

Redaktionelle Vorbemerkung: Der nachfolgende Aufsatz orientiert über besonders aktuelle Forschungen auf dem Gebiet der Physiologie der peripheren Nerven und ist einem Initiator und vielseitigen Förderer dieser Grundlagenforschungen, Herrn Prof. Dr. med. et phil. ALEXANDER VON MURALT zu seinem 60. Geburtstag gewidmet.

H. M.

Das perfundierte Riesenaxon des Tintenfisches Eine neue Methode der Nervenphysiologie und ihre ersten Anwendungen

Von H. MEVES *

Wesentliche Fortschritte in der Physiologie werden immer dann möglich, wenn die Entwicklung der Physik und Chemie dem Physiologen neue Untersuchungsmethoden in die Hand gibt oder wenn besonders geeignete, bisher unbekannte Versuchsobjekte entdeckt werden. Die Physiologie der peripheren Nerven, deren vordringlichste Aufgabe die Erforschung des Erregungsvorgangs in der Nervenfasern ist, erlebte in diesem Jahrhundert ihren ersten entscheidenden Fortschritt durch die Entwicklung des Kathodenstrahl-oszillographen. Mit ihm konnten zum ersten Mal die bei der Erregung auftretenden Aktionspotentiale in ihrem wahren zeitlichen Verlauf registriert werden¹. Mehrere Jahre danach folgte die Entdeckung – oder richtiger Wiederentdeckung – der Riesenfasern in den Stellarnerven des Tintenfisches *Loligo*²; ihr Durchmesser beträgt bei *Loligo forbesi* bis zu 1 mm, das ist das 30fache des Durchmessers der dicksten Froschnervenfasern. An diesem neuen Versuchsobjekt konnte einwandfrei nachgewiesen werden, dass das Aktionspotential von einer starken Abnahme des elektrischen Widerstands der Membran der Nervenfasern begleitet ist³. Wenig später gelang es, eine Ableitelektrode longitudinal in das Innere eines funktionsfähigen Riesenaxons einzuführen; damit war es zum ersten Mal möglich, das Aktionspotential in seiner vollen Höhe zu messen, und es zeigte sich überraschenderweise, dass das Aktionspotential grösser als das Ruhepotential ist, d. h. dass die Innenseite der Membran, die in der Ruhe 60–70 mV negativ gegen die Aussenseite ist, bei der Erregung 50 mV positiv gegen aussen wird^{4, 5}. Die inzwischen entwickelte Technik der radioaktiven Isotopen ermöglichte den Nachweis, dass pro Aktionspotential und pro cm² Membran 4 · 10⁻¹² Mol Na⁺ in die Faser eintreten und eine gleiche Menge K⁺ austritt⁶. Ihren glänzendsten Erfolg verdankt die Nervenphysiologie den Fortschritten der Elektronik: Diese machten die Entwicklung des sog. Voltage-clamp-Verfahrens möglich, bei dem das Membranpotential durch eine Gegenkopplungsschaltung (Regelkreis) automatisch auf vorgegebenen Werten festgehalten und der durch die Membran fließende Ionenstrom als Funk-

tion des Membranpotentials und der Zeit gemessen wird. Die quantitative Auswertung solcher Messungen führte zu vier Gleichungen, die die Permeabilitätsänderungen der Membran und die aus ihnen resultierenden Ionenströme in Abhängigkeit vom Membranpotential und der Zeit beschreiben; dieses System von Gleichungen bildet ein vollständiges mathematisches Modell der erregbaren Membran und gestattet, Form und Grösse des Aktionspotentials unter verschiedenen experimentellen Bedingungen vorzuberechnen (HODGKIN und HUXLEY⁷). Die Gültigkeit dieser Gleichungen und der ihnen zugrunde liegenden theoretischen Vorstellungen ist keineswegs auf die Riesenfasern des Tintenfisches beschränkt; sie sind mit geringfügigen Modifikationen auch auf die markhaltigen Nervenfasern der Wirbeltiere anwendbar⁸.

Das Riesenaxon des Tintenfisches erwies sich jedoch nicht nur für elektrophysiologische Untersuchungen als ein wegen seiner Grösse besonders geeignetes Versuchsobjekt, sondern bietet auch für neurochemische Fragestellungen einzigartige Möglichkeiten. Durch Mikroinjektion können Stoffe in das Innere der Faser injiziert werden; auf diese Weise kann zum Beispiel der Einfluss energiereicher Phosphate auf den aktiven Ionentransport untersucht werden⁹. Weiterhin ist es möglich, das gelartige Axoplasma aus dem abgeschnittenen Ende der Riesenfasern wie eine Paste aus einer

* I. Physiologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar, Deutschland).

¹ H. S. GASSER und J. ERLANGER, Amer. J. Physiol. 59, 473 (1922).

² J. Z. YOUNG, Quart. J. micr. Sci. 78, 367 (1936). – Erste Erwähnung der Riesenfasern bei L. W. WILLIAMS, The Anatomy of the Common Squid, *Loligo pealii*, Lesueur (Leiden 1909).

³ K. S. COLE und H. J. CURTIS, J. gen. Physiol. 22, 649 (1939).

⁴ A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY, Nature 140, 710 (1939).

⁵ H. J. CURTIS und K. S. COLE, J. cell. comp. Physiol. 19, 135 (1942).

⁶ R. D. KEYNES und P. R. LEWIS, J. Physiol. 114, 151 (1951).

⁷ A. L. HODGKIN und A. F. HUXLEY, J. Physiol. 117, 500 (1952). – A. F. HUXLEY, Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 221 (1959).

⁸ B. FRANKENHAUSER, J. Physiol. 151, 491 (1960); 160, 54 (1962).

⁹ P. C. CALDWELL, A. L. HODGKIN, R. D. KEYNES und T. I. SHAW, J. Physiol. 152, 561, 591 (1960).

