

Aus dem Zentrum für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierte Verfahren zur morphologischen und histochemischen
Auswertung der Niere

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carsten Dittmayer
aus Bremen

Datum der Promotion: 01.03.2019

Vorwort

Anteile meiner Monographie wurden am 17.05.2018 zur Publikation in „Kidney International“ akzeptiert (ID KI-01-18-0138.R1), hier bin ich alleiniger Erstautor.

Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder RR, Bachmann S. Modern field emission scanning electron microscopy provides new perspectives for imaging kidney ultrastructure.

(Impact Factor 2016; 8,395)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Aufbau und Funktionen der Nieren	1
1.2. Methoden zur morphologischen Auswertung von Nierengewebe	1
1.3. Zusammensetzung von Fixierlösungen	2
1.4. Historische Entwicklung ausgewählter Gewebefixierungen	3
1.5. Ansätze zur Anpassung der Fixierung an die Niere	4
1.5.1. Anpassung der Vehikelosmolarität	4
1.5.2. Vaskuläre Besonderheiten und Anfälligkeit gegenüber Ischämie	5
1.5.2.1. Fixierung über die Filtrationsbarriere	6
1.5.2.2. Proximaler Tubulus und Sensibilität gegenüber Ischämie	6
1.5.2.3. Klinischer Zusammenhang	7
1.6. Angepasste Gewebe- und Schnittpräparation für Nierenpräparate	8
1.6.1. Gewebepräparation	8
1.6.2. Schnittpräparation	9
1.7. Herleitung der Fragestellung	9
2. Methodik	12
2.1. Verwendete Chemikalien, Geräte, Software, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial sowie Rezepturen	12
2.2. Versuchstiere	12
2.3. Fixierung von Versuchstieren	12
2.3.1. Vorbereitung der Versuchstiere	12
2.3.2. Durchführung der Anästhesie	12
2.3.3. Präparation für Perfusionsfixierungen	12
2.4. Verwendete Lösungen zur Vorspülung und Fixierung	15
2.4.1. Protokoll 1	15
2.4.2. Variationen von Protokoll 1	16
2.4.3. Protokoll 2	16
2.4.4. Variationen von Protokoll 2	16
2.4.5. Protokoll 3	16
2.4.6. Variationen von Protokoll 3	17
2.5. Gewebepräparation	17
2.5.1. Paraffineinbettung	17
2.5.2. Einfrieren für Gefrierschnitte	17

2.5.3. Epon-Einbettung.....	18
2.5.4. Einbettung in hydrophiles Kunstharz	19
2.5.5. Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu.....	19
2.5.6. Konventionelle REM-Ansätze	20
2.6. Schnittpräparation	20
2.6.1. Paraffinschnitte.....	20
2.6.2. Gefrierschnitte	20
2.6.3. Semidünnschnitte	20
2.6.4. Befilmung von TEM-Netzchen.....	22
2.6.5. Ultradünnschnitte für TEM-Ansätze.....	23
2.6.6. Semidünnschnitte für Elektronentomographie.....	24
2.6.7. Ultradünnschnitte für TEM-Nanotomie	24
2.6.8. Ultradünnschnitte für REM-Array Tomographie.....	25
2.6.9. Kontrastierung der Ultradünnschnitte	26
2.6.10. Immunhistochemie	26
2.6.11. Immunzytochemische Goldmarkierungen an hydrophilen Kunstharzschnitten.....	27
2.6.12. Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu.....	27
2.6.13. Immunzytochemische Goldmarkierungen an Kryo-Ultradünnschnitten	28
2.7. Mikroskopische Verfahren	28
2.7.1. Konventionelle LM-Ansätze.....	28
2.7.2. Konfokalmikroskopie	28
2.7.3. Konventionelle TEM-Ansätze	29
2.7.4. Konventionelle REM-Ansätze	30
2.7.5. LM-Array Tomographie.....	30
2.7.6. Elektronentomographie	30
2.7.7. TEM-Nanotomie	30
2.7.8. REM-Array Tomographie; Einzelbilder	31
2.7.9. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Einzelstrahl-REM.....	32
2.7.10. REM-Array Tomographie; 3D-Datensätze im Einzelstrahl-REM.....	32
2.7.11. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Mehrstrahl-REM	32
2.7.12. Bildbearbeitung.....	32
2.8. Nichteigene Arbeitsschritte	33
2.9. Bezugsquellen	34
2.9.1. Chemikalien.....	34
2.9.2. Geräte	35
2.9.3. Software	35
2.9.4. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	36
2.9.5. Rezepturen.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Perfusionsfixierung von Versuchstieren	38

