

The results of many experiments have shown that in vertebrates 5-hydroxytryptophan is a precursor of 5-hydroxytryptamine (serotonin) (GADDUM and GIARMAN<sup>4</sup>, UDENFRIEND et al.<sup>5</sup>). In view of the results obtained with serotonin in crustaceans it was considered worth-while to investigate whether the conversion of 5-hydroxytryptophan into 5-hydroxytryptamine takes place in these animals also.

As the number of specimens of *Palaemon elegans* available was rather limited and the mortality following eyestalk extirpation in this species much higher than in *Palaemon serratus*, it was decided to carry out the next experimental series with the latter species only. A number of eyestalkless *Palaemon serratus* were divided into three groups. The animals of the first group received 1/200 part of one pair of PCO only, those of the second a mixture of 1/200 part of one pair of PCO and 1 µg serotonin, and those of the third a mixture containing the same quantity of PCO and 10 µg 5-hydroxytryptophan. The small erythrophores of the animals of all groups reacted in a similar way, showing a strong pigment-concentrating reaction immediately following injection, which reaction reached its maximum after 15 min, whereupon the pigment dispersed again.

The pigment in the large erythrophores of the animals of the first group reacted in a similar way to that in the small ones. The degree of pigment dispersion in the large erythrophores of the animals of the second group did not change until about 15 min following the injection; at that time a weak pigment concentration was noticed.

During the first 5 min following injection the pigment in the large erythrophores of the animals of the third group reacted in the same manner as those in the animals of the first group. Thereupon a strong pigment dispersion occurred. These results suggest that in the crustacean *Palaemon serratus*, like in amphibians and mammals, 5-hydroxytryptophan can be converted into serotonin, and moreover that the rate of this conversion is such that in about 5 min enough serotonin is formed to counteract the red pigment-concentrating activity of the PCO extract successfully<sup>6</sup>.

**Zusammenfassung.** Es wird gezeigt, dass Serotonin (5-Hydroxytryptamin) beim Hervorrufen der Pigmentausbreitung in den grossen Garnelen-Erythrophoren eine wichtige Rolle spielt. Versuche zeigen, dass diese Crustaceen vielleicht 5-Hydroxytryptophan in Serotonin umwandeln können.

A. C. J. BURGERS

Zoological Laboratory, University of Utrecht  
(The Netherlands), January 25, 1965.

<sup>4</sup> J. H. GADDUM and N. J. GIARMAN, Brit. J. Pharmacol. 11, 88 (1956).

<sup>5</sup> S. UDENFRIEND and H. WEISSBACH, J. biol. Chem. 224, 803 (1957).

<sup>6</sup> The experiments were carried out in the Zoological Station at Napoli (Italy) during the summer.

### Bestimmung der Zahl aktiver Zentren der Acetylcholinesterase in motorischen Endplatten

NACHMANSOHN<sup>1</sup> hat zuerst auf die hohe Konzentration Cholinesterase in den Endplatten hingewiesen und den enzymatischen Umsatz bestimmt. Es werden pro msec  $1,6 \cdot 10^9$  Moleküle Acetylcholin hydrolisiert. Zur Haupttache ist Acetylcholinesterase und nur wenig unspezifische Butyrylcholinesterase vorhanden<sup>2</sup>. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der bis heute unbekannten Anzahl von aktiven Zentren der spezifischen Cholinesterase gibt die Bindung von radioaktiv markiertem Diisopropyl-Fluorophosphat (DFP) an den Rezeptoren des Fermentes.

**Methode.** Es wurden Zwerchfelle von Mäusen während 30 min in Badlösungen (Phosphatpuffer pH 7,4 0,015 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,015 M) mit steigenden Konzentrationen <sup>32</sup>P-DFP (380 µC/mg) gebracht, dann zur Entfernung von nicht gebundenem DFP während 18 h mit Wasser gespült und zur Absorption schwächer β-Strahlen mit Aluminiumfolien (Dicke 40 µ) abgedeckt. Autoradiographien wurden durch Kontakt mit Ilford PM<sub>2</sub>-Filmen erhalten. Mit <sup>14</sup>C-markiertem DFP (39 mC/mM) inkubierte Zwerchfelle ergaben Autoradiographien durch direkten Kontakt mit PM<sub>2</sub>-Filmen ohne Aluminiumfolien. Mit einem Densitometer wurde die Schwärzung der Endplatten-Autoradiographien nach Abzug der Muskelaktivität ausgemessen und mit Eichpräparaten verglichen<sup>3</sup>. Daraus liess sich die Konzentration DFP in der Endplattenregion und die Anzahl Moleküle DFP pro Endplatte quantitativ berechnen.

