

Über die Bedeutung paranodaler Strukturen für die Impulsregeneration am Ranzier'schen Schnürring

About the Importance of Paranodal Structures of the Ranzier Node
for the Impulse Regeneration

Helmuth Müller-Mohnssen, Armin Tippe, Franz Hillenkamp und Eberhard Unsöld

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg

Z. Naturforsch. 30 c, 271–277 [1975]; eingegangen am 11. November 1974)

Ranzier Node, Action Potential, Pulse Regeneration, Laser Micro Irradiation

The site of the pulse regeneration in myelinated nerve is generally assumed to be the unmyelinated part of the axon membrane in the Ranzier node. To check this, a micro-irradiation technique using laser pulses ($\lambda=347$ nm, $t=20$ ns) was used to produce morphological lesions of about $1 \mu\text{m}$ diameter in various regions of the Ranzier node. The electro-physiological functions were monitored parallel to the irradiation. Depending on the localization of the lesions two types of changes in these functions were observed:

1. If a definite site in the paranodal myelin sheath was damaged without affecting the axon, an action potential could no longer be elicited, although the resting potential as well as the stationary current-voltage behaviour remained unchanged.

2. A damage of the axon resulted in a break down of membrane potential and resistance. In most of the cases the excitability recovered after spontaneous or current induced restitution of the membrane resting potential and resistance.

These observations indicate, that structures in the paranodal region are vital for the Na^+ -activation and inactivation. The membrane potential and stationary current-voltage behaviour can be attributed to the axon membrane. A new hypothesis concerning the mechanism of the Na^+ -activation-inactivation process is suggested.

1. Einleitung und Fragestellung

Als Sitz der elektrischen Impulsregeneration am Ranzier'schen Schnürring gilt nach der gegenwärtig herrschenden Auffassung eine nur elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur, nämlich der im Bereich des Schnürrings gelegene, von Myelin unbedeckte Abschnitt der Axonmembran. In vielen Theorien über die molekularen Mechanismen der Membranfunktion ist diese Vorstellung als Prämisse enthalten. Für deren Gültigkeit wird merkwürdigerweise selten der direkte Nachweis verlangt. Der Versuch, auf experimentellem Wege zu prüfen, ob sie zutrifft, scheint daher nicht überflüssig. In Laser-Strahlstichexperimenten wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle ca. $1 \mu\text{m}$ große Bereiche in verschiedenen Abschnitten des lebenden Schnürrings zerstört und die elektrophysiologische Funktion des Schnürrings parallel dazu gemessen. Die Korrelationen zwischen dem Ort des morphologischen Schadens und den mit

der Schädigung verbundenen Veränderungen der elektrophysiologischen Funktion erlauben Schlußfolgerungen auf die Lokalisation der Strukturen, an denen sich die Funktion abspielt.

Elektrophysiologische Vorbemerkungen

Bedingung für die Impulsregeneration am Schnürring sind drei verschiedene, experimentell getrennt nachweisbare elektrische Elementarfunktionen:

1. Die Anionen-Kationen-Permselektivität der Membran, die bewirkt, daß die Na^+ - bzw. K^+ -Konzentrationsgradienten Membranpotentiale E [mV] erzeugen. E_K liegt nahe dem Ruhepotential $E = -70$ mV (Nullpunkt der meist verwendeten Skala der Membranspannung V), E_{Na} nahe der Spitze des Aktionspotentials $E = +40$ mV (zugleich $V = 110$ mV).

2. Die Fähigkeit der Membran, zwischen Ruhebatterie und Aktionsbatterie bistabil zu schalten. Diese Fähigkeit beruht auf einem differentiell negativen Widerstand in der Strom-Spannungskennlinie der Membran für Membranpotentiale, die um mehr als 30 mV in Depolarisationsrichtung vom Ruhepotential abweichen ($V = +30$ mV). Voraussetzung für das Auftreten dieser „fallenden Charakteristik“ ist, daß die Lage des Spannungsbereichs, in dem

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Müller-Mohnssen, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Abteilung Physiologie, D-8042 Neuherberg, Ingolstädterlandstr. 1.

Abkürzungen: AP, Aktionpotential; TTX, Tetrodotoxin.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

die beiden verschiedenen großen Leitfähigkeiten der Membran stetig ineinander übergehen (Übergangsbereich, zwischen $V \approx +10$ mV und $V \approx +30$ mV), vom Membranpotential unabhängig ist (ausführliche Darstellung siehe¹).

3. Die „Aktivierung“ und anschließende „Inaktivierung“ des Na^+ -Stromes nach einem überschweligen Reiz. Dieser Prozeß bewirkt, daß die K^+ -Batterie überwiegend das stationäre Membranpotential (Ruhepotential) bestimmt, während die Na^+ -Batterie nur nach überschwelliger Ansteuerung kurzzeitig ein- und wieder ausgeschaltet wird (ansteigende und abfallende Flanke des Aktionsimpulses; Monostabilität).

Die Funktionen 2 und 3 sorgen für die Steuerung der Ionenströme derart, daß ein Aktionsimpuls entsteht, während die Funktion 1 die dafür notwendige elektrische Energie bereitstellt. Falls die nodale Axonmembran tatsächlich der Sitz aller drei Funktionen ist, wäre zu erwarten, daß eine morphologische Zerstörung dieser Struktur zum Funktionsausfall aller drei Funktionen führt.

Ein wesentlicher Hinweis dafür, daß es sich um selbständige Funktionen verschiedener Substrate handelt, ist die Tatsache, daß sich in jede der Funktionen mit anderen chemischen Mitteln eingreifen läßt, ohne daß die anderen dadurch wesentlich beeinflußt werden. Insbesondere läßt sich experimentell die Blockierung der Erregbarkeit durch Veränderung jeder dieser Einzelfunktionen allein erreichen.