3.1.1. Anästhesie.....	38
3.1.2. Chirurgische Präparation.....	39
3.1.3. Makroskopische Auswertung im Rahmen des Zuschnitts	39
3.2. Strukturelle Bewertungskriterien.....	40
3.3. Optimierte Membrandarstellung durch reduzierte Osmierung	42
3.4. Fixierungsprotokolle für kombinierte histochemische und morphologische Methoden	42
3.4.1. Protokoll 1.....	42
3.4.1.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	44
3.4.1.2. Auswertung im Rahmen von Perfusionsfixierung und Zuschnitt.....	44
3.4.1.3. Lichtmikroskopische Auswertung.....	44
3.4.1.4. Elektronenmikroskopische Auswertung	46
3.4.1.5. Immunhistochemische Auswertung	49
3.4.2. Variationen von Protokoll 1.....	51
3.4.2.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	51
3.4.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung.....	51
3.4.3. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 1 und Variationen	53
3.4.4. Protokoll 2.....	54
3.4.4.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	54
3.4.4.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung.....	55
3.4.5. Variationen von Protokoll 2.....	55
3.4.5.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	55
3.4.5.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung.....	57
3.4.6. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 2 und Variationen	63
3.5. Fixierungsprotokolle für rein morphologische Methoden	63
3.5.1. Protokoll 3.....	64
3.5.1.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	64
3.5.1.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung.....	64
3.5.2. Variationen von Protokoll 3.....	66
3.5.2.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung	66
3.5.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung.....	66
3.5.3. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 3 und Variationen	71
3.6. Orientierende vergleichende Beurteilung der vorgestellten Fixierungsprotokolle	72
3.7. Fixierungsprotokolle für andere Organe	73
3.7.1. Fixierung von Gehirngewebe.....	73
3.7.1.1. Perfusionsfixierung mit Formaldehyd.....	75
3.7.1.2. Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd	75
3.7.2. Fixierung von Dünndarm	76
3.7.3. Fixierung von Lebergewebe	76
3.7.3.1. Protokoll 2 und Variationen.....	76
3.7.3.2. Protokoll 3 und Variationen.....	77

3.7.4. Zusammenfassende Beurteilung der Fixierung von anderen Organen	78
3.8. Mikroskopische Verfahren zur optimierten Auswertung von Nierengewebe	78
3.8.1. LM-Array Tomographie.....	79
3.8.1.1. Optimale Fixierung für Segmentierungen luminaler Strukturen	80
3.8.1.2. Gewebe- und Schnittpräparation für LM-Array Tomographie	80
3.8.1.3. Auswertungen der 3D-Datensätze.....	81
3.8.2. Elektronentomographie	82
3.8.3. TEM-Nanotomie	84
3.8.4. REM-Array Tomographie.....	87
3.8.4.1. Präparation für REM-Array Tomographie	87
3.8.4.2. REM-Array Tomographie; Einzelbilder	88
3.8.4.3. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Einzelstrahl-REM.....	90
3.8.4.4. REM-Array Tomographie; 3D-Datensätze im Einzelstrahl-REM.....	95
3.8.4.5. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Mehrstrahl-REM.....	97
3.8.5. Zusammenfassende Beurteilung der mikroskopischen Verfahren.....	99
4. Diskussion	100
4.1 Fixierungsprotokolle zur optimierten morphologischen und histochemischen Auswertung der Niere	100
4.1.1. Perfusionsfixierung	101
4.1.1.1. Präparatorische Standards	101
4.1.1.2. Anästhesie.....	101
4.1.1.3. Chirurgische Präparation und Perfusionsdruck.....	102
4.1.2. Artefaktbildung während der Perfusionsfixierung	103
4.1.2.1. Podozyten.....	103
4.1.2.2. Proximale Tubuli	104
4.1.2.3. Distale Tubuli und Sammelrohre.....	107
4.1.3. Kombinierte histochemische und morphologische Methoden.....	107
4.1.3.1. Standardprotokolle und Variationen.....	109
4.1.4. Rein morphologische Methoden	111
4.1.3.1. Standardprotokolle und Variationen für rein morphologische Methoden	112
4.2. Morphologische Beurteilung nach chemischer Fixierung und Gefriermethoden.....	112
4.2.1. Das Äquivalentbild.....	112
4.2.2. Gefriermethoden.....	113
4.2.2.1. Strukturhaltung durch Gefriermethoden.....	113
4.2.3. Zusammenfassung bezüglich lebensnaher Strukturhaltung	116
4.3. Optimierte Strukturhaltung von anderen Organen und Geweben.....	116
4.3.1. Optimierte Strukturhaltung von Gehirngewebe.....	116
4.3.2. Optimierte Strukturhaltung von Dünndarm	118
4.3.3. Optimierte Strukturhaltung von Lebergewebe	118
4.4. Optimierte Gewebe- und Schnittpräparation	120

