nachmittags durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie des Astacus-Auges

Die Morphologie des Astacus-Auges wurde eingehend von den folgenden Autoren behandelt: Bernhards (1916), Eguchi (1965), Eguchi und Waterman (1966) und Krebs (1972). An dieser Stelle soll nur eine kurze zusammenfassende Darstellung der Morphologie des Auges gegeben werden (s. Abb. 8).

Ommatidium:

Das Fazettenauge des Astacus setzt sich aus ca. 2000 Ommatidien zusammen. Jedes Ommatidium besteht aus einem distalen dioptrischen Apparat und einem proximalen rezeptorischen Teil (Retinula). Zum dioptrischen Apparat gehören die Cornea und der Kristallkegel. Der Kristallkegel ist in den oberen zwei Dritteln von Pigmentzellen umgeben. Diese Pigmentzellen sind die Hauptpigmentzellen, die das Irispigment enthalten. Die Retinula besteht aus acht Retinulazellen. Die Retinulazellen bilden und umhüllen das Rhabdom.

Rhabdom:

Das Rhabdom ist aus vielen Mikrovilli aufgebaut, die von sieben Retinulazellen gebildet werden. Alle Mikrovilli, die von einer Retinulazelle stammen, heißen Rhabdomere, so daß sieben Rhabdomere das Rhabdom bilden. Im Längsschnitt fällt auf, daß die Mikrovilli in regelmäßigen Schichten liegen, und von einer Schicht zur benachbarten scheinen alle Mikrovilli in ihrem Längsschnitt senkrecht zueinander zu verlaufen. Die Mikrovilli eines Rhabdomers reichen nur bis zur Mitte des Rhabdoms, wo sie mit den Mikrovilli der gegenüberliegenden Zelle zusammenstoßen.

Achte Retinulazelle:

Die achte Retinulazelle unterscheidet sich stark von den anderen sieben Zellen. Sie besitzt kein Schirmpigment und bildet ein eigenes Rhabdom (Lietz, 1972).

Basalmembran:

Jede Retinulazelle sendet ein Axon aus, das durch die Basalmembran zum neuralen Teil des Auges führt. Die Basalmembran grenzt die Augenkapsel gegen den subokularen Raum ab. Man kann die Basalmembran als gitterartiges Netzwerk unterhalb der Retina ansehen, die nicht als Diffusionsbarriere dient (Röhling, 1980). Die Axone treten in Dreier- und Fünfergruppen durch die Öffnungen des Netzwerkes hindurch. Das kleine Axon der achten Zelle läuft als Teil der Fünfergruppe mit.

Schirmpigmentwanderung:

Ein auffallendes Merkmal der sieben Retinulazellen sind die schwarzen Schirmpigmente (distale Retinulapigmente), die in dem Cytoplasma der Zellen vorhanden sind. Bei dem helladaptierten Auge liegt die Hauptmasse des Pigmentes in der distalen Hälfte der Retinula, die Dichte nimmt distal zu, ist also zwischen den Kernen am größten. Die Pigmentgranula schirmen das Rhabdom gegen schräg einfallendes Licht ab. Das Schirmpigment liegt in Form von schwarzen Granula von ca. 0,3 µm im Durchmesser vor. Während der Dunkeladaptation wandern die Schirmpigmente proximal aus der Rhabdomregion heraus. Sie sind jetzt in der Gegend der Basalmembran zu beobachten. Das Rhabdom kann also sowohl von Lichtstrahlen durch seinen eigenen Augenkeil als auch von Licht aus benachbarten Kristallkegeln getroffen werden. Durch die Lage der Pigmentgranula wird somit der Lichtfluß variiert, der auf das Rhabdom einfällt (siehe Abb. 9).

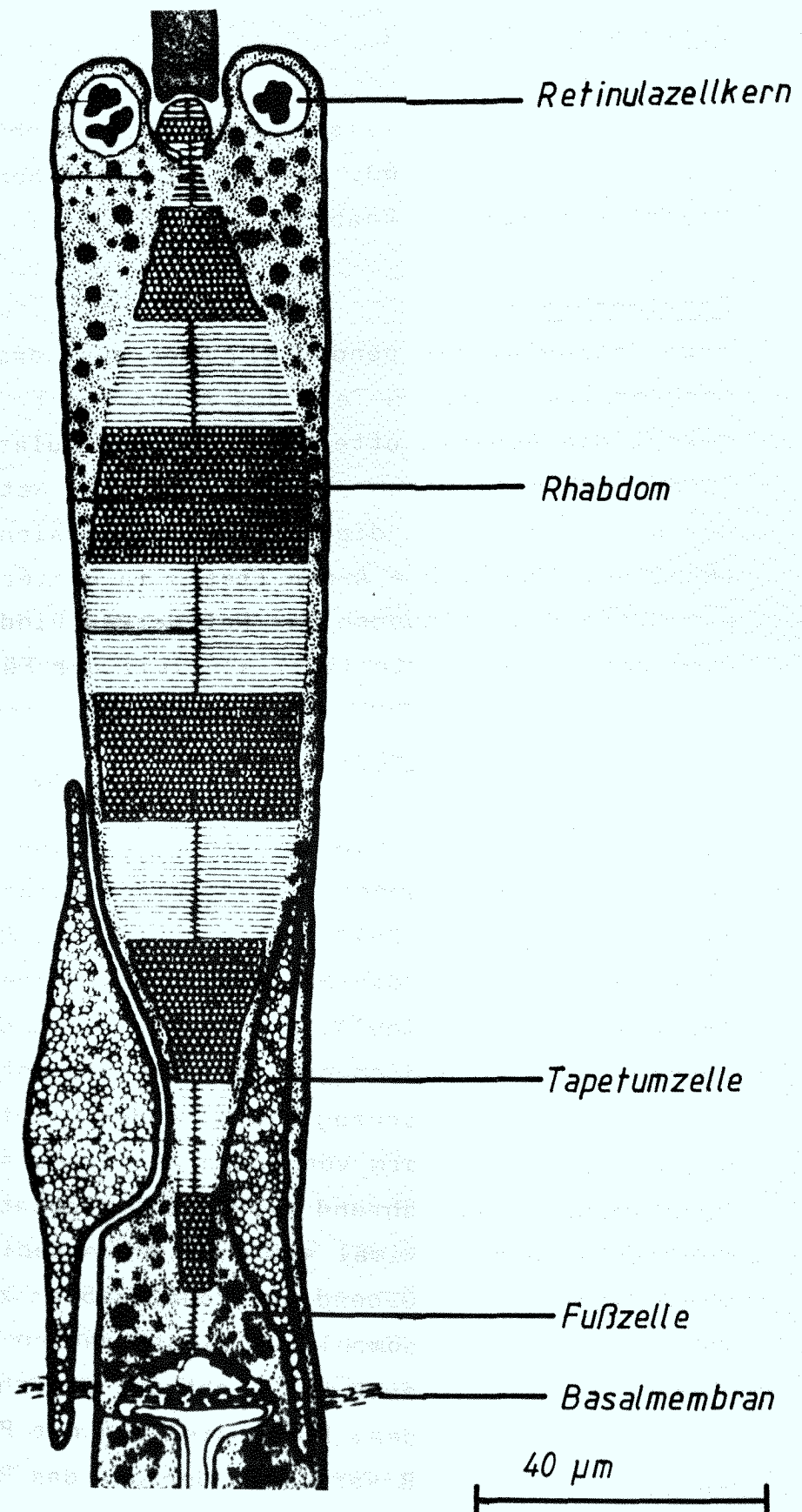
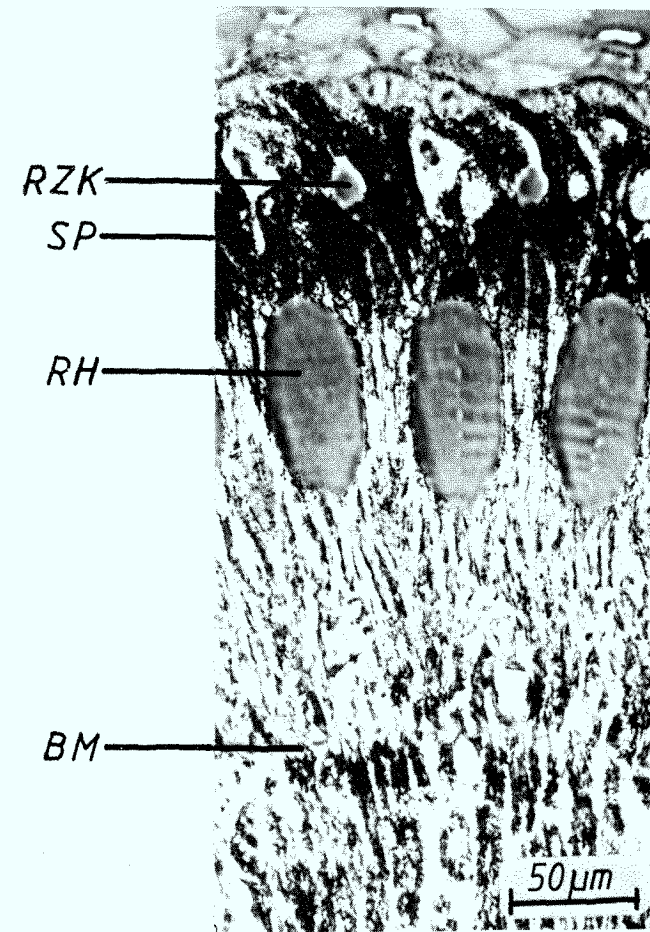
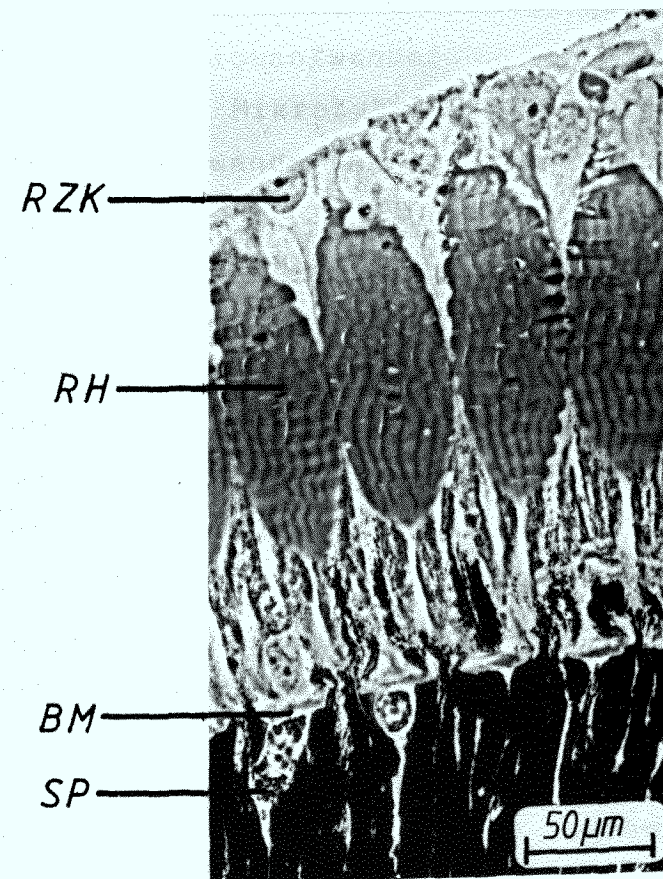


Abb. 8 Photorezeptorzelle des *Astacus*
(Nach Uebags, 1976)



a)



b)

Abb. 9:

a) Längsschnitt
durch ein hell-
adaptiertes
Auge.

Die Schirmpig-
mente befinden
sich in der
Nähe der Reti-
nulazellkerne.

b) Längsschnitt
durch ein dun-
keladaptiertes
Auge.

Die Schirmpig-
mente sind in
der Gegend der
Basalmembran zu
beobachten.

Retinulazellkern (RZK)

Schirmpigment (SP)

Rhabdom (RH)

Basalmembran (BM)

4.2. Mechanismus der Schirmpigmentwanderung

Der Mechanismus der Schirmpigmentwanderung bei Astacus leptodactylus ist noch nicht eindeutig geklärt. Von einigen anderen Zellen ist bekannt, daß Mikrotubuli an der Bewegung von Pigmentgranula beteiligt sind.

Mikrotubuli:

In den Photorezeptoren von Procamberus bouvieri wurden Mikrotubuli identifiziert (Frixone und Arechiga, 1979a; Frixone et al., 1979b). Sie liegen parallel zur Längsachse der Photorezeptorzelle und sind hauptsächlich unterhalb der Kernregion zu beobachten. Bei Astacus ist eine ähnliche Anordnung der Mikrotubuli zu beobachten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß die Schirmpigmente nicht homogen im Zytoplasma verteilt sind, sondern bevorzugt in der Nähe von Mikrotubuli auftreten.

Um zu entscheiden, ob dieses Mikrotubulsystem eine Rolle bei der Schirmpigmentwanderung im Astacus-Auge spielt, wurde die Wirkung der Mikrotubuli-Gifte Vinblastin und Colchicin auf die Pigmentwanderung untersucht.

Mikrotubuli-Inhibitoren:

Colchicin bewirkt einen Abbau der Mikrotubuli. Es wurde angenommen, daß es spezifisch an Tubulin bindet (Wilson et al., 1974). Der Abbau von Mikrotubuli durch Colchicin führte in mehreren Versuchen zu einer Hemmung der Granulabewegung; so z.B. bei der Wanderung der Melanophoren des Kilifisches (Fundulus heteroclitus). Die Mikrotubuli bei Fundulus liegen parallel zur Längsachse der Zellfortsätze. Die Melaningranula in diesen Fortsätzen scheinen sich nach einer Lichtstimulation entlang der Mikrotubuli zu bewegen. Durch Zugabe von Colchicin wird eine weitere Pigmentbewegung blockiert (Wikswa und Novales, 1969).

Vinblastin ist ein Vinca-Alkaloid, das den Abbau von Mikrotubuli verursacht. Tubulin wird dabei in geordneten Kristallen präzipitiert (Wilson et al., 1974). Ein Beispiel, wo Vinblastin die Bewegung der Pigmentgranula hemmt, findet man bei Fundulus heteroclitus (Jungueira und Porter, 1969).

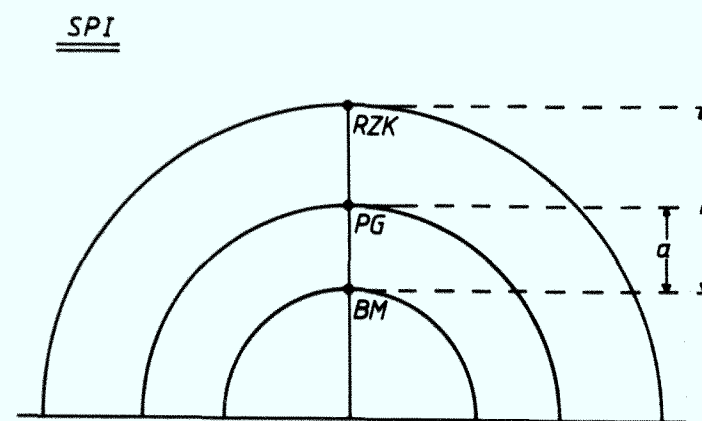
Die Ergebnisse der Versuche, in denen diese zwei Mikrotubuligifte bei Astacus verwendet wurden, sind im folgenden beschrieben. Die Lage der Schirmpigmente und der Einfluß der Testlösungen wurde semiquantitativ mit Hilfe einer Verhältniszahl (Schirmpigmentindex) ausgedruckt.

Der Schirmpigmentindex wird wie folgt definiert:

$$SPI = a/b$$

a = Abstand zwischen dem Ort der größten Schirmpigmentanhäufung und Basalmembran

b = Abstand zwischen den Retinulazellkernen und Basalmembran



RZK = Retinula Zellkerne

PG = Pigment Granula

BM = Basalmembran

Abb. 10: Schirmpigmentindex (SPI)

Der Schirmpigmentindex hat den Wert 1,0, wenn die Pigmente sich im helladaptierten Zustand, und 0, wenn sie sich im dunkeladaptierten Zustand befinden.

Colchicin:

Die Pigmentaggregation (Dunkeladaptation) wird durch Colchicin teilweise verhindert. Nach Zugabe von Colchicin zu helladaptierten Retinen und 60 Minuten Inkubation im Dunkeln blieben die Pigmentgranula in einem quasi-lichtadaptierten Zustand. Sie waren nicht mehr vollkommen lichtadaptiert, da sie sich nicht in der Nähe der Retinula-Zellkerne befanden. Vielmehr lagen sie jetzt in der oberen Hälfte der Rhabdom-Region, während in den Kontrollversuchen ohne Colchicin die Pigmentgranula in den Bereich knapp oberhalb oder unterhalb der Basalmembran wanderten. Dies zeigt, daß die Wanderungstrecke der Pigmente durch Colchicin auf etwa ein Drittel reduziert wird.

Die Versuche mit Colchicin wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt.

Auch höhere Konzentrationen (40 und 60 mmol/l) blockierten die Pigmentwanderung nicht vollständig. Bei allen verwendeten Konzentrationen wanderten die Pigmentgranula annähernd in die gleiche Position in der oberen Hälfte der Rhabdome. Diese hohen Konzentrationen wurden bei dem weiteren Verlauf der Versuche nicht mehr angewandt, da sie einen extremen Streßzustand bei den Versuchstieren hervorrufen.

Der Colchicin-Effekt war dagegen abhängig von der Inkubationszeit. Die kürzeste Inkubationszeit, die zu einer vollständigen Colchicinwirkung führte, betrug zwei Stunden. Vermutlich benötigen die Photorezeptorzellen mindestens zwei Stunden, um genügend Colchicin aufzunehmen. Auch durch längere Inkubationszeiten ließ sich die Wanderung der Pigmentgranula nicht vollständig blockieren.

Eine Wirkung von Colchicin auf die Helladaptation war nicht festzustellen.

Vinblastin:

Das Säulendiagramm 11 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit Vinblastin. Es ist ersichtlich, daß die Dunkeladaptation fast vollständig durch Vinblastin blockiert wird. Die Pigmente befinden sich nach Zugabe von Vinblastin zu helladaptierten Retinen und einer Inkubationszeit von 60 Minuten im Dunkeln noch immer in der Nähe der Retinulazellkerne. Im Gegensatz zu Colchicin hemmt Vinblastin die Dunkeladaptation der Pigmentgranula fast vollständig.

Wirkung von Mikrotubuli-Giften:

In der Astacus-Retina können Mikrotubuli-Gifte die Pigmentwanderung während der Dunkeladaptation nur teilweise blockieren. Die Helladaptation wird durch Mikrotubuli-Gifte überhaupt nicht beeinflusst. Auffallend war, daß die Pigmentwanderung während der Dunkeladaptation nur im unteren Teil der Rhabdome gehemmt wurde, nämlich in dem Bereich, in dem Mikrotubuli zu beobachten sind. In der Kernregion in der oberen Hälfte der Photorezeptorzelle, wo keine Mikrotubuli zu sehen sind, fand die Pigmentwanderung noch statt. Die Frage lag nahe, ob ein anderer Mechanismus für den ersten Teil der Dunkeladaptation und für die Helladaptation verantwortlich ist.

Actin: Es gibt Anzeichen dafür, daß in den Photorezeptoren von Astacus im Rhabdombereich Actin vorhanden ist (Baer, 1983).

Um zu entscheiden, ob nicht nur Mikrotubuli, sondern auch Mikrofilamente eine Rolle bei der Schirmpigmentwanderung spielen, wurde die Wirkung des Mikrofilamentgifts Cytochalasin B auf die Pigmentwanderung untersucht.

Mikrofilament-Gift:

Cytochalasin B ist ein Antibiotikum, das die Aggregation von G-Actin (globuläres Actin) zur F-Actin-Form (fibrilläres Actin) verhindert. Die Zugabe von Cytochalasin B zu Systemen, in denen Mikrofilamente für die Pigmentbewegung verantwortlich sind, verhindert weitere Pigmentmobilität. Beispielsweise wurde diese Wirkung bei dem Krebs Uca pugilator beobachtet (Lambert und Crowe, 1973).

Die Ergebnisse der Versuche, bei denen dieses Gift verwendet wurde, sind im folgenden beschrieben.

Cytochalasin B:

Bei dieser Versuchsreihe war eine Wirkung weder auf die Dunkeladaptation, noch auf die Helladaptation festzustellen. Die Pigmentwanderung lief in beiden Richtungen ungehindert ab. Die Pigmente wanderten während der Helladaptation in der Nähe der Retinula-Zellkerne und bei der Dunkeladaptation in der Nähe der Basalmembran.

In Abb. 11 ist der Einfluß der drei Gifte auf die Dunkeladaptation im Säulendiagramm dargestellt. Es ist ersichtlich, daß die Mikrotubuligifte Vinblastin und Colchicin einen Einfluß

auf die Dunkeladaptation haben. Demgegenüber hat das Mikrofilamentgift Cytochalasin B keinen Einfluß auf die Dunkeladaptation.

Keines der drei Gifte hat einen Einfluß auf die Helladaptation.

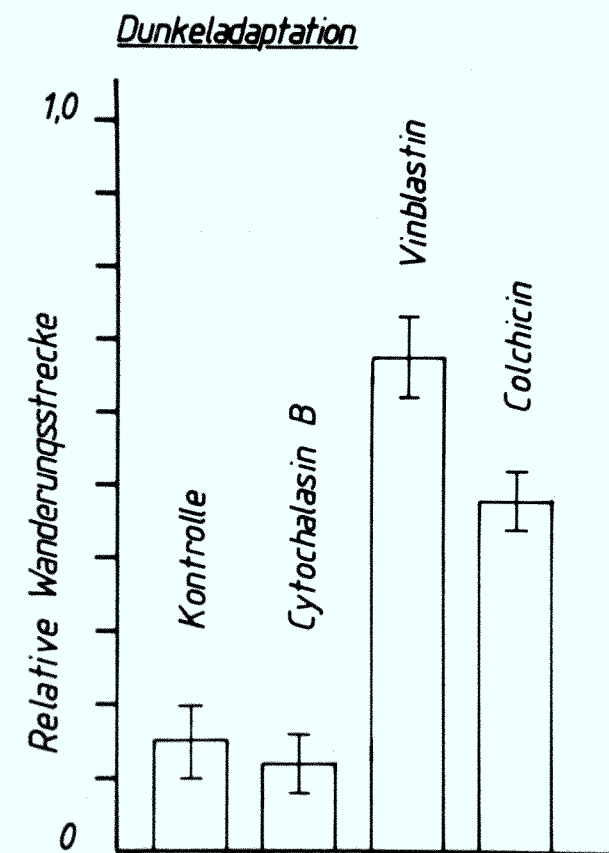


Abb. 11: Wirkung der Mikrotubuligifte (Colchicin und Vinblastin), bzw. des Mikrofilamentgiftes (Cytochalasin B) auf die Dunkeladaptation. Die Mikrotubuligifte wirkten hemmend auf die Dunkeladaptation.

4.3. Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Schirmpigmentwanderung

Welche molekularen Mechanismen an der Kontrolle der Schirmpigmentwanderung beteiligt sind, ist wenig bekannt. Olivio und Larsen (1978) nehmen an, daß Kalzium an der Regulation der Schirmpigmentwanderung beteiligt ist. Nach dieser Hypothese soll Kalzium entweder ein Transportsystem aktivieren oder den Abbau eines vorhandenen Mikrotubulsystems bewirken. Bei Krustaceen führt Belichtung zu einem Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration in der Photorezeptorzelle (Lisman and Brown, 1975).

Es ist denkbar, daß die lichtabhängige Änderung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Zytoplasma der Photorezeptoren im Zusammenhang mit der Regulation der Schirmpigmentwanderung steht.

Daher wurde zunächst der Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Schirmpigmentwanderung untersucht um festzustellen, ob eine Wechselwirkung zwischen extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration und Adaptationszustand besteht. Die Versuche wurden mit isolierten Astacus-Retinen durchgeführt.

4.3.1. Dunkeladaptation

Bei den Versuchen zur Dunkeladaptation wurden helladaptierte Retinen zuerst 15 Minuten im Licht in Testlösungen mit verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen ($150 - 10^{-7}$ mmol/l) vorinkubiert, danach wurden die Retinen 1 Stunde dunkeladaptiert. Anschließend wurde die Lage der Schirmpigmente unter dem Lichtmikroskop beobachtet, und der Einfluß der Testlösungen wurde wieder semiquantitativ (siehe Kapitel 4.2.) mit Hilfe des Schirmpigmentindex ausgedrückt.

In dem Säulendiagramm 12 ist der Einfluß der externen Ca^{2+} -Konzentration auf die Dunkeladaptation zusammengefaßt. Aus dem Diagramm ist deutlich erkennbar, daß nur in einem bestimmten Ca^{2+} -Konzentrationsbereich Dunkeladaptation stattfinden. Wenn die Ca-Ionenkonzentration über 20 mmol/l bzw. unter 10 mmol/l liegt, wird die Pigmentwanderung gehemmt.

4.3.2. Helladaptation

In den Versuchen zur Helladaptation wurden dunkeladaptierte Retinen in Testlösungen mit verschiedenen Ca-Ionenkonzentrationen ($150 - 10^{-7}$ mmol/l) 15 Minuten im Dunkeln vorinkubiert, danach wurden die Retinen 1 Stunde helladaptiert.