Zum histochemischen Nachweis der Cholinesterase in den Endplatten wurde diese mit Pyridin-2-Aldoxim

Methyljodid reaktiviert und dann nach KOELLE gefärbt. In einer zweiten Serie wurden die Zwerchfelle vor der Inkubierung mit DFP mit Mipafox ( $2 \cdot 10^{-6}$  M Badkonzentration) zur Blockierung der unspezifischen Cholinesterase vorbehandelt.

**Resultat.** <sup>32</sup>P-DFP macht durch seine relativ energiereiche β-Strahlung eine diffuse Autoradiographie im Bereich des Endplattenbandes im Zwerchfell (Figur 1). Mit <sup>14</sup>C-DFP ist infolge der schwachen β-Strahlung die Auflösung viel besser und die Schwärzung auf einzelne Endplatten beschränkt. Bei steigenden Konzentrationen DFP in der Badflüssigkeit nehmen die Endplatten immer mehr DFP-Moleküle bis zu einem Sättigungswert von  $2,4 \cdot 10^7$  auf. Vorbehandlung mit Mipafox verändert diesen Sättigungswert kaum (Figur 2). DFP scheint von der spezifischen Acetylcholinesterase sehr stark gebunden zu werden. Auch mit <sup>14</sup>C-markiertem DFP wurde eine ähnliche Sättigung erreicht ( $1,2 \cdot 10^7$  Moleküle/Endplatte).

**Diskussion.** Der geringe Effekt des Mipafox zur Blockierung der unspezifischen Cholinesterase lässt vermuten, dass diese in der Endplatte nur eine untergeordnete Rolle spielt<sup>4</sup>. Trotz der starken Bindung des DFP an beide Cholinesterasen kommt es wohl kaum zu einer Verdrängung des Mipafox von der unspezifischen Cholinesterase.

<sup>1</sup> D. NACHMANSOHN, *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity* (Academic Press, 1959).

<sup>2</sup> B. HOLMSTEDT, Acta physiol. scand. 40, 331 (1957).

<sup>3</sup> P. G. WASER und U. LÜTHI, Arch. int. Pharmacodyn. 112, 272 (1957); Helv. phys. pharmacol. Acta 20, 237 (1962).

<sup>4</sup> G. B. KOELLE, Handb. exp. Pharmak. 15, 187 (1963).

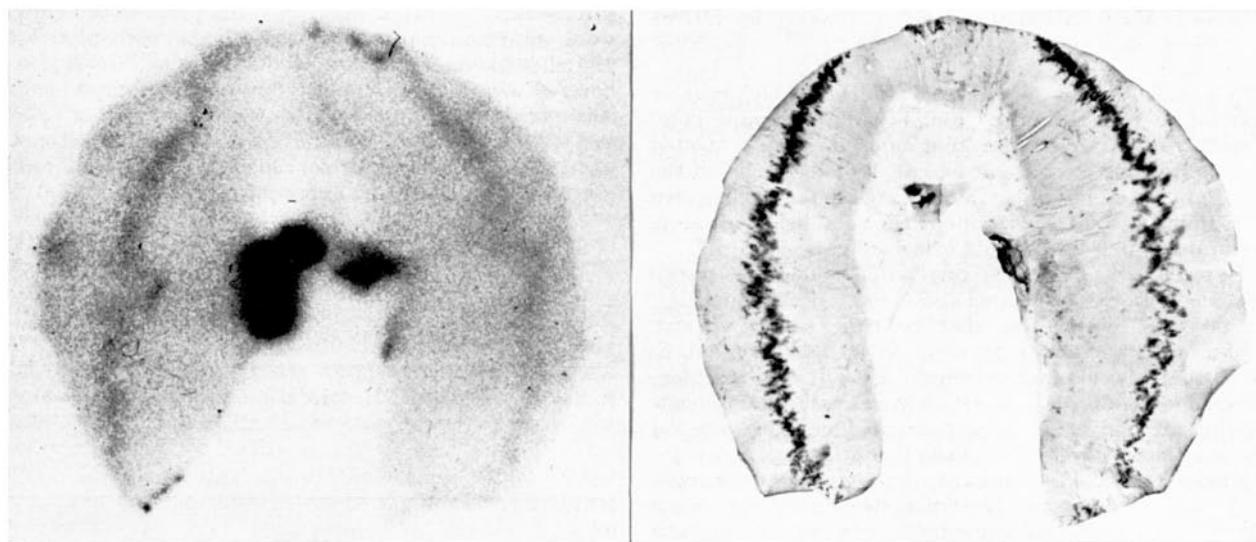


Fig. 1. Links: Autoradiographie der Endplatten eines Mäusezwerchfelles mit  $^{32}\text{P}$ -DFP. Rechts: Gleiches Zwerchfell mit Cholinesterasefärbung nach KOELLE.