Tube herauszuquetschen¹⁰. Die zurückbleibende Hülle besteht aus dem Axolemm (= erregbare Membran; 70–80 Å), den Schwannschen Zellen (0,1–1 μ), der Basalmembran (0,1–0,2 μ) und der äusseren Bindegewebshülle. Das auf diese Weise isolierte Axoplasma kann chemisch analysiert werden; es enthält als wichtigstes Kation Kalium (400 mM/kg H₂O) und als Anionen hauptsächlich Isäthionat und Chlorid. O₂-Verbrauch und Fermentaktivitäten von Axoplasma und Hülle können getrennt bestimmt und miteinander verglichen werden¹¹.

Man sollte naturgemäss erwarten, dass die Ausquetschung des Axoplasmas aus dem Riesenaxon zu einer weitgehenden Zerstörung der erregbaren Membran führt. Im Herbst 1960 fanden jedoch BAKER, HODGKIN und SHAW¹², dass eine ausgequetschte Strecke des Riesenaxons, die mit Axoplasma aus dem benachbarten intakten Faserabschnitt wiedergefüllt wurde, mehr als 2 h Aktionspotentiale normaler Grösse geben konnte. Dies war der Ausgangspunkt für den Versuch, Riesenaxone mit Salzlösungen zu perfundieren.

Methode des perfundierten Riesenaxons. Die heute gebräuchlichste Methode wurde von BAKER, HODGKIN und SHAW¹³ entwickelt. Als Standard-Perfusionslösung wird entsprechend dem hohen K-Gehalt des natürlichen Axoplasmas eine isotonische Lösung eines K-Salzes (K₂SO₄ oder KCl) benutzt, deren pH mit Phosphatpuffer auf 7,5 eingestellt wird. Der erste Schritt ist die Exzision des Stellarnerven mit der Riesenfaser und den begleitenden dünnen Nervenfasern. In das distale Ende der Riesenfaser wird eine feine Glaskanüle eingebunden. Das Axoplasma wird ausgequetscht, indem eine Gummirolle mehrfach mit leichtem Druck über das Axon gerollt wird. Eine motorgetriebene Spritze, die mit der Glaskanüle verbunden wird, drückt langsam isotonische K₂SO₄-Lösung in das ausgequetschte Axon; dadurch wird auch der dicht an der Kanüle sitzende Axoplasmapfropf entfernt. Anschliessend wird die Erregbarkeit des Axons mit Aussenelektroden getestet und das Axon in die Versuchsanordnung überführt.

Die Versuchsanordnung ist in Figur 1 dargestellt. Das Axon hängt an der Glaskanüle und ist aussen vollständig von künstlichem Seewasser umgeben. Durch die Glaskanüle wird eine Mikroelektrode in das Faserinnere eingeführt, um Ruhe- und Aktionspotential zu messen. Die Reizung erfolgt entweder über Aussenelektroden oder durch eine zusätzliche Elektrode von der Kanüle aus. Die im Innern des Axons befindliche K₂SO₄-Lösung kann durch eine beliebige Testlösung ersetzt werden. Die Testlösung wird in die Glaskanüle eingefüllt. In dem Versuchsgefäss wird ein negativer Druck von 2–3 cm H₂O erzeugt. Die Testlösung fliesst dann in etwa 1/2 min durch das 5–7 cm lange Axon hindurch. Die von den Testlösungen bewirkten Änderungen des Membranpotentials beginnen im allgemeinen bereits wenige sec nach dem Flüssig-

keitswechsel aufzutreten; daraus geht hervor, dass die intraaxonal applizierten Lösungen ungehinderten Zugang zu der Membran haben.

Figur 2 zeigt das Aktionspotential eines mit isotonischer K₂SO₄-Lösung perfundierten Axons. Zum Vergleich ist ausserdem das Aktionspotential einer intakten Riesenfaser abgebildet. Beide stimmen nach Grösse und zeitlichem Verlauf fast vollständig überein, d. h. die Perfusion führt zu keiner erkennbaren Veränderung im elektrischen Verhalten der Faser.

Die Erfolgchancen der Perfusionsversuche sind hoch. BAKER, HODGKIN und SHAW¹³ fanden, dass von 207 Riesenfasern, die in der beschriebenen Weise ausgequetscht und mit K₂SO₄-Lösung perfundiert wurden, 147 Fasern (d. h. 70%) ein Aktionspotential lieferten; in etwa zwei Drittel der Fälle blieb die Faser 1–5 h erregbar. Bei den neueren Versuchen von BAKER, HODGKIN und MEVES¹⁴ waren 90% der Fasern längere Zeit erregbar. Die Schwierigkeiten nehmen naturgemäss mit abnehmendem Faserdurchmesser zu; eine erfolgreiche Perfusion ist jedoch nicht nur bei den 0,5–1,0 mm dicken Fasern des europäischen Tintenfisches *Loligo forbesi*, sondern auch bei den nur halb

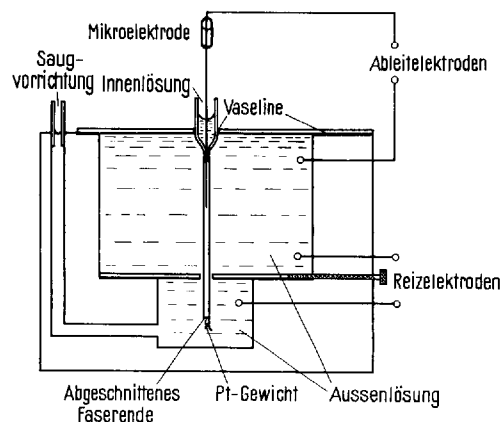


Fig. 1. Versuchsanordnung für das perfundierte Riesenaxon. Die Apparatur besteht im wesentlichen aus einer Plexiglaszelle, die mit künstlichem Seewasser (Aussenlösung) gefüllt und oben mit einem Plexiglasdeckel verschlossen ist. Das Axon hängt vertikal an einer Glaskanüle und ist am unteren Ende mit einem Platingewicht beschwert. Zur Potentialmessung dient eine Mikroelektrode von 0,1 mm Durchmesser, die durch die Glaskanüle in das Innere des Axons eingeführt wird. Die Reizung erfolgt mit Aussenelektroden am unteren Faserende; dieses ist zwecks Erhöhung des Aussenwiderstandes durch ein enges Loch in einer Plexiglasplatte geführt. Die verschiedenen Innenlösungen werden in die Glaskanüle eingefüllt und fliessen unter einem Druck von 2–3 cm H₂O durch das Axon (aus BAKER, HODGKIN und SHAW¹³).