In Abb. 13 ist der Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} -Ionenkonzentration und der Helladaptation in Form eines Säulendiagramms aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, daß vollständige Helladaptation bei Ca^{2+} -Konzentrationen im Bereich von 10 - 30 mmol/l stattfindet. Bei extrem hohen Ca^{2+} -Konzentrationen und bei Konzentrationen unterhalb von 10 mmol/l wird, ebenso wie bei der Dunkeladaptation, die Wanderung der Pigmentgranula gehemmt. Bei Ca-Ionenkonzentrationen von 150 mmol/l war die Strukturhaltung der Retinen sehr schlecht; die Rhabdome erschienen geschwollen. Dies führte wahrscheinlich zu der Hemmung der Pigmentwanderung.

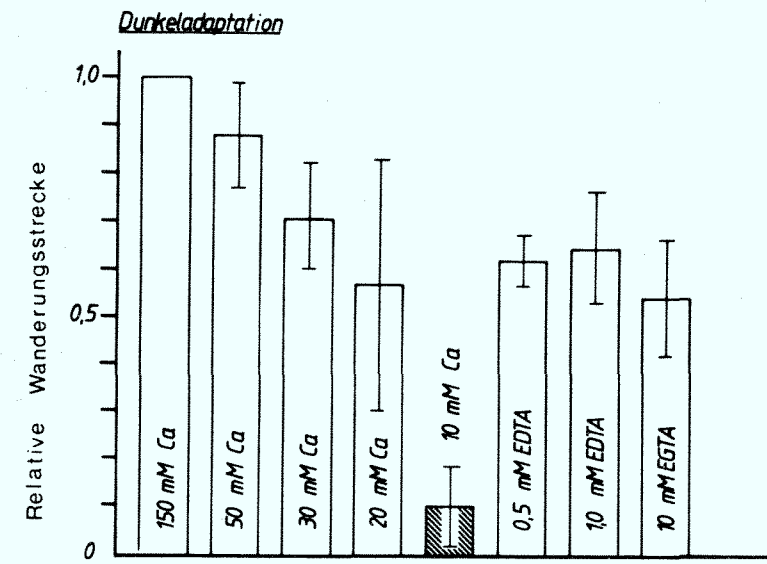


Abb. 12: Wirkung der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration auf die Dunkeladaptation. Sowohl hohe Ca -Ionenkonzentrationen (30 - 150 mmol/l), als auch niedrige (10^{-6} , 10^{-7} mmol/l) wirkten stark hemmend auf die Dunkeladaptation.

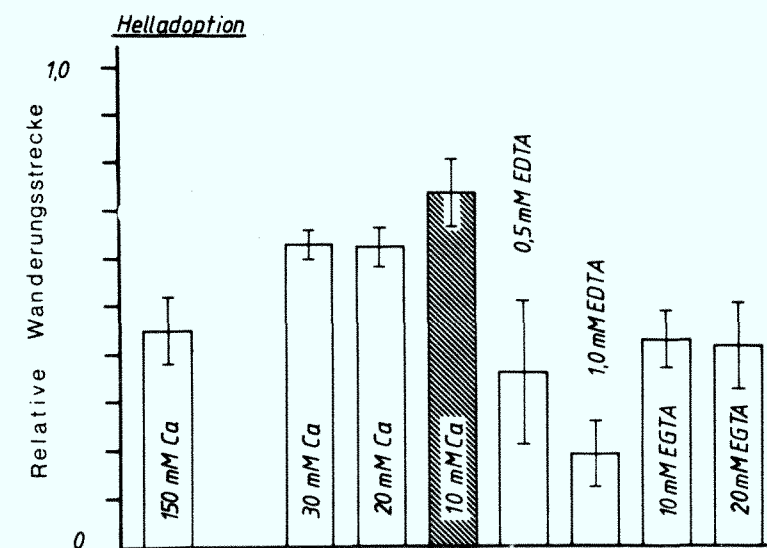


Abb. 13: Wirkung der extrazellulären Ca -Ionenkonzentration auf die Helladaptation. Niedrige Ca -Ionenkonzentrationen (10^{-6} , 10^{-7} mmol/l) wirkten hemmend auf die Helladaptation.

4.4. Wirkung des Adaptationszustandes der Schirmpigmente auf ihre Ca^{2+} -Pufferfunktion

Bei früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß die distalen Retinulapigmente (Schirmpigmente) eine Art "Pufferfunktion" für Ca^{++} in der Photorezeptorzelle von Astacus ausüben. Versuche, die in Salzlösungen mit unterschiedlichen Ca^{++} -Konzentrationen durchgeführt wurden, zeigten, daß die Schirmpigmente Ca^{++} aus Ca^{++} -reichen Lösungen aufnehmen und es in Ca^{++} -arme Lösungen abgeben können (Schröder, 1980).

Durch die Anwendung des Laser Microprobe Mass Analyzer (LAMMA) wurde dieses Studium der Ca-Ionen-Kinetik ermöglicht. Mit dieser Methode ist es möglich, Isotope zu trennen, so z.B. auch $^{40}\text{Ca}^{++}$ von $^{44}\text{Ca}^{++}$ (siehe Heinen et al., 1980).

Es wäre von Interesse zu klären, ob die Ca^{++} -Pufferfunktion der Schirmpigmente in irgendeiner Weise mit der Bewegung der Schirmpigmente im Adaptationsmechanismus verknüpft ist, d.h. ob infolge einer Hell- bzw. Dunkeladaptation eine Änderung der Ca-Ionenkonzentrationen in den Schirmpigmenten eintritt.

Um dies näher zu untersuchen, wurde die isolierte Retina mit $^{44}\text{Ca}^{++}$ inkubiert und dunkel- bzw. helladaptiert. Die aufgenommenen Isotope wurden anschließend mit dem LAMMA-Gerät gemessen.

In den Präparaten, die während der Helladaptation in der $^{44}\text{Ca}^{++}$ -Lösung inkubiert waren, wurde eine deutlich höhere Konzentration von $^{44}\text{Ca}^{++}$ gemessen, als in den Präparaten, die während der Inkubation dunkeladaptiert waren. Bei einigen Dunkeladaptationsversuchen war sogar keine $^{44}\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme meßbar. Dies zeigt, daß der Adaptationszustand der Photorezeptorzelle die Aufnahmefähigkeit der Schirmpigmente für Ca^{2+} -Ionen beeinflusst.

Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

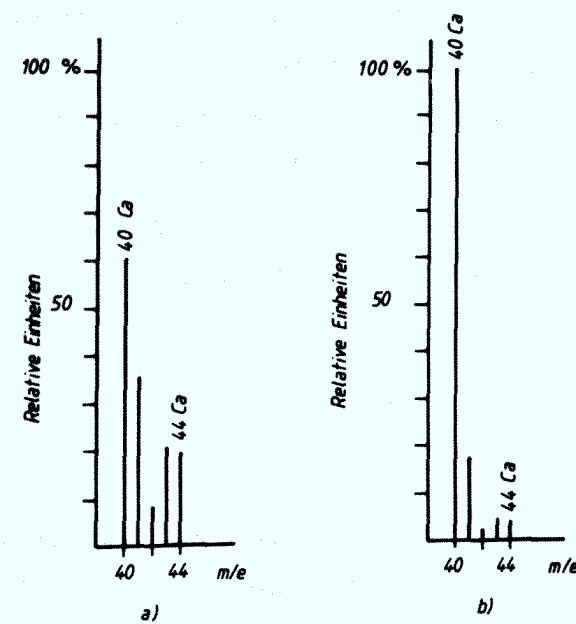


Abb. 14: Massenspektrum der Schirmpigmente

- a) von Retinen, die während der Helladaptation in der $^{44}\text{Ca}^{++}$ -Lösung inkubiert waren
- b) von Retinen, die während der Dunkeladaptation in der $^{44}\text{Ca}^{++}$ -Lösung inkubiert waren

4.5. Einfluß des Skorpion-Toxins auf Ca^{2+} -Kanäle

4.5.1. Ca-Kanal-Blocker

Um den Einfluß von Ca^{+} auf die Schirmpigmentwanderung (vgl. Kapitel 4.3.) näher untersuchen zu können, wäre es notwendig, einen spezifischen Ca-Kanal-Blocker zu finden.

Centruoides noxius

Es ist bekannt, daß Skorpion-Toxine spezifisch an Ionenkanäle binden (Carbone et al., 1982; Rochat, et al. 1979; Cahalan, 1975). Aufgrund der Untersuchungen von Carbone et al. (1982) erschien es aussichtsreich zu untersuchen, ob die FII-9-Komponente des Skorpiongifts Centruoides noxius einen Einfluß auf Kalzium-Kanäle hat. Die FII-9-Komponente ist die größte toxische Komponente des Giftes, und ihre Wirkung ist noch unbekannt (Possani et al., 1981).

Vertebraten-Zellen

Da die Biochemie der Vertebratenzellen weit ausführlicher untersucht worden ist als die der Evertibraten, erschien es sinnvoll, den Bindungsort des Toxins zuerst in Vertebratenzellen zu ermitteln. Daher wurden zuerst Versuche am Prinzipalorgan des Aals (Electrophorus electricus) und an der Photorezeptorzelle der Kröte (Bufo marinus) durchgeführt. Bei diesen Zellen ist die regulatorische Wirkung von Kalzium auf unterschiedliche biologische Prozesse gut untersucht.

Aal

Das Prinzipalorgan des Aals, das einen hoch entwickelten Ionen-Pump-Mechanismus besitzt, eignet sich sehr gut für die Untersuchungen der synaptischen Übertragung. Nach der Transmitterfreisetzungstheorie von Katz (1969) bewirkt ein Aktionspotential einen Einstrom von Ca^{+} -Ionen in den präsynaptischen Bereich. Dieser Ca^{+} -Einstrom bewirkt eine Ausschüttung der Transmittersubstanz aus den synaptischen Vesikeln in den subsynaptischen Spalt. Nach dem Abklingen des Aktionspotentials wird das eingeströmte Kalzium mit Hilfe einer Ca^{+} -Pumpe aktiv herausbefördert. Wenn die FII-9-Fraktion wirklich ein Ca-Kanal-Blocker ist, wäre zu erwarten, daß sie im Bereich der Synapse gebunden wird.

Kröte

Die Photorezeptorzellen der Kröte werden bevorzugt als Versuchsobjekte zur Untersuchung der Photorezeption bei Vertebraten verwendet. Nach der Hypothese von Hagins (1972) wirkt Ca^{2+} als Transmitter für die visuelle Erregung. Die Kalzium-Konzentration soll im Zytoplasma des Außensegments viel geringer (10^{-8} mol/l) sein als in den Discs (10^{-3} mol/l). (Die angegebenen Konzentrationswerte sind hypothetisch, nicht gemessen.) Ein aktiver Pumpenmechanismus hält diesen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten aufrecht. Bei Belichtung werden Ca^{2+} -Ionen aus den Discs in den zytoplasmatischen Raum freigesetzt. Die Ca^{2+} -Ionen sollen dann zur Außenmembran diffundieren, dort mit den Na-Ionenkanälen reagieren und dadurch das Schließen dieser Kanäle bewirken. Am Ende der Belichtung soll Ca^{2+} dann wieder von den Discs aufgenommen werden, und die Na-Kanäle öffnen sich wieder. Sollte die FII-9-Frak-

tion ein Kalzium-Kanal-Blocker sein, würde man ihre Bindung an der Disk- bzw. Außenmembran der Stäbchen erwarten.

Falls die Versuche an Vertebratenzellen einen Hinweis dafür liefern, daß das Toxin ein Ca-Kanal-Blocker ist, soll der Bindungsort des Toxins an Astacus und seine Wirkung auf die Schirmpigmentwanderung untersucht werden.

4.5.2. Untersuchung des Toxin-Bindungsortes

Der Bindungsort des Toxins (Centruoides noxius Fraktion FII und FII-9) in der Zelle wurde mit Hilfe spezieller Marker elektronenmikroskopisch untersucht.

In Abb. 15 sind die verwendeten Markierungsarten schematisch dargestellt, mit primären (anti-Toxin) und sekundären (anti-Kaninchen) Antikörpern. Die Markierungsart mit sekundären und primären Antikörpern liefert in der Regel einen empfindlicheren Nachweis, da an einen primären Antikörper (anti-Toxin) mehrere markierte sekundäre Antikörper (anti-Kaninchen) binden können. Die so markierten Stellen ließen sich unter dem Elektronenmikroskop beobachten.

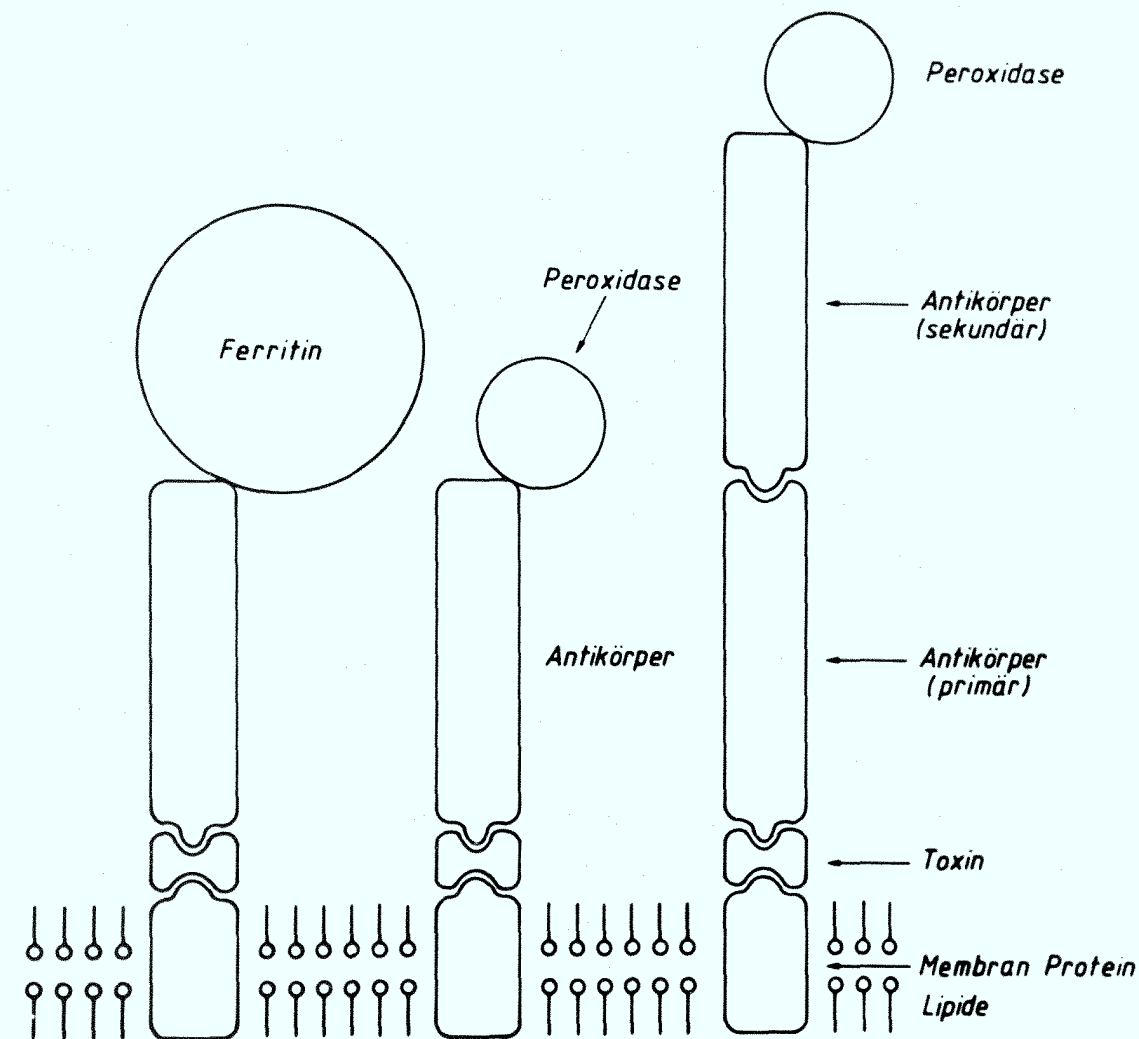


Abb. 15: Aufbau eines Peroxidase- bzw. Ferritin-markierten Toxin-Bindungsortes einer Zelle

Marker: Mittel zur Lokalisierung von Membranproteinen

Bei der klassischen Dünnschnittmethode wird ein Querschnitt durch eine Zelle bzw. Membran hergestellt und nicht deren Oberfläche betrachtet. Diese Methode ist oft ausreichend bei einer rein morphologischen Untersuchung. Handelt es sich jedoch um ein funktionelles Studium, ist

es unbedingt notwendig, die spezifischen Proteine der Oberfläche eindeutig identifizieren zu können. Die Proteine sind unter dem Elektronenmikroskop nur erkennbar, wenn sie eine eindeutige Struktur aufweisen, die entweder natürlicher oder künstlicher Art sein kann. Falls die Proteine keine eindeutige Struktur besitzen, muß man sie künstlich markieren, z.B. durch Antikörper. Eine weitere Möglichkeit, spezifische Membranproteine zu markieren, besteht in der Anwendung spezifischer Toxine. Diese Toxine wiederum werden durch geeignete Antikörper markiert. Diese Art der Markierung wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Da jedoch die Antikörper selbst unter den üblichen Bedingungen elektronenmikroskopisch nicht erkennbar sind, ist es weiterhin notwendig, sie durch elektronenmikroskopisch-sichtbare Substanzen zu kennzeichnen. Diese elektronenmikroskopisch-sichtbaren Substanzen (Marker) für die Antikörper-Markierung müssen eine Reihe von spezifischen Anforderungen erfüllen:

Marker-Anforderungen:

- Die Antikörper sollen mit den Markern eine stabile kovalente Bindung eingehen.
- Die Kopplung der Marker mit den Antikörpern soll ohne Denaturierung oder Beeinflussung der biologischen Aktivität der Proteine erfolgen.
- Die Marker selbst, sowie die damit markierten Antikörper, sollen keine unspezifischen Bindungen mit anderen Proteinen eingehen.

- Der Marker oder sein Reaktionsprodukt muß einerseits so groß sein, daß er unter dem Elektronenmikroskop eindeutig erkennbar ist, andererseits darf die Größe des Markers so wenig wie möglich die Mobilität der Antikörper in intra- bzw. interzellulären Räumen sowie ihre Interaktion mit dem Antigen behindern, d.h. die Marker sollten keine sterischen Einflüsse haben.
- Der Marker muß so stabil sein, daß er die chemischen Einwirkungen während der Fixierung der biologischen Präparate und die physikalischen Einwirkungen der Elektronenmikroskopie (Elektronenstrahl, hohes Vakuum) unbeeinflußt übersteht.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden die Marker Ferretin und Horseradish Peroxidase eingesetzt.

Ferretin

Der Marker Ferretin wurde schon im Jahre 1959 von Singer vorgeschlagen. Ferretin ist ein konjugiertes Makromolekül, das aus einem sphärischen, elektronendichten Kern (sog. Mizelle) mit ca. 70 Å Durchmesser besteht und von einer Hülle aus 20 identischen Untereinheiten umgeben ist. Der gesamte Durchmesser des Markers beträgt ca. 12 nm. Der Kern ist ein Eisenhydroxyphosphatpolymer. Sein Molekulargewicht beträgt 460,000 Dalton. Das Ferretinmolekül besteht aus ca. 23 % Eisen und ist daher unter dem Elektronenmikroskop aufgrund des elektronendichten Kerns gut sichtbar.

Seine Nachteile sind, daß in einigen Fällen wegen seiner Größe und Form sterische Einflüsse auftreten können. Während die Globulinmoleküle eines Kaninchens zum Beispiel mit ihrem Molekulargewicht von 160,000 Dalton leicht durch formaldehyd-fixierte Gewebe diffundieren können, bewegen die ferretin-markierten Globulin-Moleküle mit ca. 800,000 Dalton sich nur langsam durch die Gewebe (Pierce et al., 1964).

Enzym als Marker

Als Marker können weiterhin verschiedene Enzyme benutzt werden. Der grundsätzliche Unterschied zum Marker vom Typ Ferretin ist, daß nicht das Enzym sichtbar wird, sondern sein Reaktionsprodukt. Das zur Markierung eingesetzte Enzym muß daher nach seiner Bindung an den Antikörper noch enzymatisch aktiv sein. Die enzymatische Aktivität entlang der Membran ergibt ein Abbild der Verteilung der zu lokalisierenden Antigene.

Es ist jedoch wichtig, bei der Wahl des Enzyms zu beachten, daß sein Reaktionsprodukt sich für elektronenmikroskopische Untersuchungen eignet, d.h. unter dem Elektronenmikroskop erkennbar ist und nicht weiter diffundiert.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Markierungsart im Vergleich zu Ferretin ist die höhere Nachweisempfindlichkeit, da nicht das Protein selbst, sondern das Produkt seiner enzymatischen Aktivität sichtbar ist.

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von enzym-markierten Antikörpern ist das deutlich leichtere Durchdringen der Gewebe gegenüber Ferretin-markierten Antikörpern. Die Hintergrundfärbung ist oftmals geringer beim Einsatz der

enzym-markierten Antikörper. Weiterhin lassen sich die mit Enzym markierten Präparate sowohl für licht- als auch für elektronenmikroskopische Untersuchungen benutzen.

Horseradish Peroxidase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym Horseradish Peroxidase benutzt. Peroxidase hat ein Molekulargewicht von ca. 40.000 Dalton, d.h. um eine Zehnerpotenz geringer als Ferretin (460.000 Dalton). Das käufliche Enzympräparat ist eine Mischung von verschiedenen Isoenzymen. Peroxidase verliert durch die Fixierung nur unwesentlich ihre enzymatische Aktivität (30 - 60 %).

4.5.3. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, an Stäbchen der Vertebraten-Retina (Bufo marinus)

Die Morphologie der Photorezeptorzellen von Vertebraten ist eingehend von den folgenden Autoren behandelt: Fein und Szuts (1982) und Borwein (1981). An dieser Stelle wird nur eine kurze zusammenfassende Darstellung der Morphologie der Photorezeptorzellen gegeben.

Wie bei allen Vertebraten unterscheidet man auch bei der Kröte Bufo marinus zwischen zwei Arten von Sehzellen:

Stäbchen:

Die ca. 80 um langen Stäbchen der Kröte bestehen aus vier Abschnitten, aus dem Außensegment (ROS), dem Innensegment, dem Zellkern und dem Axon. Die Länge des Außensegmentes beträgt ca. 50 - 60 um und der Durchmesser ca. 7 - 8 um.

Außensegment:

Das Außensegment ist mit flachen Membransäckchen (Discs) gefüllt, die wie Münzen einer Geldrolle innerhalb der Hüllmembran gestapelt sind. Sie enthalten ebenso wie die Hüllmembran das Sehpigment Rhodopsin. Der Abstand von Discmitte zu Discmitte beträgt etwa 30 nm. Ein Stäbchen-Außensegment enthält etwa 1000 Discs.

Innensegment:

Innensegment und Außensegment sind durch einen dünnen Hals, in dem sich eine Cilienstruktur befindet, verbunden. Dem Innensegment, das eine große Anzahl von Mitochondrien enthält, folgt der Abschnitt mit dem Zellkern und ein längerer Nervenfortsatz, der mit der nachfolgenden Nervenzelle eine Synapse bildet. Über diese Schaltstelle wird die Erregung aus der Lichtsinneszelle weitergeleitet.

Zapfen:

Die Zapfen unterscheiden sich von den Stäbchen durch ihre konische Form und vor allem durch den abweichenden Aufbau des Membransystems im Außensegment. Die flachen Einfaltungen der Photorezeptormembran werden nicht als innere Discs abgeschnürt, sondern behalten ihre Verbindung mit der Außenmembran.

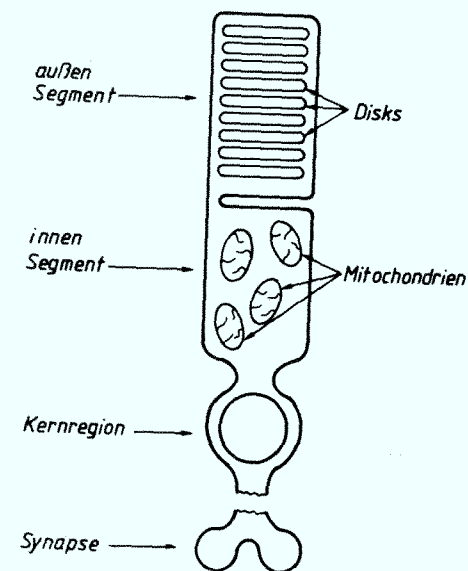


Abb. 16: Stäbchen eines Vertebraten-Photorezeptors

Ergebnisse:

Die Lokalisierung des Toxin-(FII-9)-Bindungsortes in der Photorezeptorzelle der Kröte Bufo marinus erfolgte in zwei Stufen. Die mit Toxin behandelte Retina ließ man in einer aus Kaninchen stammenden anti-FII-9-Lösung inkubieren und danach folgte eine weitere Inkubation in einer markierten anti-Kaninchen-IgG-Lösung. Als Marker wurde Peroxidase oder Ferretin verwendet. Bei den Versuchen an der Retina der Kröte ergaben sich folgende Ergebnisse:

Markierung mit Ferretin

Der Ferretinkomplex wurde in den Stäbchenaußensegmenten beobachtet. Wie aus den Abb. 6.1, 6.3 und 6.5 ersichtlich ist, liegen die Moleküle in dem Intradisc-Raum bzw. auf der Discmembran, jedoch nicht in dem Interdisc-Raum.