4.4.1. Osmierung	120
4.4.2. Schnittpräparation	121
4.5. Mikroskopische Verfahren zur optimierten morphologischen Darstellung der Niere.....	122
4.5.1. LM-Array Tomographie.....	123
4.5.2. Elektronentomographie	124
4.5.3. Nanotomie und REM-Array Tomographie zur 3D-Rekonstruktion.....	126
4.5.3.1. TEM-Nanotomie.....	126
4.5.3.2. REM-Nanotomie und REM-Array Tomographie zur 3D-Rekonstruktion.....	128
4.5.4. Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie	131
4.5.5. Ausblick: Mehrstrahl-REM ermöglicht Hochdurchsatzverfahren.....	132
5. Literaturverzeichnis	136
Abbildungsverzeichnis	VIII
Eidesstattliche Versicherung	IX
Lebenslauf	XI
Komplette Publikationsliste	XIII
Danksagung.....	XIII

Zusammenfassung

Immersionsfixierungen von Mäuse- und Rattennieren ermöglichen nur eine ungenügende Strukturhaltung für licht- und elektronenmikroskopische Auswertungsansätze, als Goldstandard gilt daher die Perfusionsfixierung. Etablierte Protokolle hierfür wurden in früheren Arbeiten für Glutaraldehyd-haltige Fixierlösungen erstellt, welche sich jedoch allgemein nicht für immunhistochemische Präparationen eignen. Hierfür müssen üblicherweise separate Versuchstiergruppen mit Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen per Immersion oder Perfusion fixiert werden, was in beiden Fällen häufig mit starken qualitativen Einschränkungen der Strukturhaltung verbunden ist. Aufgrund der verbesserten Generierung von immer neuen experimentellen Tiermodellen und neuen mikroskopischen Auswertungsansätzen wie Konfokalmikroskopie und Super-Resolution-Lichtmikroskopie besteht daher ein immer größer werdender Bedarf an hochwertig fixiertem Nierengewebe für immunhistochemische sowie ultrastrukturelle Auswertungen. Um sämtliche konventionellen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden sowie auch immunhistochemischen und biochemischen Methoden anhand von nur einem Versuchstier durchführen zu können, optimierte ich im Rahmen meiner Dissertation die Zusammensetzung von Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen für Perfusionsfixierungen von Mäusen und Ratten durch Anpassung der Vehikelosmolarität, des kolloidosmotischen Drucks, des Puffersystems und des Fixans. Durch diese optimierte Fixierung erreichte ich eine hochwertige Strukturhaltung von Rinde und äußerem Mark durch zwei Standardprotokolle (Protokoll 1 mit Zusatz von Hydroxyethylstärke, Protokoll 2 ohne Zusatz von Hydroxyethylstärke), welche mit einem klassischen Protokoll zur Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd verglichen wurden (Protokoll 3 mit Zusatz von Hydroxyethylstärke). Im Rahmen von Variationen dieser Protokolle konnte durch verringerte Vehikelosmolarität die ultrastrukturelle Darstellung von Podozyten und kortikalen Tubuli optimiert werden, während sich eine hohe Vehikelosmolarität und ein hoher kolloidosmotischer Druck allgemein für gute Strukturhaltung des äußeren Marks eigneten. Zusätzlich optimierte ich die Auswertung von Nierengewebe durch Anpassung der Gewebe- und Schnittpräparation sowie der verwendeten mikroskopischen Techniken. Hierfür stellte ich durch neue Präparationsansätze qualitativ hochwertige Ultradünnschnitte für großflächige Digitalisierungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop und neuartigen Techniken per Rasterelektronenmikroskop her. Dies erhielt den räumlichen Zusammenhang komplexer Nierenstrukturen wie Glomeruli von der Übersicht bis zum hochauflösenden Detail und ermöglichte damit eine stufenlose Vergrößerung. Die Nutzung von Siliziumplättchen als Trägermaterial für Ultradünnschnitte im Rasterelektronenmikroskop zeigte viele Vorteile im Vergleich zu klassischen Grids bei der Verwendung im Transmissionselektronenmikroskop; sie vereinfachten die Probenpräparation, erhöhten drastisch die Stabilität der Präparate und ermöglichten eine großflächige Abbildung barrierefreier

Ultradünnschnittareale. Die Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen per Rasterelektronenmikroskop konnte durch Verwendung eines neuartigen Mehrstrahl-Rasterelektronenmikroskops darüber hinaus um das ca. 100-fache beschleunigt werden, wodurch komplette Ultradünnschnitte innerhalb von ca. 30 min. in guter Qualität digitalisiert wurden.