Funktion 1 ist wesentlich abhängig vom Konzentrationsgradienten bestimmter 1-wertiger Ionen (K^+ , ersatzweise Rb^+ und Cs^+ , sowie Na^+ , ersatzweise Li^+ , NH_4^+ und Guanidinohydrochlorid); Ausgleich der Konzentrationsgradienten führt zur Entladung der Membranbatterien und zur Unerregbarkeit. Funktion 2 wird über die Lage des Übergangsbereichs durch die extrazelluläre Konzentration aller Kationen beeinflußt. 2-wertige Ionen, die einen geringen Einfluß auf das Membranpotential haben, sind hier um ein Vielfaches wirksamer als einwertige (Ca^{2+} z. B. ist 25mal wirksamer als Na^+)². Unerregbarkeit tritt ein, wenn der Übergangsbereich durch Erhöhung der wirksamen Gesamtkonzentration bis zur Spannung der Aktionsbatterie verschoben wird. In diesem Fall verschwindet der differentiell negative Widerstand und damit die Bistabilität und folglich auch die Fähigkeit der Membran, nach dem Alles- oder Nichtsprinzip zu schalten. In die Funktion 3 greifen wir dagegen spezifisch mit Veratridin, Tetrodotoxin (TTX) und Lokalanästhe-

tika ein, also mit komplizierten organischen Verbindungen. Unerregbarkeit tritt z. B. ein, wenn der Na^+ -Einstrom durch TTX blockiert ist, die Aktionsbatterie sich also nicht mehr einschalten kann.

Für jeden dieser drei verschiedenen Eingriffe, die die Erregbarkeit blockieren, muß man andere chemische Reaktionspartner in dem erregbaren System voraussetzen. Die Elementarfunktionen sind also zumindest molekular verschieden lokalisiert. Funktion 1 beruht nach unserer heutigen Kenntnis auf einer Ladungstrennung bei der Diffusion starker Elektrolyte durch Membranen mit Festladungsüberschuß. Die Wirkung von Alkali-Ionen auf das Membranpotential ist nicht als eigentlich chemische Reaktion mit der Membran, sondern als Folge eines veränderten Ladungsangebots in den an die Membran angrenzenden Phasen zu verstehen. Anders verhält es sich bei der Funktion 2. Die Lage des Übergangsbereichs hängt von der Oberflächenladung der Membran ab und wird wie diese von der Aktivität der Gegenionen in der angrenzenden Phase beeinflußt. Die Reaktion besteht in einer elektroadsorptiven Wechselwirkung der freien Kationen mit den Festionen der Membran². Da die Oberflächenladung und die Anionen-Kationen-Selektivität von der effektiven Festladungskonzentration und damit vom gleichen Parameter abhängen, liegt die Vermutung nahe, daß die Funktionen 1 und 2 an die gleiche materielle Struktur geknüpft sind. Die Wirkung des TTX, Veratridins (und anderer Lokalanästhetika) auf die Funktion 3 ist dagegen spezifisch, d. h., von der speziellen Molekülkonfiguration dieser Stoffe abhängig. Das läßt vermuten, daß die Reaktionspartner in der Membran (materielle Substrate der Funktion 3) komplizierte organische Moleküle sind. Es ist denkbar, daß diese Moleküle aufgrund verschiedener chemischer Reaktionsmechanismen das materielle Substrat aller drei Funktionen sind. Damit wäre dann zu vereinbaren, daß entweder diese Stoffe statistisch über die ganze nodale Axonmembran verteilt oder in größeren getrennten Membranabschnitten vorkommen (Kanal- oder Porenhypothese). Als materielle Substrate der Funktion 3 wären aber auch besondere Zellorganellen denkbar, die außerhalb der Membran lokalisiert sind.

Um diese Möglichkeiten zu prüfen, wurden parallel zur Zerstörung kleiner Bereiche des Schnürrings die drei Meßgrößen: Membranpotential, stationäre Strom-Spannungskennlinie und Aktionspotential (AP) getrennt registriert.

2. Methode

2.1 Präparat und elektrophysiologische Messung

Die Untersuchungen wurden an motorischen Einzelfasern von *Rana esculenta*-Männchen durchgeführt; zur Kontrolle wurden auch Einzelfasern von *Xenopus laeves* verwendet. Die Zuführung und Ableitung der Meßströme und -spannungen erfolgte in einer modifizierten 3-Elektrodenanordnung mit Luftspaltisolierung³. Sie besteht aus einem mit Ringer- oder Testlösungen durchströmten Kanal zur Aufnahme des Testschnürrings und zwei seitlich dazu angeordneten, mit Ringerlösung gefüllten Gläströgen, auf denen die Nachbarschnürringe gelagert werden. Mittelkanal und Tröge werden getrennt über KCl-Agarbrücken mit 3 Kalomelektroden verbunden.

Aktionsimpulse wurden durch elektrische Reizung (Rechteckimpulse) ausgelöst und zusammen mit dem Membranpotential – über einen Kathodenfolger auf einem 2-Strahl-Oszillographen – registriert. (Auf dem zweiten Strahl wurden Zeitverlauf und Intensität des Laser-Impulses dargestellt, s. 2.3.) Die stationäre Strom-Spannungskennlinie wurde ebenfalls mit einem 2-Strahl-Oszillographen aufgenommen, und zwar wurden Membranstrom und -spannung bei einer linearen Spannungsänderung von 1 mV/s registriert.

2.2 Mikroskopische Beobachtung

Die 3-Elektrodenanordnung wurde auf den Drehstisch eines Polarisationsmikroskops montiert (s. Abb. 1*). Zur mikroskopischen Beobachtung und zur Bestrahlung diente ein UV-Immersionsobjektiv 100×. Daher mußte der Mittelkanal der 3-Elektrodenanordnung mit einem Deckglas (Dicke ca. 0,08 mm) verschlossen werden. Eine Querbohrung von 0,04 mm Durchmesser dicht unterhalb des Deckglases erlaubte das Einziehen der Faser in den Kanal und die Lagerung des Schnürrings im Schärfebereich des Objektivs⁴.

2.3 Impulsbestrahlung

Die Laser-Strahlstichanordnung sei nur kurz skizziert (ausführliche Beschreibung siehe^{5, 6}). Ein Rubin-Impulslaser erzeugt Lichtimpulse der Wellenlänge $\lambda = 694$ nm von ca. 20 ns Dauer. Durch Nachschalten eines KDP-Frequenzverdopplers und eines CuSO₄-Filters zur Absorption des restlichen Rotlichtes konnten Impulse gleicher Dauer mit der Wellenlänge $\lambda = 347$ nm im nahen UV erzeugt werden. Der Laserimpuls wurde mit dem elektrophysiolo-

gischen Reizimpuls derart synchronisiert, daß der Bestrahlungszeitpunkt beliebig vor, während oder nach dem AP gewählt werden konnte. Eine Zwischenoptik fokussierte den Laserstrahl auf eine Blende von 50 µm – 100 µm Durchmesser, die sich in der Zwischenbildebene des Mikroskopes befand. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Auflichtspiegels wurde dann der Laserstrahl in den Strahlengang des Mikroskopes eingeblendet. Mit dieser Anordnung läßt sich ein beugungsbegrenzter Fokus von ca. 0,5 µm Durchmesser erzeugen. Die Bestrahlungsintensität wurde durch Graufilter reguliert. Da die Lichtintensität der einzelnen Laserimpulse um maximal 30% schwankte, wurde sie für jeden Einzelimpuls mit Hilfe eines Photodetektors gemessen und registriert. Im Fokus betrug die Intensität ca. 10⁸ W/cm².