Markierung nur der Stäbchen, nicht der Zapfen

Auffällig ist, daß die Markierung nur in den Stäbchenaußensegmenten zu finden ist. In den Zapfen der Retina sind keine Zeichen einer Markierung zu finden. Dies ist besonders deutlich in Abb. 6.1 erkennbar. Hier ist ein deutlich markiertes Stäbchen neben einem Zapfen ohne jegliche Markierungsspuren zu erkennen.

Markierung nur an der Außensegment-Region

Besonders auffällig ist, daß nur die Außensegment-Region des Stäbchens Markierungen aufweist. In Abb. 6.6 und 6.7 ist die Kernregion bzw. das Innensegment der Stäbchen abgebildet. Hier findet man keine Zeichen einer Markierung.

Kontroll-Retinen, die nicht mit Toxin vorbehandelt waren, aber ebenfalls mit anti-FII-9, anti-Kaninchen IgG und Ferretin inkubiert wurden, sind in Abb. 6.2 und 6.4 gezeigt. Hier ist weder in den Stäbchenaußensegmenten noch in den Innensegmenten und Kernregionen der Stäbchen oder in den Zapfen eine Markierung erkennbar.

Markierung mit Peroxidase

Aus den Abbildungen 6.8 und 6.9 sind die Ergebnisse der Peroxidase-Markierung ersichtlich. In diesen Versuchen war die Strukturhaltung sehr schlecht, die Disc-Membranen wurden bei der Versuchsdurchführung zerstört und waren dadurch nicht gut auszuwerten. Ursache für die schlechte Strukturhaltung ist vermutlich die Verwendung von H_2O_2 als Co-Substrat für die Peroxidase-Reaktion.

Markierung nur an den Außensegmenten

In Abb. 6.9 sind mehrere Stäbchenaußensegmente erkennbar und entlang ihrer Außenmembran ist eine deutliche Markierung zu sehen. Auch innerhalb der Stäbchenaußensegmente sind schwarze, punktförmige Ablagerungen sichtbar (Abb. 6.8).

Die Kernregion

In der Kernregion des Stäbchens findet man wie bei den Ferretinversuchen keine Markierung. In Abb. 6.8 ist ein Zapfen neben einem Stäbchen abgebildet. Obwohl entlang der Zapfenränder eine Ablagerung zu sehen ist, zeigt sich innerhalb des Zapfens keine Markierung. Daher ist zu vermuten, daß die Ablagerung an den Zapfenrändern keine spezifische Markierung darstellt; es ist auch aus früheren Arbeiten bekannt, daß sich Peroxidase bevorzugt an Zellmembranen anlagert.

Die Kontrollversuche ohne Toxin (Abb. 6.9) zeigen keine spezifische Peroxidase-Markierungsspuren. In Abb. 6.9 liegt ein Zapfen neben zwei Stäbchenaußensegmenten. Entlang der Ränder der Photorezeptorzellen befindet sich das Peroxidase-Reaktionsprodukt, aber innerhalb des Stäbchenaußensegments selbst sind keine Markierungsspuren zu sehen.

Die Ergebnisse der Ferretin- und Peroxidase-Markierungen zeigen, daß der Bindungsort der Toxin-Fraktion FII-9 entlang der Disc-Membranen in der Außensegment-Region des Stäbchens liegt. Das Toxin wird weder von den übrigen Regionen des Stäbchens noch von den Zapfen gebunden.

Es ist bemerkenswert, daß die markierten Antikörper innerhalb des Stäbchenaußensegments entlang der Discmembran zu beobachten waren, da im Normalfall die Außenmembran das Eindringen derart großer Moleküle, wie die markierten Antikörper und das Toxin sie darstellen, nicht erlaubt. Es ist zu vermuten, daß das Toxin "Löcher" durch die Membran verursacht, wie es auch von anderen Toxinen bekannt ist. Ein Beispiel dafür ist das Toxin der Schwarzen Witwe. Es wurde festgestellt, daß die aktiven Komponenten dieses Giftes in der Lage sind, Kanäle in dünne Lipidfilme zu machen (Hurlbut und Ceccarelli, 1979). Die so entstandenen Kanäle könnten dann die Passage der markierten Antikörper ermöglichen.

4.5.4. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, am elektrischen Organ des elektrischen Aals (Electrophorus electricus)

Die Morphologie des Prinzipalorgans des Aals ist eingehend von den folgenden Autoren behandelt: Luft (1956, 1958) und Chagas (1961). An dieser Stelle wird nur eine kurze zusammenfassende Darstellung der Morphologie des Prinzipalorgans gegeben.

Electrophorus electricus hat drei elektrische Organe, die 70 % seiner Gesamtkörpermasse ausmachen. Die drei Organe sind das sogenannte Prinzipalorgan (90 % der gesamtelektrischen Organmasse), das Hunter- und das Sachs-Organ (von Sengbusch, 1979).

Die elektrischen Organe enthalten elektrische Platten (Elektroplaque), die den Muskelfasern homolog sind, während der Entwicklung aber die funktionsfähigen Myofibrillen verloren haben und dadurch nicht mehr kontrahieren können. Sie sind serienweise in Säulen gestapelt (von Sengbusch, 1979).

Eine elektrische Platte hat zwei funktionell verschiedene Seiten. Nur die caudal gelegene ist innerviert und enthält Synapsen. Die rostral gelegene Seite ist auf den aktiven Transport von Natrium- und Kaliumionen spezialisiert (Bourgeois et al., 1971; siehe Abb. 17).

Die beiden Membranen unterscheiden sich erwartungsgemäß in ihrem Enzymmuster. Acetylcholin-Rezeptoren und die Acetylcholin-Esterase findet man nur auf der innervierten Seite, während die Rückseite reich an Na/KATPase ist (Bourgeois et al., 1971).

Ein weiterer morphologischer Unterschied der beiden Seiten besteht in dem Vorhandensein eines hoch entwickelten Systems von Caveolae. Caveolae sind blinde, elongierte, Tubulus-artige Einstülpungen der Plasmamembran der Zelle. Der Elektroplaque enthält Vesikel, die ungefähr den gleichen Querschnitt haben wie die Caveolae (500 - 1000 Å). Dieses System ist auf der nicht-innervierten Seite stärker entwickelt (Luft, 1958).

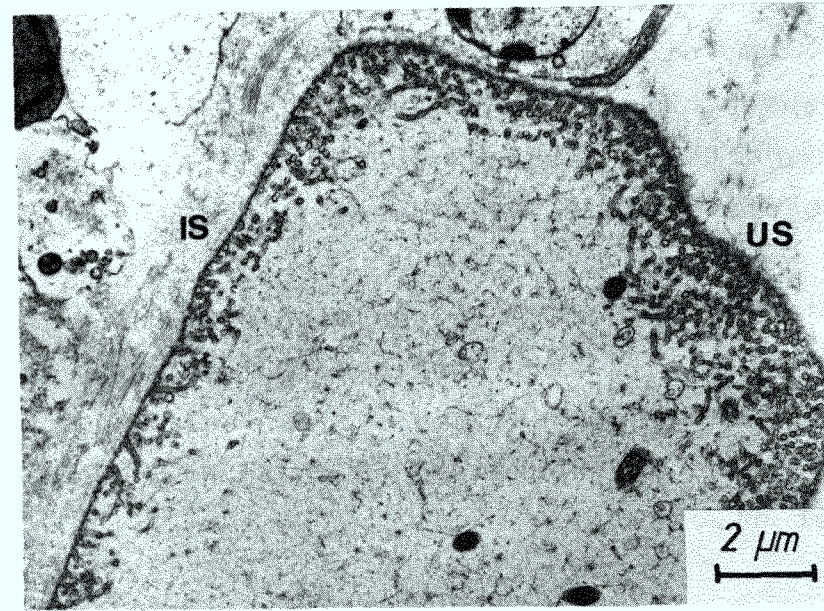


Abb. 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme der funktionell verschiedenen Seiten des Aals. Innervierte Seite (I.S.), uninnervierte Seite (U.S.).

Ergebnisse:

Die Lokalisierung des Toxin-Bindungsortes (FII und FII-9) im Prinzipalorgan des Aals Electrophorus electricus erfolgte mit spezifischen markierten Antikörpern in der gleichen Weise wie bei Bufo marinus. Teile des Prinzipalorgans wurden mit der Toxinlösung und anschließend mit einer spezifischen anti-Toxin-Antikörper-Lösung behandelt.

Electrophorus electricus

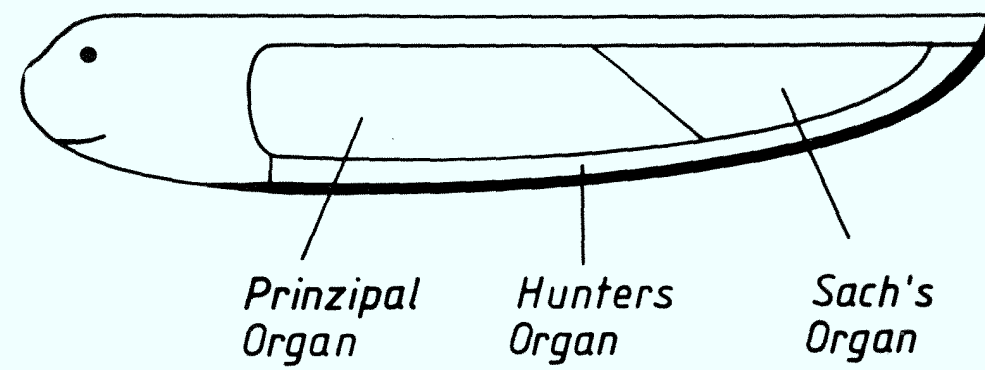


Abb: 18 *Electrophorus electricus*

Synaptische Region des Aals

Electrophorus electricus

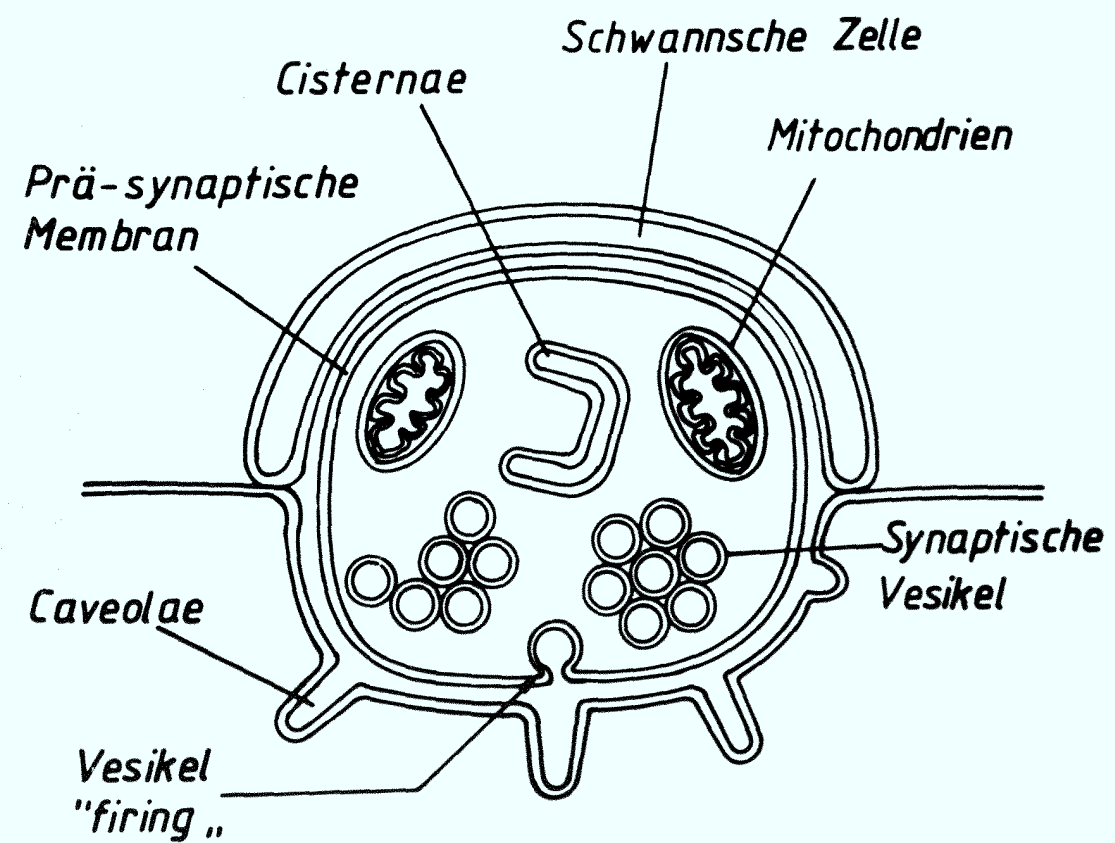


Abb: 19 *Synaptische Region des Aals*

Markierung mit Peroxidase:

Die Bindung des Toxins erfolgte ausschließlich in den Synapsen des Prinzipalorgans. Auf den Abbildungen 6.11 und 6.13 sind die durch das Peroxidase-Reaktionsprodukt (HRP) markierten Bindungsorte deutlich als schwarze Ablagerungen innerhalb der Synapse erkennbar. In Abb. 6.13 erscheint besonders deutlich, daß die Peroxidase-Reaktionsprodukte entlang einer Längsstruktur, vermutlich die Cisternae, innerhalb der Synapse liegen. Das Reaktions-Produkt ist auf Abb. 6.11 sogar innerhalb mehrerer synaptischer Vesikel zu beobachten. Verwendung der gesamten FII-Fraktion und der isolierten Unterfraktion FII-9 führten zu identischen Ergebnissen.

Demgegenüber findet man derartige spezifische Ablagerungen bei den Kontrollversuchen ohne Toxin nicht (siehe Abb. 6.12 und 6.14).

Auffallend ist der aufgequollene Zustand der Mitochondrien bei den Toxinversuchen. Diese aufgequollene Struktur ist besonders in Abb. 6.13 gut erkennbar.

In den Toxinversuchen (Abb. 6.11 und 6.13) scheint außerdem die Anzahl der synaptischen Vesikel im Vergleich zu den Kontrollversuchen (Abb. 6.12 und 6.14) stark reduziert zu sein.

Markierung mit Ferretin

Bei den mit Ferretin durchgeführten Markierungsversuchen sind die Bindungsorte des Skorpiontoxins noch deutlicher erkennbar als bei den Versuchen mit Peroxidase.

In beiden Fällen ist jedoch eindeutig zu sehen, daß der Bindungsort innerhalb der Synapse liegt (siehe Abb. 6.15 und 6.16). Die stark aufgequollenen Mitochondrien und eine stark reduzierte Anzahl von synaptischen Vesikeln innerhalb der Synapse ist auch bei den Ferretinversuchen zu beobachten (siehe Abb. 6.15 und 6.18).

Auch bei den Kontrollversuchen ohne Toxin (Abb. 6.19 und 6.20) war eine Schwärzung der Präparate durch Ferretin zu beobachten, jedoch in viel geringerem Maße, als dies bei den Toxinversuchen der Fall war. Auffällig ist, daß keine Reduzierung der synaptischen Vesikel erkennbar war.

Es ist zu vermuten, daß die bei den Kontrollversuchen beobachteten Markierungsbilder dadurch zustande kamen, daß die verwendeten markierten anti-Toxine durch Spuren von Toxinen verunreinigt waren. Diese Verunreinigung kann aus dem Gelbett der Toxin-beladenen Affinitätssäule stammen, über die die anti-Toxine gereinigt wurden.

Schwarze Witwe-Toxin

Bei der Diskussion der Ergebnisse mit Prof. Maelicke (Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund) fiel die Ähnlichkeit der Wirkung des Skorpiontoxins mit dem Toxin der Schwarzen Witwe bezüglich der reduzierten Anzahl von synaptischen Vesikeln auf. Es wurden daher Vergleichsversuche mit beiden Toxinen, jedoch ohne Markierung, am Aal durchgeführt.

Wie aus den Abbildungen 6.21, 6.23 und 6.24 erkennbar ist, haben beide Toxine eine stark reduzierende Wirkung auf die Anzahl der synaptischen Vesikel.

Zusammenfassend kann man sagen, daß der Bindungsort des Skorpiontoxins Centruoides noxius, Fraktion FII-9, der durch die Verteilung des Peroxidase-Reaktionsprodukts und des Ferretins ermittelt wurde, in den Synapsen des Prinzipalorgans liegt.

Mit der Annahme, daß das Toxin an die Ca-Kanäle bindet und diese blockiert, ließe sich die reduzierte Anzahl der Vesikel erklären. Die Blockierung der Ca-Kanäle bewirkt eine gesteigerte Konzentration von Kalzium innerhalb der Synapse, dadurch wird eine Dauerdepolarisierung simuliert. Dies hat eine ständige Ausschüttung der Transmittersubstanz zur Folge. Es ist noch zu klären, warum die markierten Stellen nicht an der Membran, sondern innerhalb der synaptischen Endigungen in den Cisternen zu finden sind. Das sogenannte "Synaptische Recycling Modell" von Heuser könnte hierfür eine plausible Erklärung liefern.

Nach diesem Modell verschmilzt die Membran der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran, wenn die Vesikel die Transmittersubstanz freisetzen. Die entleerten Vesikel wandern als "coated Vesicels" zurück in die synaptische Endigung. Innerhalb der Synapse binden sie an die Cisternae, wo neue Vesikel gebildet werden. Bemerkenswert ist, daß nur bei Synapsen, die einer verstärkten Reizung ausgesetzt waren, die Cisternae deutlich zu sehen sind.

Nach Heuser

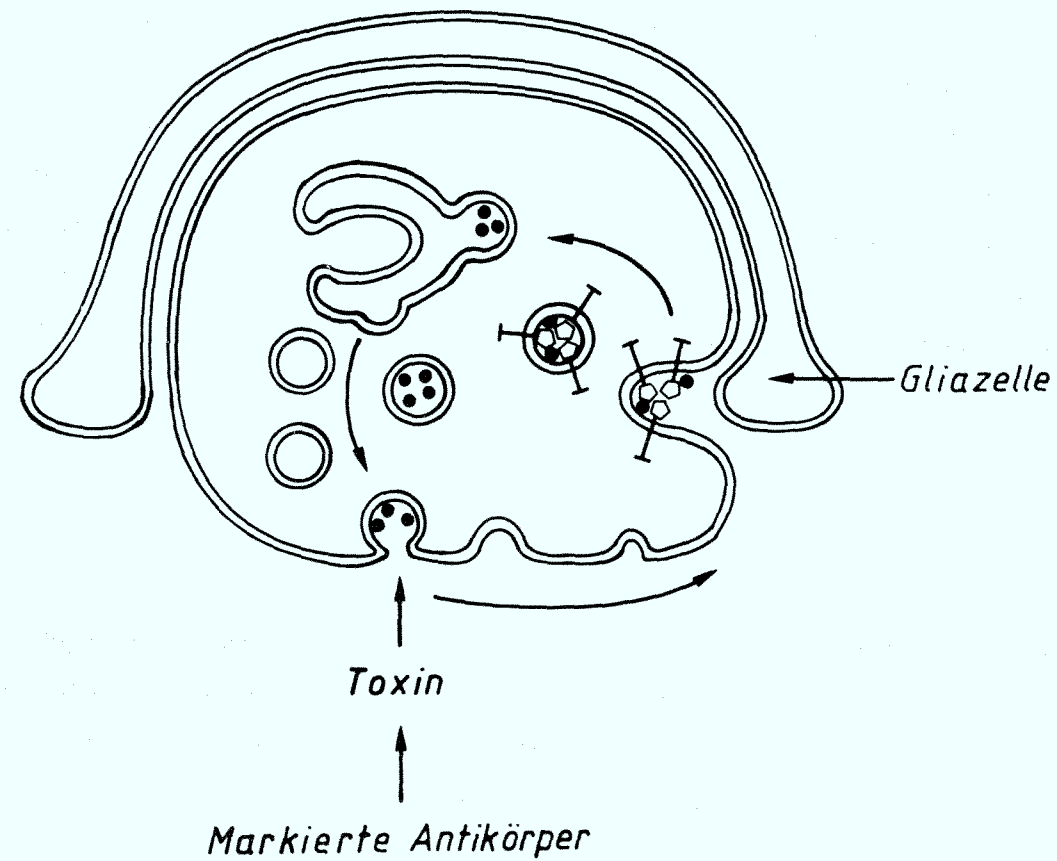


Abb. 20: Das synaptische Recycling-Modell von Heuser.
Schematische Darstellung der Aufnahme von
Toxin und markierten Antikörpern (•) in die
synaptische Endigung.

Die schematische Darstellung des Heuser-Modells in Abb. 20 zeigt, wie möglicherweise die markierten Antikörper in der Phase des Öffnens der Vesikel bei der Ausschüttung des Transmitters in die Vesikel gelangen können. Die an der inneren Membran der Vesikel gebundenen Antikörper können nach dem oben geschilderten

Mechanismus in die Cisternae hineingelangen. Auf diese Weise ließe sich das Auftreten von Antikörpern in den Cisternae erklären. Die Vermutung, daß die Antikörper (bzw. das Toxin) nur auf der Innenseite der Vesikel binden, wurde durch die anschließenden Versuche von Prof. Maelicke bestätigt. Seine Versuche mit isolierten intakten Vesikeln zeigen in normal orientiertem Zustand keine Bindung von Jod-markiertem Toxin, demgegenüber weisen Vesikel, die in Gegenwart von jodiertem Toxin somifiziert wurden, starke Markierungsspuren auf.

4.5.5. Lokalisierung des Bindungsortes des Skorpion-Toxins, Fraktion FII-9, in der Photorezeptorzelle von Astacus

Die Bindungsstudien wurden an isolierten Retinen von Astacus leptodactylus durchgeführt. Die Retina ließ man in einer Toxinlösung (FII und FII-9) inkubieren, und anschließend wurde sie mit spezifischen anti-Toxin-Antikörpern, die mit Peroxidase oder Ferretin markiert waren, behandelt. Die FII -Markierung diente hauptsächlich als Vorversuch, um festzustellen, ob eine Bindung des Toxins überhaupt stattfindet und ob diese Bindung mittels anti-Toxin-Antikörpern elektronenmikroskopisch nachweisbar ist.

Markierung mit Peroxidase

In der Retina des Flußkrebsses sind die Peroxidase-Reaktionsprodukte, die unter dem Elektronenmikroskop als schwarzer Komplex zu erkennen sind, innerhalb der Photorezeptorzelle zu beobachten, wobei eine unterschiedliche Bindung der gesamten Fraktion FII und FII-9 nicht beobachtet wurde.

In Abb. 6.25 sind die Peroxidase-Reaktionsprodukte wie eine Art Umrandung um das Schirmpigment verteilt. Die Mikrovilli der Retinulazellen weisen keine Zeichen einer Markierung auf. Ebenfalls sind in den interzellulären Räumen zwischen den Photorezeptorzellen keine Spuren des Reaktionsproduktes zu beobachten.

Die Schirmpigmente aus Kontrollversuchen ohne Toxin weisen keine Spuren einer Markierung auf (Abb. 6.26).

Markierung mit Ferretin:

In Abbildung 6.27 ist deutlich erkennbar, daß auch mit Ferretin markierte Antikörper an die Oberfläche der Schirmpigmente binden. Aus der Aufnahme (Abb. 6.30) ist ersichtlich, daß wie bei den Peroxidase-Markierungsversuchen kein Ferretin in den Mikrovilli der Retinulazellen zu finden ist. Abb. 6.29 zeigt interzelluläre Räume zwischen zwei Photorezeptorzellen. Auch hier sind keine Ferretin-Markierungen zu erkennen.

In den Kontrollversuchen ohne Toxin findet man keine Ferretinspuren an den Schirmpigmenten (Abb. 6.28).

Ebenso wie in der Retina von Bufo marinus war auch bei Astacus Ferretin bzw. Peroxidase innerhalb der Photorezeptorzelle zu beobachten. Es ist daher zu vermuten, daß das Toxin, ebenso wie in den Stäbchenaußensegmenten auch hier die Durchlässigkeit der Membran für große Moleküle wie Ferretin- bzw. Peroxidase-konjugierte Antikörper und das Toxin selbst erhöht.

Zusammenfassung:

Zusammenfassend kann man sagen, daß das Toxin (FII-9) die Photorezeptorzellmembran von Astacus permiiert und überwiegend an das Schirmpigment bindet.

Schlußfolgerung aus den Toxin-Bindungsstudien:

Das Toxin Centruoides noxius, Fraktion FII-9, bindet sowohl in der Retina von Bufo marinus als auch im Prinzipalorgan von Electrophorus electricus ausschließlich in Bereichen, die Ca-Kanäle enthalten. In der Photorezeptorzelle von Astacus bindet das Toxin an die Pigmentgranula, von denen bekannt ist, daß sie, je nach Bedarf, Ca^{2+} aufnehmen oder abgeben können (Schröder, 1980). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das Toxin möglicherweise Ca-Kanäle blockieren kann. Um diese Vermutung zu bestätigen ist es notwendig, den Ca^{2+} -Transport in Gegenwart des Toxins quantitativ zu untersuchen.

4.6. Der Einfluß des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, auf die Ca^{2+} -Pufferfunktion der Schirmpigmente bei Astacus

Die Schirmpigmente der Photorezeptorzelle von Astacus sind in der Lage, je nach Bedarf Ca^{2+} abzugeben bzw. aufzunehmen. Sie wirken daher als eine Art Puffersystem für Ca^{2+} in der Photorezeptorzelle (Schröder, 1980).