Abstract

Immersion fixation of rodent kidneys leads to poor structural preservation for light- and electron microscopical analysis. Thus, perfusion fixation represents the goldstandard. Therefore, protocols for glutaraldehyde containing fixative solutions were established by previous authors for optimized structural preservation of rodent kidneys. Glutaraldehyde-fixed tissue, however, is generally not suitable for immunohistochemical approaches. Therefore, separate animal groups are usually used to perform formaldehyde fixation via immersion or perfusion, both associated with severe drawbacks in structural preservation. Based on today's versatile experimental animal models and innovative microscopy techniques, such as confocal microscopy and superresolution microscopy, there is an increasing demand on high quality fixed tissue for combined immunohistochemical and ultrastructural analysis. My aim was to provide high quality fixed tissue as a basis for all conventional light- and electron microscopical techniques as well as immunohistochemical and biochemical techniques using one single animal. Therefore, I optimized fixation solutions for perfusion fixation of mice and rat kidneys by adapting vehicle osmolarity, colloid osmotic pressure, buffer solution and fixative type. Based on this improved fixation, renal cortex and outer medulla were preserved with superior quality using two standard protocols (protocol 1 containing hydroxy ethyl starch and protocol 2 without addition of hydroxy ethyl starch). Morphology was compared to a standard protocol, containing glutaraldehyde and hydroxy ethyl starch (protocol 3). Variations of these protocols with reduced vehicle osmolarity improved ultrastructural preservation especially of podocytes and cortical proximal tubular epithelium cells, whereas raised vehicle osmolarity and colloid osmotic pressure improved ultrastructural preservation of medullary components. In addition, improvements of tissue processing and section preparation further increased overall quality. By combining new approaches in transmission- and scanning electron microscopy with my adapted tissue processing protocols, I was able to digitize large thin section areas with superior quality as compared to conventional approaches. As a result, complex microanatomical architecture was preserved in the digitized datasets, facilitating smooth zooming. Compared to traditional transmission electron microscopy, improvements of thin section processing were mainly based on a more stable preparation using silicon substrate and imaging using a scanning electron microscope. Thin section digitization was further sped up using a new and powerful multi-beam scanning electron microscope by approximately 100-fold, enabling whole thin section digitization in about 30 min. with satisfactory quality.

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSE	<i>Backscattered electron</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
EsB	<i>Energy selective Backscattered</i>
f-Aktin	Filamentöses Aktin
FIB	<i>Focused ion beam</i>
gER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
LM	Lichtmikroskop
LR	<i>London resin</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
Na-Kakodylat	Natriumkakodylat
NaPi-2a	Natrium-abhängiger Phosphat-Kotransporter
pNKCC2	Phosphorylierter Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
SBF	<i>Serial block face</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

1. Einleitung

1.1. Aufbau und Funktionen der Nieren

Die Nieren bilden ein lebenswichtiges Ausscheidungssystem und sind darüber hinaus an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts und des Wasserhaushalts beteiligt. Als Teil des endokrinen Systems spielen sie weiterhin eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation, der Produktion von Erythrozyten und dem Knochenstoffwechsel (1).

Täglich werden beim Menschen ca. 180 L Primärharn gebildet und dieser durch nachfolgende Aufarbeitung (Rückresorption und Sekretion) in seiner Zusammensetzung verändert, bis schließlich ca. 2 L Endharn über die harnleitenden Systeme ausgeschieden werden. Die funktionell und strukturell abgrenzbaren Baueinheiten der Niere sind die Nephrone, von denen jede menschliche Niere über ca. eine Million verfügt, jeweils bestehend aus einem Glomerulus und einem daran angeschlossenen Tubulussystem (2). Dieses Tubulussystem setzt sich aus speziell differenzierten Segmenten zusammen, die in ihrer mikroanatomischen Anordnung die Zonengliederung der Niere definieren.

1.2. Methoden zur morphologischen Auswertung von Nierengewebe

Transgene Technologien haben in den letzten 30 Jahren die Entwicklung von zahlreichen Tiermodellen im nephrologischen Sektor ermöglicht (3). Veränderungen des genetischen Materials konnten dabei durch neue Techniken wie CRISPR¹/Cas darüber hinaus gezielter, schneller und kostengünstiger durchgeführt werden (4). Für die Untersuchung der eingeleiteten Veränderungen, die unmittelbar aus der Manipulation hervorgehen oder Folge von pathophysiologischen Prozessen sind, finden neben physiologischen und biochemischen auch immunhistochemische und morphologische Methoden Verwendung. Hier haben neue Techniken das Spektrum erweitert; neben konventionellen histologischen und elektronenmikroskopischen Verfahren bieten neuartige Ansätze wie Super-Resolution-Lichtmikroskopie (5) und verbesserte Rasterelektronenmikroskopie (6) Vorteile bei Probenpräparation, Auflösung und korrelativer Nutzung der licht- und elektronenmikroskopischen Signale (7, 8).

Die verschiedenen mikroskopischen Verfahren benötigen eine unterschiedliche Vorbereitung der Proben. Mithilfe von *in vivo* Auflichtmikroskopie wurde die mikroskopische Anatomie von Nierentubuli beschrieben (9); es waren offene proximale Tubuli mit ihrem Bürstensaum abgrenzbar. Tiefere Einblicke wurden außerdem durch intravitale Multiphotonenmikroskopie und injizierte Farbstoffe erreicht; neben offenen Tubuli und zirkulierenden Erythrozyten (10) wurden auch dynamische Prozesse auf subzellulärer Ebene, wie z.B. die Endozytose im proximalen

¹ CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*.