Der kollinear eingespiegelte Strahl eines 4 mW-Helium-Neon-Lasers diente zur Justierung der Strahlengänge und als Zielstrahl. Im Bereich des Internodiums ist der Zielstrahl als zentrales Scheibchen mit den Beugungsringen niedriger Ordnung zu sehen. Die Lokalisierung des Fokus bereitet hier keine Schwierigkeiten. Im Bereich des Schnürrings mit seiner komplizierten optischen Struktur führen Streulicht und Reflexion an verschiedenen Grenzflächen zu einem mehr diffusen Bild. Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse wurde die Zwischenoptik derart justiert, daß der Brennfleck zentral im Bildfeld lag und sein Ort exakt mit der objektseitigen Schärfeebene des Mikroskopes zusammenfiel.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine morphologische Beobachtungen beim Laser-Strahlstich

Bei den eigentlichen Strahlstichexperimenten wurden ausschließlich Lichtimpulse von $\lambda = 347$ nm verwendet. Bestrahlt man nämlich die Faser mit $\lambda = 694$ nm, so kann die Intensität in einem großen Bereich variiert werden, ohne daß eine Wirkung erkennbar wird. Die Überschreitung eines gut reproduzierbaren, vom Bestrahlungsort unabhängigen Schwellenwertes in der Größenordnung von 10⁹ W/cm² führt stets zu groben Zerstörungen, meist mit Auseinanderreißen der Faser (Abb. 2).

Bestrahlung mit Licht der doppelten Frequenz ($\lambda = 347$ nm), ruft bei Überschreiten einer um den Faktor 2 kleineren Schwellenintensität dagegen streng lokalisierte Schäden von der Größe des Fokus hervor. Das lichtmikroskopische Erscheinungsbild dieses Schadens verändert sich allerdings innerhalb eines Zeitraums von Sekunden bis Minuten, wenn

* Abbn. 1–6 siehe Tafeln auf Seiten 274 a bis 274 d.

ein Bereich der Myelinscheide getroffen wurde. Diese Vorgänge lassen sich am besten im Bereich des Internodiums beobachten, da die Abbildungsbedingungen hier günstiger sind als am Schnürring (Abb. 3). Am häufigsten nimmt zunächst der Durchmesser des „Kraters“ bis ca. $5 \mu\text{m}$ zu. In der Folge quillt an der geschädigten Stelle Myelin aus der Faser heraus (Abb. 4). Wird das Axon im Bereich des Spalt- raumes getroffen, zieht sich das Myelin der Markkegel in die Segmentenden zurück. Im Bereich des nodalen Axons bleibt ein Defekt von der Form und Größe des Fokus bestehen (Abb. 6), der sich im weiteren Verlauf des Experiments nicht mehr verändert.

Die gleichen Unterschiede im Bestrahlungseffekt konnten auch an Zellen verschiedener anderer Gewebe beobachtet werden, wenn mit Licht der beiden hier verwendeten Wellenlängen bestrahlt wurde⁵. Die Grundabsorption in der Zelle ist bei beiden Wellenlängen zu gering, als daß die beobachteten Wirkungen auf sie zurückgeführt werden könnten. Oberhalb einer charakteristischen Intensitätsschwelle führen nichtlineare optische Effekte (z. B. 2-Photonen-Absorption, Absorption der freien Elektronen) zu einem lawinenartigen Anstieg der absorbierten Energie. Bei $\lambda = 694 \text{ nm}$ liegt diese Schwelle so hoch, daß die Energie des Lichtimpulses ausreicht, um die vollständige Zerstörung der Faser herbeizuführen. Wegen der größeren Quantenenergie liegt die Schwelle für das Auftreten nichtlinearer Prozesse für $\lambda = 347 \text{ nm}$ bei kleineren Intensitäten, so daß hier ein Intensitätsbereich zur Verfügung steht, in dem die Größe des Schadens reguliert werden kann. Die von Lüthy⁷ an der Nervenfaser ermittelten Maxima der spektralen Absorption liegen zwischen 250 nm und 280 nm . Es ist daher nicht zu erwarten, daß die Quantenenergie bei $\lambda = 347 \text{ nm}$ ausreicht, um einzelne molekulare Strukturelemente der Faser selektiv zu zerstören. Die in unseren Experimenten beobachtete Schädigung kommt eher einer mechanischen Läsion gleich. Dafür sprechen auch die elektrophysiologischen Befunde.

Ist die elektrophysiologische Funktion deutlich verändert, so ist auch regelmäßig ein morphologischer Schaden nachweisbar. Umgekehrt ist dagegen oft trotz deutlich erkennbarer morphologischer Strahlenschäden keine wesentlichen Veränderungen des AP's und des Ruhepotentials meßbar.

Das erste Anzeichen einer funktionellen Schädigung ist die unmittelbar auf den Bestrahlungsimpuls folgende Depolarisation. Ist diese überschwellig, so läuft sie „selbststeigernd“ weiter, und zwar mit der gleichen Anstiegssteilheit und fast der gleichen Amplitude wie beim Aktionsimpuls. Hat die Bestrahl-

lung eine derartige Erregung ausgelöst, so bleiben in jedem Fall funktionelle Schäden zurück. Nähere Aufschlüsse über die Art und das Ausmaß der Schädigung gibt erst der Verlauf der Repolarisationsphase dieses „Laser-induzierten AP“ (s. folgenden Abschnitt). Diese Erregungsauslösung erinnert an die inadäquate mechanische Reizung durch ungewollte Berührung der Faser bei der mißglückten Präparation. Auch hier beobachten wir eine fortgeleitete Erregung und anschließend bleibende Funktions schäden. Diese Analogie ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die durch den Laserimpuls erzeugten morphologischen Defekte mit mechanischen Schäden vergleichbar sind.

