

Selektivdarstellung der Riechsinneszellen des Zwergwelses *Ictalurus nebulosus* mit Procionfarbstoffen

Selective Staining by Procion Dyes of Olfactory Sensory Neurons in the Catfish *Ictalurus nebulosus*

Arthur Holl

Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, J. L. Universität Gießen, Stephanstraße 24, D-6300 Gießen

Z. Naturforsch. **35 c**, 526–528 (1980);

eingegangen am 11. Dezember 1979/31. Januar 1980

Selective Fluorescence, Procion, Olfactory Receptors, Fishes

Procion Brilliant Yellow M4RAN and Procion Yellow M4R applied to the catfish olfactory mucosa stain intravitaly and enter the olfactory receptors by their dendrites. The dye invades the receptor pericaryon and subsequently migrates within the axon in distal direction. Fluorescence microscopy of aldehyd fixed and paraffin sectioned preparations reveals clear selective staining of the sensory neurons in yellow colour.

Seit Einführung von Procion-Farbstoffen in der Neurobiologie [1] sind verschiedene Arbeiten über Applikationstechniken [2–4] und den erfolgreichen Einsatz dieser Fluorochrome (Vertebraten und Invertebraten) zur Markierung einzelner Neurone oder von Neuronenpopulationen, besonders im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Untersuchungen erschienen [5–10]. Auch zur Identifizierung etwa von Schaltneuronen der Retina ist Procion-Injektion wertvoll [11, 12]. Für die Darstellung sensorischer Neurone der Wirbeltierriechschleimhaut fanden diese Farbstoffe bisher keine Verwendung.

Nach ersten gelungenen intrazellulären Procion Gelb-Färbungen der Riechaxone beim Zwergwels (Abb. 1) und der Regenbogenforelle durch axonale Iontophorese [13] erwies sich auch die weniger aufwendige Vitalfluorochromierung über die Riechschleimhautoberfläche als praktikable Möglichkeit zur Rezeptordarstellung. Dabei konnte festgestellt werden, daß sowohl Procion Brilliant Gelb M4RAN als auch Procion Gelb M4R [18] nach intravitale Applikation selektiv über die Rezeptorköpfchen in die Dendriten eindringen. Im Verlauf weniger Minuten gelangt der Farbstoff bis zum Perikaryon und wandert dann – allerdings mit geringerer Geschwindigkeit – in den Neuriten. Ein Verlust von Farbstoff

an den Interzellularraum oder an benachbarte Stützzellen tritt nicht auf. In der Regel nehmen nur zwischen 10 und 20% der Sinneszellen eines Epithelbezirks Procion auf, seltener sind von den Rezeptoren kleiner Areale mehr als 50% erfaßt (Abb. 2a, b). Damit wird eine hohe Durchlässigkeit der peripheren Rezeptormembran für Substanzen der Prociongruppe dokumentiert, aber auch deren besondere Affinität zum Rezeptorcytoplasma. Für die Untersuchung wurde das in seiner Organisation hinreichend bekannte Geruchsorgan der Zwergwelsart *Ictalurus nebulosus* (Jungtiere 6–8 cm Körperlänge) herangezogen. In dem hier, wie auch bei anderen Welsarten meist Flimmerzellen- und Schleimzellenfreien Sinnesepithel liegen die Perikarien der Rezeptoren in einer mittleren Zone, eine für die Beurteilung der Selektivität der Färbung günstige Situation [14, 15].

