

93. Fluoreszenzmethoden zur histochemischen Sichtbarmachung von Monoaminen

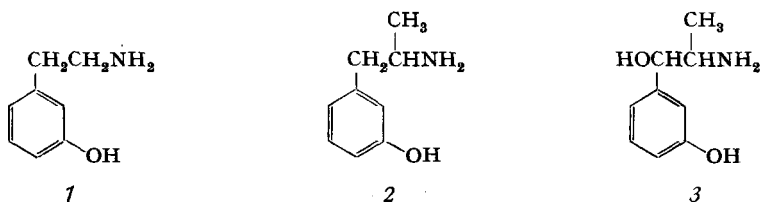
6¹⁾. Identifizierung der fluoreszierenden Produkte aus *m*-Hydroxyphenyläthylaminen und Formaldehyd

von H. Corrodi²⁾ und G. Jonsson

(25. XI. 65)

1. Einleitung. – Catecholamine wie Dopamin und Noradrenalin sowie gewisse Tryptaminderivate, z. B. 5-Hydroxytryptamin, werden bei der Behandlung mit Formaldehydgas in intensiv fluoreszierende Produkte umgewandelt, unter der Voraussetzung, dass die Reaktion in einer trockenen Proteinschicht erfolgt. Auf Grund dieser Reaktion haben HILLARP und FALCK eine spezifische und hochempfindliche histochemische Methode zur Sichtbarmachung dieser Monoamine auf cellulärem und subcellulärem Niveau ausgearbeitet (Referenzen siehe [2]).

CORRODI & HILLARP [3] [4] konnten zeigen, dass Dopamin in einer trockenen Proteinschicht unter milden Bedingungen bei Behandlung mit Formaldehydgas schnell in das stark fluoreszierende 6,7-Dihydroxy-3,4-dihydro-isochinolin übergeht. Noradrenalin bildet entsprechend das ebenfalls fluoreszierende 4,6,7-Trihydroxy-3,4-dihydro-isochinolin, das aber beim Erhitzen oder bei Behandlung mit Chlorwasserstoff leicht unter Wasserabspaltung in das voll aromatische 6,7-Dihydroxy-isochinolin übergeht [4] [5]. Dieser Unterschied kann zur histochemischen Differenzierung von Dopamin und Noradrenalin verwendet werden [5]. Zwischenprodukte bei der Umwandlung beider Substanzen sind die im Sinne einer PICTET-SPENGLER-Reaktion gebildeten 6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinoline [3] [4].



m-Hydroxyphenylamine wie *m*-Tyramin (1), *m*-Hydroxyamphetamin (2) und *m*-Hydroxynorephedrin (Metaraminol, 3) haben die für den PICTET-SPENGLER-Ringschluss nötige erhöhte Elektronendichte am Kohlenstoffatom 6 des Phenylrestes. Es war daher zu erwarten, dass auch diese Amine sowohl in trockenen Modellproteinschichten wie auch in histologischen Schnitten nach Behandlung mit Formaldehyd-

¹⁾ 5. Mitteilung: [1].

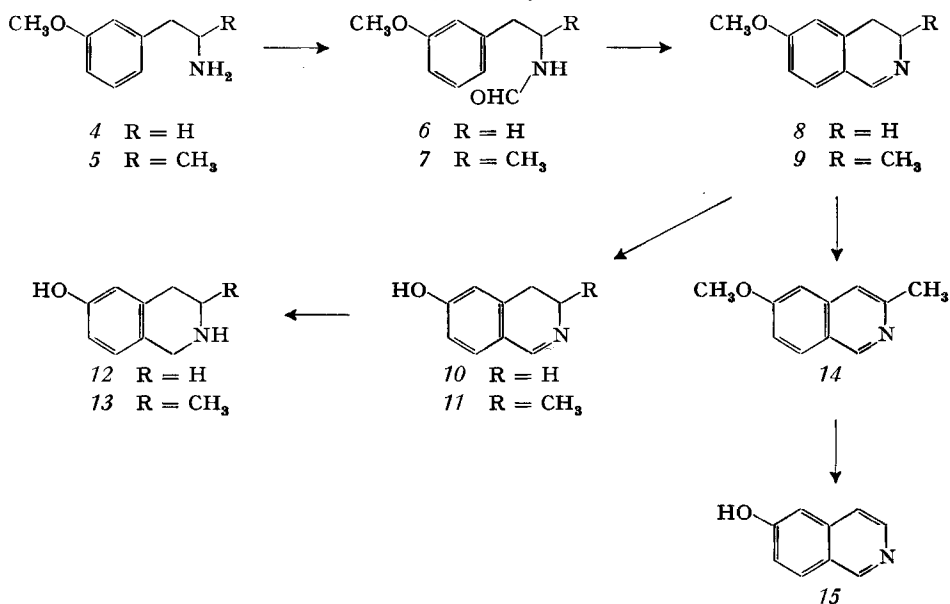
²⁾ Auszugsweise vorgetragen am 7. 7. 1965 in Mailand während des 2. Internationalen Catecholamin-Symposiums.