¹⁰ R. S. BEAR, F. O. SCHMITT und J. Z. YOUNG, Proc. Roy. Soc. B 123, 520 (1937).

¹¹ N. R. ROBERTS, R. R. COELHO, O. H. LOWRY und E. J. CRAWFORD, J. Neurochem. 3, 109 (1958).

¹² P. F. BAKER, A. L. HODGKIN und T. I. SHAW, Nature 190, 885 (1961).

¹³ P. F. BAKER, A. L. HODGKIN und T. I. SHAW, J. Physiol. 164, 330 (1962).

¹⁴ P. F. BAKER, A. L. HODGKIN und H. MEVES, J. Physiol., im Druck.

so dicken Fasern der amerikanischen Art *Loligo pealii* möglich (NARAHASHI¹⁵).

Die naheliegende Frage, wie vollständig die Entfernung des Axoplasmas gelingt, wird am besten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen beantwortet. Figur 3 zeigt, dass die zurückbleibende Axoplasmaschicht etwa $7\ \mu$ dick ist; da der Durchmesser dieser Faser $700\ \mu$ beträgt, bedeutet das 4% des ursprünglichen Axoplasmas. Obwohl exakte Angaben nicht möglich sind, kann man sagen, dass im allgemeinen etwa 95% des Axoplasmas entfernt werden.

Die Möglichkeit, dass das am perfundierten Riesenaxon abgeleitete Aktionspotential gar nicht von der Riesenfaser selbst, sondern von den begleitenden dünnen Nervenfasern oder etwa von den Schwannschen Zellen geliefert würde, kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Das perfundierte Riesenaxon kann vollständig von den dünnen Fasern befreit werden, ohne dass sich an dem registrierten Aktionspotential etwas ändert. Die Schwannschen Zellen können bei den Riesenfasern des südamerikanischen Tintenfisches *Sepioteuthis sepioidea* mit intrazellulären Mikroelektroden untersucht werden, da sie bei dieser Art ungewöhnlich dick sind ($2\text{--}5\ \mu$); sie liefern – wie Figur 4 zeigt – zwar ein Ruhepotential, aber kein Aktionspotential.

Ausser der Methode von BAKER, HODGKIN und SHAW¹³ wurden andersartige Verfahren zur Perfusion des Riesenaxons mit Salzlösungen gleichzeitig oder früher von TASAKI et al.^{16, 17} entwickelt. Bei einem dieser Verfahren wird von jedem Ende des Axons eine dünne Glaskapillare bis zur Axonmitte vorgeschoben. Die Glaskapillaren sind unterschiedlich dick. Die Spitze

der dünneren Kapillare ($160\ \mu$ Durchmesser) wird in das Lumen der dickeren Kapillare ($330\ \mu$ Durchmesser) eingeführt. Dann wird Perfusionslösung durch die beiden Kapillaren gedrückt. Wenn ein kontinuierlicher

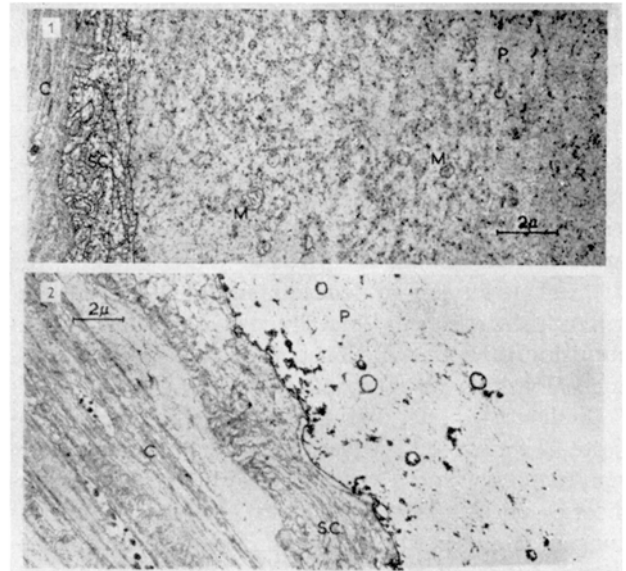


Fig. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme des intakten und des perfundierten Riesenaxons. (1) intaktes Axon, (2) perfundiertes Axon. Abkürzungen: C äussere Bindegewebshülle, M Mitochondrien, P Protoplasma des Riesenaxons (= Axoplasma), SC Schwannsche Zelle. Beim perfundierten Axon ist nur noch ein $7\ \mu$ breiter Axoplasmasaum vorhanden; das Axoplasma ist elektronenoptisch weniger dicht als das Axoplasma der intakten Faser. Fixation mit OsO_4 (aus BAKER, HODGKIN und SHAW¹³).