Vor Ausführung der Färbung wurde die Riechhöhle des mit MS 222 narkotisierten Fisches zwecks Entfernung des epithelialen Schleims mehrfach kurz mit 30 °C warmer 0,5-prozentiger NaCl-Lösung und anschließend Aqua dest. gespült. Die Einleitung der Farblösung in die Riechhöhle erfolgte kontinuierlich über eine circa 100 µm weite Glaskanüle durch die vordere Riechöffnung. Für jeden Färberversuch wurden frisch bereitete Lösungen (in Aqua dest.) verwendet. Der nicht genau bestimmbare Zeitpunkt einer befriedigenden, selektiven Rezeptorfärbung hängt ab von der Farbstoffkonzentration, der Temperatur und der Dicke des Schleimfilms. Läuft der Färbeprozess bei einer Temperatur um 22 °C ab, so resultiert – nach den vorläufigen Befunden – eine optimale Färbung der Sinneszellen mit einer 3–4-prozentigen Procion-Lösung schon nach rund 20 min. Bei 10 °C ist eine 1-prozentige Lösung vorzuziehen, die nach 60–70 min eine besonders markante Axonfärbung liefert. Diese Angaben beziehen sich auf Procion Brilliant Gelb M4RAN [18], das gegenüber Procion Gelb M4R intensivere Fluoreszenz und klarere Bilder erzeugt.

Das Optimum einer Selektivfärbung der Rezeptoren, vor Einsetzen der Farbstoffaufnahme durch Stützzellen und Basalzellen, läßt sich am besten durch Aldehyd-Fixierung bei pH 5–6,5 ortsstabil konservieren. Alkoholdehydrierung, Paraffindurchtränkung, sowie die Einschlußmittel Entellan und Caedax beeinflussen die Färbung nur minimal. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung [19] leuchten alle Prociongefärbten Strukturen tiefgelb.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Arthur Holl.

0341-0382/80/0500-0526 \$ 01.00/0



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 digitalized 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.

Abb. 1. *Ictalurus nebulosus*. Schnitt durch Riechfalte nahe Basis. Im beidseitigen Riechepithel dicht angeordnete, quer oder schräg getroffene Axonbündel (Pfeile). Markierung durch axonale Iontophorese mit Procion Brilliant Gelb M4 RAN. Fluoreszenzaufnahme. 250 \times .

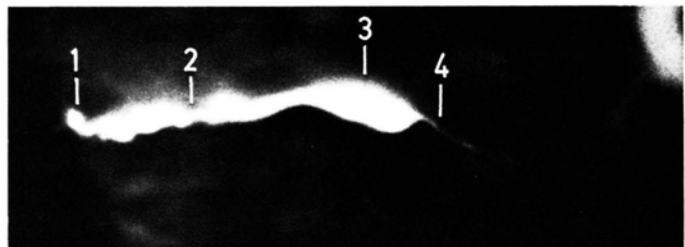
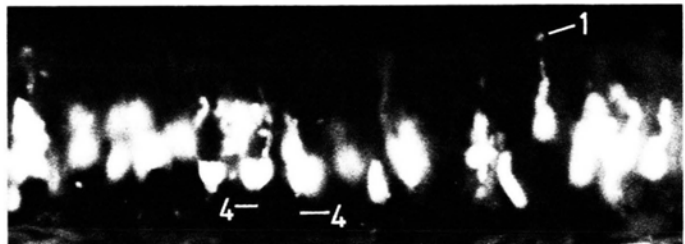
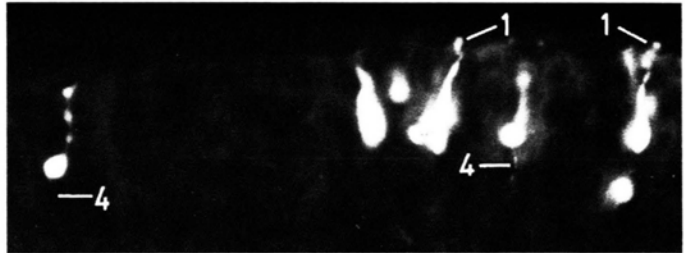
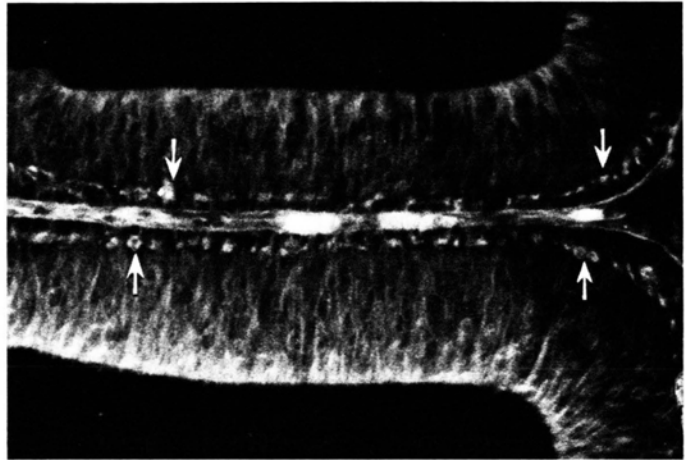