gas leicht ähnliche Fluoreszenz zeigen würden. Wirklich zeigten auch *m*-Tyramin und Metaraminol sowohl in Proteinschichten als auch nach vitaler Administration in gewissen Zellen (Myocardzellen, Gliazellen [6], Pericyten des Endothels der Gehirnkapillaren [7]) im Fluoreszenzmikroskop mit Standardausrüstung (Sperrfilter für Licht unter 490 nm) die erwartete Fluoreszenz mit maximaler Emission bei 510 nm nach der Formaldehydbehandlung. In den peripheren und zentralen noradrenergen Neuronen konnte dagegen nie eine solche Fluoreszenz beobachtet werden, wenn Tieren, die mit Reserpin vorbehandelt wurden (was das endogene Noradrenalin und damit die Fluoreszenz zum Verschwinden bringt), Metaraminol oder α -Methyl-*m*-tyrosin (das im Säugetier sowohl im Gehirn wie auch in peripheren Organen enzymatisch in Metaraminol umgewandelt wird) gegeben wurde [6]. Das war ausserordentlich überraschend, denn pharmakologische Untersuchungen hatten es sehr wahrscheinlich gemacht, dass in solchen Fällen Metaraminol von den noradrenergen Neuronen aktiv aufgenommen und gespeichert wird (für Einzelheiten und Referenzen siehe [6]). Nach SACHS [6] kommen zur Erklärung dieses Phänomens folgende drei Möglichkeiten in Betracht: 1. Die intraneuronalen Proteine hemmen die Dehydrierung der als Zwischenprodukte sich bildenden Tetrahydro-isochinoline zu den fluoreszierenden Dihydro-isochinolininen; 2. die intraneuronale Umgebung erschwert die Bildung der chinoiden Form der 6-Hydroxy-3,4-dihydro-isochinoline, die sehr wahrscheinlich für die Fluoreszenz verantwortlich ist [4]; 3. gewisse intraneuronale Bestandteile löschen die Fluoreszenz oder verunmöglichen die histochemische Reaktion der Amine mit Formaldehyd.

Die hier beschriebenen Versuche wurden unternommen, um diese Frage abzuklären.

Schema 1

Synthesewege



2. Synthese der Vergleichssubstanzen. – Die benötigten Dihydro- und Tetrahydro-isochinoline wurden auf den im Schema 1 beschriebenen Wegen hergestellt, die keines Kommentars bedürfen.

3. Isolierung und Charakterisierung der fluoreszierenden Produkte in Modellversuchen. – a) *Produkte aus m-Tyramin (1) und aus 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (12)*: Wenn *m*-Tyramin (1) in einer dünnen trockenen Schicht aus Serumalbumin oder Saccharose (enthaltend 0,1% Glycin) mit Formaldehydgas behandelt wird, bildet sich ein stark fluoreszierendes Produkt (siehe exp. Teil). Die Untersuchung der UV-, Aktivierungs- und Emissionsspektren dieser Schichten zeigte, dass *m*-Tyramin (1) in guter Ausbeute in ein Produkt, dessen Spektren mit denen von 6-Hydroxy-3,4-dihydro-isochinolin (10) identisch waren, übergegangen war (Fig. 1,

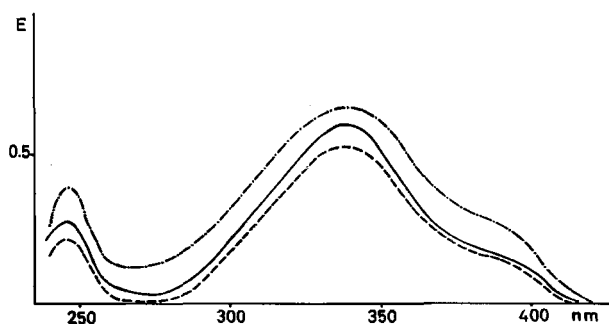


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren von 10 (—), 12 (---) und 1 (-·-·-) nach Lösen zu 1 mg/ml in 2-proz. wässriger Serumalbuminlösung, Eintrocknen und 30 Min. Behandlung mit Formaldehydgas bei 50°