Tubulus (11), dargestellt. Eine höhere Auflösung von Strukturen in einer lebensnahen Morphologie benötigt eine Präparation des Gewebes *ex vivo*, hierfür ist eine chemische Fixierung für die Niere der Standard. Immersionsfixierungen sind einfach durchzuführen und ermöglichen leicht reproduzierbare Bedingungen, erhalten die Strukturen jedoch nur ungenügend und sind deshalb für Lokalisationsstudien und ultrastrukturelle Darstellungen von experimentellen Tiermodellen nur eingeschränkt nutzbar (12, 13). Daher ist die Perfusionsfixierung für eine optimale Strukturhaltung der Niere seit langem eine etablierte Technik, mit der organspezifische Besonderheiten der Niere am besten berücksichtigt werden können (13, 14).

1.3. Zusammensetzung von Fixierlösungen

Von einer Fixierlösung ist eine Vorspüllösung abzugrenzen, mit der das Blut eines Versuchstiers aus dem Kreislauf gespült wird, um eine Agglutination von Blutbestandteilen durch die Fixierlösung mit negativem Einfluss auf die Strukturhaltung zu vermeiden (15).

Innerhalb einer Fixierlösung werden zwei Komponenten unterschieden; die fixierende Komponente (Fixans) und das Vehikel (16, 17). Als Fixans werden Formaldehyd, Glutaraldehyd, Pikrinsäure oder eine Kombination dieser Stoffe verwendet. Als Formaldehyd wird in dieser Arbeit eine wässrige Lösung von Formaldehyd verstanden, welche frisch aus Paraformaldehyd (Pulverform) angesetzt wird. Hiervon abzugrenzen ist Formalin, welches 37%¹ Formaldehyd und ggf. Zusatzstoffe wie Methanol zur Hemmung von Polymerbildung enthält (18).

Die einzelnen Fixantien reagieren auf unterschiedliche Weise mit den Komponenten des Gewebes (18, 19). Formaldehyd diffundiert schnell auch in große Gewebevolumina und fixiert schwach, die Reaktion ist reversibel. Glutaraldehyd diffundiert langsam und fixiert stark, die Reaktion ist irreversibel. Glutaraldehyd und Formaldehyd fixieren hierbei vor allem Proteine, während Osmiumtetroxid, das in einem separaten Schritt nach der Perfusionsfixierung angewendet wird, vor allem Lipide fixiert (20). Zum einen ermöglicht die starke quervernetzende Wirkung von Glutaraldehyd eine gute Strukturhaltung für hochauflösende Elektronenmikroskopie, zum anderen induziert es jedoch auch Veränderungen der Proteinstruktur, was die Diffusion von Antikörpern innerhalb des Gewebes erschwert und Sensitivität und Spezifität von Immunmarkierungen deutlich reduziert (19). Die schwache quervernetzende Wirkung von Formaldehyd erhält dagegen die Antigenität besser, ermöglicht aber keine vergleichbar gute Strukturhaltung wie Glutaraldehyd (7, 20). Für Immersionsfixierungen mit dem Ziel einer qualitativ hochwertigen ultrastrukturellen Darstellung sind Fixierlösungen mit einer Kombination von Formaldehyd und Glutaraldehyd beschrieben; die schnelle Diffusion durch Formaldehyd ermöglicht eine schnelle Fixierung, die nachfolgend durch Glutaraldehyd weiter stabilisiert wird (21).

¹ Die Angabe von 37% Formaldehyd bezieht sich idR. auf g (Formaldehyd) pro g (Lösungsmittel; Wasser). Die Angabe 40% Formaldehyd bezieht sich idR. auf g (Formaldehyd) pro ml (Lösungsmittel; Wasser).

Das Vehikel besteht aus einer Pufferlösung, z.B. Na-Kakodylatpuffer oder Phosphatpuffer, der fakultativ Kolloide oder Salze zugesetzt werden. Die Gesamtosmolarität der Fixierlösung setzt sich aus dem Anteil des Fixans (Fixansosmolarität) und dem Anteil des Vehikels (Vehikelosmolarität) zusammen. Trotz einer hohen rechnerischen Osmolarität von Formaldehyd (3% = 1 M; 1000 mOsmol) und Glutaraldehyd (2% = 0,2 M; 200 mOsmol) haben diese Fixantien – im Gegensatz zur Vehikelosmolarität (üblicherweise 200-300 mOsmol) – nur einen geringen osmotischen Einfluss auf Gewebe (= effektive Osmolarität). Auf Grundlage einer empirischen Formel wurde der prozentuale Einfluss von Formaldehyd auf die effektive Osmolarität mit 10% und von Glutaraldehyd mit 30% beschrieben (17). Als Ergebnis dieses Zusammenhangs wird bei der Zusammenstellung einer Fixierlösung primär die Vehikelosmolarität berücksichtigt.