Abb. 2a–c. *Ictalurus nebulosus*. Vertikalschnitte durch Riechepithelbezirke mit selektiver Rezeptordarstellung. Vitalfluorochromierung mit Procion Brilliant Gelb M4 RAN. Fluoreszenzaufnahmen: a) Selektivfärbung nur weniger Rezeptoren. 3-prozentige Procionlösung, 15 min, bei 22 °C. 400 \times . b) Circa 60% der vorhandenen Rezeptoren gefärbt. Einsetzen der Farbstoffaufnahme durch andere Zellen. 1,5-prozentige Procionlösung, 80 min, bei 12 °C. 380 \times . c) Einzelrezeptor zwischen ungefärbten Nachbarzellen. Behandlung wie bei a). 1550 \times . 1. Riechköpfchen an Epitheloberfläche; 2. Dendrit mit artefiziell bedingten Aufblähungen; 3. Perikaryon; 4. Axon mit vereinzelt Anschwellungen.

Procionfarbstoffe (Verbindungen bestimmter Aminoazofarbstoffe mit Cyanursäurechlorid) wirken offenbar nicht cytotoxisch [4]. Mit Carbohydraten und Proteinen gehen sie covalente Bindungen ein, mit ein Grund dafür, daß vital gefärbte Neuronen den Farbstoff nicht wieder abgeben. Da die Bindung,

die von der Temperatur abhängig ist, relativ langsam vonstatten geht, kann ungebundenes Procion in noch ungefärbte Zellbereiche einwandern [4]. Insofern wirkt sich eine niedrige Arbeitstemperatur von 8–10 °C günstig auf die Farbstoffbewegung aus. In Riechepithelschnitten von Präparationen mit dem

für niedrige Temperatur optimalen Fixierungszeitpunkt sind die Axone gefärbter Rezeptoren als feinste Fäserchen bis zur Basallamina eindeutig erkennbar. Dabei wird der zunächst senkrechte oder schräge, entlang der Basalzellenzone dann horizontale Axonverlauf mit lockerer Bündelung und schließlich der Übertritt stärkerer Axon-Bündel ins Bindegewebe besonders deutlich.

Bemerkenswert ist die hohe Durchlässigkeit der peripheren Rezeptormembran für Procion-Verbindungen. So zeigen die Befunde, daß sowohl die Riechköpfchen als auch die sensorischen Cilien bereits nach weniger als 30 sec Färbezeit deutliche Gelbfluoreszenz aufweisen. Hier kann nur vermutet werden, daß die Membranorganisation und -ladungsverhältnisse eine schnelle Passage des Farbstoffs ermöglichen. Dazu darf auf Untersuchungen über die Einschleusung elektronenmikroskopisch nachweisbarer Substanzen durch die Rezeptormembran (Riech- und Geschmacksrezeptoren von Fischen) hingewiesen werden, bei denen für Thorotrast Werte im Sekundenbereich registriert wurden [17].