OSTROWSKI und BARNARD<sup>5</sup> konnten als erste mit der von uns früher verwendeten Methode<sup>3</sup> die Lokalisation von  $^3\text{H}$ -DFP in Endplatten des Mäusezwerchfelles zeigen. Allerdings erlaubte die Auszählung der Silberkörner nur eine relativ quantitative Messung, wie wir damals auch mit  $^{14}\text{C}$ -Curarin festgestellt haben. Erst die später beschriebene densitometrische Technik<sup>3</sup>, welche wir hier verwenden, macht eine absolute quantitative Bestimmung der Zahl der aktiven Zentren der Acetylcholinesterase im Gewebe zum ersten Mal möglich. Die Zahl von maximal  $2,4 \cdot 10^7$  Molekülen  $^{32}\text{P}$ -DFP pro Endplatte ist etwa doppelt so gross wie die von  $1,2 \cdot 10^7$  Molekülen  $^{14}\text{C}$ -DFP. Ob der Unterschied durch Abspaltung einer der beiden  $^{14}\text{C}$ -Isopropylgruppen verursacht ist, muss in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

Die Gesamtzahl der DFP-blockierten Zentren der Cholinesterase ist grösser als die für eine Endplatten-depolarisation notwendigen  $5-6,6 \cdot 10^6$  Acetylcholinmoleküle<sup>6</sup>. Die Proportion entspricht etwa der bereits bekannten 80% Reserve an Cholinesterase, welche für eine Beeinflussung der motorischen Impulsübertragung minimal blockiert werden muss<sup>1</sup>. Immerhin besteht grössenord-

nungsmässig kein grosser Unterschied, was die Möglichkeit einer Beziehung zwischen cholinergischem Rezeptor und Acetylcholinesterase offen lässt.

Die Rezeptorenzahl der Acetylcholinesterase ist auch grösser als die Sättigungszahl für grosse Curaremoleküle (Calebassen-Curarin und Toxiferin) in der Endplatte von  $4 \cdot 10^6$  Molekülen. Hier scheint nicht nur funktionell, sondern auch quantitativ ein Unterschied zwischen Curare-bindungsstellen und aktiven Zentren der Acetylcholinesterase zu bestehen.

Aus der Zahl der aktiven Zentren der Acetylcholinesterase ( $2,4 \cdot 10^7$ ) und dem Umsatz von  $1,6 \cdot 10^9$  Molekülen Acetylcholin/msec in der Endplatte<sup>1</sup> kann sehr leicht berechnet werden, dass jedes Zentrum in der Millisekunde 67 Moleküle Acetylcholin spaltet und daher die Umsatzzeit pro Molekül etwa 15  $\mu\text{sec}$  beträgt. Sie ist kürzer als die von LAWLER<sup>7</sup> für Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Aal (*Electrophorus electricus*) bestimmte Umsatzzeit von 30–60  $\mu\text{sec}$ <sup>8</sup>.

**Summary.**  $^{32}\text{P}$  or  $^{14}\text{C}$ -labelled diisopropyl-fluoro-phosphate (DFP) was bound to endplates of mouse diaphragms by incubation. The number of molecules was determined by densitometric measurement of autoradiographs. One endplate contains  $2,4 \cdot 10^7$  active centres for acetylcholine, blocked by DFP. The turnover time for acetylcholine is very short: 15  $\mu\text{sec}$ .

P. G. WASER und J. RELLER

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich (Schweiz), 15. März 1965.

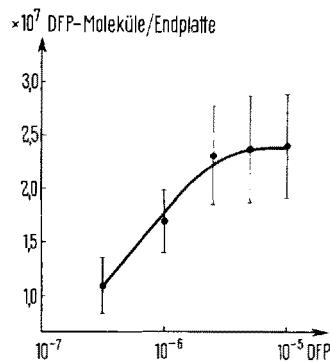


Fig. 2. Sättigung der Endplattencholinesterase mit  $^{32}\text{P}$ -DFP Molekülen nach Inkubation der Mauszwerchfelle in steigenden Konzentrationen DFP. Nach Vorbehandlung mit Mipafox gleiches Resultat.

Zahl der aktiven Zentren:  $2,4 \cdot 10^7$  pro Endplatte.

<sup>5</sup> E. A. BARNARD und K. OSTROWSKI, *Exp. Cell Res.* 25, 465 (1961); 36, 28 (1964).

<sup>6</sup> K. KRNJEVIC und R. MILEDI, *Nature* 182, 805 (1958). – K. KRNJEVIC und J. F. MITCHELL, *Nature* 186, 241 (1960).

<sup>7</sup> H. C. LAWLER, *J. biol. Chem.* 236, 2296 (1961).

<sup>8</sup> Wir danken für die technische Hilfe von Fräulein Dr. U. LÜTHI und Fräulein A. GUTTMAYER wie auch für die finanzielle Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3046).