3.2 Spezielle Ergebnisse

Abhängig von der Lokalisation des morphologischen Defektes treten zwei grundsätzlich verschiedene Typen elektrophysiologischer Funktionsänderungen auf:

1. Das durch den Laserimpuls ausgelöste AP repolarisiert vollständig oder fast vollständig; die stationäre Strom-Spannungskurve wird durch den Laserschaden praktisch nicht verändert; trotzdem sind im weiteren Verlauf des Experiments keine Aktionspotentiale mehr auslösbar, die Faser ist unerregbar geworden (Abbn. 5 c – d). Diesen Effekt erhält man, wenn der Laserimpuls einen begrenzten Schaden im Bereich der Segmentenden verursacht hat (Abbn. 5 a und b). Voraussetzung dafür ist, daß der Ort des Schadens möglichst weit vom Axon entfernt ist und der Schaden selbst klein bleibt (ca. $1 \mu\text{m}^2$).

2. Das durch den Laserimpuls ausgelöste AP repolarisiert nicht vollständig. Im Anschluß an die 1. Repolarisationsphase wird eine starke Nachdepolarisation erkennbar, deren Amplitude und Dauer von der Größe des Schadens abhängt (Abb. 6). Nur bei leichten Schäden erfolgt die Wiederherstellung des Ruhepotentials nach wenigen ms spontan. Bei stärkeren Schäden läßt sich das Ruhepotential durch Einwärtsströme aus einer Gleichspannungsquelle in den meisten Fällen künstlich wieder herstellen. Nach einem Anelektrotonus von wenigen Minuten Dauer bleibt die künstlich eingestellte Membranspannung auch nach dem Abschalten des polarisierenden Stromes bestehen. Die Membran scheint sich unter dem Einfluß des polarisierenden Gleichstroms wieder formiert zu haben. Während der Dauer der Depolarisation ergibt die Messung der Strom-Spannungs-

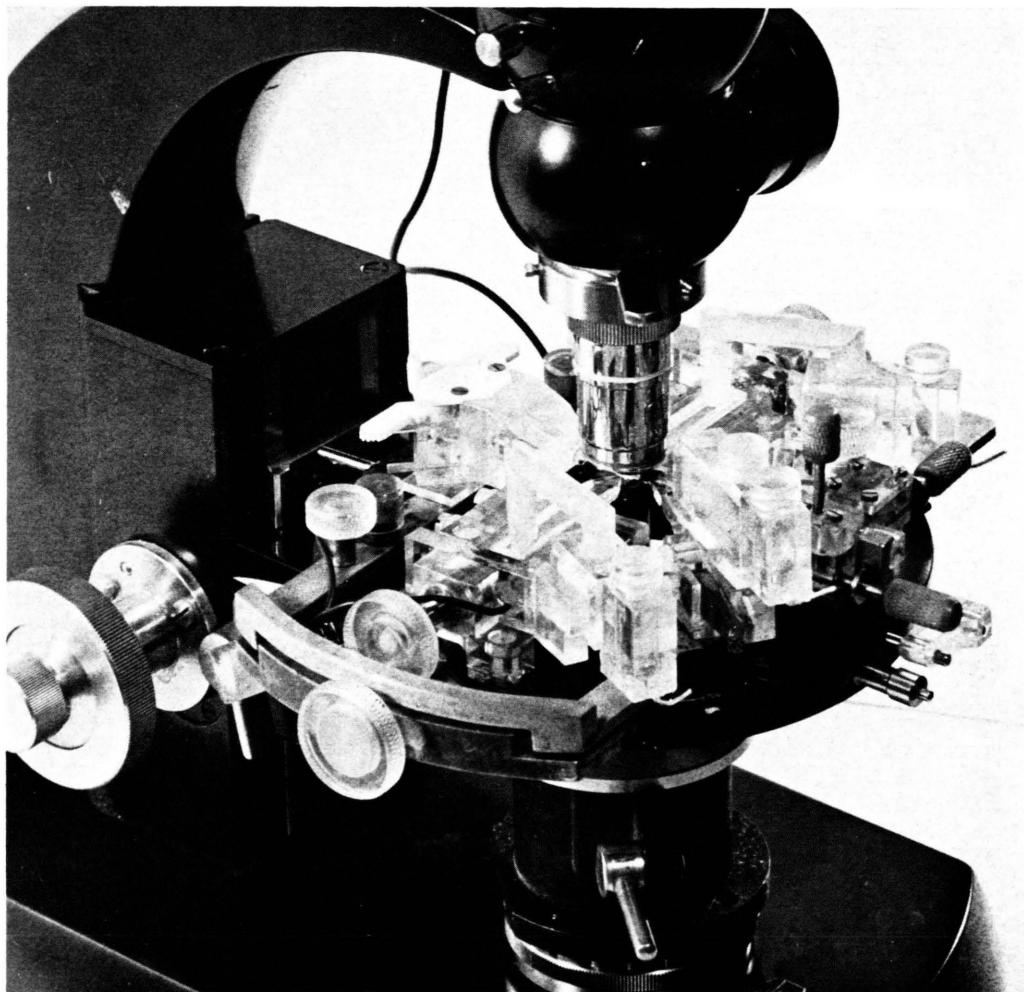


Abb. 1. 3-Elektrodenanordnung, modifiziert für die Laser-Mikrobestrahlung des Ranzier'schen Schnürrings während der elektrophysiologischen Messung. Laserstrahleintritt siehe Pfeil.