1.4. Historische Entwicklung ausgewählter Gewebefixierungen

Im Zeitintervall zwischen dem Beginn einer Immersionsfixierung bis zur effektiven Stabilisierung von Zellen sind diese besonders vulnerabel gegenüber Veränderungen ihres Milieus (13). Als zugrundeliegende Ursache wurde vermutet, dass durch Diffusion von Fixiergemischen innerhalb des Gewebes ein Konzentrationsgradient entsteht, durch welchen Zellen in tiefen Schichten initial von einer geringen Konzentration strukturell geschädigt werden, bevor sie durch eine ausreichend hohe Konzentration effektiv fixiert und in diesem Zustand erhalten werden. Immersionsfixierungen mit ungepufferten Lösungen von Osmiumtetroxid, wie sie in den Anfängen der renalen Ultrastrukturforschung üblich waren, verursachen einen Abfall des zellulären pH-Wertes, der sich in der vulnerablen Phase der Fixierung negativ auf die Strukturhaltung auswirkt. Durch eine Pufferung des Osmiumtetroxids mit Veronalacetat wurde 1952 durch Palade eine deutliche Verbesserung von Immersionsfixierungen erreicht (22). Eine modifizierte Immersionsfixierung stellt das Auftropfen der Fixierlösung auf die Nierenoberfläche des lebendigen Tieres dar (13). Durch die erhaltene Blutzirkulation werden Zellen in einer für sie physiologischen Umgebung fixiert; eine verbesserte Strukturhaltung wurde hierdurch ermöglicht. 1962 haben Maunsbach et al. Nierengewebe mit dieser Technik bis in eine Tiefe von ca. 200 µm in guter Qualität fixieren können, welche durch offene Tubuli mit glatten Lumina charakterisiert war. Eine hochwertige Fixierung auch von Gehirnen bis in tiefere Gewebeschichten wurde 1962 von Palay et al. durch vaskuläre Perfusion von Veronalacetat-gepuffertem Osmiumtetroxid erreicht (14). Gehirngewebe, welches wie Nierengewebe sehr anfällig gegenüber Ischämie ist, wurde auf diese Weise in hoher Qualität für die elektronenmikroskopische Auswertung fixiert. Die vasokonstriktorische Wirkung von Osmiumtetroxid wurde hier durch die Verwendung von Vorspülung und Vasodilatoren reduziert. Zur weiteren Reduktion von hypoxischen Schäden wurde eine artifizielle Beatmung mit 95-97% Sauerstoff und 3% Kohlenstoffdioxid durchgeführt. Mit der Einführung von Glutaraldehyd durch Sabatini et al. 1963 wurde Osmiumtetroxid als Fixans zur Perfusionsfixierung weitestgehend

abgelöst (23). Damit wurden aufgrund der hohen Kosten und der sehr hohen Giftigkeit von Osmiumtetroxid besonders Perfusionsfixierungen deutlich vereinfacht.

Durch sequentielle Fixierung von Gewebe mit beiden Fixantien wurden darüber hinaus noch bessere Ergebnisse erzielt als mit einer einfachen Fixierung (16). Zur optimierten Strukturhaltung von Nierengewebe wurden von Maunsbach verschiedene Perfusionsmodi für Fixierlösungen über den Blutweg getestet, dabei auch eine Variation der Perfusionsfixierung von Palay et al. (15, 24). Die Ergebnisse wurden mit einer Immersionsfixierung und einer Auftropffixierung verglichen. Nur durch Perfusionsfixierungen war es möglich, kortikale und medulläre Strukturen zuverlässig in hoher Qualität zu fixieren. Die Perfusionsfixierung über den linken Ventrikel und mit artifizierter Respiration (Palay et al. 1962) war dabei aufwändig und lieferte keine entscheidenden Vorteile gegenüber der einfacheren retrograden Perfusionsfixierung über die Aorta abdominalis ohne artifizierende Respiration.

1.5. Ansätze zur Anpassung der Fixierung an die Niere

In früheren Arbeiten wurde der Einfluss von Perfusionsparametern und Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Vorspülung und Fixierung auf die mikroanatomische und ultrastrukturelle Nierenmorphologie untersucht (9, 13, 24-27).