Die Farbstoffwanderung vom Perikaryon in den proximalen Axonbezirk (über Distanzen von 10 bis 15 µm) verläuft ähnlich schnell wie die „Füllung“ des Perikaryons über den Dendritenabschnitt. Im weiteren Axonverlauf ist die Procion-„Bewegung“ (der Terminus Transport wird bewußt vermieden) jedoch zunehmend langsamer. Mitbestimmend, aber nicht entscheidend dafür dürfte der geringe Faserdurchmesser der Riechaxone von unter 0,3 µm sein. Immerhin sind Procion-Füllungen (Iontophorese) neuronaler Strukturen mit 0,2 µm Kaliber bekannt [4, 6]. Für den Zwergwels konnten schließlich über Distanzen von mehr als 120 µm durchziehende Färbungen einzelner Riechaxone nachgewiesen wer-

den. Erschwert wird allerdings die Wahrnehmung einer weiterführenden Axonfärbung im Bindegewebe wegen dessen relativ starker Autofluoreszenz (orange). Die hier beobachtete proximo-distale Procionwanderung steht im Gegensatz zur retrograden Axonfüllung durch axonale Iontophorese [4, 13].

Nicht erreichbar war die quantitative Erfassung der Sinneszellen aller Riechepithelbezirke. Während in einzelnen, kleineren Bezirken über 50% der Rezeptoren Selektivfärbung zeigen, liegt die Procion-Markierung in den übrigen Arealen bei höchstens 20%, mit einer Minimalquote an der Faltenbasis (Abb. 2a, b). Dies spricht für eine den Farbstoffeintritt (in die Rezeptorköpfchen) störende Wirkung des Schleimfilms, dessen Beseitigung gerade an der Faltenbasis erschwert ist. Außerdem dürfte aber auch die Art des Lösungsmittels und der Zusatz bestimmter Ionen zur Farblösung unter Umständen eine Rolle spielen. So ließen sich in einigen Fällen durch Procion-Lösungen mit KCl-Beigaben (0.01 M) etwas bessere Resultate erzielen.

Inwieweit die Procioneinschleusung in olfactorische Rezeptoren zum Zwecke einer zum *Bulbus olfactorius* durchziehenden Färbung und damit für eine fluoreszenzmikroskopisch registrierbare Axonmarkierung geeignet ist, kann nach den vorläufigen Befunden noch nicht abschließend beurteilt werden. Als Routinemethode zur Darstellung der Rezeptor-geometrie innerhalb des Riechepithels liefert die vitale Procion-Fluorochromierung jedenfalls beachtliche Resultate und erweist sich Trypanblau-Färbungen [16] als überlegen.

Danksagung

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

- [1] A. Stretton u. E. Kravitz, *Science* **162**, 132 (1968).
- [2] J. Barrett u. K. Graubard, *Brain Res.* **18**, 565 (1970).
- [3] J. Iles u. B. Mulloney, *Brain Res.* **30**, 397 (1971).
- [4] S. Kater u. C. Nicholson, *Intracellular Staining in Neurobiology*, p. 332, Springer 1973.
- [5] L. Van Keulen, *J. Physiol. Paris* **63**, 131 A (1971).
- [6] R. Llinas u. C. Nicholson, *J. Neurophysiol.* **34**, 532 (1971).
- [7] C. Harris u. T. Smyth Jr., *Comp. Biochem. Physiol.* **40 A**, 295 (1971).
- [8] S. Kater u. C. Rowell, *J. Neurophysiol.* **36**, 142 (1973).
- [9] W. Ziegelgänsberger u. C. Reiter, *Exp. Brain Res.* **20**, 527 (1974).
- [10] S. Hester *et al.*, *Brain Res.* **159**, 41 (1978).
- [11] A. Kaneko, *J. Physiol. Lond.* **207**, 673 (1970).
- [12] W. Miller *et al.*, *Vision Res.* **3**, 443 (1973).
- [13] A. Holl, unveröffentlicht.
- [14] A. Holl, *Z. Morph. Ökol. Tiere* **54**, 707 (1965).
- [15] P. Cancalon, *Chem. Senses Flavour* **3**, 381 (1978).
- [16] A. Holl, *Stain Technol.* **40**, 269 (1965).
- [17] E. Schulte u. A. Holl, unveröffentlicht.
- [18] Serva, Heidelberg.
- [19] Ploemopak, Leitz. Filterblock H2 (Anregung: 390 bis 490 nm, Sperrung: 515 nm).