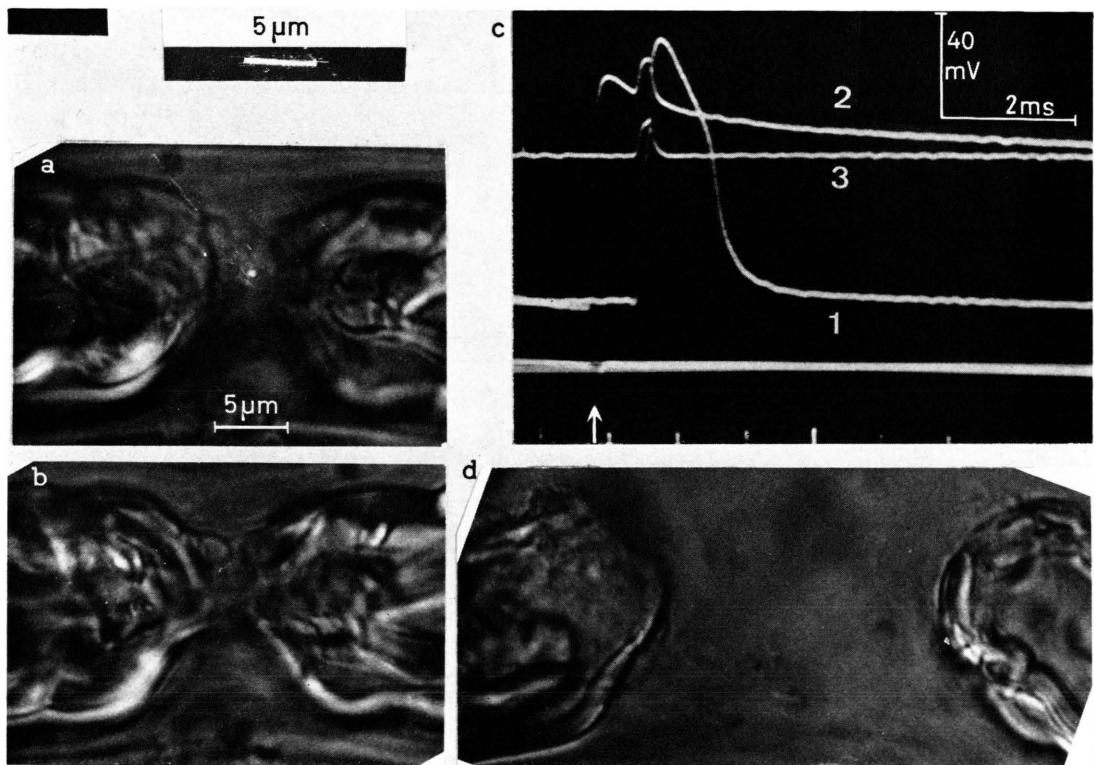


Abb. 2. Laser-Mikrobestrahlung eines Schnürrings im Bereich des nodalen Axons bei $\lambda=694$ nm. Die Reihenfolge der Abbildungen gibt zugleich den Gang des Standard-Experiments wieder. a. Aufnahme des intakten Schnürrings mit dem Fokus des Zielstrahls. b. Dasselbe nach Unterbrechen des Ziellaserstrahls; die Strukturen im Fokusbereich sind dadurch besser erkennbar und lassen sich während des Bestrahlungsexperiments beobachten. c. Elektrophysiologische Registrierungen während des Bestrahlungsexperiments. Ordinate: Membranspannung V [mV] bezogen auf Ruhepotential; positiv: in Depolarisationsrichtung abweichende Spannungen. Abszisse: Zeit [ms] (Maßstab, siehe Inset). Kurve 1: Normale AP des intakten Schnürrings. Kurve 2: Laserschuß 400 μ s vor dem Zeitpunkt des Reizes (Pfeil). Depolarisation mit „overshoot“. Die Faser ist vollständig durchtrennt (morphologische Abb. 2 d). Die Repolarisation verläuft langsamer und lediglich bis zum Membranpotential $E \cong 0$, d. h. bis der „overshoot“ (aktives Na^+ -Potential) ausgeglichen ist. Kurve 3: Irreversibler Zusammenbruch des Membranpotentials und des Membranwiderstandes. Auch eine künstliche Repolarisation ist nicht mehr möglich. Der Rechteckimpuls erzeugt ein Reizartefakt wie an einem passiven Schaltelement. d. Aufnahme unmittelbar nach der Bestrahlung; Durchtrennung der Faser; das vollständige Auseinanderreißen wird durch die endoneurale Bindegewebshülle verhindert.

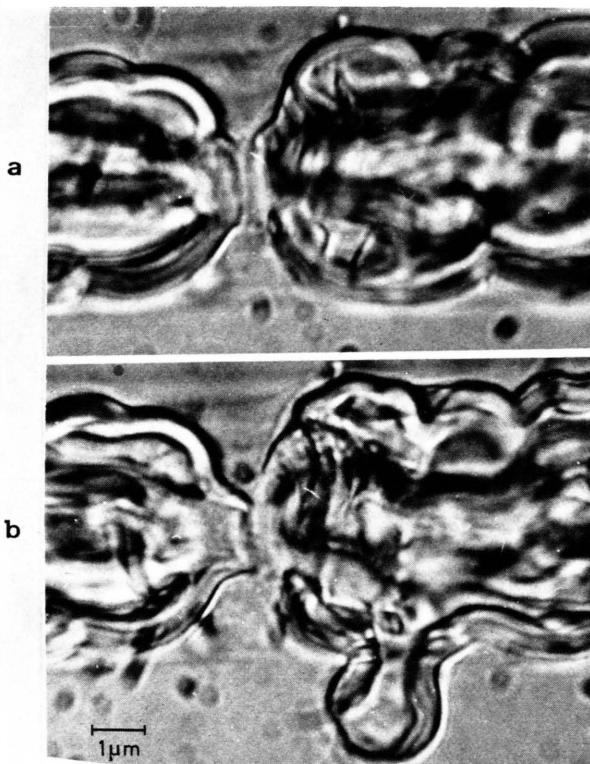
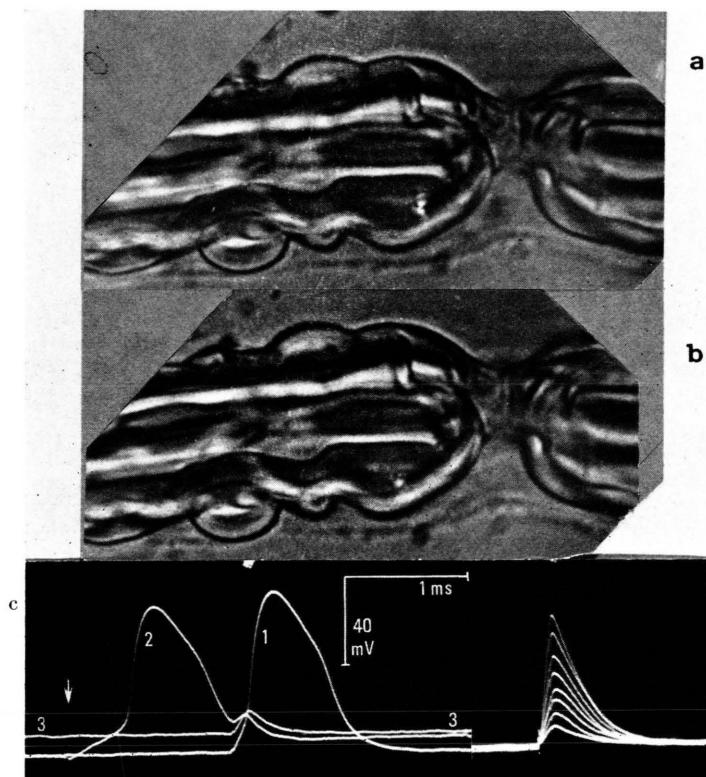


Abb. 4. Ausfließen des Myelins im Bereich eines Laser-induzierten Schadens im rechten unteren Segmentende. a. vor dem Laserschuß, b. etwa 10 s nach dem Laserschuß.