1.5.1. Anpassung der Vehikelosmolarität

Die Konzentrierung des Harns wird durch passiven Wassertransport im Sammelrohr ermöglicht, durch Anpassung an die Bedürfnisse des Körpers ist hierdurch die Ausscheidung eines Urins mit einer Osmolarität zwischen 50-1200 mOsmol/l möglich. Die hierfür nötige hohe interstitielle Osmolarität wird durch die Henle-Schleife aufgebaut. In der Folge steigt die interstitielle Osmolarität zonenabhängig von ca. 290 mOsmol in der Rinde auf bis zu 1200 mOsmol im Mark (28). Im Rahmen der Perfusionsfixierung muss die Osmolarität der Fixierlösung auf diese zonale osmotische Heterogenität abgestimmt werden, um Schwellungen oder Schrumpfungen von Zellen in der vulnerablen Phase der Fixierung zu vermeiden. Im Rahmen von tierexperimentellen Versuchen mit Ratten wurden Glutaraldehyd-haltige Fixierlösungen mit dem Ziel einer optimierten Fixierung der Rinde untersucht (15, 24). Dabei wurde die Vehikelosmolarität der Fixierlösungen als entscheidender Faktor identifiziert. So kam eine gute Strukturhaltung des proximalen Tubulus mit dem Resultat glatter luminaler Zelloberflächen bzw. der Abwesenheit apikaler Zytoplasmablasen sowie einer guten Abgrenzbarkeit subzellulärer Details bei elektronenlichtem Erscheinungsbild des Zytoplasmas bei 235 mOsmol zustande (15). Eine geringere Vehikelosmolarität (ca. 180 mOsmol) führte zu vermehrt geschwollenen Zellen mit apikalen Abschnürungen, eine höhere (ca. 300 mOsmol) zu geweiteten Interzellularräumen. Eine darüber hinaus erhöhte Vehikelosmolarität (ca. 530 mOsmol) führte zu verstärkter Spaltbildung und Zellenschrumpfung mit geringer Auflösung subzellulärer Details bei unverhältnismäßig

elektronendichtem Zytoplasma (15). Variationen in Pufferzusammensetzung und Glutaraldehydkonzentration führten im Rahmen dieser Experimente nur zu mäßigen Abweichungen. Auswirkungen von Variationen der Vehikelosmolarität wurden auch für die Morphologie des Nierenmarks der Ratte untersucht (26). Lösungen, die der regionalen Osmolarität der Nierenzonen angepasst waren, führten generell zu guten Ergebnissen. Der Innenstreifen (Markaußenzone) wurde mit einer Vehikelosmolarität von ca. 360 mOsmol gut fixiert; tiefere Markschichten waren geschwollen. Der äußere Bereich der Markinnenzone wurde mit einer Vehikelosmolarität von ca. 650 mOsmol gut fixiert, der innere Bereich der Markinnenzone mit einer Vehikelosmolarität von 1000 mOsmol und die Papillenspitze mit 1500 mOsmol. Benachbarte Zonen waren hier jeweils schlecht fixiert; ausgehend von gut fixierten Zonen waren Richtung Kapsel Schrumpfungen und Richtung Papille Schwellungen erkennbar.

1.5.2. Vaskuläre Besonderheiten und Anfälligkeit gegenüber Ischämie

Eine Durchführung von Perfusionsfixierungen an Mäusen oder Ratten mit dem Ziel einer optimalen morphologischen Darstellung von Nierengewebe erfordert die Berücksichtigung von anatomischen und physiologischen Besonderheiten der Niere. Im Rahmen einer Perfusionsfixierung muss die empfindliche Blutdruckregulation der Niere bedacht werden; ein Abfall des Perfusionsdrucks kann über eine reflektorische Vasokonstriktion eine erfolgreiche Instillation der Fixierlösungen in Gefäße und Tubuli verhindern und zu Ischämie-bedingten morphologischen Veränderungen führen. Weiterhin kann der Perfusionsdruck nur als äußerer Faktor kontrolliert werden; aufgrund unphysiologischer rheologischer Eigenschaften der Fixierlösung und Veränderungen des Gewebes während der Fixierung bleibt der effektive Perfusionsdruck im Gewebe ein unklarer Faktor (15). Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde im Rahmen von Perfusionsfixierungen *in vivo* nach Erhöhung des Perfusionsdrucks eine Dilatation der Tubuli festgestellt. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) fielen Tubuli, die unter erhöhtem Perfusionsdruck fixiert wurden, durch abgeplattete Zellen und schräg orientierte Mitochondrien auf (15, 29).

Ca. 20-25 % des Herzminutenvolumens fließt durch die Nieren, wodurch sie sehr gut mit Blut versorgt werden (30). Die Rinde ist dabei wesentlich besser durchblutet als das Mark (31). Das Mark wird über ein Kapillarnetz versorgt, das nur aus postglomerulären Vasa recta der juxtamedullären Glomeruli gespeist wird (32). Dieses Kapillarnetz ist im Außenstreifen und in der Innenzone schwach ausgeprägt, wodurch diese Bereiche anfälliger gegenüber Ischämie sind als die Rinde und der Innenstreifen. Die geringere Versorgung des Nierenmarks wird zusätzlich durch die Gegenstrom-Anordnung der Vasa recta verstärkt (31).