Absorptionsmaxima bei 245 und 335 nm, Buckel zwischen 375 und 400 nm). Das Aktivierungsspektrum zeigte ein Hauptmaximum bei 385 nm und ein schwächeres bei 250 nm, während das Emissionsmaximum bei 510 nm lag. Wenn die Schichten in einem geschlossenen Exsikkator einige Minuten trockenem Chlorwasserstoff ausgesetzt wurden, wurde ein Aktivierungsmaximum bei 360 nm erhalten, während sich das Emissionsmaximum auf 420 nm verschob. Das langwellige Emissionsmaximum bei 510 nm konnte durch Exponierung der Schichten in trockenem Ammoniak wieder erhalten werden. In Schichten bestehend aus Saccharose mit 0,1% Glycin verlaufen diese Umwandlungen mit Chlorwasserstoff, bzw. Ammoniak sehr viel schneller als in Serumalbuminschichten, was durch die viel grössere Pufferkapazität des Proteins gegenüber derjenigen von Saccharose-Glycin erklärt werden kann. Dünnschichtchromatographische Untersuchung eines Isopropanol-Extraktes der Schichten zeigte oft zwei Flecke abhängig von Temperatur und Dauer der Formaldehydbehandlung. Der Hauptfleck fluoreszierte im UV. und zeigte in allen Lösungsmittelsystemen den gleichen Rf-Wert wie authentisches 10. Der Rf-Wert des kleinen nicht fluoreszierenden Flecks stimmt mit dem von 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (12) überein. Die Ausbeute an Dihydro-isochinolin ist quantitativ, wenn die Formaldehydbehandlung 30 Min. bei 50° durchgeführt wird. Das UV- und die Fluoreszenzspektren der Lösung wurden bei verschiedenen pH näher untersucht. Auch hier zeigte das

fluoreszierende Produkt aus *m*-Tyramin das gleiche spektrale Verhalten wie 10 (Fig. 2). Sehr charakteristisch ist die Veränderung des UV.-Spektrums zwischen pH 6 und pH 7,5, das sehr wahrscheinlich durch die Umwandlung der Hydroxyform 10 in die chinoide Form 10a bedingt ist (siehe Schema 2). In 0,1N Natronlauge dagegen liegt das Produkt als Phenolat wieder in der Form 10 vor; folgerichtig zeigt auch das UV.-Spektrum wieder das ursprüngliche Aussehen (Fig. 2). Das Aktivierungsspektrum des

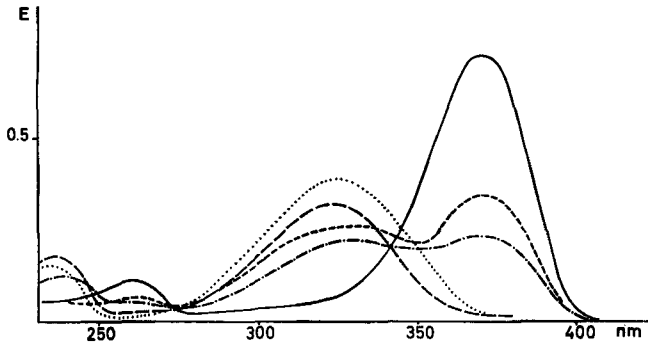


Fig. 2. UV.-Absorptionsspektrum von 10 (6,25 $\mu\text{g/ml}$) in Lösung bei verschiedenen pH-Werten
0,1N HCl (· · · · ·); pH 6,0 (- · - · -); pH 7,5 (—); pH 10,5 (- - -); 0,1N NaOH (- - - -)

Extraktes und von authentischem 10 in Lösung verschiebt sich von 335 nm (pH 1) über 375 nm (pH 8) nach noch längeren Wellen mit einem Maximum der Fluoreszenzintensität bei ca. pH 8 (Fig. 3); in 0,1N Natronlauge ist die Fluoreszenz nur noch sehr schwach. Bei allen pH liegt in Lösung das Emissionsmaximum bei 410 nm.