Restdepolarisation von 8 mV. 3. Kurve: Restdepolarisation bleibt bestehen, bei Re-polarisation werden auch sehr hohe Stimuli (dargestellt 8 Stufen) von keinem Impuls mehr beantwortet.

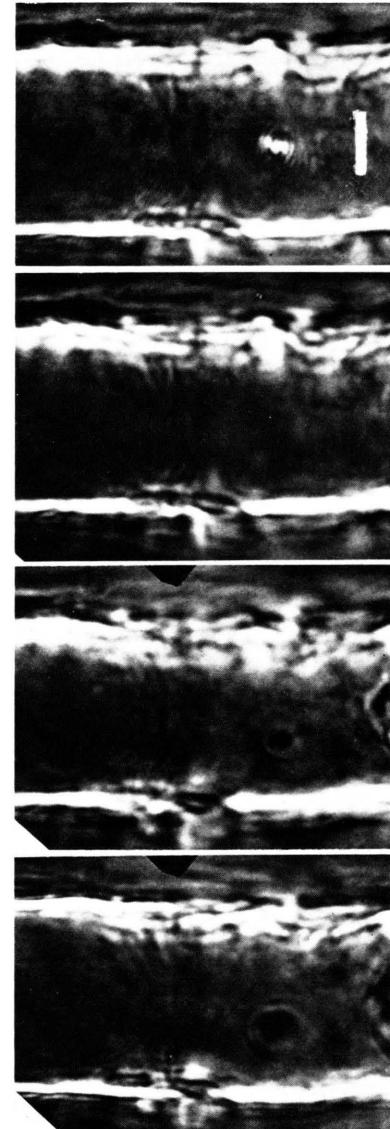


Abb. 3. Bestrahlung im internodalen Abschnitt nahe einer Schmidt-Lantermannschen Inzisur mit $\lambda=347$ nm. a. Zielfokus, b. vor dem Schuß, c. 1–4 s nach dem Schuß Bildung eines Kraters im Bereich des Zielfokus, d. 6–10 s nach dem Schuß Vergrößerung des Kraters. Nach weiteren 10 s tritt das Myelin an dieser Stelle aus der Faser aus (letzteres nicht dargestellt, s. Abb. 4).

← Abb. 5. Bestrahlung eines Schnürrings bei $\lambda=347$ nm im paranodalen Bereich (Typ des paranodalen Funktionsausfalls). a. Fokus des Ziellaserstrahls im linken unteren Segmentende. b. Geringe morphologische Schädigung nach dem Schuß. c. Elektrophysiologische Registrierung, derselbe Schnürring. 1. Kurve: Aktionspotential des Schnürrings Abb. 5 a. 2. Kurve: Laser-Impuls 1,2 ms vor dem Reizzeitpunkt, siehe Pfeil; Aktionsimpuls ausgelöst durch Laser-Impulsbestrahlung. Der nachfolgende elektrische Stimulus (gleiche Amplitude wie bei Kurve 1) löst keine Reizantwort. d. Nach künstlicher Re-

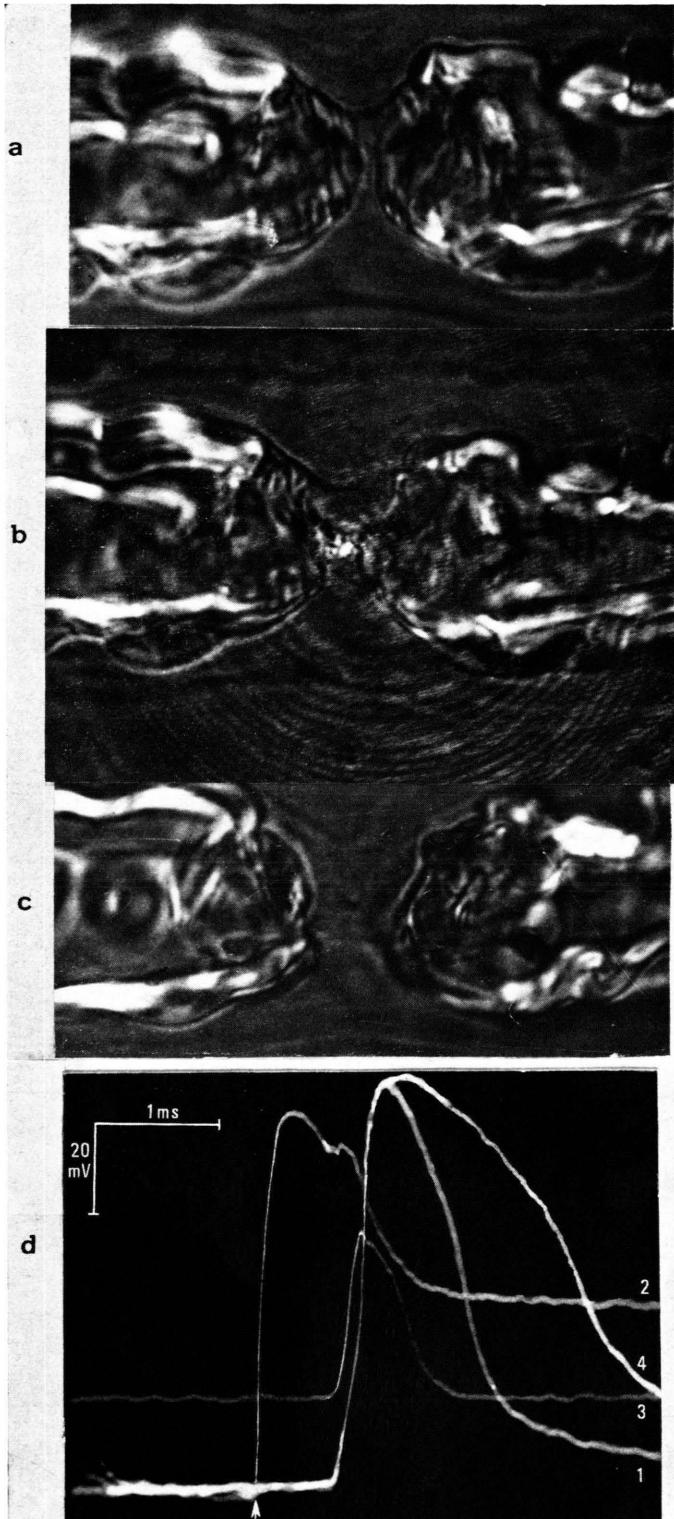


Abb. 6. Laser-Mikrobestrahlung des nodalen Axons bei $\lambda=347$ nm (Typ des axonalen Funktionsausfalls), a. vor der Bestrahlung, b. Zeitpunkt des Schusses und c. 10 s danach. Schädigung kreisrund ($\phi \approx 1 \mu\text{m}$). d. Parallel durchgeführte elektrophysiologische Registrierung. 1. Kurve: AP der morphologisch intakten Faser (Abb. 6 a). 2. Kurve: Der „Laser-Reiz“ ist überschwellig. Die Repolarisation verläuft in der hier dargestellten ersten Phase der Restitution spontan bis $+40$ mV (morphologischer Zustand siehe Abb. 6 c). 3. Kurve: Bei der nächsten Registrierung, also nach ca. 1 s, weitere Repolarisation, bis $+20$ mV unterschwellige Erregung. 4. Kurve: Künstliche Repolarisation bis $V \approx \pm 0$ mV; AP mit stark verzögter Repolarisation.