Das Ziel der folgenden Versuche ist zu ermitteln, ob die Bindung der Skorpion-Toxin-Fraktion FII-9 an die Pigmentgranula einen Einfluß auf die Ca^{2+} -Aufnahmefähigkeit dieser Schirmpigmente hat. Die Klärung dieser Frage könnte uns helfen, ein Bild der Wirkungsweise des Toxins auf erregbare Membranen zu gewinnen.

Die Untersuchung wurde an der isolierten Astacus-Retina durchgeführt. Die Retina wurde in $^{44}\text{Ca}^{++}$ in Gegenwart der Skorpiontoxin-Fraktion FII-9 inkubiert; anschließend wurde die aufgenommene Menge an $^{44}\text{Ca}^{++}$ bestimmt. Kontrollversuche wurden in der gleichen Weise durchgeführt, jedoch ohne Inkubation in der Toxinlösung.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung dargestellt. Die Meßergebnisse zeigen, daß in den Kontrollversuchen durch die Schirmpigmente ungefähr die doppelte Menge von $^{44}\text{Ca}^{++}$ gegenüber den mit Toxin behandelten Präparaten aufgenommen wurde. Demgegenüber war die $^{40}\text{Ca}^{++}$ -Konzentration im Toxinversuch und in der Kontrolle gleich. Die unveränderte $^{40}\text{Ca}^{++}$ -Konzentration bedeutet, daß die Membran der Pigmentgranula durch die Toxineinwirkung nicht zerstört wurde, da sonst aufgrund des unspezifischen Ca^{2+} -Austritts aus den Granula nur noch geringe Mengen von $^{40}\text{Ca}^{++}$ feststellbar wären. Daraus kann man folgern, daß die Skorpiontoxin-Fraktion FII-9 die Ca-Ionen-Aufnahmefähigkeit der Schirmpigmente von Astacus beeinflusst.

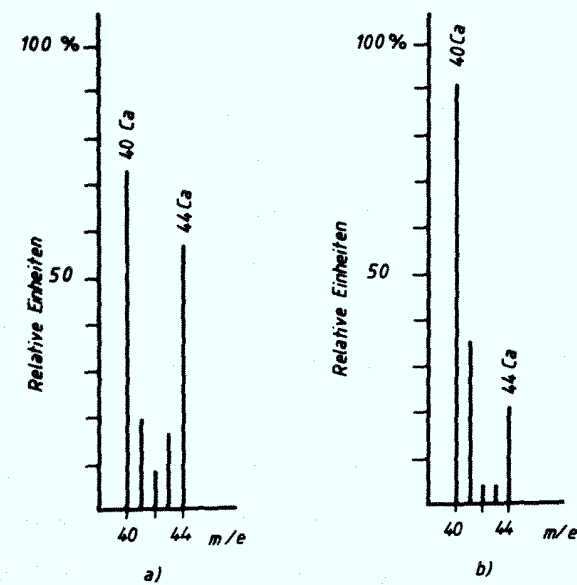


Abb. 21: Massenspektrum der Schirmpigmente

a) Kontrollretina ohne Toxin

b) Toxin-behandelte Retina

Im Kontrollversuch wurde etwa doppelt so viel $^{44}\text{Ca}^{++}$ von den Schirmpigmenten aufgenommen wie im Toxinversuch. Die $^{40}\text{Ca}^{++}$ -Konzentration war in beiden Experimenten gleich.

4.7. Der Einfluß des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, auf die Schirmpigmentwanderung bei Astacus

Nach den bisher beschriebenen Ergebnissen ist es sehr wahrscheinlich, daß die FII-9-Fraktion des Skorpiontoxins spezifisch die Aufnahme von Ca^{2+} in die Pigmentgranula von Astacus hemmt. Somit erscheint dieses Toxin geeignet, den in Kapitel 4.3. beschriebenen Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Pigmentwande-

rung und den vermuteten Zusammenhang zwischen Ca^{2+} und dem Mikrotubulisystem (vgl. Kapitel 4.2.) näher zu untersuchen.

Es ist zu klären, ob die durch die Wirkung des Toxins eingeschränkte Fähigkeit der Schirmpigmente, Ca^{2+} aufzunehmen, d.h. den Ca-Haushalt der Photorezeptorzelle zu regulieren, auch einen hemmenden Einfluß auf die Adaptationsfunktion (Lichtflußadaptation) der Pigmente hat. Hierzu wurden Retina mit Toxin inkubiert und anschließend hell- oder dunkeladaptierten Bedingungen ausgesetzt. Nach dem Versuchen wurde die Retina fixiert, und die Lage der Pigmente wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Das Säulendiagramm 22 zeigt den Einfluß des Toxins auf die Dunkeladaptation und die Helladaptation. Die Pigmentwanderung während der Dunkeladaptation wurde durch das Toxin stark gehemmt, während die Helladaptation unbeeinflusst blieb.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit dem Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Pigmentwanderung: auch hier wurde durch erhöhte Ca^{2+} -Konzentration nur die Dunkeladaptation der Schirmpigmente gehemmt. Im Gegensatz zur Helladaptation benötigt die Dunkeladaptation ein Mikrotubuli-System (vgl. Kapitel 4.2.). Der Schluß liegt nahe, daß Ca^{2+} spezifisch an der Regulation der Pigmentwanderung beteiligt ist, indem es die Aktivität des Mikrotubuli-Systems steuert.

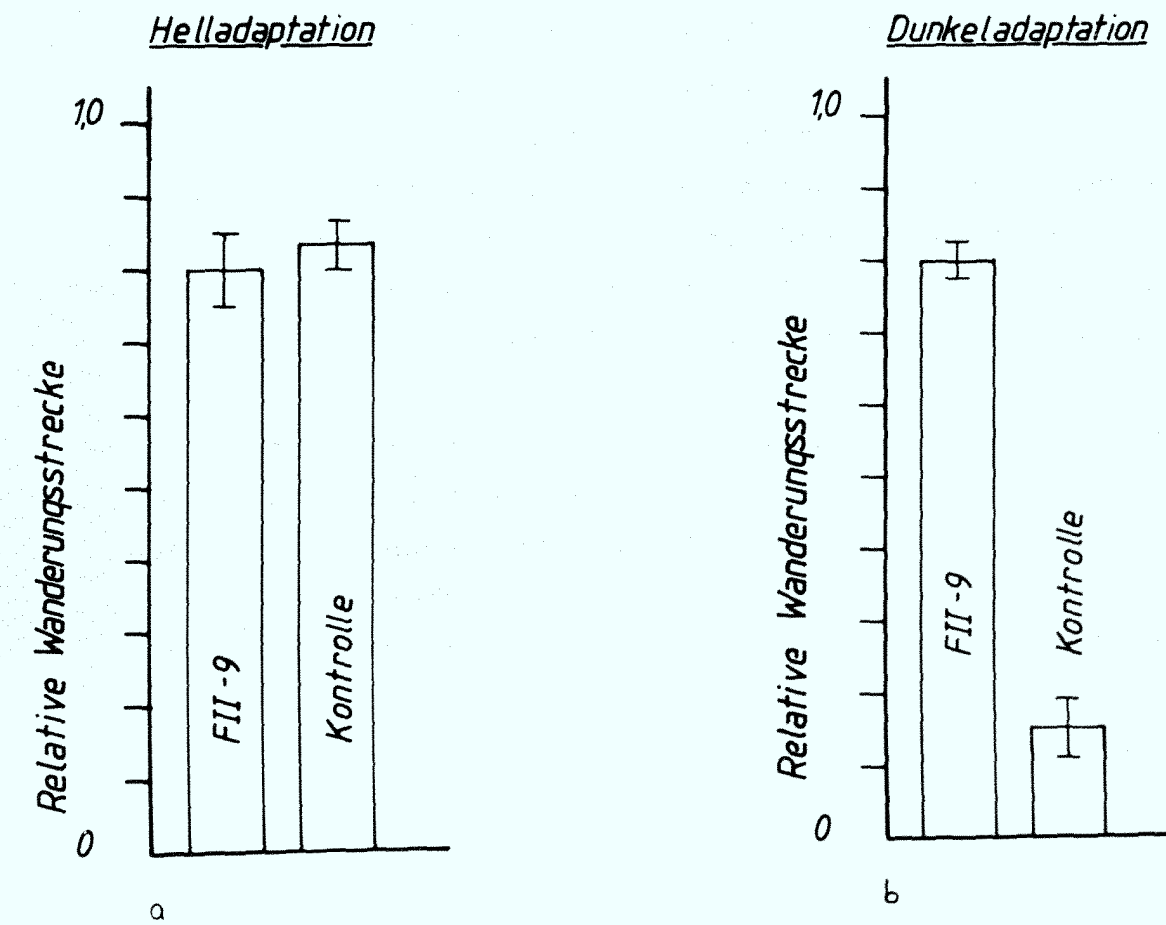


Abb. 22: Wirkung des FII-9-Toxins auf die Schirmpigmentwanderung
a) Helladaptation
b) Dunkeladaptation

5. Diskussion

Wie die meisten Photorezeptoren von Evertibraten, so reagieren auch die Retinulazellen der Krustaceen auf Lichtreize mit depolarisierenden Rezeptorpotentialen (Stieve, 1976). Veränderung der Lichtintensität hat außerdem eine Wanderung der Schirmpigmente zur Folge. Es ist zu vermuten, daß diese zwei Lichtantworten - Änderung der Ionenleitfähigkeit und Wanderung der Pigmentgranula - funktionell gekoppelt sind.

Lichteinwirkung auf die Photorezeptorzellen der Evertibraten verursacht eine Steigerung der internen freien Ca-Ionen-Konzentration (Lisman und Brown, 1975). Nach der Arbeitshypothese (Stieve, 1974) überführt ein Lichtreiz die Pfortnersubstanz P', die das Öffnen und Schließen des Lichtkanals kontrolliert, in einen "kurzlebigen" Zustand P". Die Affinität von P" ist für Natriumionen höher als für Kalzium, dadurch wird Kalzium freigesetzt. Es wird vermutet, daß eine Steigerung der Ca^{++} -Konzentration im Zytoplasma der Photorezeptorzelle die Pigmentwanderung in Richtung Lichtadaptation bewirkt (Olivio und Larsen, 1978).

Die vorliegenden Beobachtungen unterstützen diese Hypothese. Versuche, in denen der Einfluß der extrazellulären Ca-Konzentration auf die Helladaptation überprüft wurde, zeigten, daß Ca^{++} -Konzentrationen von über 10 mmol/l fördernd auf die Helladaptation wirkten. Wurde die Konzentration der Ca-Ionen durch Zugabe vom Ca-Chelat EDTA bzw. EGTA vermindert, so war eine hemmende Wirkung auf die Helladaptation zu beobachten. Es ist anzunehmen, daß eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration auch die intrazelluläre Konzentration von Ca^{++} er

höht. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen, die von Stieve et al. (1980) erzielt wurden. Hier ist ermittelt worden, daß eine Steigerung der Ca-Konzentration in der Inkubationslösung zum lichtadaptierten Zustand des ERG der Flußkrebs-Retina führte. Die Dunkeladaptation wird im Gegensatz zur Lichtadaptation durch hohe Ca-Konzentration gehemmt.

Um die Ursache des Einflusses von Ca auf die Schirmpigmentwanderung deuten zu können, ist eine Klärung des "Wanderungsmechanismus" erforderlich. In den Versuchen mit den Mikrofilament- und Mikrotubuligiften hat sich gezeigt, daß die Mikrotubuligifte Colchicin und Vinblastin einen signifikanten Einfluß auf die Schirmpigmentwanderung bei der Dunkeladaptation haben. Bei dem Mikrofilamentgift Cytochalasin B war kein Einfluß feststellbar. Dies unterstützt die Annahme, daß für die Schirmpigmentwanderung bei der Dunkeladaptation Mikrotubuli verantwortlich sind. Die Lichtadaptation dagegen wird durch Mikrofilament- und Mikrotubuligifte nicht gehemmt. Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß die Pigmentgranula während der Dunkeladaptation durch ein Mikrotubuli-System transportiert werden, daß der Helladaptation jedoch ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muß.

Es ist bewiesen, daß Ca eine wichtige Rolle bei der Regelung des Mikrotubuli-Abbaus spielt. Eine hohe Ca-Konzentration wirkt stark hemmend auf die Polymerisation von Mikrotubuli bzw. verursacht ihren Abbau (Schliwa, 1976; Weisenberg, 1972).

Eine Reihe von Zelltypen besitzen die Fähigkeit, je nach Bedarf Mikrotubuli auf- bzw. abzubauen. Ein bekanntes Beispiel ist das periodische Auf- und Abbauen von Mikrotubuli bei der Mitose. Eine ähnliche Eigenschaft ist bei der Photorezeptorzelle zu vermuten, wobei die Steuerung des Prozesses Ca-Ionen zuzuschreiben wäre.

Nach dieser Vorstellung bewirkt eine Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration durch Belichtung den Abbau der existierenden Mikrotubuli, die in ihrer aktiven Form die Pigmente im dunkeladaptierten Zustand halten. Auf diese Weise wird die Rückwanderung der Schirmpigmente in den lichtadaptierten Zustand ermöglicht.

Im Dunkeln ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kleiner als im helladaptierten Zustand. Dies hat die Reorganisation des Mikrotubuli-Systems zur Folge, mit dessen Hilfe die Pigmentgranula in den dunkeladaptierten Zustand wandern können. Bei den Dunkeladaptationsversuchen mit unterschiedlichen Ca-Konzentration erreichte die Zelle nur bei physiologischer Ca-Konzentration den dunkeladaptierten Zustand. Der scheinbare Widerspruch zu der hier aufgestellten Hypothese, daß es auch bei einer durch EDTA bzw. EGTA erniedrigten Ca-Konzentration zu keiner Dunkeladaptation kam, läßt sich mit der Bindung von intrazellulärem Mg^{2+} durch die Chelatbildner erklären. Bekanntlich ist das Vorhandensein von Mg-GTP-Komplexen Bedingung für die Polymerisation der Mikrotubuli (Weisenberg, 1972).

Die Hemmung der Dunkeladaptation durch den FII-9-Toxin läßt sich auch mit Hilfe dieses Modells erklären. Das Toxin bindet während der Inkubationszeit (20 Minuten bei Licht) an das Ca^{2+} -Transportsystem der Schirmpigmente, und

dadurch wird die Ca^{2+} -Aufnahmefähigkeit der Schirmpigmente eingeschränkt (vgl. Kapitel 4.6.). Die bei der Lichteinwirkung freigesetzten Ca -Ionen können nur noch zu einem geringen Teil von den Schirmpigmenten aufgenommen werden. Die in Kapitel 4.4. beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die während der Helladaptation freigesetzten Ca -Ionen von den Schirmpigmenten aufgenommen werden. In der anschließenden Dunkelphase verhindert nun die unter dem Einfluß des Toxins erhöhte "freie" Ca -Ionen-Konzentration einen Aufbau des Mikrotubulsystems. Eine Wanderung der Schirmpigmente (Dunkeladaptation) findet nicht statt.

6. Elektronenmikroskopische Abbildungen

- Anhang -

	<u>Abb.:</u>	<u>Seite:</u>
Lokalisierung des Bindungs- ortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, an Stäbchen der Vertebraten-Retina	6.1 - 6.10	83 - 85
Lokalisierung des Bindungs- ortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, am elektri- schen Organ des elektrischen Aals	6.11 - 6.24	86 - 88
Lokalisierung des Bindungs- ortes des Skorpiontoxins, Fraktion FII-9, in der Photo- rezeptorzelle von <u>Astacus</u>	6.25 - 6.30	89 - 90

Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen war die
Schnittdicke ca. 90 nm.

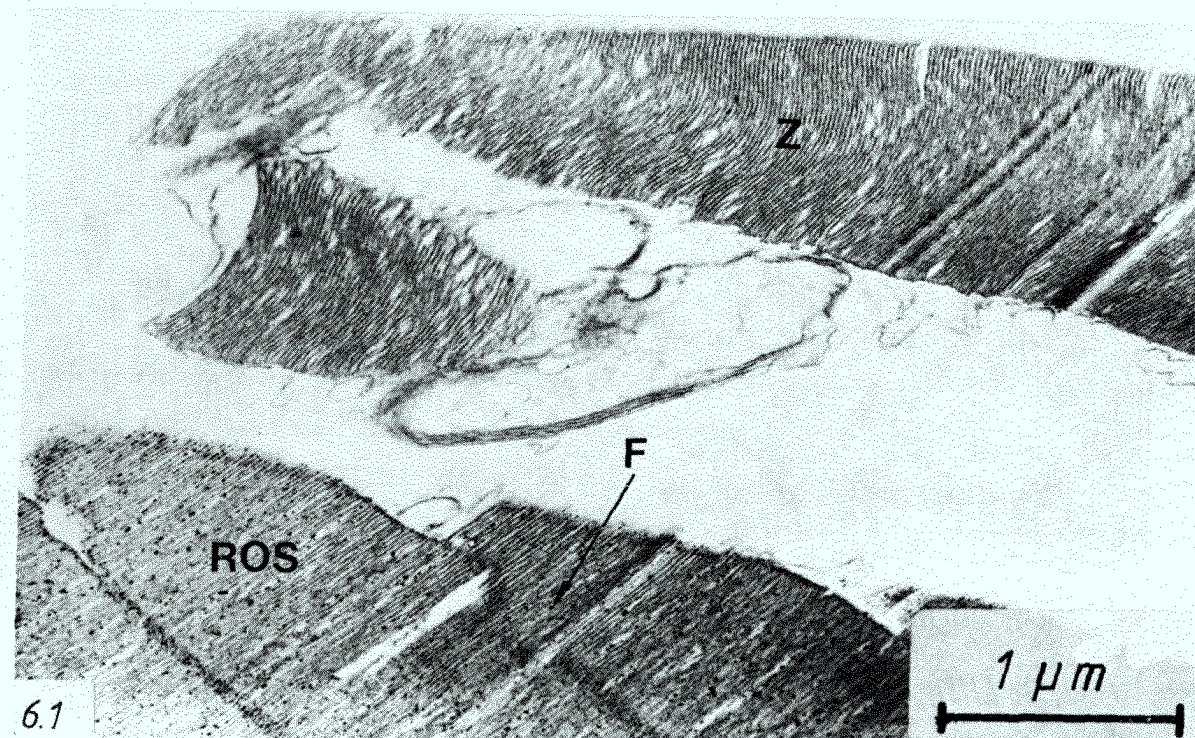


Abb. 6.1: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. Im Bild sieht man ein Stäbchenaußensegment (ROS) neben einem Zapfen (Z). In dem Stäbchenaußensegment sind deutliche Markierungsspuren zu sehen, demgegenüber in dem Zapfen keine.

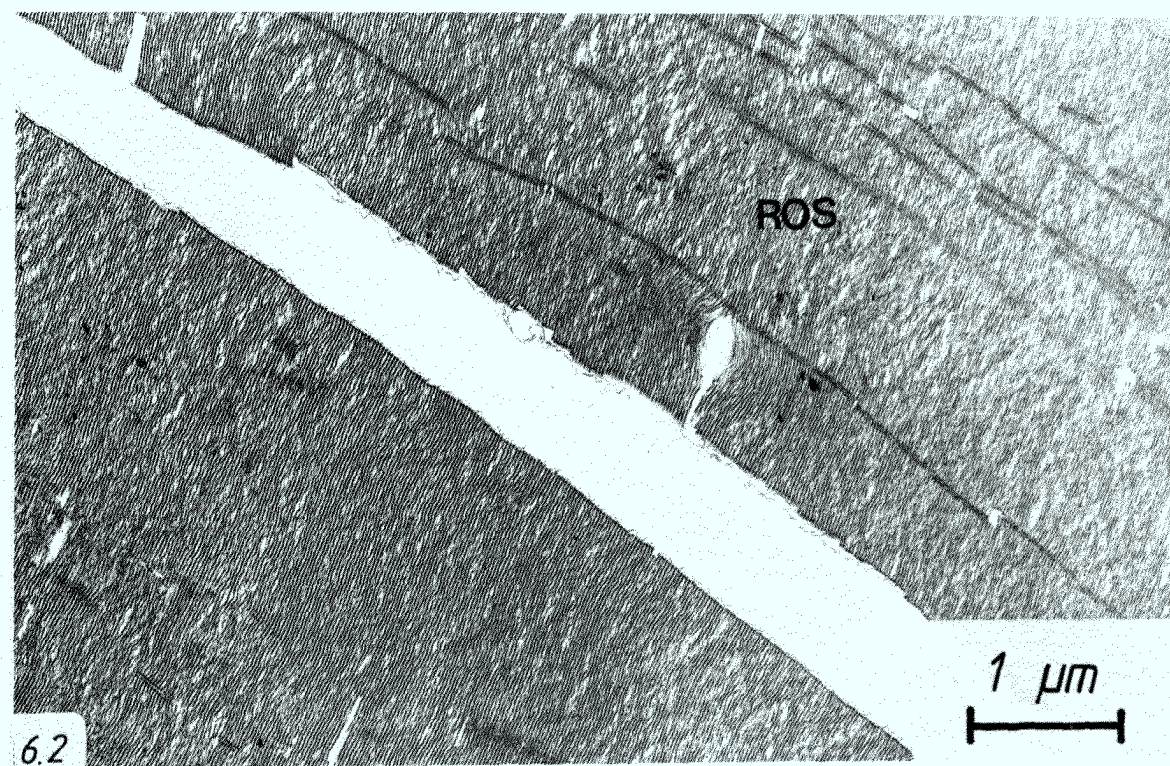


Abb. 6.2: Kontrollversuch: Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. Die zwei Stäbchenaußensegmente (ROS) weisen keine Markierungsspuren auf.

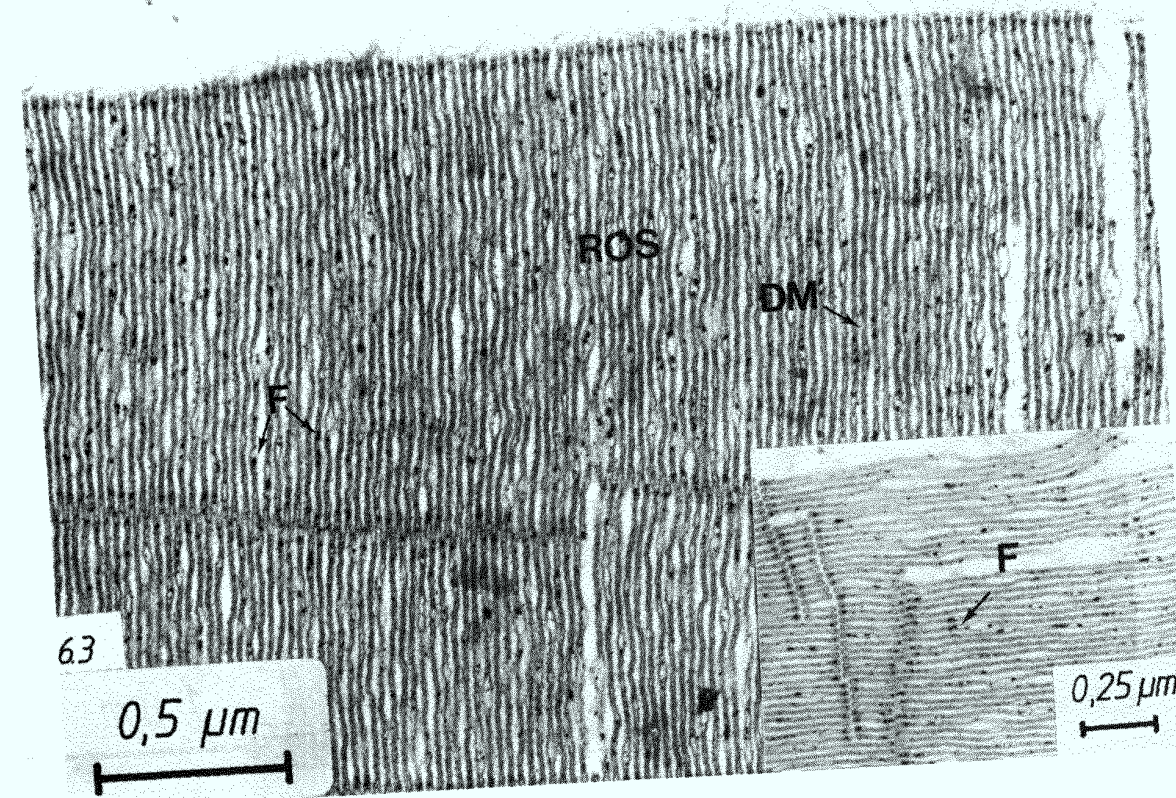


Abb. 6.3: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. Die Ferretin-Markierung (F) befindet sich entlang der Discmembran (DM). Stäbchenaußensegment (ROS).