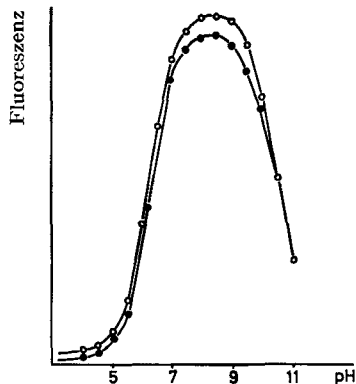


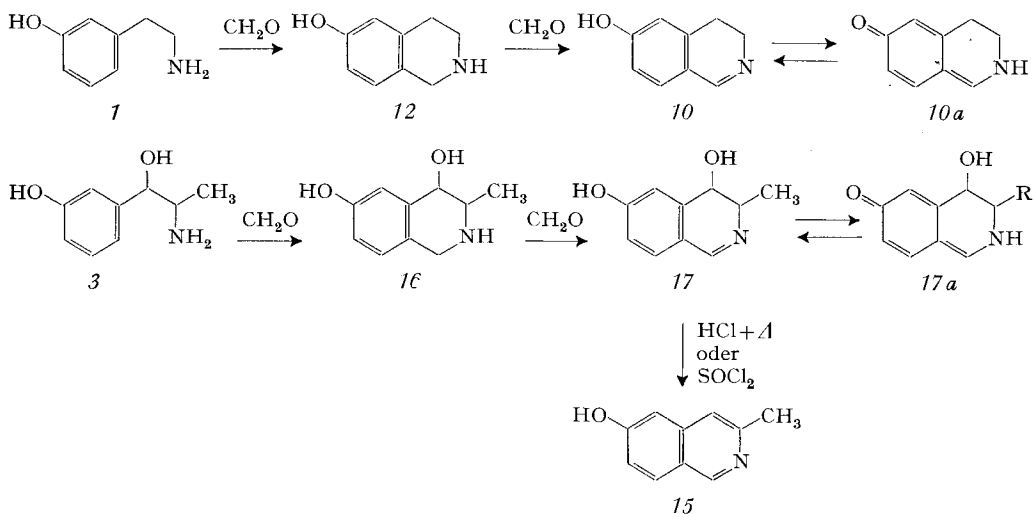
Fig. 3. Intensität der Fluoreszenz von 10 (o-o-o) und 11 (●-●-●) in Lösung in Abhängigkeit vom pH
Aktivierung 370 nm; Fluoreszenz 410 nm

Mit 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin (12) wurden genau die gleichen Resultate wie mit *m*-Tyramin (7) erhalten.

b) *Produkt aus m-Hydroxyamphetamin (2) und aus 3-Methyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin (13)*. Wenn 2 oder 13 in einer trockenen Serumalbuminschicht Formaldehydgas ausgesetzt werden, bildet sich ein fluoreszierendes Produkt, das sich spektroskopisch und im Dünnschichtchromatogramm wie authentisches 11 verhält, sowohl in der Schicht (UV.-Maxima bei 243 und 340 nm; Aktivierungsmaximum 380 nm; Emissionsmaximum 510 nm, verschoben durch Chlorwasserstoffbehandlung nach 350/410 nm) wie auch in Lösung [in 0,1N Salzsäure UV.-Maxima bei 238 und 323 nm, Fluoreszenz 360/460 nm mit sehr schwacher Emissionsintensität; bei pH 7,5 UV.-Maxima bei 260 und 367 nm, Fluoreszenz 375/410 nm mit hoher Emissionsintensität (Fig. 3)].

c) *Produkt aus Metaraminol (3)*. Mit dem gleichen Resultat wurde 3 sowohl als racemisches Hydrochlorid wie auch als (-)-Metaraminol-D-hydrogentartrat mit der oben beschriebenen Technik untersucht. Das fluoreszierende Produkt 17 aus Metaraminol zeigte in Schicht und in Lösung die gleichen UV.- und Fluoreszenzcharakteristika wie 10 (unter 2b beschrieben). Auch hier ist der Übergang in die chinoide Form 17a (Schema 2) mit hoher Fluoreszenzintensität (385/510 nm), welche bei Chlorwasserstoffbehandlung in eine kürzerwellige Fluoreszenz (360/420 nm) übergeht, bei der histochemischen Reaktion wesentlich. Eine unabhängige Synthese von 3-Methyl-4,6-dihydroxy-3,4-dihydro-isochinolin (17) gelang nicht, so dass ein direkter chromatographischer Vergleich nicht möglich war. Dass aber dem fluoreszierenden Produkt aus Metaraminol die Struktur 17 zukommt, geht daraus hervor, dass die Hydroxylgruppe in 4-Stellung in 17 beim Erhitzen in saurer Lösung oder in einer Proteinschicht beim Behandeln mit Thionylchloridgas abgespalten wird [4] [5], wobei sich das vollaromatische 3-Methyl-6-hydroxy-isochinolin (15) bildet, das in seinem spektralen Verhalten mit authentischem 15 identisch ist. Über die histochemische Anwendung dieser Reaktion wird später berichtet werden [8].