charakteristik einen linearen Widerstand im $k\Omega$ -Bereich — wie nach einem elektrischen Durchschlag der Membran. Gleichzeitig mit der Wiederherstellung des Ruhepotentials restituiert sich auch das normale Strom-Spannungsverhalten weitgehend; sobald der ursprüngliche Zustand annähernd erreicht ist, sind wieder AP auslösbar. Funktionsänderungen dieses Typs erhält man, wenn der Laser-Schaden im mikroskopischen Bild des Axons (nodal, paranodal oder internodal) lokalisiert ist.

Die unter Punkt 2 beschriebenen Vorgänge können an demselben Schnürring oft mehrere Male wiederholt werden, ehe die Aktivität vollständig erlischt. Nachwirkungen jeder einzelnen Schädigung bestehen in einer Verminderung des Widerstandes in allen Bereichen der Strom-Spannungskennlinien, in der Verminderung der AP-Amplitude und in einer Verlängerung der 1. Repolarisationsphase; letztere ist in diesem Experiment zugleich das empfindlichste Zeichen für eine funktionelle Schädigung.

Eine offensichtliche Korrelation zwischen der Größe des lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Schadens und den Funktionsänderungen besteht nicht. Oft werden auch bei starken morphologischen Zerstörungen Aktionspotentiale von normaler Amplitude beobachtet, die sich lediglich durch ihre Verbreiterung vom ursprünglichen AP unterscheiden. Dagegen scheint eine Korrelation zwischen der Lokalisation der „Axonschäden“ und dem funktionellen Schaden zu bestehen. Bei etwa gleich großem morphologischem Schaden nimmt der Umfang des funktionellen Schadens in folgender Reihenfolge ab: Paranodales Axon, nodales Axon, internodales Axon.

4. Diskussion

Zunächst sei das experimentelle Ergebnis kurz zusammengefaßt. Durch die Zerstörung zweier verschiedener Zellbestandteile im Bereich des Schnürrings lassen sich zwei grundsätzlich verschiedene Funktionsänderungen erreichen:

1. Wird eine bestimmte Stelle in den Segmentenden zerstört, so erlischt die Fähigkeit, Aktionsimpulse zu regenerieren, irreversibel, obwohl Ruhepotential und Strom-Spannungsverhalten nicht verändert werden.

2. Wird das Axon durch den Laserimpuls getroffen, so brechen Membranwiderstand und Membranpotential zusammen. In den meisten Experimenten „erholen“ sich beide Parameter entweder

spontan oder im Verlauf einer 3–120 s dauernden künstlichen Repolarisation. Ist das Ruhepotential wieder hergestellt, so sind in jedem Fall wieder Aktionsimpulse auslösbar — auch bei starken morphologischen Schäden, die das mikroskopische Bild des Schnürrings bis zur Unkenntlichkeit verändern. Ob die eine oder die andere Funktionsänderung auftritt, hängt ausschließlich vom Ort des Schadens ab.

Diese Ergebnisse der Laser-Strahlstichexperimente sind mit der generell vertretenen Ansicht, daß die drei zur Impulsregeneration notwendigen Elementarfunktionen gemeinsam in dem von Myelin unbedeckten Abschnitt der Axonmembran lokalisiert sind, nicht zu vereinbaren. Dagegen deutet der unter 1. beschriebene Funktionsausfall bei Paranodalschäden darauf hin, daß die dosierte Freisetzung des Na^+ nach dem überschwwelligen Reiz (Aktivierung und Inaktivierung des Na^+ -Stromes, Teilfunktion 3, siehe Einleitung) in den Segmentenden der Myelinscheide stattfindet, also in Strukturen, die nicht nur außerhalb des nodalen Abschnitts der Axonmembran, sondern außerhalb der Axonmembran überhaupt gelegen sind. Aus dem unter 2. beschriebenen axonalen Funktionsausfall ist zu schließen, daß das Membranpotential und das Strom-Spannungsverhalten, das der Bistabilität zugrundeliegt, an die Axonmembran gebunden sind. Für die Funktionen 1 und 2 (siehe Einleitung) gilt demnach die konventionelle Betrachtungsweise. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß auch außerhalb des nodalen Spaltraums gelegene Abschnitte der Axonmembran für diese Funktionen in Frage kommen.

Unsere Interpretation wird durch folgende allgemein bekannte Tatsachen gestützt: Die Axonmembran des Schnürrings ist im Spaltraum von einer fast $3 \mu\text{m}$ dicken Schicht Schwann'schen Plasmas bedeckt. Seitlich angrenzend lagern die ca. $3 \mu\text{m}$ dicken Markkegel über der Axonmembran. Nach außen sind diese Strukturen von verschiedenen Bindegewebsschichten umgeben, die den geringen Faserdurchmesser am Schnürring auf den internodalen Faserdurchmesser auffüllen. Da das nodale Plasmacompartment aus Zellausläufern besteht, ist seine Elektrolytzusammensetzung wie die des Zellplasmas, also K^+ -reich. Das extrazelluläre Na^+ -Reservoir hat also keinen direkten Kontakt mit der Axonmembran. Die zwischengeschalteten Strukturen wirken als Diffusionshindernis und der hohe K^+ -Gehalt des nodalen Schwann-Plasmas erschwert zusätzlich das

Eindringen von Na^+ . Ob der Na^+ -Einstrom über den interzellulären Spalt von 22 nm Breite zwischen den nodalen Schwannzellabschnitten bewerkstelligt wird, erscheint mehr als fraglich.