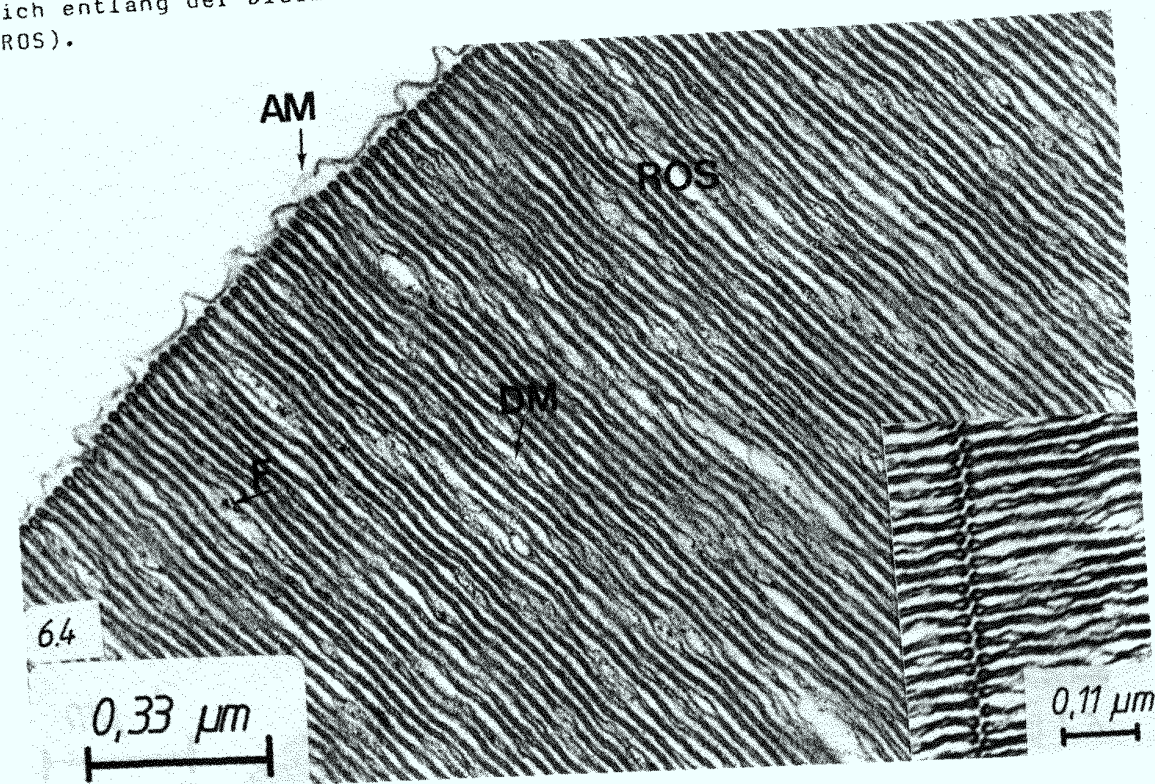


Abb. 6.4: Kontrollversuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. Vereinzelt sind Ferretinspuren (F) hier zu beobachten, jedoch nicht annähernd in dem Maße wie in Bild 6.3. Stäbchenaußensegment (ROS), Außenmembran (AM).

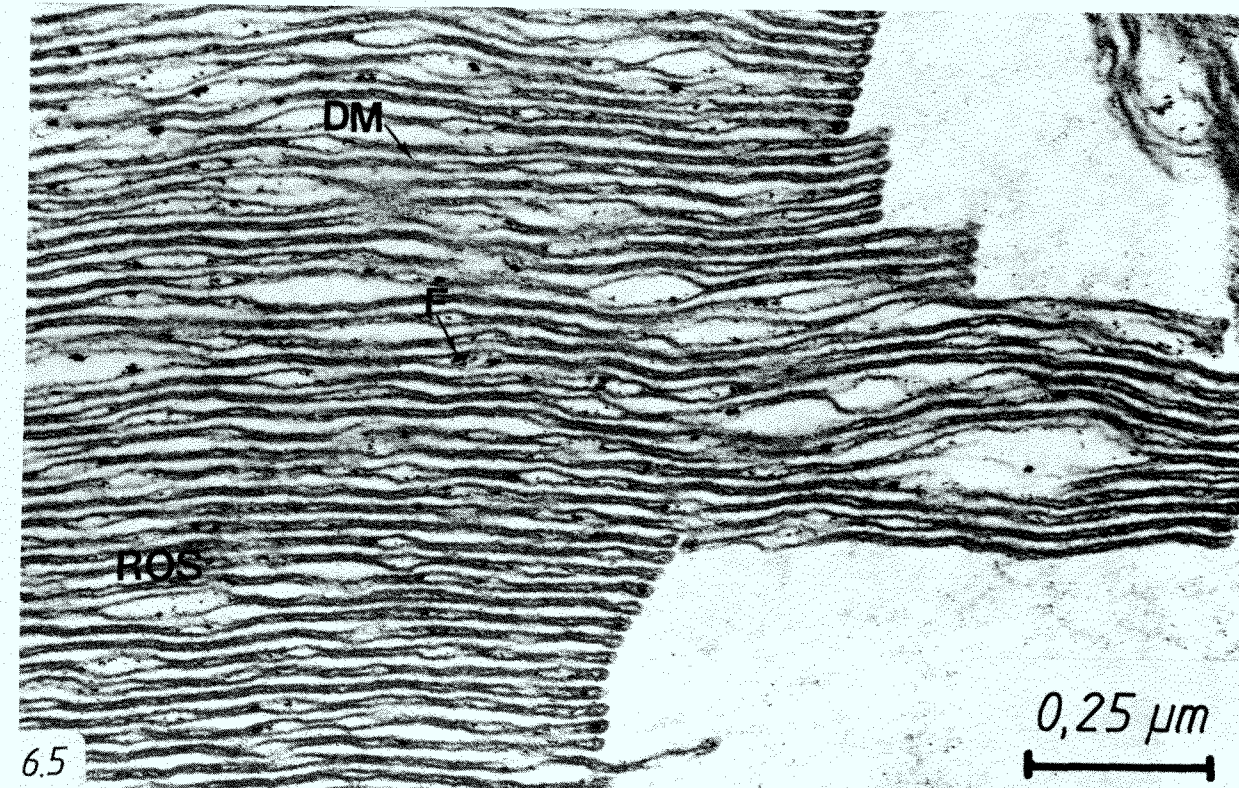


Abb. 6.5: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. Diese Aufnahme zeigt die Verteilung des Ferretins (F) entlang der Discmembran (DM) bei höherer Vergrößerung. Stäbchenaußensegment (ROS), Außenmembran (AM).

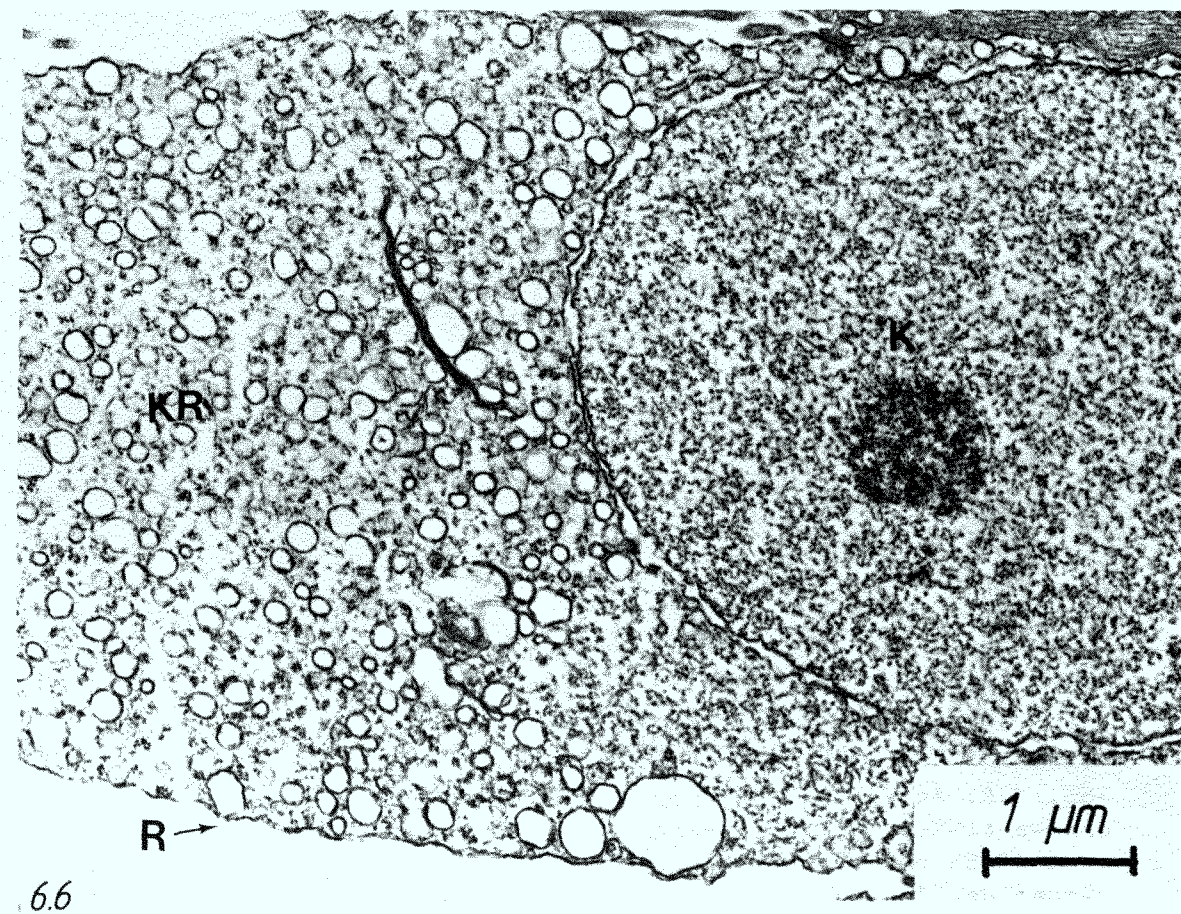


Abb. 6.6: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. In der Kernregion (KR) der Stäbchen (R) findet man keine Spuren von Ferretin.

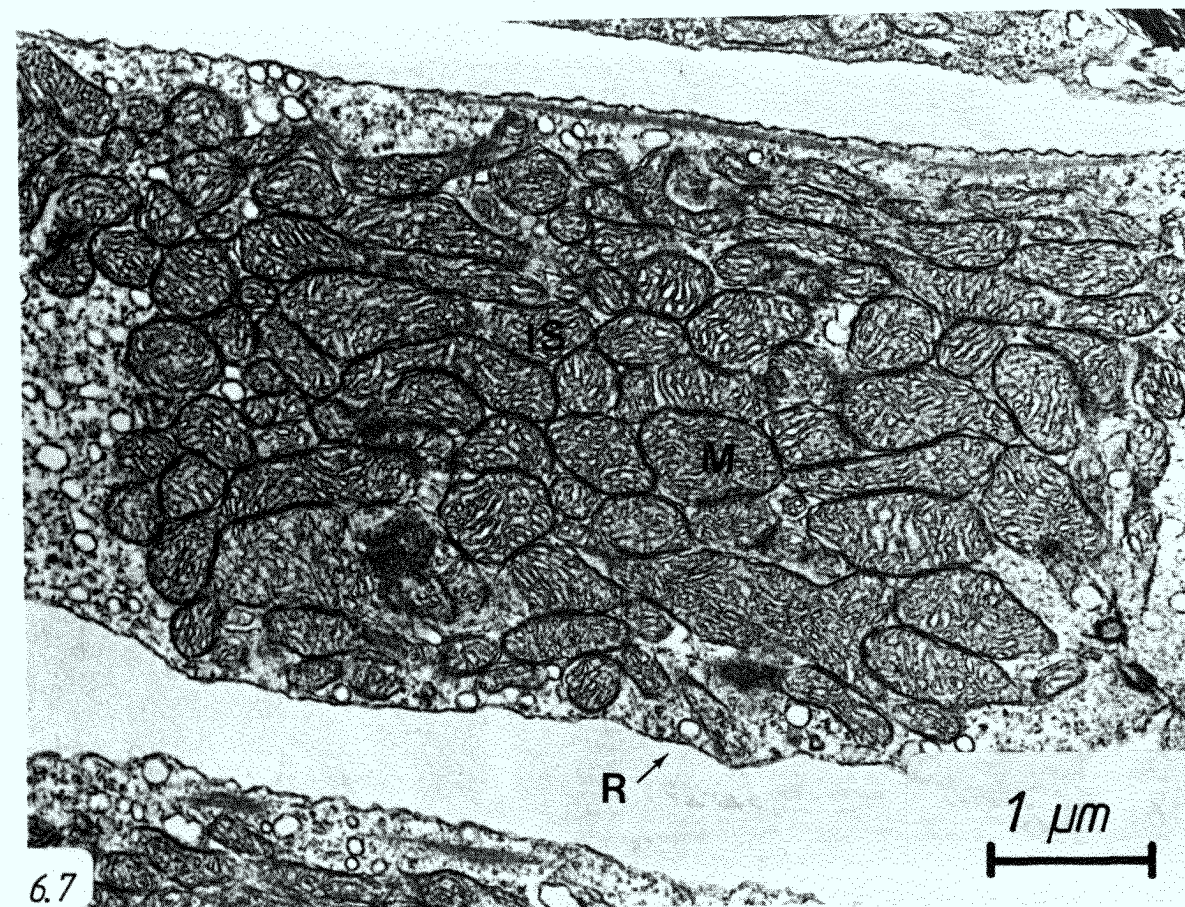


Abb. 6.7: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-Kaninchen. In den Innensegmenten (IS) der Stäbchen (R) findet man keine Markierungsspuren.

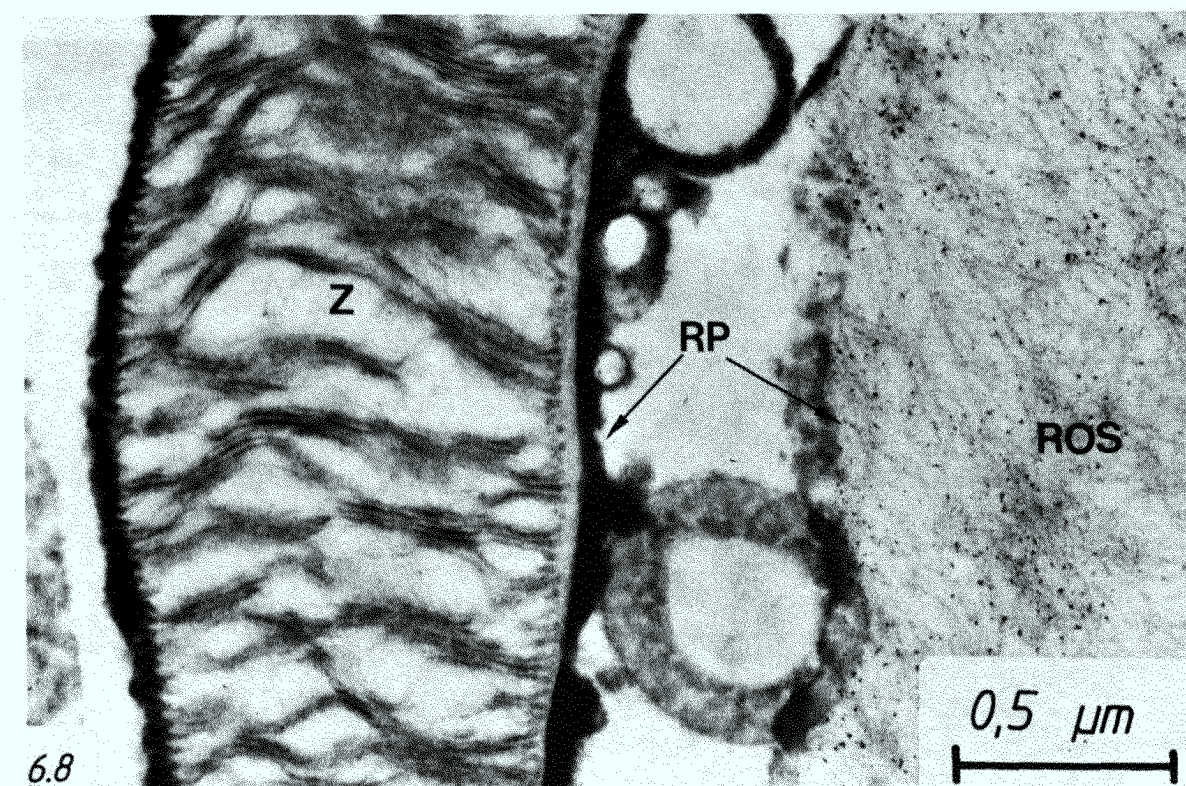


Abb. 6.8: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Peroxidase-anti-Kaninchen. Im Bild ist ein Stäbchenaußensegment (ROS) neben einem Zapfchen (Z) zu sehen. Um die Ränder der Zapfen und im Stäbchenaußensegment selbst sind die Reaktionsprodukte der Peroxidase (RP) als schwarze Punkte erkennbar.

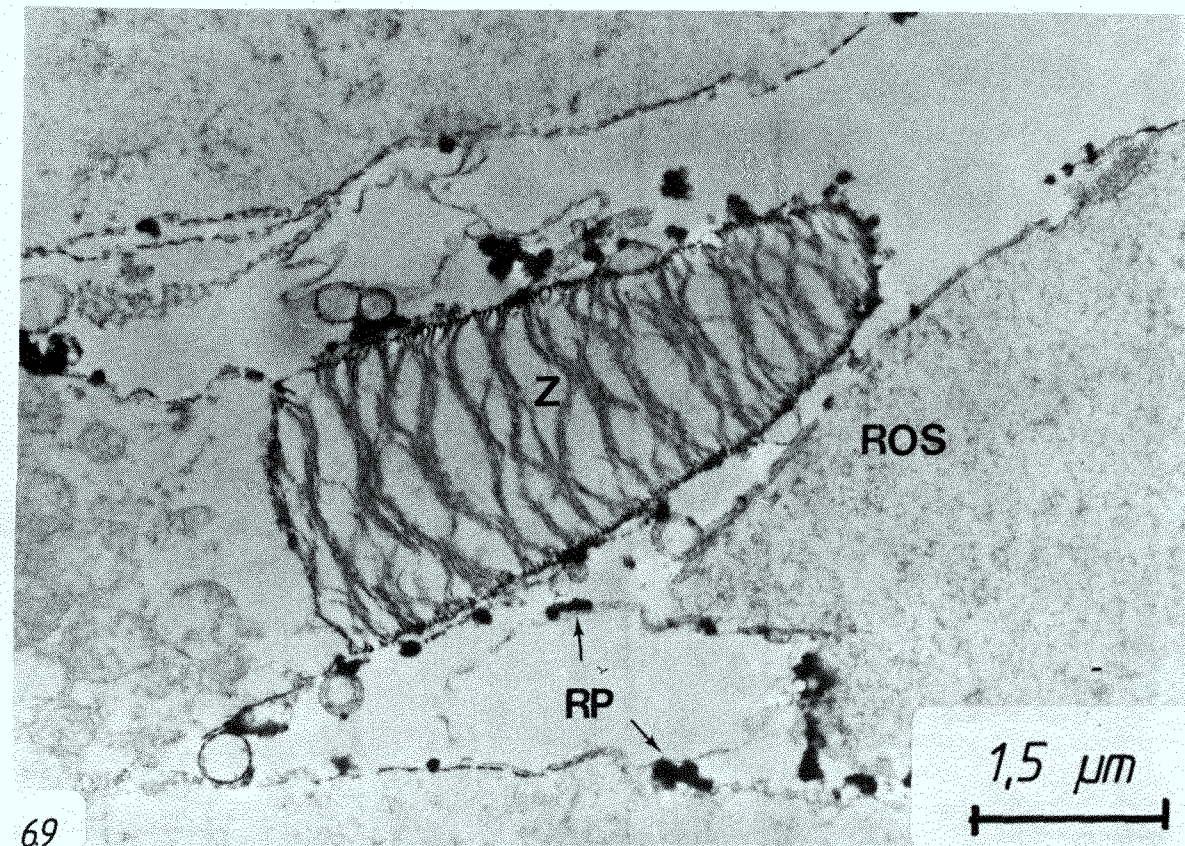


Abb. 6.9: Kontrollversuch: Markierung mit Peroxidase-anti-Kaninchen. Hier liegt ein Zapfen (Z) zwischen zwei Stäbchenaußensegmenten (ROS). Entlang der Ränder der Photorezeptorzellen befindet sich das Peroxidase-Reaktionsprodukt (RP), aber innerhalb des Stäbchenaußensegments selbst sind keine Markierungsspuren zu sehen.

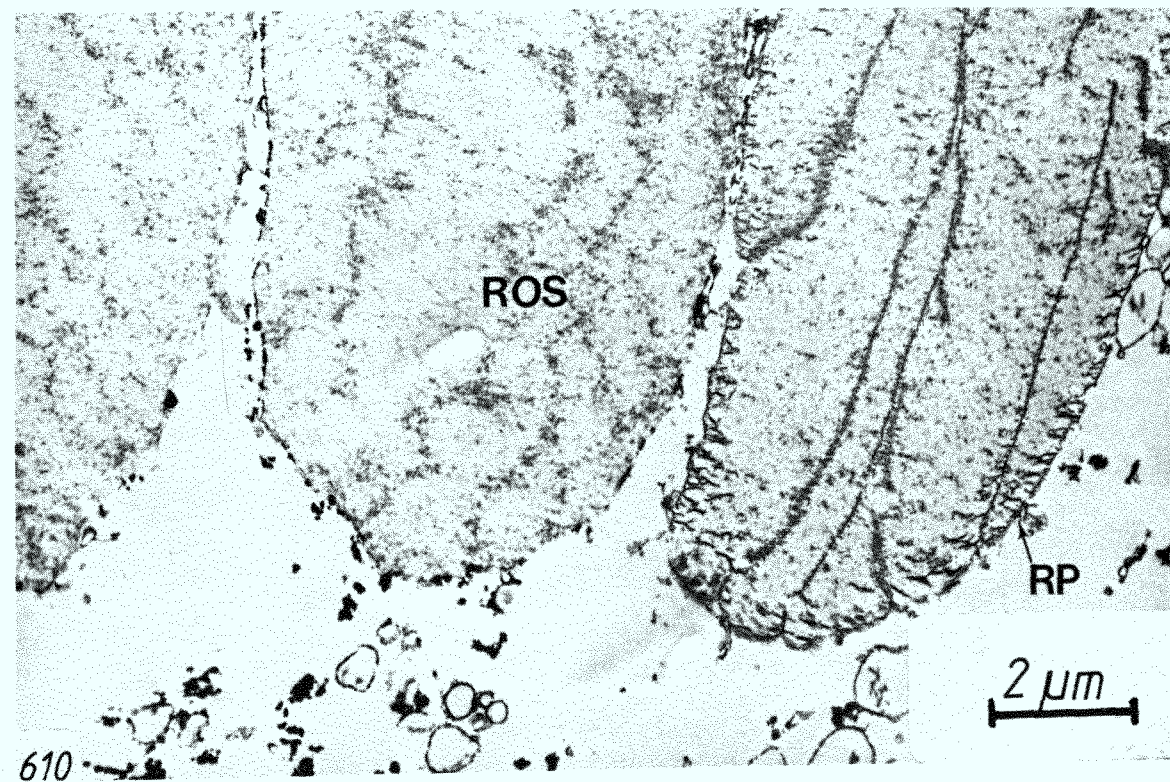


Abb. 6.10: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Peroxidase-anti-Kaninchen. Im Bild sind mehrere Stäbchenaußensegmente (ROS) mit den angelagerten Peroxidase-Reaktionsprodukten (RP) entlang der Ränder der Außenmembran zu sehen.

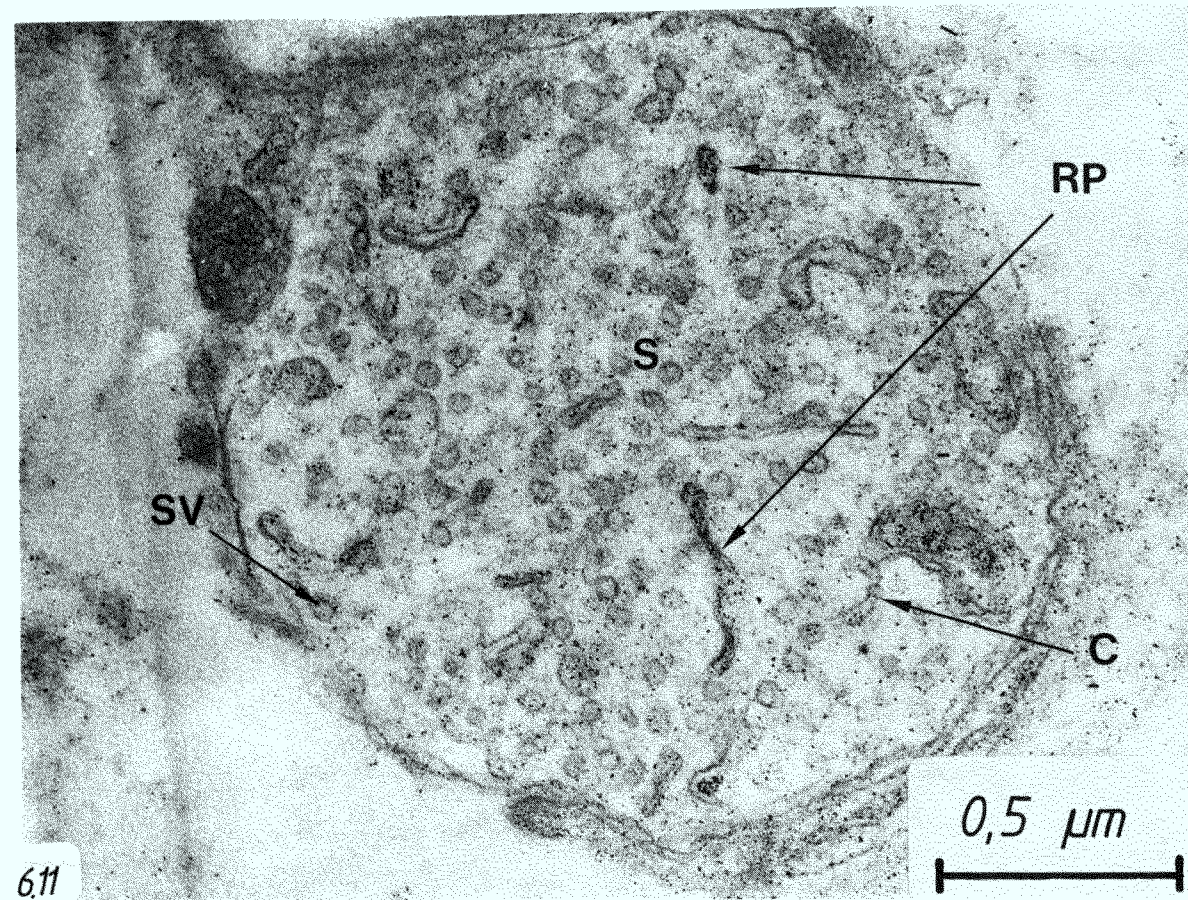


Abb. 6.11, 6.13: Toxinversuch (FII-9): Markierung mit Peroxidase anti-FII-9. In den Bildern 11 und 13 sind die mit Peroxidase-Reaktionsprodukten (HRP) gefüllten Synaptische Vesikel (SV) und Cisternae (C) zu sehen.