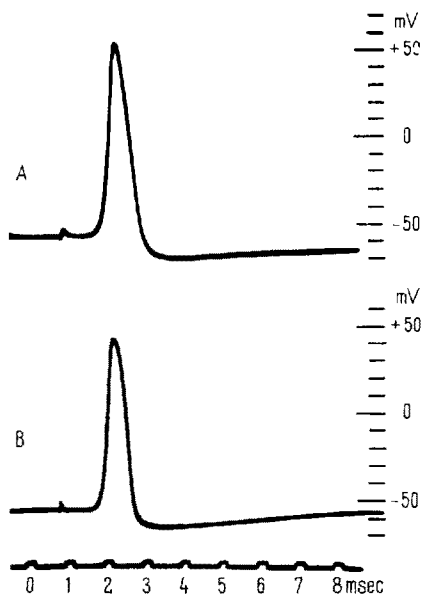


Fig. 2. Ruhe- und Aktionspotential des perfundierten und des intakten Riesenaxons. (A) perfundiertes Axon (16°C) mit isot. K_2SO_4 -Lösung als Innenlösung, (B) intaktes Axon (18°C); in beiden Fällen Potentialableitung mit intraaxonaler Mikroelektrode (aus BAKER, HODGKIN und SHAW¹³).

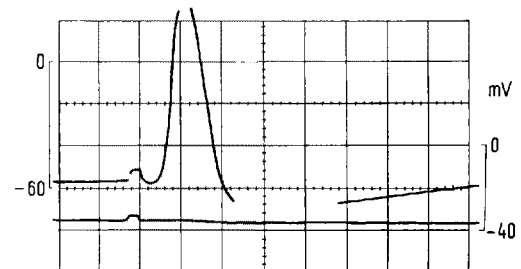


Fig. 4. Gleichzeitige Registrierung des Axonpotentials und des Potentials einer Schwannschen Zelle an der Riesenennervenfaser des Tintenfisches, *Sepioteuthis sepioidea*. Je eine Mikroelektrode von $0,5\ \mu$ Spitzendurchmesser wird in das Axon und in eine Schwannsche Zelle eingestochen. Obere Registrierung: Axonpotential (linke Skala); Ruhepotential von $-60\ \text{mV}$ und Aktionspotential. Untere Registrierung: Potential einer Schwannschen Zelle (rechte Skala); Ruhepotential von $-40\ \text{mV}$, kein Aktionspotential (aus VILLEGAS, GIMENEZ und VILLEGAS¹⁸).

¹⁵ T. NARAHASHI, Abstr. biophys. Soc. N. Y., Februar 1963, WC 5; J. Physiol., im Druck.

¹⁶ T. OIKAWA, C. S. SPYROPOULOS, I. TASAKI und T. TEORELL, Acta physiol. scand. 52, 195 (1961).

¹⁷ I. TASAKI, A. WATANABE und T. TAKENAKA, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 48, 1177 (1962). – I. TASAKI und M. SHIMAMURA, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 48, 1571 (1962).

¹⁸ R. VILLEGAS, M. GIMENEZ und L. VILLEGAS, Biochem. biophys. Acta 62, 610 (1962).

Flüssigkeitsstrom hergestellt ist, werden die beiden Kapillaren etwas zurückgezogen, bis der Abstand zwischen ihren Spitzen 7–10 mm beträgt. Bei diesem Verfahren wird das Axoplasma also nur auf einer 7–10 mm langen Strecke entfernt und auch das nur im Zentrum des Axons.

Prüfung und Bestätigung der Theorie der Nerven-erregung durch Versuche am perfundierten Axon. Die Methode des perfundierten Riesenaxons bietet eine einzigartige Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung der im Innern eines erregbaren Zellfortsatzes befindlichen Flüssigkeit in beliebiger und reproduzierbarer Weise zu ändern und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen des Ruhe- und Aktionspotentials zu verfolgen. Es wurde auf diese Weise möglich, die Richtigkeit unserer in dem letzten Jahrzehnt entwickelten theoretischen Vorstellungen über die Entstehung des Ruhe- und Aktionspotentials in ihren wesentlichen Punkten zu überprüfen.

Die heute von der Mehrheit der Physiologen akzeptierte Theorie der Nerven-erregung ist die Ionentheorie von HODGKIN und HUXLEY⁷, die auf der Membrantheorie von BERNSTEIN¹⁹ aufbaut. Durch die Bezeichnungen «Membrantheorie» und «Ionentheorie» ist bereits der wesentliche Inhalt angedeutet: Es wird angenommen, dass der Erregungsvorgang in der Membran (= Axolemm) und nicht im Innern der Nerven- faser (= Axoplasma) lokalisiert ist; die Entstehung des Ruhe- und Aktionspotentials wird erklärt durch die unterschiedliche Konzentration der Kalium- und Natriumionen in der Aussen- und Innenflüssigkeit und durch die unterschiedliche Permeabilität der Membran für diese Ionen. Für das Membranpotential ergibt sich aus dieser Vorstellung der einfache Ausdruck

$$V = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_a + P_{Na} [Na^+]_a}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i} \quad (1)$$

wobei $[]_a$ und $[]_i$ die Aktivitäten von K^+ und Na^+ in der Aussenflüssigkeit bzw. Innenflüssigkeit und R , T und F die allgemeine Gaskonstante, die absolute Temperatur und die Faradaysche Äquivalentladung bedeuten. P_K und P_{Na} sind die K - bzw. Na -Permeabilität der Membran; sie sind keine Konstanten, sondern Funktionen des Membranpotentials und der Zeit. In der Ruhe ist P_K relativ gross; der Quotient P_{Na}/P_K beträgt etwa 0,1 und ist im einzelnen von der Höhe des Ruhepotentials abhängig. Während der Erregung steigt P_{Na} vorübergehend stark an ($P_{Na}/P_K \sim 10$), und Na^+ -Ionen fließen entlang ihrem Konzentrationsgefälle von aussen nach innen durch die Membran (ansteigende Phase des Aktionspotentials); dem Anstieg von P_{Na} folgt mit einer gewissen Verzögerung eine Zunahme von P_K , die zu einem K^+ -Strom in umgekehrter Richtung führt (abfallende Phase des Aktionspotentials). Die physikalisch-chemischen Veränderungen in der Membran, die den experimentell nachgewiesenen Permeabilitätsänderungen zugrunde

liegen, sind unbekannt; am meisten diskutiert wird die Hypothese, dass geladene Teilchen, die als «Trägermoleküle» für die Na^+ - und K^+ -Ionen fungieren (« Na^+ -Träger», « K^+ -Träger»), unter dem Einfluss des elektrischen Feldes verschiedene Positionen in der Membran annehmen können.