Schema 2

Histochemische Umwandlung von *m*-Tyramin und Metaraminol

Die fluoreszierenden Dihydro-isochinoline *10*, *11* und *17* werden durch Natriumborhydrid in Isopropanol [9] momentan zu den entsprechenden nicht fluoreszierenden Tetrahydro-isochinolininen *12*, *13* bzw. *16* reduziert. Diese Reaktion wurde schon früher als spezifisch für die Fluoreszenz herrührend von Dopamin, Noradrenalin und 5-Hydroxytryptamin beschrieben [9].

4. Diskussion. – Durch die beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass *m*-Tyramin und Metaraminol mit Formaldehyd auf der im Schema 2 dargestellten Weise reagieren.

Die pH-abhängigen Verschiebungen des UV.-Absorptions- und des Fluoreszenzspektrums der 6-Hydroxy-3,4-dihydro-isochinoline *10*, *11* und *17* sind nun für das Verständnis der in der Einleitung geschilderten Diskrepanzen zwischen histochemischen und pharmakologischen Befunden von grosser Wichtigkeit. In Lösung zeigen *10*, *11* und *17* bei pH 1–4 nur eine sehr schwache Fluoreszenz (siehe Fig. 3), bei Erhöhung des pH erleiden die Spektren jedoch eine charakteristische reversible Veränderung mit maximaler Fluoreszenz bei pH 8. Das Emissionsmaximum in diesen Lösungen liegt immer bei 410 nm. Wenn die Verbindungen *10*, *11* und *17* in einer trockenen Modell-Proteinschicht eingelagert sind, zeigen sie noch stärker ausgeprägte pH-abhängige reversible Veränderungen des Fluoreszenzspektrums, welche durch Exponierung der Schicht in Chlorwasserstoff- oder Ammoniakgas bewirkt werden können. Der Form mit der langwelligen Fluoreszenz ist sehr wahrscheinlich die chinoide Struktur *10a*, bzw. *17a* zuzuschreiben, während die kurzwellige, schwächere Fluoreszenz wohl von der tautomeren Struktur *10*, bzw. *17* stammt. In Lösung konnte nie die langwellige Fluoreszenz beobachtet werden; es ist jedoch bekannt (siehe [11]), dass fluoreszierende Substanzen kombiniert mit Proteinen andere Fluoreszenzeigenschaften haben können als in Lösung. Die Feststellung, dass *m*-Hydroxyphenäthylamine nach Formaldehydbehandlung in einer Proteinschicht in zwei Formen vorliegen können abhängig von dem pH oder besser gesagt der Acidität der Umgebung, löst die Frage, warum Metaraminol intraneuronal im Fluoreszenzmikroskop keine Fluoreszenz zeigt. Die übliche Ausrüstung eines solchen Mikroskopes hat nämlich ein Sperrfilter, das unterhalb 490 nm absorbiert, so dass eine Emission bei 420 nm nicht sichtbar wird. JONSSON & RITZÉN [12] haben jüngst mikrospektrophotofluorometrisch festgestellt, dass Metaraminol intraneuronal nach Formaldehydbehandlung in der bei 420 nm fluoreszierenden Form vorliegt. Dies ist zugleich auch der erste histochemische Beweis, dass Metaraminol von den noradrenergen Neuronen aufgenommen und gespeichert wird. Die Frage, warum Metaraminol intraneuronal nach Formaldehydbehandlung in der kurzwellig fluoreszierenden Form, in anderen Zellen dagegen in der langwelligen Form vorliegt, kann noch nicht beantwortet werden. Ob das intraneuronale pH auch *in vivo* bei pH 5,5–6 liegt, wie es das Fluoreszenzspektrum von *17* aus Metaraminol andeutet, oder ob es sich um ein Artefakt bei der Formaldehydbehandlung oder um den Ausdruck einer mangelnden Pufferkapazität der intraneuronalen Cytoplasmaproteine handelt, bleibt noch aufzuklären.