Wegen der äußerst geringen Verzögerung, mit der der Na^+ -Einstrom aber tatsächlich erfolgt, ist die Existenz eines speziellen Na^+ -Zwischenspeichers anzunehmen, der entweder im nodalen Schwann-Plasma, in den nodalen Myelinkegeln oder im Myelin der Segmentenden gelegen ist (Voraussage 1). Außerdem ist eine besondere Struktur zu fordern, die das Na^+ – wie die intraneurale Synapse ihren Transmitterstoff – auf einen überschweligen elektrischen Impuls hin in Membrannähe freisetzt und so die regenerative Depolarisation ermöglicht (Voraussage 2). Orte, an denen sich besondere Funktionen abspielen, sind erfahrungsgemäß an besonderen morphologischen Strukturen erkennbar, in diesem Fall wäre demnach eine Synapse zu erwarten.

Aus unserer Hypothese leiten sich Folgerungen ab, deren Gültigkeit durch das Experiment unmittelbar nachprüfbar sind. Wir gehen nur auf die oben genannten Voraussagen ein, weil sie, von den heutigen elektrophysiologischen Theorien aus gesehen, nicht gerade naheliegen – von hier aus schiene unsere Hypothese am leichtesten falsifizierbar – und weil für beide bereits experimentelle Ergebnisse vorliegen.

1. Orientierende Experimente mit der Elektronensonde an gefriergetrockneten Schnitten von Nervenfasern⁸ deuten darauf hin, daß im Myelin die Elektrolytzusammensetzung der extrazellulären Phase entspricht. Das Myelin kommt also als Na^+ -Speicher in Betracht. In den paranodalen Markkegeln liegen die Umschlagfalten zwischen den übereinanderliegenden einzelnen Myelinlamellen. Jede dieser Umschlagfalten schließt zwischen den Myelinlamellen einen bläschenartig erweiterten Hohlraum ein. Falls Elektrolyte in diesen Hohlräumen frei dissoziieren können – was anzunehmen ist –, stünde hier eine hohe Na^+ -Konzentration und damit der postulierte Na^+ -Zwischenspeicher zur Verfügung.

2. Durch elektronenoptische Untersuchungen (freeze-etching-Verfahren) wurden im Bereich der Markkegel glia-axonale Synapsen gefunden^{9, 10}, die wegen ihrer komplizierten aber regelmäßig organisierten Anordnung als paranodales Organ bezeichnet wurden. Bei den Einzelstrukturen des Organs handelt es sich um sehr enge (2–3 nm), morpho-

logisch hochdifferenzierte Kontakte der Umschlagfalten mit der Axonmembran.

Während die Kanal- oder Porenhypothese für die unterschiedlichen K^+ - und Na^+ -Permeabilitäten ionenspezifische Durchtrittsstellen im gleichen Membranabschnitt verantwortlich macht, verlegt die hier vertretene Ansicht, die man als Synapsenhypothese bezeichnen kann, die Na^+ -Aktivierung und -Inaktivierung in ein spezielles paranodales Organ und betrachtet sie als dosierte Zufuhr von Na^+ durch eine Synapse. In dieser Synapsenhypothese wird angenommen, daß sich die eigentlichen Membranpermeabilitäten für Na^+ und K^+ nicht so stark voneinander unterscheiden, wie man bisher annahm. Man kann sich dabei auf die Ähnlichkeit der stationären Na^+ - und K^+ -Kennlinien stützen¹.

Beide Hypothesen unterscheiden sich in ihrer Brauchbarkeit für die Interpretation der elektrophysiologischen Meßergebnisse nicht wesentlich von einander. Die Synapsenhypothese erklärt zusätzlich die hier dargestellten Ergebnisse und kommt bei der Interpretation des stationären Strom-Spannungsverhaltens zu einem einfacheren Bild als die Kanalhypothese, die über die ursprünglich angenommenen beiden Arten von Kanälen hinaus noch besondere Na^+ - und K^+ -Kanäle einführen mußte, um die Ergebnisse stationärer Messungen erklären zu können.

Abschließend seien einige Befunde der Strahlstichexperimente beschrieben, die sich unserer Hypothese nicht ohne weiteres unterordnen:

a. Trifft der Laser-Strahlstich das Segmentende derart, daß das Axon mitverletzt wird, so beobachten wir einen Funktionsausfall vom Typ 2 (Axonschaden). Allerdings sind die irreversiblen Schäden des AP hierbei größer als bei Verletzungen der übrigen Faserabschnitte. In diesem Experiment durchschneidet der Laserstrahl die Myelinlamellen senkrecht zur Flächennormalen, während er die Myelinlamellen bei einer Verletzung des Segmentendes, die zum Funktionsausfall des Typs 1 führt, parallel zur Flächennormalen schneidet. Wahrscheinlich bedingt die unterschiedliche Anordnung des Laserstrahls relativ zur Orientierungsachse der Feinstruktur morphologische Schäden, die sich in Gestalt und Umfang unterscheiden und vielleicht dadurch den unterschiedlichen Funktionsausfall erklären. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des geschädigten Gewebes sind bisher nicht durchgeführt worden.

b. Typ 1 der Funktionsänderungen wird beobachtet, obwohl das „paranodale Organ“ nicht in seinem gesamten Umfang zerstört ist. Demnach ließe

sich die Funktionsfähigkeit dieses Organs bereits durch Teilzerstörung vollständig ausschalten.

- ¹ H. Müller-Mohnssen, Kybernetik **7**, 207 [1970].
- ² H. Müller-Mohnssen u. H. Barske, Am. J. Physiol. **226**, 844 [1974].
- ³ R. Stämpfli, Helv. Physiol. Pharmacol. Acta **16**, 127 [1958].
- ⁴ H. Müller-Mohnssen, Z. Zellforsch. **54**, 486 [1961].
- ⁵ F. Hillenkamp, R. L. Kaufmann u. E. Remy, Modern Techniques in Physiol. Sciences, p. 225, Academic Press, London u. New York 1973.

- ⁶ R. L. Kaufmann, F. Hillenkamp u. E. Remy, Microscopica Acta **73/1**, 1 [1972].
- ⁷ H. Lüthy, Pflügers Arch. ges. Physiol. **253**, 477 [1951].
- ⁸ A. Dörge, R. Rieck u. A. Tippe, in Vorbereitung.
- ⁹ K. Akert, C. Sandri, R. B. Livingston u. H. Moor, Actualités Neurophysiologiques, p. 9, Masson, Paris 1974.
- ¹⁰ R. B. Livingston, K. Pfenniger, H. Moor u. K. Akert, Brain Research **58**, 1 [1973].