Die Tatsache, dass das Aktionspotential des perfundierten Axons vollständig dem Aktionspotential eines intakten isolierten Axons gleicht (Figur 2), bestätigt in eindrucksvoller Weise die Grundannahme der Membrantheorie. Axone, die nach Ausquetschung von ca. 95% des Axoplasmas mit isotonischer K_2SO_4 -Lösung gefüllt wurden, konnten 2 h lang mit einer Reizfrequenz von 50/sec gereizt werden und dabei eine Gesamtzahl von 300000 Aktionspotentialen liefern; das entspricht der maximalen Impulszahl, die man von nicht ausgequetschten isolierten Axonen erhält. Selbst nach Perfusion mit Flüssigkeitsvolumina, die mehr als das 100fache des Faservolumens betragen, ist die Faser erregbar. Diese Befunde zeigen eindeutig, dass dem überwiegenden Teil des Axoplasmas keine unmittelbare Bedeutung für den Erregungsvorgang zukommt.

Nach Gleichung (1) soll das Ruhepotential in einem weiten Bereich proportional $\ln [K^+]_a/[K^+]_i$ sein, während die Höhe des Aktionspotentials im wesentlichen durch $\ln [Na^+]_a/[Na^+]_i$ bestimmt wird. Die Richtigkeit dieser Vorstellung konnte bisher nur dadurch geprüft werden, dass am intakten Axon die K - oder Na -Konzentration der Aussenlösung variiert und die dadurch hervorgerufenen Änderungen des Ruhe- und Aktionspotentials gemessen wurden^{5,20}. Am perfundierten Axon besteht die zusätzliche Möglichkeit, die bei Änderung der K - und Na -Konzentration der Innenlösung auftretende Änderung des Ruhe- und Aktionspotentials zu verfolgen. Im Versuch der Figur 5 wurde die als Standard-Perfusionslösung verwendete isotonische K_2SO_4 -Lösung teilweise durch isotonische Na_2SO_4 -Lösung ersetzt und auf diese Weise $[K^+]_i$ erniedrigt und $[Na^+]_i$ erhöht. Dies führt in Übereinstimmung mit Gleichung (1) zu einer deutlichen Verkleinerung des Aktionspo-

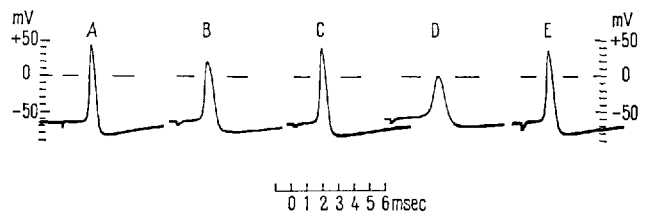


Fig. 5. Veränderung des Aktionspotentials bei teilweisem Ersatz des intraaxonalen K_2SO_4 durch Na_2SO_4 . Innenlösung: isot. K_2SO_4 bei A, C, E; $3/4$ isot. K_2SO_4 + $1/4$ isot. Na_2SO_4 bei B; $1/2$ isot. K_2SO_4 + $1/2$ isot. Na_2SO_4 bei D. Aussenlösung: Seewasser (aus BAKER, HODGKIN und SHAW²²).

¹⁹ J. BERNSTEIN, Pflügers Arch. ges. Physiol. 92, 521 (1902).

²⁰ A. L. HODGKIN und B. KATZ, J. Physiol. 108, 37 (1949).

tentials und zu einer leichten Abnahme des Ruhepotentials (Depolarisation). In Figur 6 ist ein solcher Versuch quantitativ ausgewertet, indem das in der Ruhe (\circ) und auf dem Gipfel des Aktionspotentials (\bullet) gemessene Potential in Abhängigkeit von $[K^+]_i$ und $[Na^+]_i$ aufgetragen wurde. Die auf dem Gipfel des Aktionspotentials gemessenen Werte können mit guter Annäherung durch eine aus Gleichung (1) mit $P_{Na}/P_K = 7$ berechnete Kurve wiedergegeben werden. Die Werte für das Ruhepotential liegen zwischen den Kurven für $P_{Na}/P_K = 0,08$ und $0,03$; dabei gibt für hohe Membranpotentiale die Kurve mit dem relativ kleineren P_K die bessere Annäherung (vgl. STÄMPFLI²¹), während für niedrigere Membranpotentiale (und für die dem Spitzenpotential folgende Nachhyperpolarisation) die Kurve mit dem grösseren P_K gilt. In Übereinstimmung mit Gleichung (1) wird das Ruhepotential 0, wenn $[K^+]_i = [K^+]_a$ ist. Wenn man die K-Konzentration der Aussenlösung über ihren normalen Wert erhöht, kann man zeigen, dass das Ruhepotential für $[K^+]_a > [K^+]_i$ positiv wird, wie es nach Gleichung (1) zu erwarten ist.

Eine wichtige Rolle in der Theorie der Nervenenerregung spielt die «Inaktivierung der Na^+ -Träger». Darunter wird die Erscheinung verstanden, dass die durch den Reiz ausgelöste P_{Na} -Zunahme und damit das Aktionspotential bei länger dauernder Herabsetzung des Ruhepotentials abnehmen; die Inaktivierungskurve, die den maximalen Na -Einwärtsstrom $I_{Na \max}$ als Funktion des Membranpotentials darstellt, zeigt, dass $I_{Na \max}$ schon bei einer Depolarisation um 10 mV auf die Hälfte verkleinert ist. Die Inaktivierung, die für die schnelle Rückkehr des Membranpotentials auf den Ruhewert in der abfallenden Phase des Aktionspotentials verantwortlich ist, tritt auch am perfundierten Axon auf. Im Versuch der Figur 6 ist die Faser unerregbar, wenn die isotonsche K_2SO_4 -Lösung im Innern des Axons so weitgehend durch Na_2SO_4 -Lösung ersetzt wird, dass das Ruhepotential auf -30 mV oder darunter absinkt; auch bei teilweisem Ersatz von K_2SO_4 durch Cs_2SO_4 verschwindet das Aktionspotential, sobald das Ruhepotential von seinem normalen Wert von etwa -60 mV auf -40 mV herabgesetzt ist. NARAHASHI¹⁵ hat die vollständige Inaktivierungskurve am perfundierten Axon gemessen, die mit der Inaktivierungskurve des intakten Axons sehr weitgehend übereinstimmt. Das perfundierte Riesenaxon verhält sich also auch in bezug auf die Inaktivierung wie ein intaktes Axon.