Ing. G. HALLHAGEN, Ing. R. SVAHN und Ing. V. TARKKANEN möchten wir für die Mithilfe bei der Synthese der Vergleichssubstanzen und dem SCHWEDISCHEN MEDIZINISCHEN FORSCHUNGSRAT, der STIFTUNG ZUM ANDENKEN AN TH. UND J. ANDERSSON sowie dem US PUBLIC HEALTH SERVICE (NB 05236-01) für finanzielle Unterstützung danken.

Experimenteller Teil

1. Synthese der Vergleichssubstanzen. – a) (\pm)-*m*-Hydroxynorephedrin (Metaraminol, 3): Durch katalytische Reduktion von 3-Hydroxy- α -oximinopropiophenon nach HARTUNG *et al.* [13] erhielten wir direkt *m*-Hydroxynorephedrin; aus Methanol-Äthylacetat Kristalle vom Smp. von 179° (Lit. 182°).

$C_9H_{14}O_2NCl$ Ber. C 53,07 H 6,92 Cl 17,41% Gef. C 53,01 H 6,83 Cl 17,56%

b) *m*-Hydroxyamphetamin (2): Nach Literaturangaben [14] synthetisiert. Smp. 137° (Lit. 138°).

c) *N*-Formyl-*m*-methoxy-phenäthylamin (6): 18,6 g *m*-Methoxyphenäthylamin (4) wurden mit 100 ml Äthylformiat 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde das Äthylformiat im Vakuum verdampft, der Rückstand in Chloroform gelöst und diese Lösung mit 2*N* Salzsäure ausgeschüttelt. Nach Trocknung über Pottasche wurde die Chloroformphase eingedunstet und das zurückbleibende hellgelbe Öl (19,8 g 6) direkt weiterverarbeitet.

d) 6-Methoxy-3,4-dihydro-isochinolin (8): 19,5 g *N*-Formylderivat 6 wurden unter Eiskühlung mit 30 ml Phosphoroxychlorid vermischt, dann wurde die Mischung $\frac{1}{2}$ Std. auf dem Wasserbad erwärmt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2*N* Salzsäure und Benzol aufgenommen. Nach üblicher Aufarbeitung der sauren Phase lieferte die ölige Base durch Destillation im Hochvakuum bei 100–110°/0,1 Torr 6,7 g 8 (Lit. [15]: Sdp. 155°/16 Torr).

$C_{10}H_{11}ON$ Ber. C 74,51 H 6,88% Gef. C 74,68 H 6,78%

e) 6-Hydroxy-3,4-dihydro-isochinolin (10): 6,5 g 8 wurden in 50 ml konz. Bromwasserstoffsäure 3 Std. unter Stickstoff gekocht. Nach Eindunsten im Vakuum wurde der feste Rückstand aus Äthanol-Äthylacetat umkristallisiert: 5,8 g 10-Hydrobromid in hellgelben Kristallen vom Smp. 172–174°.

$C_9H_{10}ONBr$ Ber. C 47,39 H 4,42 Br 35,04% Gef. C 47,58 H 4,62 Br 34,82%

f) 6-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin (12): Eine Lösung von 3,4 g 10-Hydrobromid in 40 ml Wasser wurde unter Kühlen und Rühren durch langsame Zugabe von 1,3 g Natriumborhydrid reduziert. Dann wurde das pH der Lösung mit Weinsäure auf 8 gebracht, wobei die freie Tetrahydrobase kristallin ausfiel und abfiltriert wurde. Aus Äthanol 3,1 g Kristalle vom Smp. 192–193°.

$C_9H_{11}ON$ Ber. C 72,45 H 7,43% Gef. C 72,40 H 7,45%

12-Hydrochlorid: Eine Lösung von 12 in 1*N* Salzsäure wurde im Vakuum zur Trockne abgedampft. Das zurückbleibende Hydrochlorid wurde aus Äthanol umgelöst, Smp. 222–224° (Lit. [16]: Smp. 233°).

$C_9H_{12}ONCl$ Ber. C 58,22 H 6,52 Cl 19,10% Gef. C 58,01 H 6,75 Cl 19,41%

g) *N*-Formyl-*m*-methoxy-amphetamin (7): Aus *m*-Methoxyamphetamin (5) mit Äthylformiat entsprechend der Darstellung von 6; Öl.

h) 3-Methyl-6-methoxy-3,4-dihydro-isochinolin (9): Aus *N*-Formyl-*m*-methoxy-amphetamin (7) analog wie 8, Sdp. 100–110°/0,7 Torr.