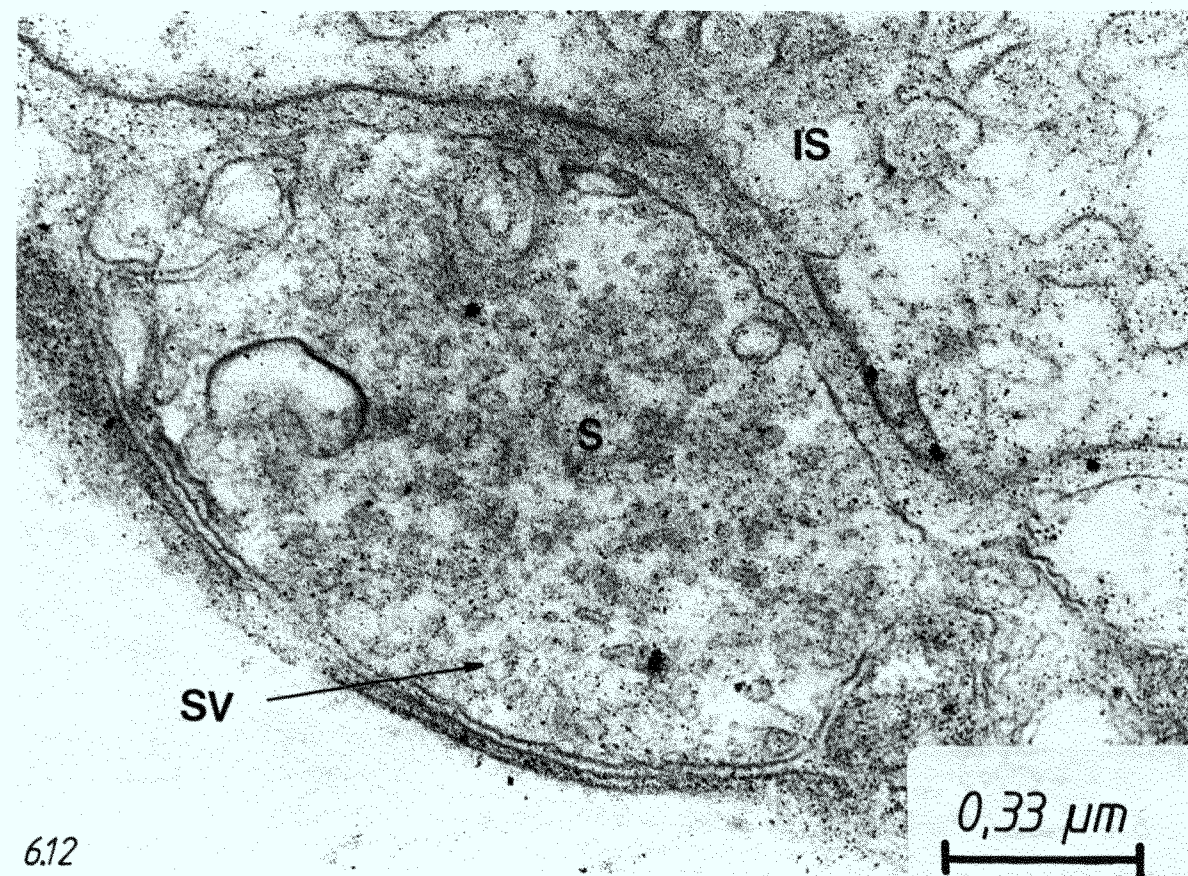
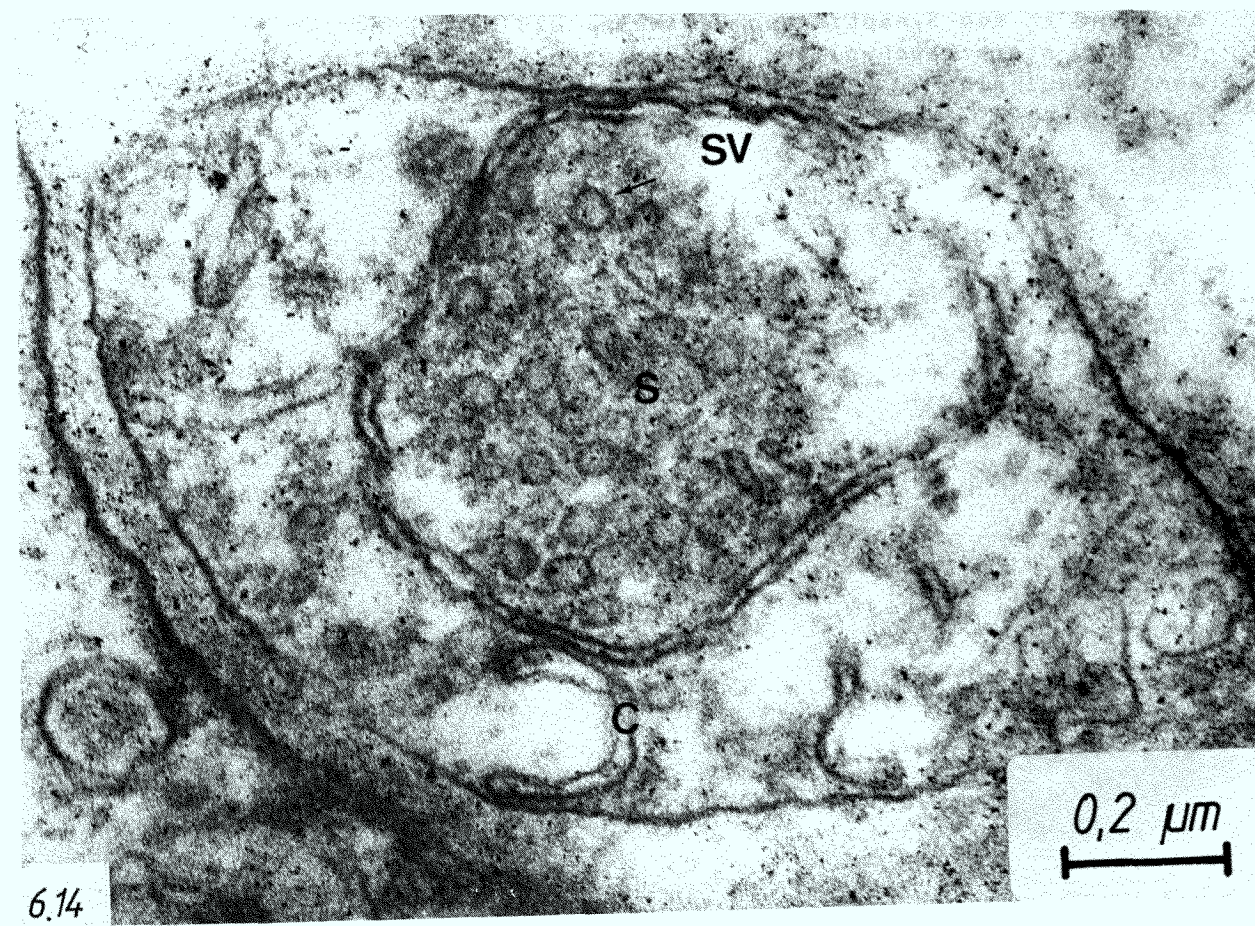
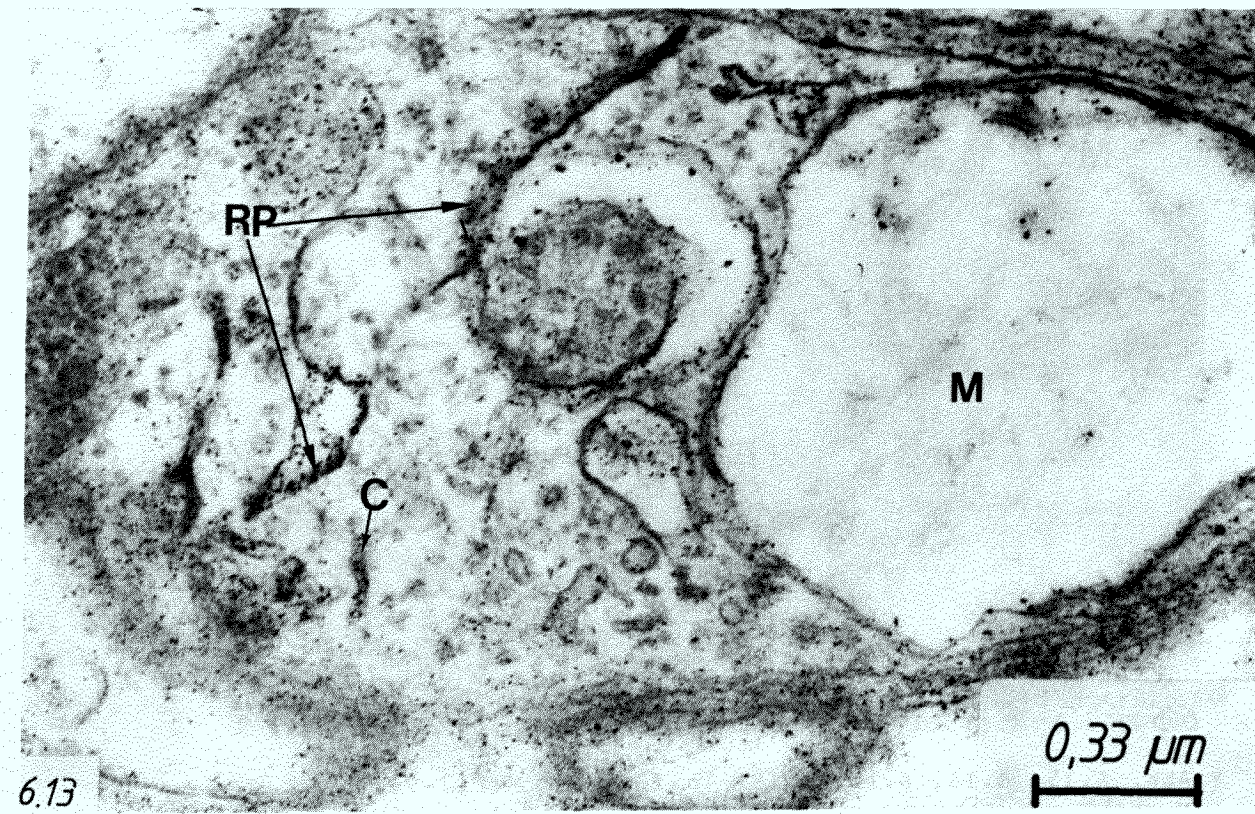
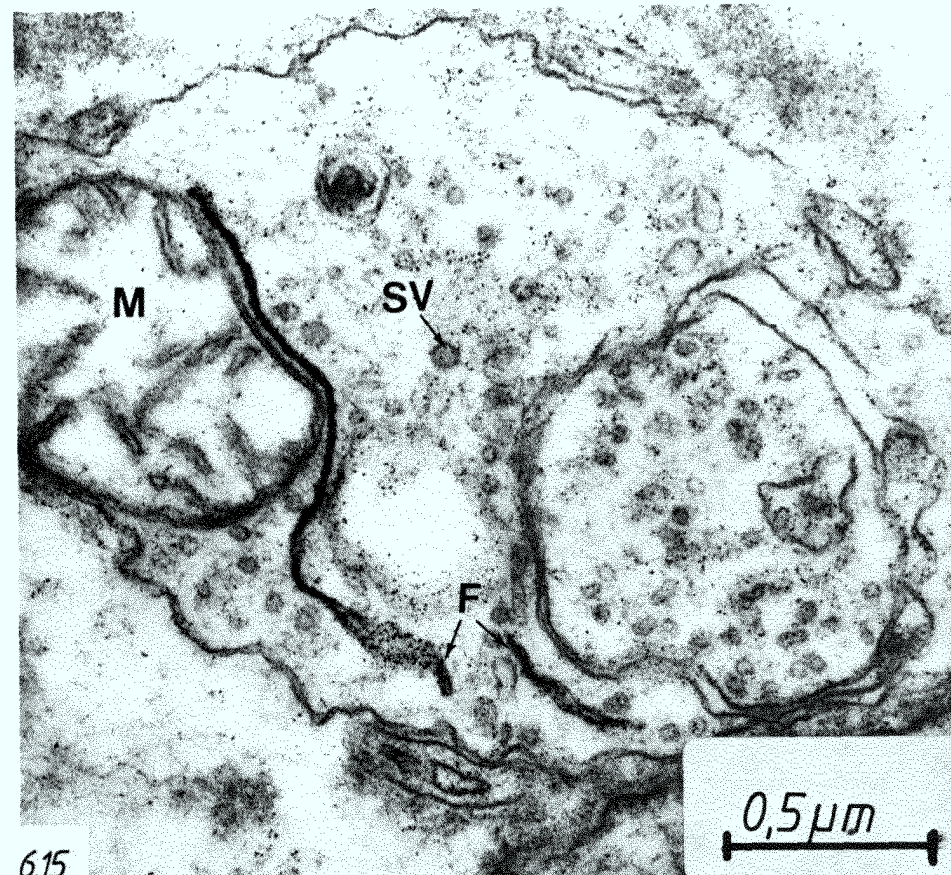


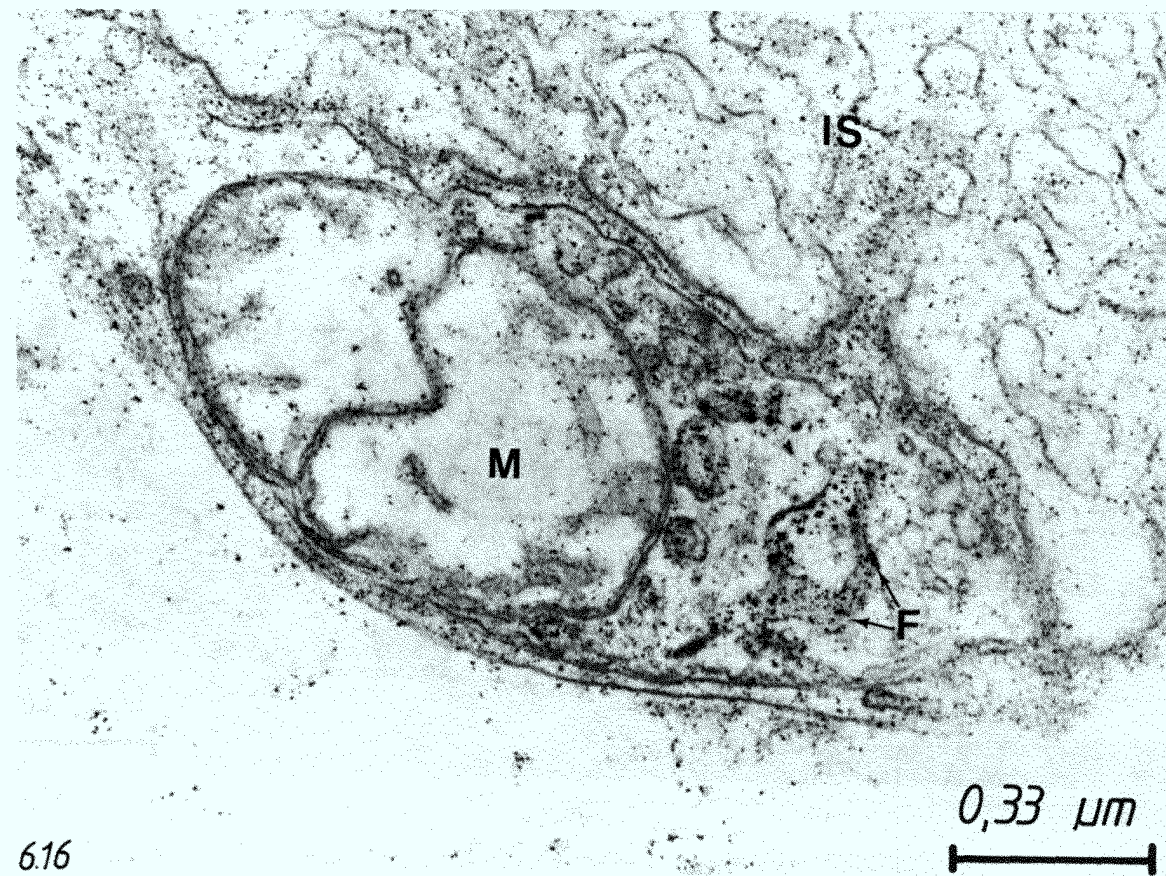
Abb. 6.12, 6.14: Kontrollversuch: Markierung mit Peroxidase anti-FII-9. Die Bilder 12 und 14 zeigen die mit Vesikeln (SV) gefüllten Synapsen (S) ohne deutliche Markierung. In Bild 14 sind besonders deutlich die Cisternen (C) erkennbar.



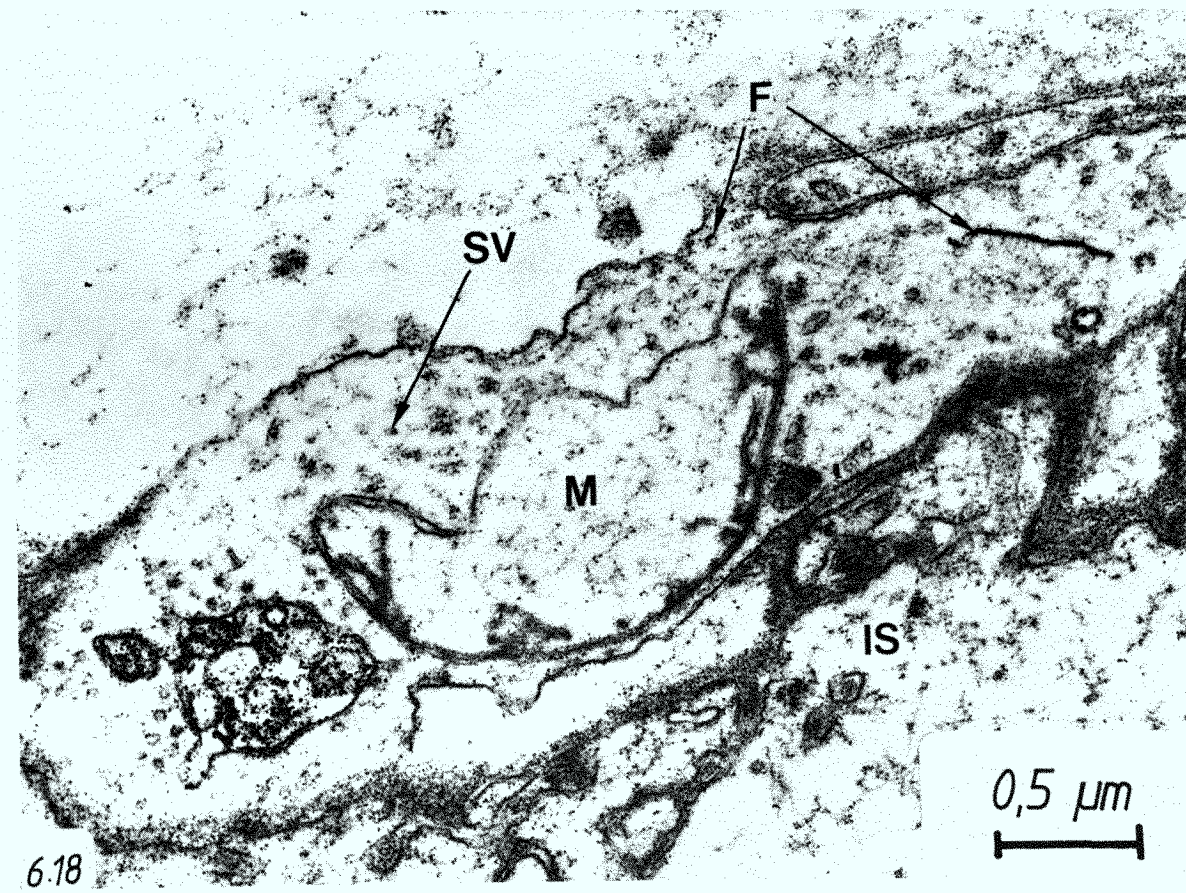
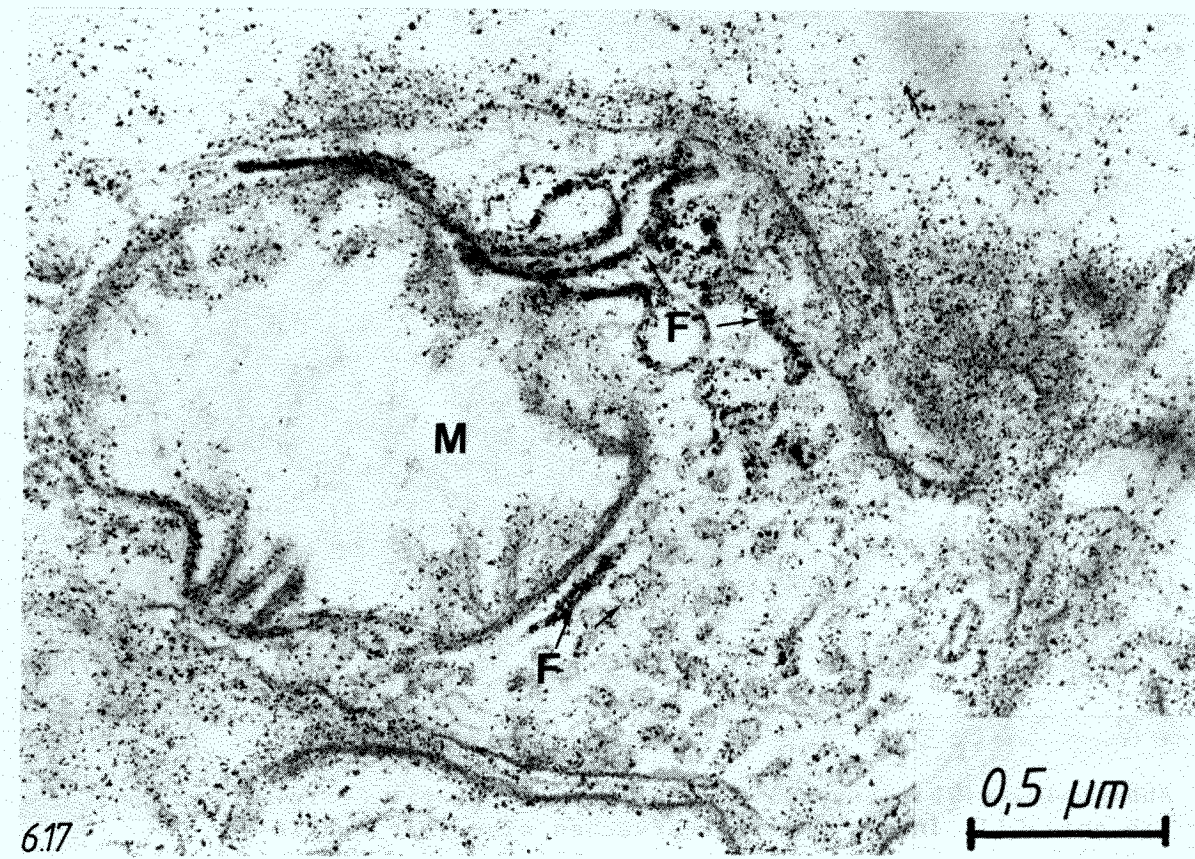


6.15

Abb. 6.15, 6.16, 6.17, 6.18: Toxinversuch (FII-9):
Markierung mit Ferretin anti-FII. Diese Bilderreihe
zeigt mit Ferretin anti-FII markierte Zellen. Man er-
kennt eindeutige Markierungsspuren (F) entlang einer
Längsstruktur in der Synapse (vermutlich in den Cister-
nae) und in den Synaptischen Vesikeln. Die Mitochondrien
(M) sind stark geschwollen. Die Synapsen (S) enthalten
wenige Vesikel.