Neuere experimentelle Befunde am perfundierten Axon. Man sollte erwarten, dass eine so neuartige Methode wie die intraaxonale Perfusion nicht nur neues Beweismaterial für die Richtigkeit der bestehenden theoretischen Vorstellungen erbringt, sondern auch prinzipiell neue Erkenntnisse vermittelt. Diese Erwartung wird durch die interessanten Befunde bei Perfusion mit elektrolytarmen Perfusionslösungen erfüllt.

Die ersten derartigen Versuche wurden von TASAKI et al.¹⁷ und von BAKER, HODGKIN und SHAW²² angestellt; später wurden eingehende Untersuchungen von NARAHASHI¹⁵ und von BAKER, HODGKIN und MEVES¹⁴ durchgeführt. Bei diesen Versuchen wird die als Standard-Perfusionslösung dienende isotonsche Kaliumsalzlösung partiell durch isotonsche Saccharose- oder Glucoselösung ersetzt; dadurch wird im Gegensatz zu den früheren Versuchen nicht nur die K^+ -Aktivität, sondern die gesamte Salzkonzentration der Innenlösung (d. h. die intraaxonale Ionenstärke) verringert. Die wesentlichen Befunde können mit Hilfe von Figur 7 erläutert werden. Bei Perfusion mit einer Lösung,

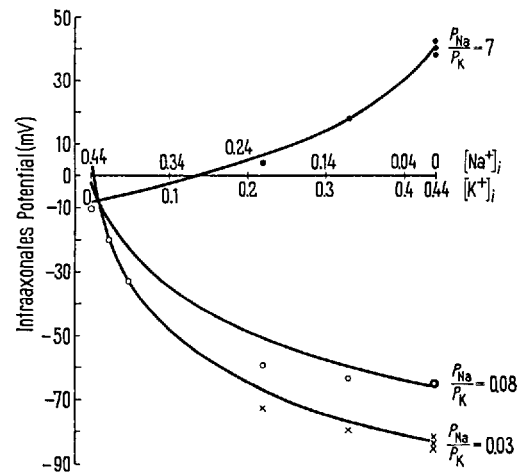


Fig. 6. Veränderung des Ruhe- und Aktionspotentials bei teilweisem Ersatz des intraaxonalen K_2SO_4 durch Na_2SO_4 . Ordinate: intraaxonales Potential in der Ruhe (\circ), auf dem Gipfel des Aktionspotentials (\bullet) bzw. während der Nachhyperpolarisation (\times). Abszisse: K^+ -Aktivität $[K^+]_i$ und Na^+ -Aktivität $[Na^+]_i$ der Innenlösung in Mol/l. Die Aussenlösung ist Seewasser mit $[K^+]_a = 0,007$ und $[Na^+]_a = 0,32$ Mol/l. Die Kurven wurden nach Gleichung (1) berechnet, wobei für P_{Na}/P_K die angegebenen Werte eingesetzt wurden (nach BAKER, HODGKIN und SHAW²²).

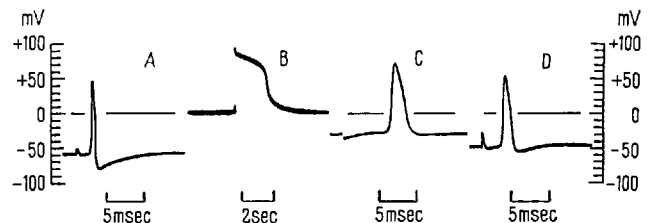


Fig. 7. Veränderung des Aktionspotentials bei teilweisem Ersatz des intraaxonalen KCl durch isotonsche Saccharoselösung. Innenlösung: Saccharose + 305 mM KCl bei A; Saccharose + 6 mM NaCl bei B; Saccharose + 24 mM KCl bei C; Saccharose + 100 mM KCl bei D. Aussenlösung: K-freies Seewasser. Beachte Änderung des Zeitmaßstabs bei B (aus BAKER, HODGKIN und MEVES¹⁴).

²¹ R. STÄMPFLI, Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 265 (1959).

²² P. F. BAKER, A. L. HODGKIN und T. I. SHAW, J. Physiol. 164, 355 (1962).

die zu gleichen Teilen aus isotonischer (0,61 M) KCl-Lösung und isotonischer Saccharoselösung besteht, erhält man ein normales Ruhe- und Aktionspotential (Registrierung A). Perfusion mit einer K-freien Saccharoselösung, die anstelle von KCl nur eine kleine Menge NaCl (oder Cholinchlorid) enthält, führt erwartungsgemäss zu einer starken Depolarisation (Registrierung B). Obwohl das Ruhepotential bis auf 0 herabgesetzt ist und die Faser dementsprechend vollständig inaktiviert sein sollte, liefert sie überraschenderweise ein Aktionspotential von annähernd normaler Amplitude; seine Dauer ist auf etwa das 1000fache der normalen Dauer eines Aktionspotentials verlängert, und seine Form gleicht derjenigen eines Herzmuskelfaser-Aktionspotentials. Wenn der Perfusionslösung wieder KCl zugesetzt wird, nimmt das Ruhepotential wieder zu, und das Aktionspotential wird wieder kürzer (Registrierung C und D).