$C_{11}H_{15}ON$ Ber. C 75,40 H 7,48% Gef. C 75,75 H 7,28%

i) 3-Methyl-6-hydroxy-3,4-dihydro-isochinolin (11): Als Hydrobromid aus 9 erhalten analog wie 10-Hydrobromid. Smp. 195°.

$C_{10}H_{12}ONBr$ Ber. C 49,60 H 4,99 Br 33,01% Gef. C 49,33 H 5,11 Br 33,00%

j) 3-Methyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolin (13): Aus (11), analog wie 12. Hydrochlorid umkristallisiert aus Methanol-Äthylacetat. Smp. 300° (Zers.).

$C_{10}H_{14}ONCl$ Ber. C 60,15 H 7,07 Cl 17,76% Gef. C 59,92 H 7,00 Cl 17,75%

k) 3-Methyl-6-methoxy-isochinolin (14): Eine Lösung von 5,0 g 3-Methyl-6-methoxy-3,4-dihydro-isochinolin (9) in 20 ml Dekalin wurde nach Zugabe von 3 g Pd-Kohle (10-proz.) 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen wurde mit 50 ml 3*N* Salzsäure ausgeschüttelt und die wässrige Phase vom Dekalin durch Ausäthern befreit. Die saure Phase wurde alkalisch gemacht,

das ausgefallene Öl mit Chloroform extrahiert und nach Trocknen und Eindampfen des Lösungsmittels destilliert. Ausbeute 3,8 g, Sdp. 120°/1 Torr.

$C_{11}H_{11}ON$ Ber. C 76,27 H 6,40% Gef. C 76,01 H 6,68%

1) *3-Methyl-6-hydroxy-isochinolin (15)*: Das Hydrobromid von 15 wurde durch Kochen von 3-Methyl-6-methoxy-isochinolin (14) mit konz. Bromwasserstoffsäure erhalten. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Äthylacetat Smp. 230°.

$C_{10}H_{10}ONBr$ Ber. C 50,02 H 4,20 Br 33,28% Gef. C 49,88 H 4,41 Br 33,10%

2. Übrige Substanzen. – *m*-Tyramin-hydrochlorid wurde von F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. in Basel und (–)-Metaraminol-D-hydrogentartrat (Aramin®) von MERCK, SHARP & DOHME, Rahway, N. Y., USA bezogen. Spektrale und dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten keine nennenswerten Mengen Verunreinigungen an. Wässrige Stammlösungen aller Verbindungen wurden bei –20° aufbewahrt.

3. UV.- und Fluoreszenz-Spektren. – Untersuchung bei verschiedenen pH, siehe [4].

4. Dünnschichtchromatographie. – Ausgeführt auf 0,3 mm dicken Kieselgelschichten (Kieselgel G nach STAHL, MERCK). Lösungsmittelsysteme: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) und 96-proz. Äthanol–22-proz. Ammoniaklösung (4:1). Alle Chromatogramme liefen 30 Min. in einer gut äquilibrierten Kammer, wobei die Front 10–15 cm wanderte. Nach Trocknung an der Luft wurden die Schichten im UV.-Licht auf fluoreszierende Flecke untersucht, nachher wurde durch Besprühen mit einer 0,5-proz. Jodlösung in Chloroform entwickelt.

5. Fluoreszenzmikroskopie. – Die zu untersuchenden Substanzen (0,01–1 mg/ml) wurden in 1–2-proz. wässriger Serumalbumin- oder Saccharoselösung gelöst. Im letzteren Fall wurde 0,1% Glycin (berechnet auf die Saccharose) beifügt [4]. Je 1 μ l dieser Lösungen wurde als Fleck auf einem gut gereinigten Objektglas bei 20° eingetrocknet. Nach einer Kontrollbestimmung der Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop wurden die Flecke $\frac{1}{2}$ –3 Std. Formaldehydgas ausgesetzt (für Einzelheiten siehe [3] und [17]). Nachher wurden die Flecke vor und nach weiterer Behandlung in einem geschlossenen Gefäß mit Chlorwasserstoff bzw. Ammoniak im Fluoreszenzmikroskop untersucht [2].