6.16



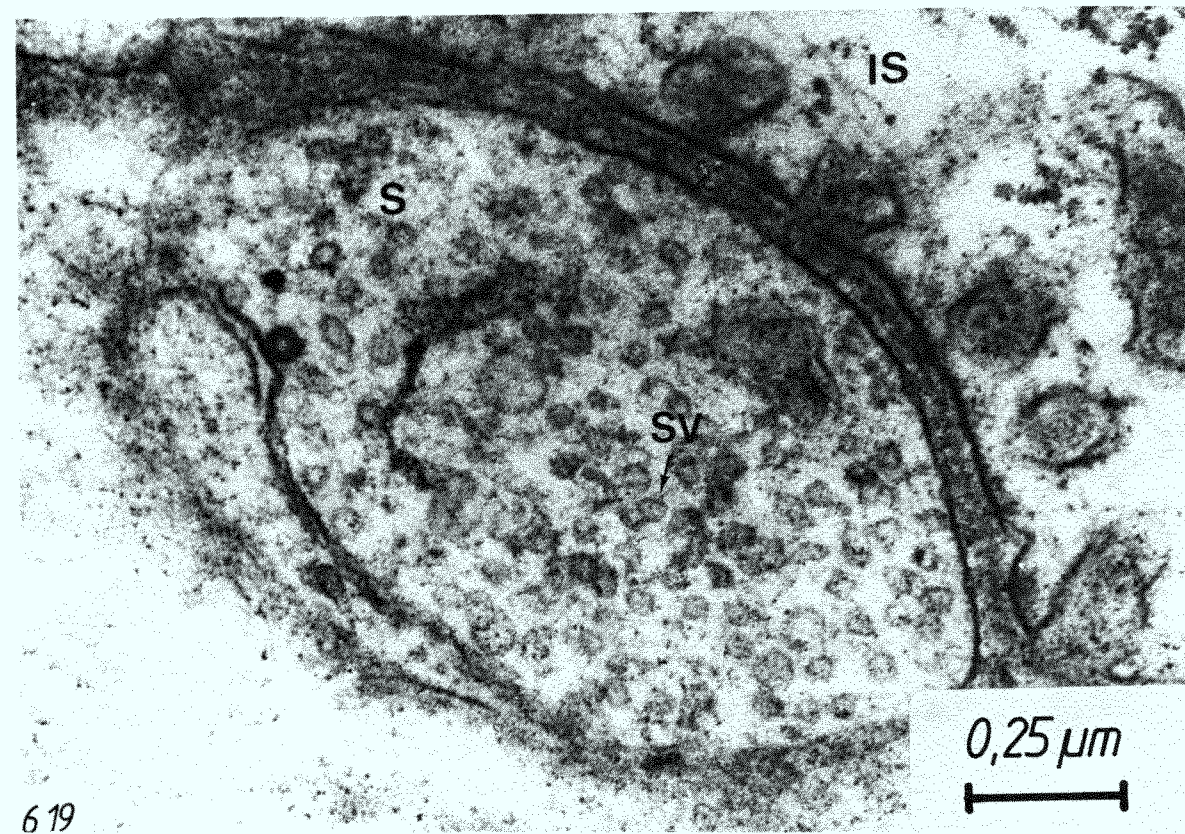
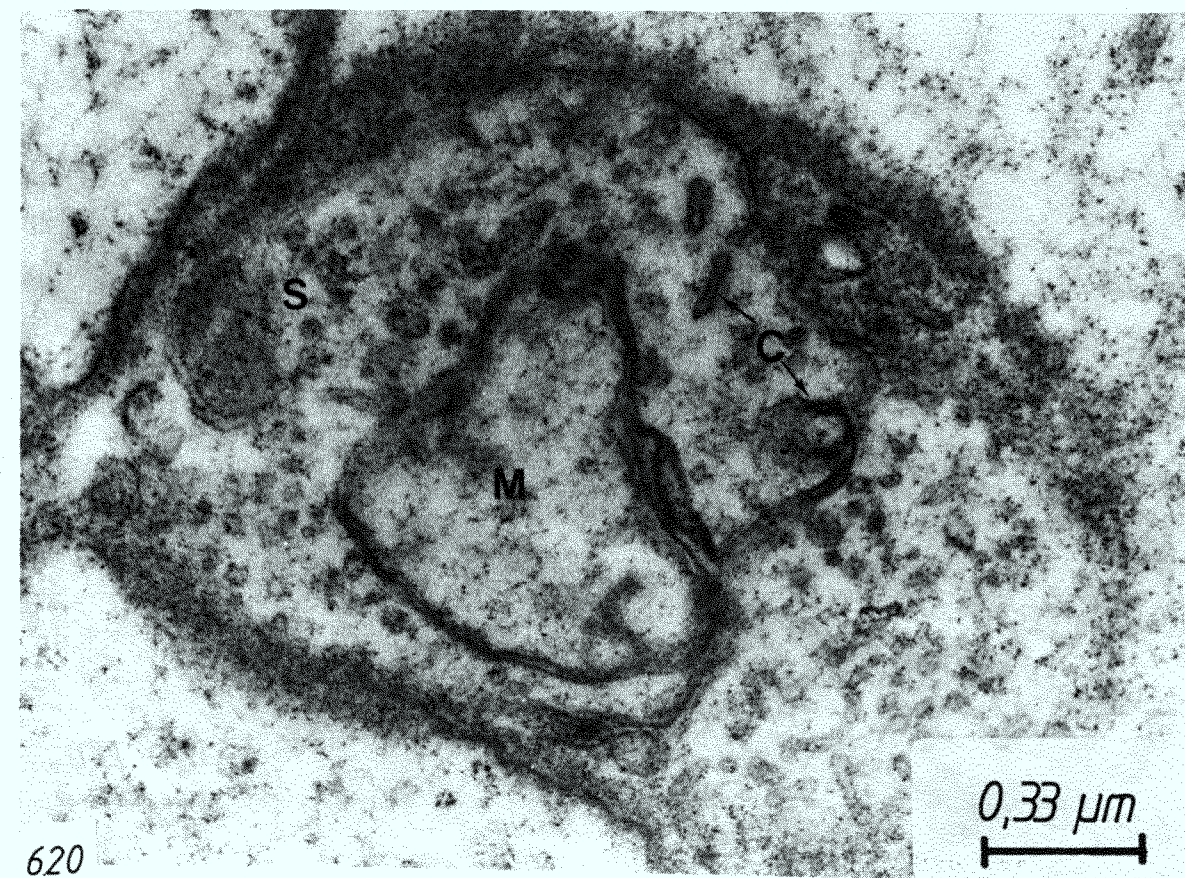


Abb. 6.19, 6.20: Kontrollversuch: Markierung mit Ferretin anti-FII. In den Kontrollversuchen sind zwar Markierungsspuren erkennbar, jedoch in deutlich geringerem Maß als in den Toxinversuchen. Die Markierung erscheint als eine allgemeine Untergrundfärbung, d.h. es handelt sich hier keinesfalls um spezifische Markierungsspuren. Synapse (S). Synaptische Vesikel (SV). Ferretin (F).



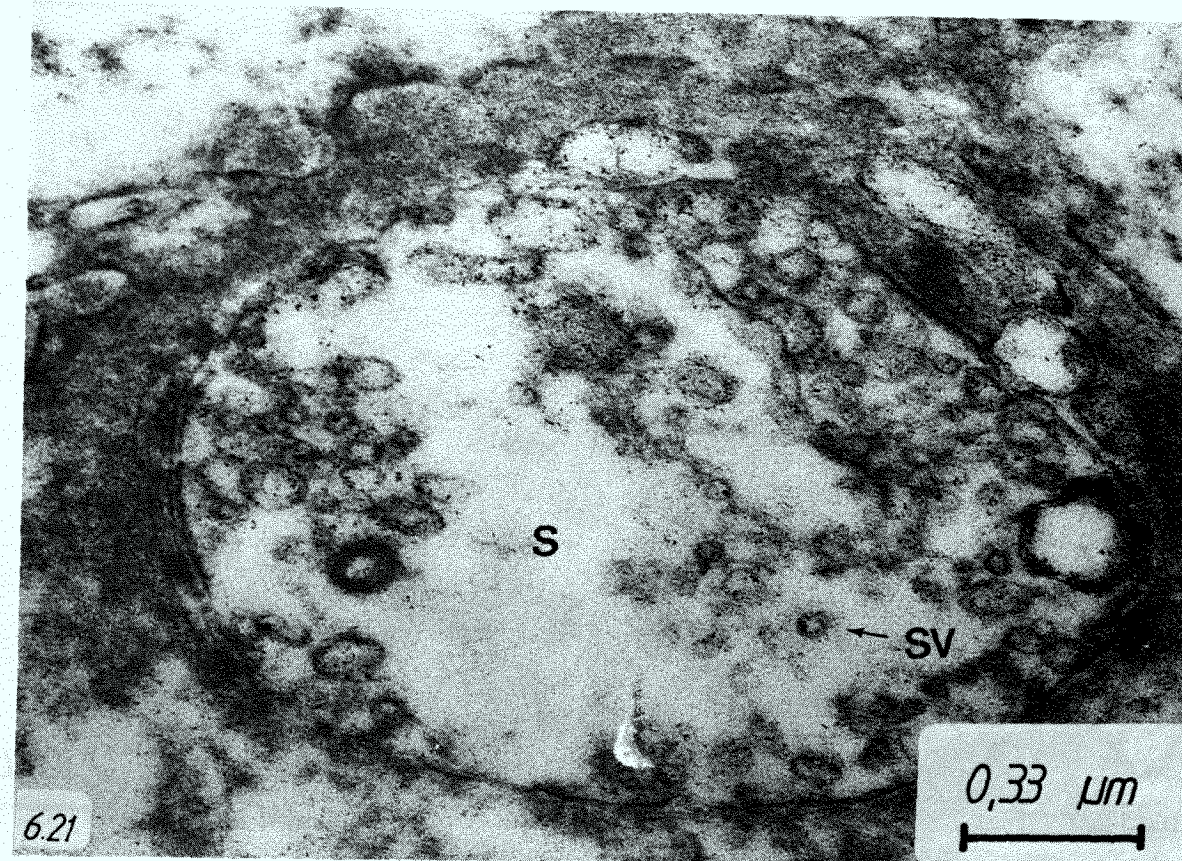


Abb. 6.21: Wirkung der FII-9-Fraktion auf die Morphologie der Synapse. In diesem Bild ist deutlich die veränderte Morphologie der Synapse (S) erkennbar, die Zahl der Synaptischen Vesikel (SV) ist verringert, und die Cisternae (C) werden deutlich hervorgehoben.

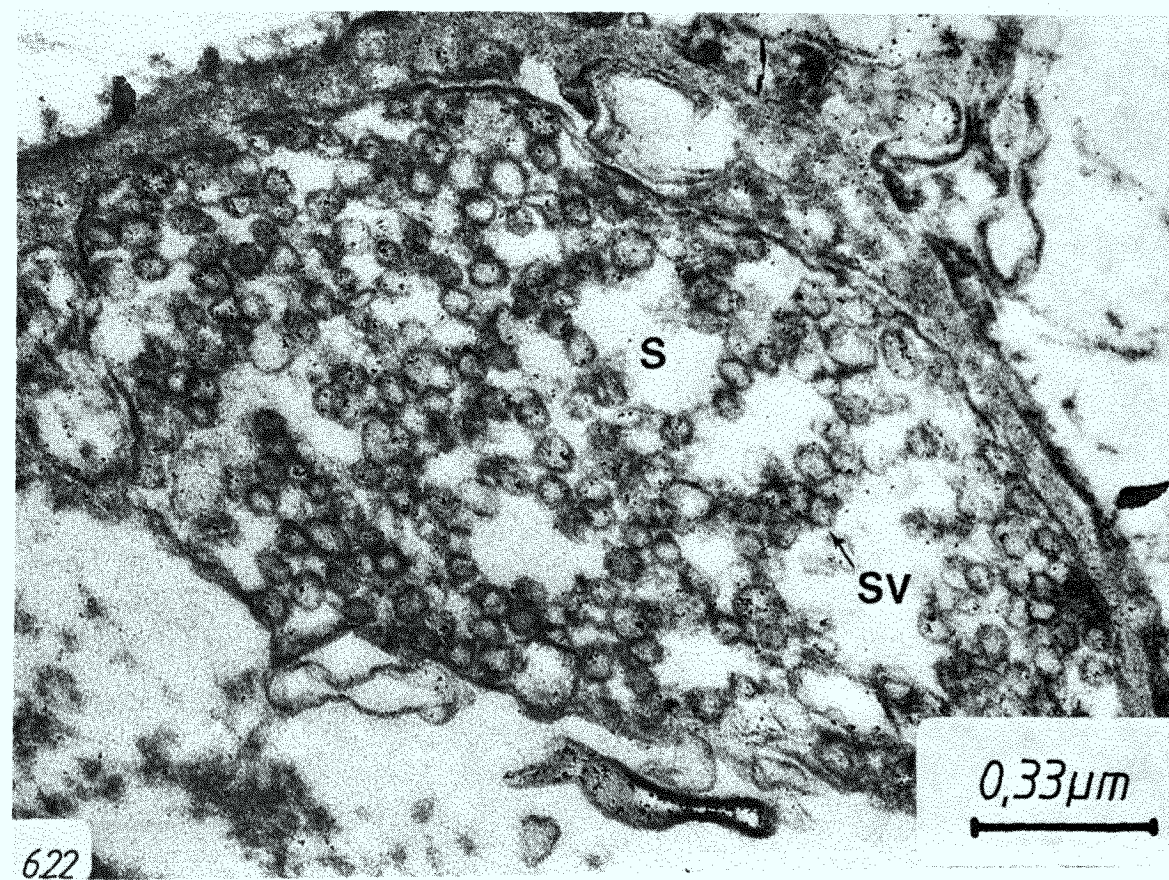


Abb. 6.22: Kontrolle. In diesem Bild ist deutlich erkennbar, daß im Normalfall die Synapsen mit einer höheren Anzahl von Vesikeln gefüllt sind.

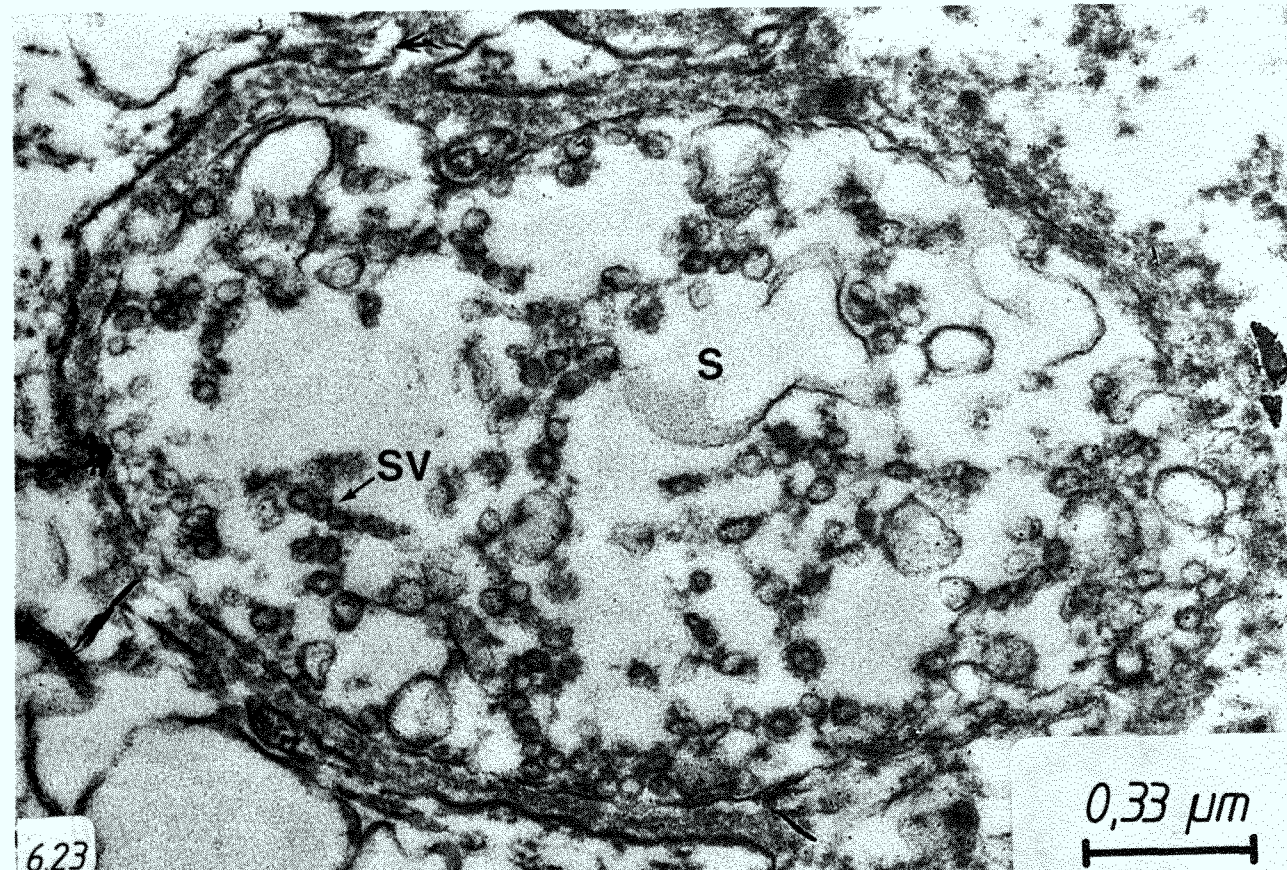
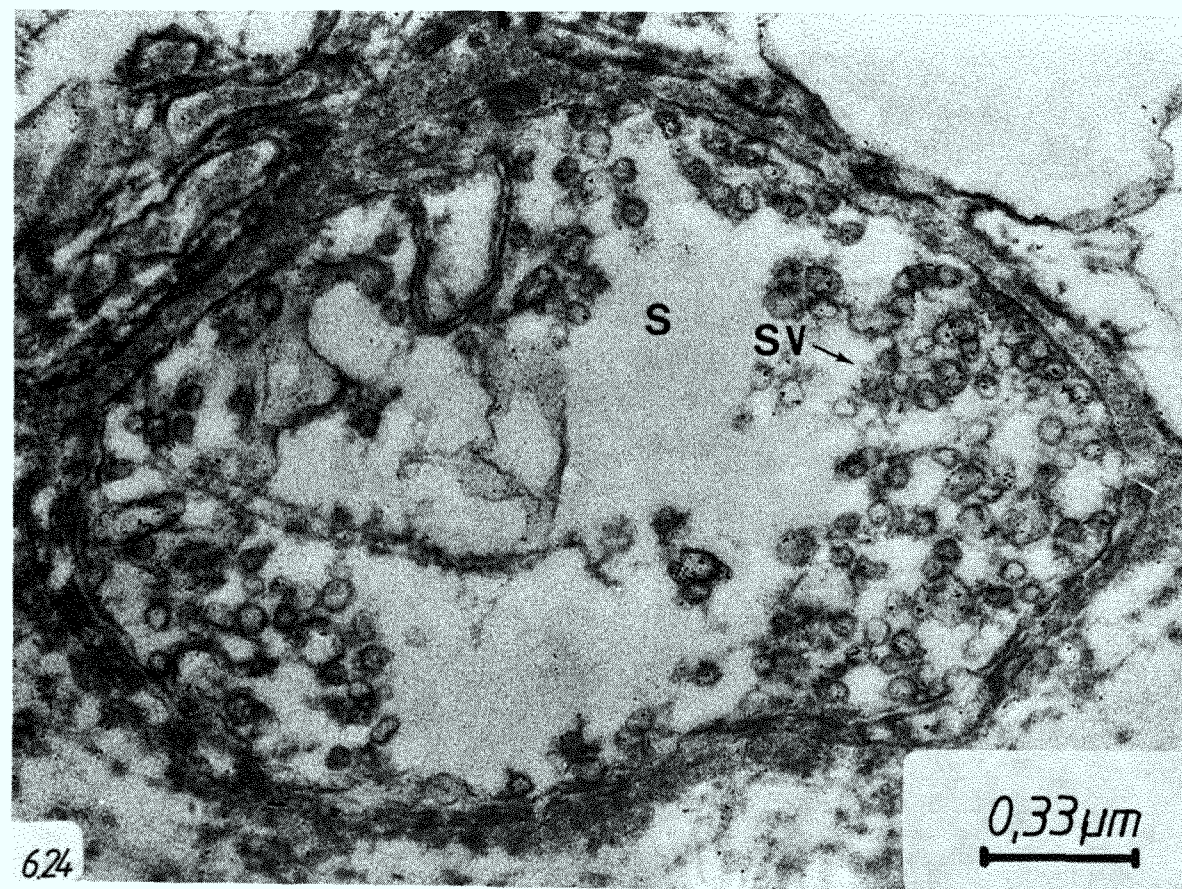


Abb. 6.23, 6.24: Wirkung des Schwarze-Witwe-Toxins auf die Morphologie der Synapsen. Bei diesem Versuch sind ähnliche Beeinflussungen der Synapse wie bei den Versuchen mit FII-9 zu beobachten, d.h. verringerte Anzahl der Synaptischen Vesikel (SV).



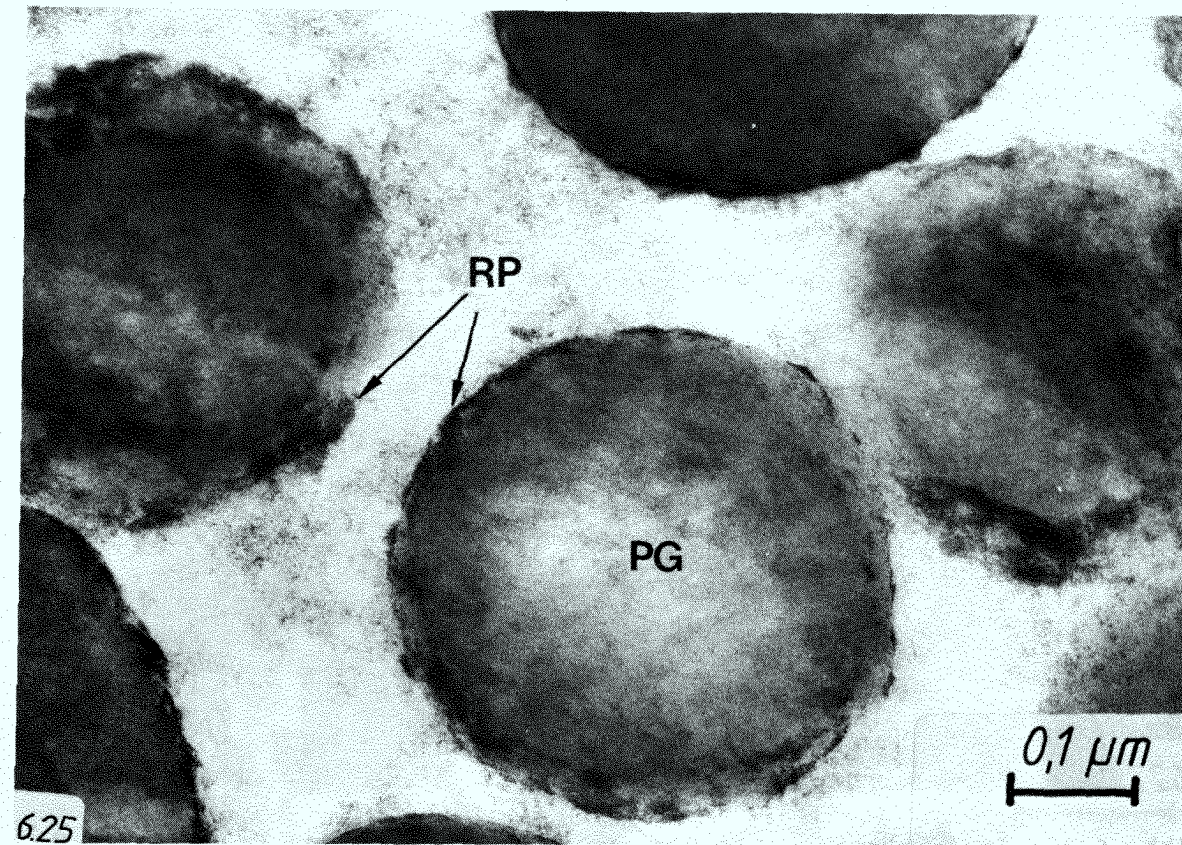


Abb. 6.25: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Peroxidase-anti-FII-9. Das Bild weist eine deutlich erkennbare schwarze Umrandung der Pigmentgranula (PG) auf. Diese Umrandungen sind die Ablagerungen der Peroxidase-Reaktionsprodukte (RP).