Wie können diese Befunde interpretiert werden? Die Analyse beginnt zweckmässigerweise wieder damit, dass die beobachteten Potentialänderungen mit den theoretischen Voraussagen aus Gleichung (1) verglichen werden. Die quantitative Auswertung zeigt, dass die bei Verdünnung der intraaxonalen KCl-Lösung mit Saccharoselösung beobachteten Ruhepotentialänderungen durch Gleichung (1) mit guter Annäherung wiedergegeben werden, wobei wiederum für niedrige Membranpotentiale eine relativ grössere K-Permeabilität als für höhere Membranpotentiale einzusetzen ist ($P_{Na}/P_K = 0,035$ bzw. 0,1). Auch die Verschiebung des auf dem Gipfel des Aktionspotentials erreichten Membranpotentials zu immer positiveren Werten, die bei Herabsetzung von $[K^+]_i$ eintritt (Figur 7), ist nach Gleichung (1) zu erwarten; denn Gleichung (1) geht für $[Na^+]_i = 0$ und $[Na^+]_a \gg [K^+]_a$ in die Form

$$V = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na} [Na^+]_a}{P_K [K^+]_i}$$

über.

Eine relativ einfache Erklärung bietet sich auch für die extreme Verlängerung des Aktionspotentials bei KCl-freier Innenlösung an. Sie ist die Folge des vollständigen Fehlens von K^+ -Ionen in der Innenlösung: Bereits bei Zusatz von 2 mM KCl zu der Saccharoselösung tritt statt des einfachen plateauartigen Aktionspotentials, wie es Figur 7 B zeigt, ein purkinjefaserähnliches Aktionspotential auf, das durch einen initialen schnellen Potentialabfall gekennzeichnet ist; bei 6 mM KCl beträgt die Dauer des Aktionspotentials nur noch 5–30 msec. Die starke Verlängerung des Aktionspotentials beim Fehlen von K^+ -Ionen deutet darauf hin, dass die Inaktivierung der Na^+ -Träger unter diesen Bedingungen stark verzögert ist. Dies legt die Annahme nahe, dass die Inaktivierung normalerweise durch Verbindung des Na^+ -Trägers mit K^+ -Ionen an der Innenseite der Membran zustande kommt;

der Na^+ -Träger würde sich auf diese Weise in einen K^+ -Träger verwandeln, d. h. Inaktivierung des Na^+ -Systems und Aktivierung des K^+ -Systems würden auf demselben Vorgang beruhen. Diese Schlussfolgerung ist sicher zur Zeit erst eine Hypothese, die durch weitere Versuche bestätigt werden muss; sie zeigt aber, dass die Möglichkeit besteht, durch Untersuchungen am perfundierten Axon einen etwas tieferen Einblick in den molekularen Mechanismus des Erregungsvorgangs zu erhalten.

Der interessanteste Befund, der sich bei den Untersuchungen mit elektrolytarmen Perfusionslösungen ergab, ist das Auftreten von Aktionspotentialen annähernd normaler Amplitude bei sehr niedrigem oder völlig fehlendem Ruhepotential. Um diesen Befund in seiner vollen Bedeutung zu erkennen, muss man sich daran erinnern, dass bei Ersatz des intraaxonalen K_2SO_4 durch eine Elektrolytlösung bereits eine Erniedrigung des Ruhepotentials auf –40 bis –30 mV zu vollständiger Inaktivierung führt. Offenbar wird bei Herabsetzung der Ionenstärke der Innenlösung das kritische Potential für die Aktivierung und Inaktivierung der Na^+ -Träger zu positiveren Werten verschoben. BAKER, HODGKIN und MEVES¹⁴ bestimmten das kritische Potential für die Auslösung eines Aktionspotentials durch Reizung mit Rechteckreizen verschiedener Stärke und fanden bei verschieden starker Verdünnung der intraaxonalen KCl-Lösung mit isotonischer Saccharoselösung folgende Werte:

Lösung	Ruhepotential	kritisches Potential
305 mM KCl + Saccharose	– 63 mV	– 47 mV
100 mM KCl + Saccharose	– 46 mV	– 19 mV
24 mM KCl + Saccharose	– 35 mV	– 8 mV
6 mM KCl + Saccharose	– 18 mV	+ 20 mV

Die Messwerte zeigen deutlich die Verschiebung des kritischen Potentials bis zu positiven Werten; ergänzend sei bemerkt, dass die Werte für 100 mM KCl am Ende des Versuches gemessen wurden und infolge Verschlechterung des Faserzustandes um etwa 10 mV zu positiv sind. Ähnliche Befunde wurden von NARAHASHI¹⁵ und von MOORE, NARAHASHI und ULBRICHT²³ erhalten, die ausserdem die Verschiebung der Inaktivierungskurve experimentell nachwiesen.

Eine Erklärung für die Verschiebung der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve bei herabgesetzter Ionenstärke der Innenlösung wäre möglich durch die Annahme fixer negativer Ladungen an der Innenseite der erregbaren Membran, die das elektrische Feld in der Membran und damit den Zustand der Na^+ -Träger beeinflussen müssten. Es würde sich dabei um negative

²³ J. W. MOORE, T. NARAHASHI und W. ULBRICHT, Fed. Proc. 22, 174 (1963).

Gruppen (z. B. Carboxylgruppen) handeln, die entweder zu den Membranmolekülen selbst oder zu dem am Axolemm zurückgebliebenen Axoplasmaeiweiss gehören. Die ausführliche Beschreibung der in Betracht gezogenen Hypothesen würde den Rahmen dieser Darstellung überschreiten; es ist jedoch ohne weiteres verständlich, dass die durch derartige Arbeitshypothesen angeregten weiteren Versuche möglicherweise genauere Auskunft über die physikalisch-chemische Beschaffenheit der die Membran aufbauenden Moleküle geben könnten.