6. Darstellung und Untersuchung der fluoreszierenden Produkte in Lösung und in einer trockenen Proteinschicht. – Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,01 und 5 mg/ml in 1–2-proz. wässriger Serumalbumin- oder Saccharoselösung (im letzteren Fall enthaltend 0,1% Glycin bezogen auf die Saccharose) gelöst. Je 30–50 μ l dieser Lösung wurden dann auf Glas- oder wenn nötig Quarz-Objektgläsern ausgebreitet und zu dünnen Schichten eingetrocknet. Vor und nach Formaldehydgasbehandlung wurden die UV.-Absorptions-, Aktivierungs- und Emissions-Spektren, wie in der 1. Mitteilung [3] beschrieben, registriert. Zur Extraktion der fluoreszierenden Produkte wurden die Schichten abgekratzt und in ein Zentrifugenrohr übergeführt; in letzterem wurden sie 15 Min. mit 0,04N HCl in 96-proz. Isopropanol behandelt.

SUMMARY

It is known that in tissue slices treated with dry gaseous formaldehyde according to the histochemical technique of HILLARP & FALCK structures containing catecholamines show a green fluorescence in the fluorescence microscope. The *m*-hydroxyphenylethylamines *m*-tyramine, *m*-hydroxyamphetamine and *m*-hydroxynorephedrine (metaraminol) enclosed *in vitro* in dry protein films undergo a similar reaction with dry gaseous formaldehyde and form fluorescent products which have been characterized as 6-hydroxy-3,4-dihydro-isoquinolines existing predominantly in the quinoidal form fluorescing at 385/510 nm. By treatment of these protein layers with gaseous hydrogen chloride another form fluorescing at 360/420 nm can be obtained which is not visible in the fluorescence microscope with the usual equipment.

m-Hydroxynorephedrine (metaraminol) has recently been shown by pharmacological methods to be taken up and stored by noradrenergic neurons. When slices of tissue containing metaraminol are treated with dry gaseous formaldehyde, metaraminol is converted into 4,6-dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydro-isoquinoline in agreement with the model experiments. However, intraneuronally this substance exhibits – in contrast to the model experiments and to the behaviour of this substance in other tissue structures – the fluorescence at 360/420 nm which is not visible in the fluorescence microscope with the usual equipment, and which is present in other tissues or in protein layers under the action of hydrogen chloride. These results may indicate either that the pH within the neurons is lower than in other cells or that the intraneuronal cytoplasmic proteins have a lower buffer capacity than the other cell proteins.

A B HÄSSLE, Göteborg, und
Histologische Abteilung, Karolinska Institutet,
Stockholm, Sverige

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. CORRODI & G. JONSSON, *Acta histochem.* 23 (1965); im Druck.
- [2] A. DAHLSTRÖM & K. FUXE, *Acta physiol. scand.* 63, Suppl., 232 (1964); K. A. NORBERG & B. HAMBERGER, *ibid.* 63, Suppl., 238 (1964); T. MALMFORS, *ibid.* 64, Suppl., 248 (1965).
- [3] H. CORRODI & N. Å. HILLARP, *Helv.* 46, 2425 (1963).
- [4] H. CORRODI & N. Å. HILLARP, *Helv.* 47, 911 (1964).
- [5] H. CORRODI & G. JONSSON, *J. Histochemistry & Cytochemistry* 13, 484 (1965).
- [6] CH. SACHS, *Biochemical Pharmacology* 15 (1966); im Druck.
- [7] B. HAMBERGER, persönliche Mitteilung.
- [8] H. CORRODI & G. JONSSON, in Vorbereitung.
- [9] H. CORRODI, N. Å. HILLARP & G. JONSSON, *J. Histochemistry & Cytochemistry* 12, 582 (1964).
- [10] N. Å. HILLARP, persönliche Mitteilung.
- [11] S. UDENFRIEND in «Fluorescence Assay in Biology and Medicine», Academic Press, New York 1962.
- [12] G. JONSSON & M. RITZÉN, in Vorbereitung.
- [13] W. H. HARTUNG, J. C. MUNCH, E. MILLER & F. CROSSLEY, *J. Amer. chem. Soc.* 53, 4149 (1931).
- [14] E. H. WOODRUFF & T. W. CONGER, *J. Amer. chem. Soc.* 60, 465 (1938).
- [15] J. M. GULLAND & C. J. VIRDEN, *J. chem. Soc.* 1929, 1791.
- [16] J. S. BUCK, *J. Amer. chem. Soc.* 56, 1769 (1934).
- [17] B. HAMBERGER, T. MALMFORS & CH. SACHS, *J. Histochemistry & Cytochemistry* 13, 147 (1965).