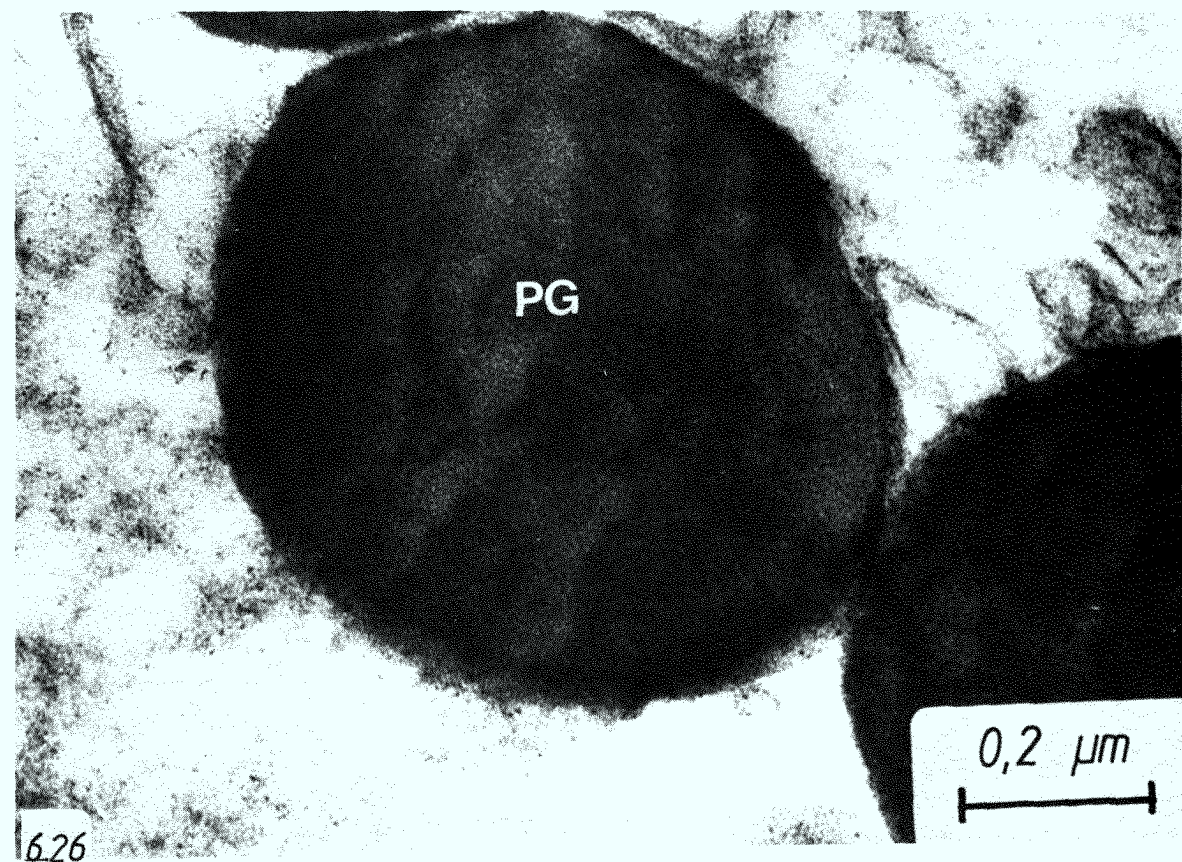


Abb. 6.26: Kontrollversuch: Markierung mit Peroxidase-anti-FII-9. Die Pigmentgranula (PG) haben eine annähernd gleiche Verfärbung ohne jegliche Umrandung, d.h. ohne Ablagerung des Peroxidase-Reaktionsprodukts.

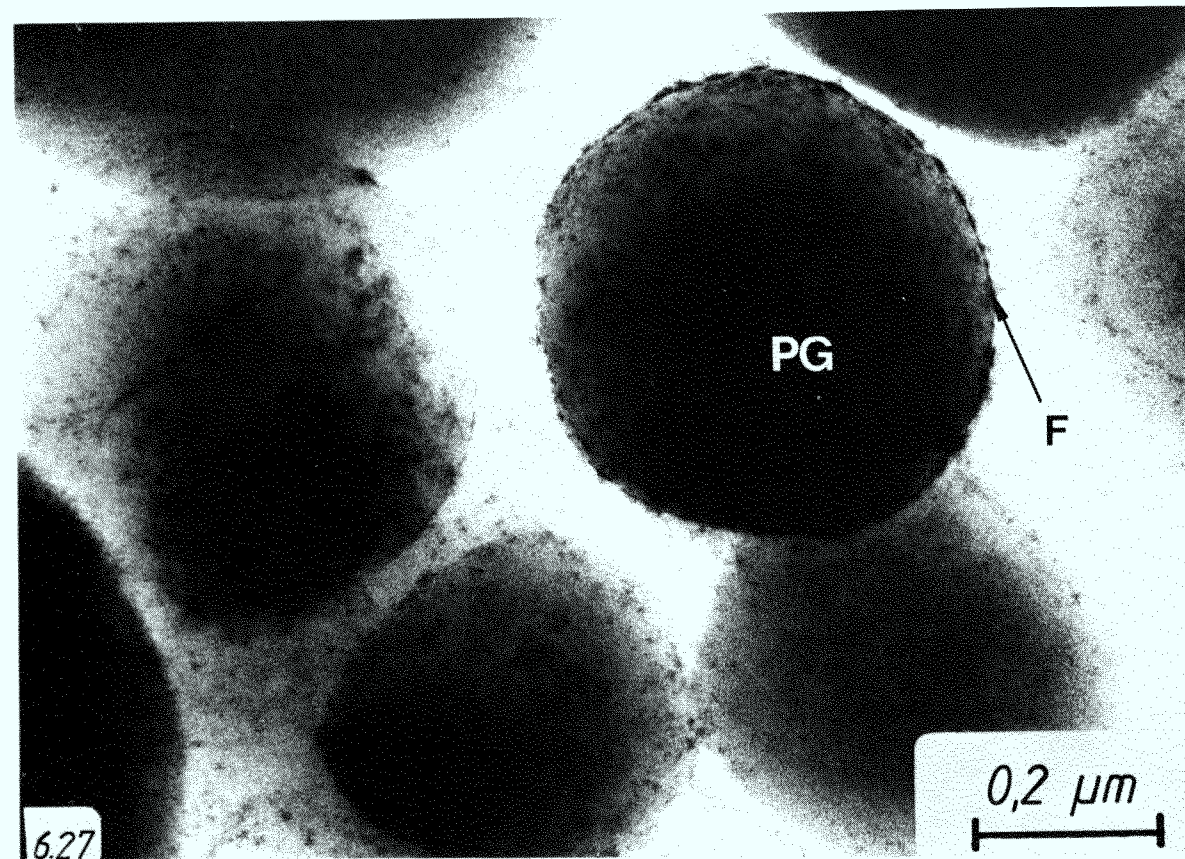


Abb. 6.27: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-FII-9. Die mit Ferretin durchgeführten Versuche bestätigen, daß der Toxin-Antikörper bzw. das Toxin an den Pigmentgranula (PG) bindet; die Oberfläche der Pigmentgranula weist deutliche Ferretin-Markierung (F) auf.

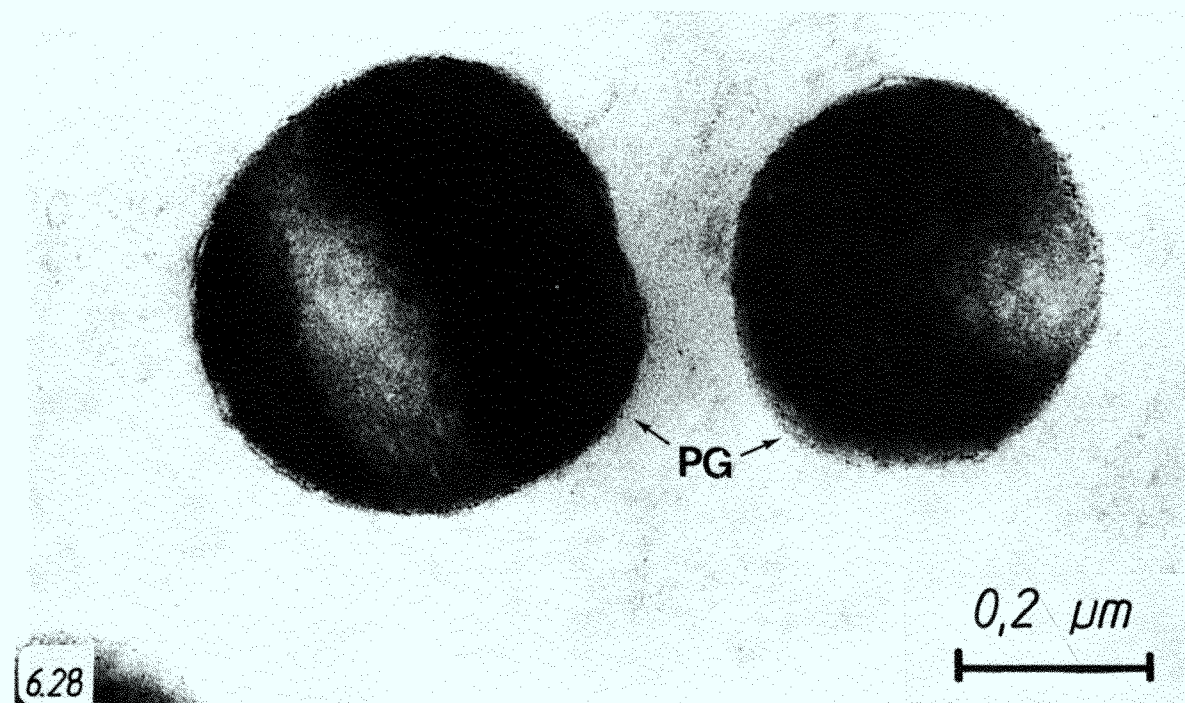


Abb. 6.28: Kontroll-Versuch: Markierung mit Ferretin anti-FII-9. Der Kontrollversuch zeigt, daß derartige Ferretin-Markierungen an der Oberfläche unbehandelter Zellen (ohne Toxin) nicht vorhanden sind.

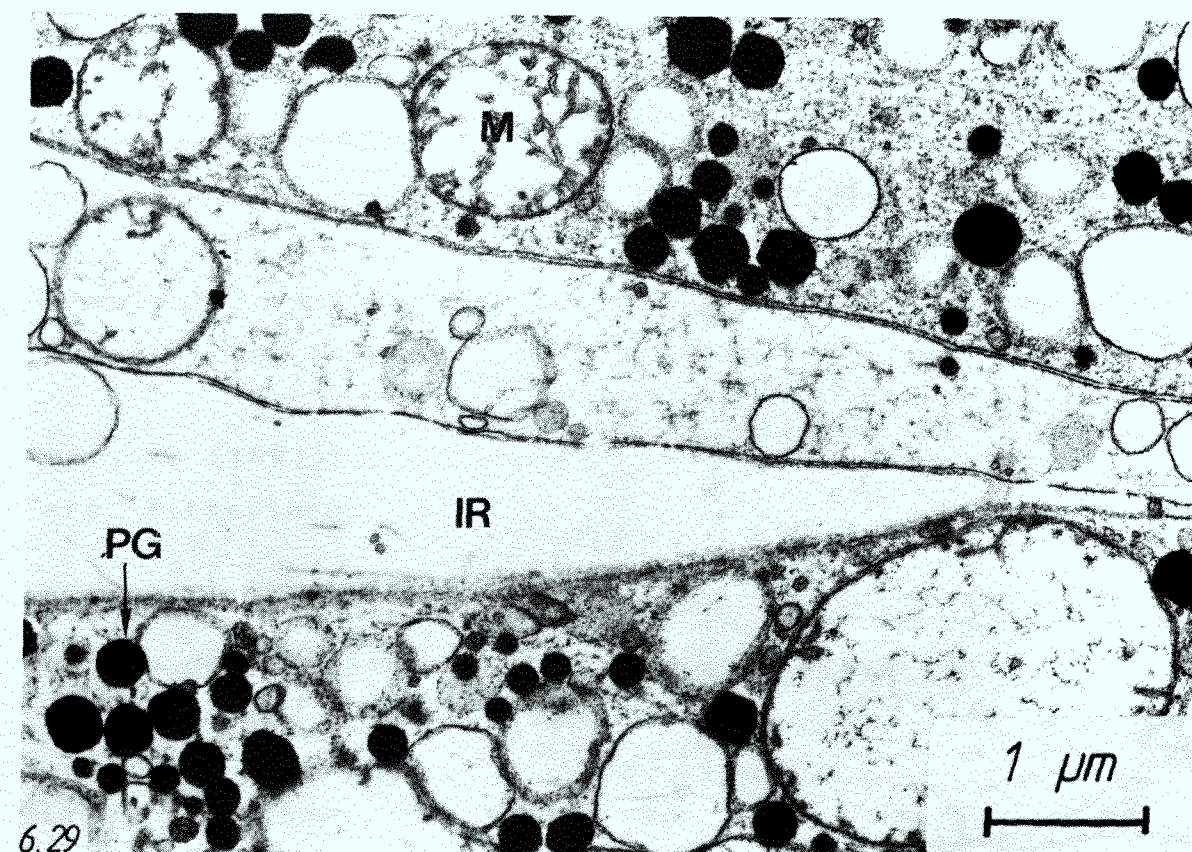


Abb. 6.29: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin anti-FII. Aus dem Bild ist erkennbar, daß die Intrazellularräume (IR) zwischen den Photorezeptoren kein Ferretin aufweisen. Mitochondrien (M), Schirmpigment (PG).

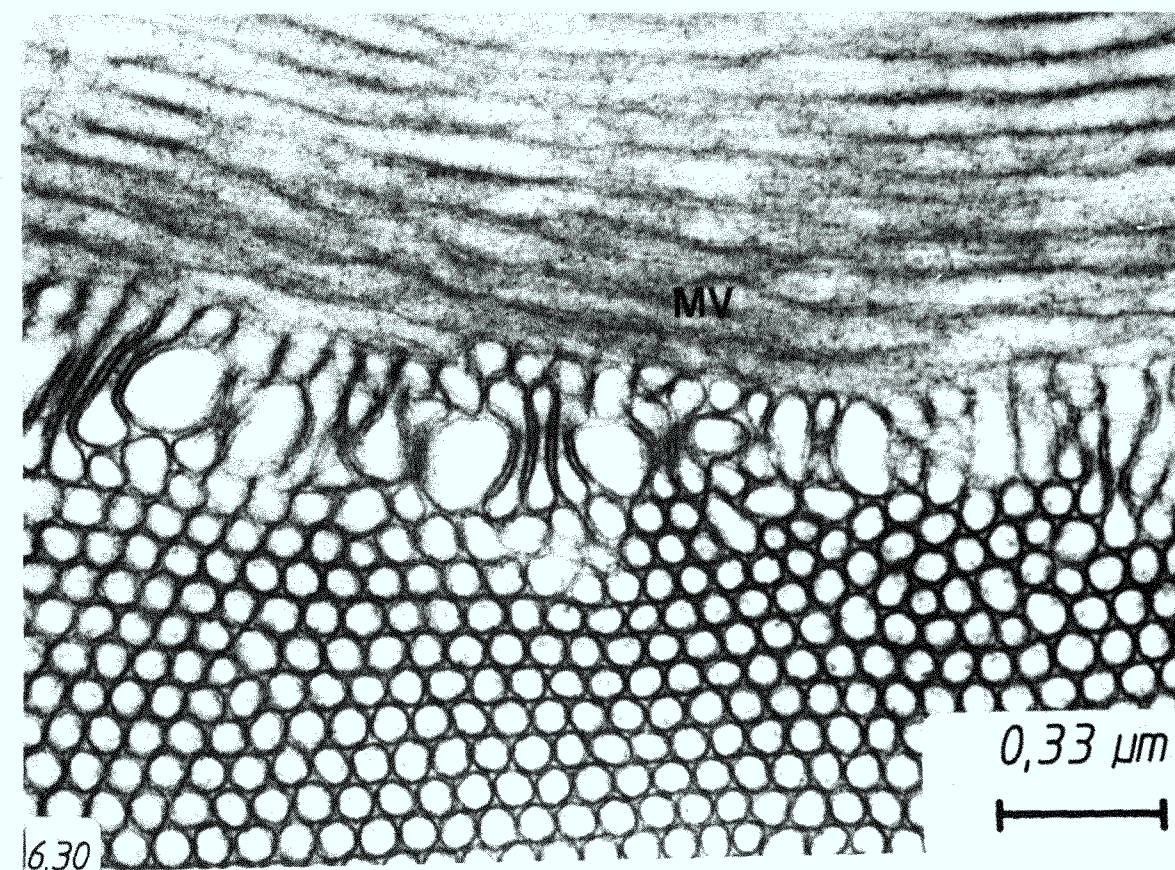


Abb. 6.30: Toxin-Versuch (FII-9): Markierung mit Ferretin-anti-FII. Wie aus diesem Bild ersichtlich ist, ist zwischen den Mikrovilli (MV) ebenfalls keine Markierung zu beobachten.

7. Literaturverzeichnis

Arechiga, H. (1977):

Modulation of visual input in the crayfish.

In: G. Havle (Herausg.), Identified Neurons and Behaviour in Arthropods, S. 387 - 403.

Plenum Press, New York.

Baer, K. (1983):

Pers. Mitteilung.

Bernhards, H. (1916):

Der Bau des Komplexauges von Astacus fluviatilis.

Z. Wiss. Zool. 116, 649 - 707.

Bikle, D., Tilney, L.G. und Porter, K.R. (1966):

Microtubules and pigment migration in the melanophores of Fundulus heteroclitus.

Protoplasma 61, 322 - 345.

Borwein, R. (1981):

The retinal receptor: A description.

In: V. Enoch und F. Tobey (Herausg.), Vertebrate Photoreceptor Optics, S. 11 - 68.

Springer Verlag, Berlin.

Bourgeois, J.P. et al. (1971):

Localisation of the cholinergic receptor protein by immunofluorescence in eel electroplax.

FEBS Letters 16, 92 - 94.

Cahalan, M.D. (1975):

Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by Centruroides sculpturatus scorpion venom.

J. Physiol. 244, 511 - 534.

Carbone, E. et al. (1982):
Selective blockade of voltage-dependent K channels by a
novel scorpion toxin.
Nature 296, 90 - 91.

Chagas, C. and Paes de Carvalho, A. (Herausg.: 1961):
Bioelectrogenesis: A Comparative Survey of its
Mechanisms with Particular Emphasis on Electric Fishes.
Elsevier Publ. Co., Amsterdam.

Equchi, E. (1965):
Rhabdom structure and receptor potential in single
crayfish retinular cells.
J. Comp. Physiol. 66, 411 - 429.

Equchi, E. und Waterman, T.H. (1966):
Fine structure patterns in crustacean rhabdoms.
In: Functional Organisation of the Compound Eye.
Pergamon Press, London.

Fein, A. und Szuts, E. (1982):
Photoreceptors: Their role in vision, S. 28 - 48.
Cambridge University Press, Cambridge.

Fingerman, M., Nagabhushanam, R. und Philpott, L.
(1962):
Photomechanical responses of the proximal pigment in
Palaemonetes and Orconectes.
Biol. Bull. 123, 121 - 131.

Frixone, E. und Arechiga, H. (1979a):
Photomechanical migrations of pigment granules along the
retinula cells of the crayfish.
J. Neurobiol. 10, 573 - 590.

Frixone, E., Tsutsumi, V. und Vargas, M. (1979b):
Migrating pigment granules of the crayfish retinula
cells are associated with a tridimensional filamentous
lattice.

J. Cell Biol. 83, 321 a.

Hagins, W. (1972):

The visual process: Excitatory mechanisms in the primary
receptor cells.

Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1, 131 - 158.

Hagiwara, S. und Byerly, L. (1981):

Calcium Channel.

Ann. Rev. Neurosci. 4, 69 - 125.

Harreveld, A. von (1936):

A physiological solution for fresh water crustaceans.

Proc. Soc. Exp. Med. 34, 428 - 432.

Heinen, H.J. et al. (1980):

LAMMA: A new laser microprobe mass analyzer for
biomedicine and material analysis.

In: Frigerio und McCamish (Herausg.), Recent
Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and
Medicine, 6.

Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam.

Heuser, J.E. und Reese, T.S. (1973):

Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane
during transmitter release at the frog neuromuscular
junction.

J. Cell. Biol. 57, 315 - 344.

Hurlbut, W. und Ceccarelli, B. (1979):

Use of Black Widow Spider venom to study the release of neurotransmitters.

In: Ceccarelli und Clementi (Herausg.), Advances in Cytopharm., Vol. 3.

Raven Press, New York.

Junqueira, L. und Porter, K.R. (1969):

Mechanisms for pigment migration in melanophores and erythrophores.

J. Cell Biol. 43, 62a.

Katz, B. (1969):

The Release of Neural Transmitter Substances.

Thomas, Springfield, Ill.

Kirschfeld, K. und Vogt, K. (1980):

Calcium ions and pigment migration in fly photoreceptors.

Naturwissenschaften 67, 516 - 517.

Krebs, W. (1972):

The fine structure of the retinula of the compound eye of Astacus fluviatilis.

Z. Zellforsch. 133, 399 - 414.

Lambert, D. und Crowe, J. (1973):

Colchicine and cytochalasin B: effects on pigment granule translocation in melanophores of Uca pugilator.

Comp. Biochem. Physiol. 46a, 11 - 16.

Lietz, K. (1972):

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Auge von Astacus leptodactylus.

Hausarbeit RWTH Aachen.

Lisman, J.E. und Brown, J.E. (1975):
Effects of intracellular injection of calcium buffers on
light adaptation in Limulus ventral photoreceptors.
J. Gen. Physiol. 66, 489 - 506.

Luft, J. (1956):
The fine structure of the electric organ of the electric
eel and torpedo ray.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 229 - 231.

Luft, J. (1958):
The fine structure of electric tissue.
Exp. Cell Res. 5, 168 - 182.

Maliwista, S. (1971):
Cytochalasin B reversibly inhibits melanin granule
movement in melanocytes.
Nature 234, 354 - 355.

Olivio, R. und Larsen, M. (1978):
Brief exposure to light initiates screening pigment
migration in retinula cells of the crayfish
Procamberus.
J. Comp. Physiol. 125, 91 - 96.

Olivio, R.F. und Chrismer, K.L. (1980):
Spectral sensitivity of the screening pigment migration
in retinula cells of the crayfish Procamberus.
Vision Res. 20, 385 - 389.

Pierce, G.B., Ram, J. und Midgley, J. (1964):
The use of labeled antibodies in ultrastructural
studies.
Int. Rev. Exp. Path. 3, 1 - 34.

Possani, L., Dent, M., Martin, B. und Maelicke, A.
(1981):

The amino terminal sequence of several toxins from
the venom of the Mexican scorpion Centruoides noxi
Hoffmann.

Carlsberg Res. Commun. 46, 207 - 214.

Rochat, H., Bernard, P. und Couraud, F. (1979):

Scorpion toxins: Chemistry and mode of action.

Adv. Cytopharm. 3, 325 - 333.

Röhling, S. (1980):

Gibt es eine Blut-Retina-Barriere in Astacus? In situ
Zugänglichkeit des Astacus Rhabdoms für im Blut gelöste
Stoffe.

Diplomarbeit RWTH Aachen.

Schliwa, H. (1976):

The role of divalent cations in the regulation of
microtubule assembly.

J. Cell. Biol. 70, 527 - 540.

Schröder, W., Frings, D. und Stieve, H. (1980):

Measuring calcium uptake and release by invertebrate
photoreceptor cells by laser microprobe mass
spectroscopy.

In: Scanning Electron Microscopy 1980/II SEM Inc., AMF
O'Hare, Chicago, Ill., USA.

Senqbusch, P. von (Herausg.: 1979):

Molekular- und Zellbiologie.

Springer Verlag, Berlin.

Singer, S.J. (1959):

Preparation of an electron-dense antibody conjugate.
Nature 183, 1523 - 1524.

Stavenga, D.G. (1971):

Adaptation of the compound eye.
Proc. Int. Union of Physiol. Soc. 9, 532 S.

Stavenga, D.G. und Kuiper, J.W. (1977):

Insect Pupil Mechanisms.
J. Comp. Physiol. 113, 55 - 72.

Stieve, H. (1974):

On the ionic mechanisms responsible for the
generation of the electrical response of light
sensitive cells.

In: L. Jaenicke (Herausg.), Biochemistry of
Sensory Functions, S. 79 - 105.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Stieve, H. (1976):

Photorezeption und ihre molekularen Grundlagen.
Interner Bericht, KFA-INB-IB 1313.

Stieve, H. und Classen-Linke, I. (1980):

The effect of changed extracellular calcium and sodium
concentration in the electroretinogram of the crayfish
retina.
Z. Naturforsch. 35, 516 - 517.

Stieve, H. und Wirth, C. (1971):

Über die Ionenabhängigkeit des Rezeptorpotentials der
Retina von Astacus leptodactylus.
Z. Naturforsch. 26b, 457 - 470.

Tsutsumi, V., Frixione, E. und Arechiga, H. (1981):
Transformations in the cytoplasmic structure of crayfish
retinula cells during light- and dark adaptation.
J. Comp. Physiol. 145, 179 - 189.

Uebags, E. (1976):
Untersuchungen am Rhabdom des Sumpfkrebsses (Astacus
leptodactylus) mit Hilfe der Gefrierätztechnik.
Diplomarbeit RWTH Aachen.

Vogt, K. (1980):
Die Spiegeloptik des Flußkrebsauges.
J. Comp. Physiol. 135, 1 - 19.

Weisenberg, (1972):
Microtubule formation in vitro in solutions con-
taining low calcium concentrations.
Science 177, 1104 - 1105.

Welsh, J. (1939):
The action of eyestalk extracts on retinal pig-
ment migration in the crayfish Camberus bartoni.
Biol. Bull. 77, 119 - 125.

Wikswo, M.A. und Novales, R. (1969):
The effect of colchicine on migration of pigment
granules in the melanophores of Fundulus heteroclitus.
Biol. Bull. (Woods Hole) 137, 220 - 237.

Wikswo, M.A. und Novales, R. (1972):
Effect of colchicine on microtubules in the melano-
phores of Fundulus heteroclitus.
J. Ultrastruct. Res. 41, 189 - 201.

Wilson, L. et al. (1974):

Interaction of drugs with microtubule protein.

Fed. Proc. 33, 158 - 166.

Yoshikami, S. und Hagins, W.A. (1971):

Light, calcium and the photocurrent of rods
and cones.

Biophys. Soc. Abstr. 15, 472.

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die durch konstruktive Kritik und stetige Diskussionsbereitschaft am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt haben: Herrn Dr. W. Schröder, Herrn Prof. Dr. A. Maelicke, Herrn Prof. Dr. L. Possani, Herrn Prof. Dr. H. Stieve sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie. Besonders danke ich Frau A. Einerhand für ihre hervorragende technische Assistenz bei den Versuchen 3.2. und für ihre Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen. Frau D. Schröder danke ich für die Anfertigung dieses Manuskripts. Frau Dr. A. Schimz danke ich besonders für ihre Diskussion der Arbeit.