Überblicken wir die bis jetzt vorliegenden Untersuchungen am perfundierten Riesenaxon, so stellen wir fest, dass sie die Richtigkeit der bisherigen theoretischen Vorstellungen über die Bedeutung der Membran,

das Zustandekommen des Ruhepotentials und die Entstehung des Aktionspotentials vollauf bestätigen. Sie führten darüber hinaus in der jüngsten Zeit zu neuartigen Befunden und Hypothesen, die einen hoffnungsvollen Ansatzpunkt zur Aufklärung der dem Erregungsvorgang zugrunde liegenden Veränderungen der Membranmoleküle bilden, die uns heute noch unbekannt sind.

Summary. The recently developed 'perfused nerve fibre technique', which consists of perfusing the interior of a squid giant fibre with artificial solutions, is described. The experimental results obtained with various perfusion fluids are discussed in relation to the theory of nerve excitation.

Die Synthese des Novobiocins*

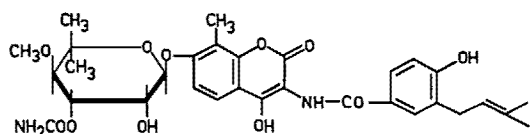
Von B. P. VATERLAUS**, K. DOEBEL, J. KISS, A. I. RACHLIN und H. SPIEGELBERG

Zu einem Zeitpunkt, in dem die Staphylokokkenresistenz gegen Penicillin zu einem bedeutenden Problem wurde, musste die Entdeckung eines neuen Antibioticums, das in besonderem Masse gegenüber diesen Bakterienarten wirksam ist, grösserem Interesse begegnen.

WALLICK et al.¹ berichteten über die Isolierung und Kultivierung eines neuen Actinomycetenstammes, den sie als *Streptomyces sphaeroides* n.sp. charakterisierten. Die Spezies lieferte ein unbekanntes, kristallines Antibioticum, das als Cathomycin bekannt wurde. In seinem mikrobiologischen Verhalten² entsprach das Cathomycin einem gleichzeitig durch LIN und CORIELL³ aufgefundenen Antibioticum, das sie nach der Spezies *Streptomyces niveus* Streptonivicin nannten. Die Identität der beiden neu aufgefundenen Verbindungen war wahrscheinlich und wurde später durch einen Austausch bestätigt⁴. Kurz darauf stellte es sich heraus, dass ein weiteres Antibioticum, Cardelmicin, mit der Bezeichnung PA-93, mit Cathomycin und Streptonivicin identisch war⁵.

Das aus verschiedenen Quellen stammende Antibioticum erhielt, einem späteren Übereinkommen entsprechend, den neuen Namen Novobiocin⁶.

Die Voraussetzungen für die Synthese des Novobiocins waren 1958 gegeben. Zwei Arbeitsgruppen hatten sich erfolgreich mit der Strukturaufklärung befasst. Die Arbeiten von FOLKERS et al.⁷ sowie HINMAN, CARON und HOEKSEMA⁸ führten in unabhängiger Art zu folgender Strukturformel für Novobiocin:



Die im Novobiocin enthaltene Zuckerkomponente, die 3-O-Carbamoyl-noviose, ist zum ersten Mal in der Natur beobachtet worden. Sie ist eine 3-O-Carbamoyl-5,5-di-C-methyl-4-O-methyl-L-lyxopyranose^{7,8}. Die Bestimmung der Konfiguration^{7,9-11} stützte sich zum Teil auf Regeln der optischen Rotation. Es war daher wünschenswert, die Stereochemie chemisch zu beweisen. Dazu eignete sich ein Derivat der Noviose, die

* Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel.

** Vortrag Dr. B. P. VATERLAUS, gehalten an der Gordon Research Conference on Steroids and other Natural Products, 16.-20. Juli 1962, New Hampton, N.H., USA, und vor der Basler Chemischen Gesellschaft, 8. November 1962. Im Auszug: H. SPIEGELBERG, *Synthèse du 3-O-carbamoylnoviose, sucre de la novobiocine*, Symposium international de chimie organique, Bruxelles, 15. Juni 1962; J. KISS, *The Synthesis of Noviose and Allied Compounds*, Birkbeck College (Univ. London), 23. Oktober 1962. Der vorliegende Aufsatz ist Gegenstand von Detailpublikationen in den *Helv. chim. Acta*, in Vorbereitung (1963).

¹ H. WALLICK, D. A. HARRIS, M. A. REAGAN, M. RUGER und H. B. WOODRUFF, *Antibiotics Annual 1955-56*, 909.

² M. FINLAND, *Antibiotics Annual 1955-56*, 929.

³ F. K. LIN und L. L. CORIELL, *Antibiotics Annual 1955-56*, 634.

⁴ H. WELCH und W. W. WRIGHT, *Antibiotics and Chemotherapy* 5, 670 (1955).

⁵ G. ROLLAND et al., *Farmaco [Pavia] Ediz. sci.* 1, 549 (1956), berichteten am IX. Kongress der Mikrobiologie in Palermo (April 1956) ebenfalls über eine neue *Streptomyces*-gattung. Das Antibioticum, S-800, das dieser Mikroorganismus produzierte, erwies sich in der Folge als identisch mit Novobiocin.

⁶ *Antibiotic Med.* 2, 172 (1956).

⁷ C. H. SHUNK, C. H. STAMMER, E. A. KACZKA, E. WALTON, C. F. SPENCER, A. N. WILSON, J. W. RICHTER, F. W. HOLLY und K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 1770 (1956).

⁸ J. W. HINMAN, E. L. CARON und H. HOEKSEMA, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 3789 (1957).

⁹ E. WALTON, J. O. RODIN, F. W. HOLLY, J. W. RICHTER, C. H. SHUNK und K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 1489 (1960).

¹⁰ E. WALTON, J. O. RODIN, C. H. STAMMER, F. W. HOLLY und K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 5454 (1956).

¹¹ H. HOEKSEMA, E. L. CARON und J. W. HINMAN, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 2019 (1956).