1.5.2.1. Fixierung über die Filtrationsbarriere

In den Kapillarschlingen des Glomerulus wird das Blut filtriert und der Primärharn in den Harnraum – umgeben von der Bowmankapsel – geleitet. Podozyten sitzen den Kapillarschlingen auf und umfassen diese mit ihren Fortsätzen. Das strukturelle Korrelat der Blutfiltration im Glomerulus ist die Filtrationsbarriere, bestehend aus einem Porenendothel, den Podozytenfortsätzen und einer gemeinsamen Basalmembran (32). In ihrer Gesamtheit ist die Filtrationsbarriere gut durchlässig für Wasser und darin gelöste Stoffe. Größere Stoffe werden abhängig von ihrer Ladung und Größe filtriert; neutrale Stoffe werden bis zu einer Größe von 50 kDa (ca. 4 nm) filtriert, negative Ladungen erschweren die Filtration durch Abstoßung an der ebenfalls negativ geladenen Filtrationsbarriere (31). Das Filtrationsverhalten von unreifen oder geschädigten Glomeruli kann hiervon jedoch abweichen, wodurch die Passage von makromolekularen Additiven wie HES nur schwer vorauszusagen ist und möglicherweise auch Stoffe mit einem Molekulargewicht von über 70 kDa die Filtrationsbarriere passieren können (33). Speziell im Rahmen der Perfusionsfixierung kann daher angenommen werden, dass es an der Filtrationsbarriere zu strukturellen und funktionellen Veränderungen mit Einfluss auf die Größenselektivität kommen kann. Der Perfusionsdruck im Glomerulus, damit auch der Perfusionsdruck im postglomerulären Kapillarbett in Rinde und Mark, wird physiologisch durch den Autoregulationsmechanismus der Niere bestimmt (31). Wie sich die Komponenten dieses Regelkreises bei der Perfusionsfixierung verhalten, ist unklar. Sicher ist jedoch, dass hierbei Schwankungen von Perfusionsdruck und Vehikelosmolarität die lokale glomeruläre Perfusion, die Filtration und damit auch den Durchtritt von Fixierlösungen beeinflussen kann (34, 35). Auswirkungen einer Unterbrechung des Filtrationsdrucks auf die Selektivität des glomerulären Filters wurden in diesem Kontext untersucht (34); eine Perfusionsfixierung mit vorübergehender Unterbrechung des Perfusionsdrucks ermöglichte die Passage von Albumin in den Harnpol, während ohne Unterbrechung des Perfusionsdrucks das Albumin auf Kapillarlumina und die Filtrationsbarriere selbst beschränkt war.

1.5.2.2. Proximaler Tubulus und Sensibilität gegenüber Ischämie

Der proximale Tubulus besitzt generell gegenüber Ischämie und Änderungen des Perfusionsdrucks eine hohe Sensitivität (9, 15, 25, 36). Durch *in vivo* Auflichtmikroskopie wurde die Reaktion von Nierentubuli auf Ischämie, verursacht durch Abklemmen der Arteria renalis, studiert (9). 5 s nach Unterbrechung des Blutflusses durch Gefäßklemme waren Lumina und Bürstensaum der proximalen Epithelien nicht mehr abgrenzbar, 4-5 min. nach Wiedereröffnung des Blutflusses konnte das morphologische Bild der Ausgangssituation – mit offenen proximalen Tubuli und abgrenzbarem Bürstensaum – wiederhergestellt werden. Eine ähnlich drastische Reaktion war bei anderen Nephronabschnitten nicht festzustellen (9). Es wurde aufgrund des gleichbleibenden Außendurchmessers der proximalen Tubuli vermutet, dass der

Lumenverschluss nicht primär Folge eines druckbedingten Kollapses sei, sondern das Ergebnis eines Anschwellens der Zellen. Diese Schwellung wurde in einer anderen Arbeit durch einen „Schutzpuffer“, bestehend aus Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) und Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) bei 274 mOsmol, verhindert; nach einer 2-minütigen Pause zwischen der Perfusion des Schutzpuffers und der Perfusion der Fixierlösung waren die proximalen Tubuli im Semidünnschnitt weiterhin offen (25). Als Vehikel der Fixierlösung wurde ebenfalls dieser Schutzpuffer verwendet. Die Perfusion des Schutzpuffers verhinderte nach Durchführung einer Immersionsfixierung ebenfalls das Kollabieren der proximalen Tubuli, wohingegen in Folge einer Perfusion von *Phosphate buffered saline* (PBS; 280-290 mOsmol) die proximalen Tubuli nach 2-minütiger Pause sowie Immersionsfixierung kollabiert waren. Der Effekt des Schutzpuffers wurde mit dem schützenden Effekt von Kolloiden wie Polyvinylpyrrolidon und Dextran verglichen, die ebenfalls ein Anschwellen von Zellen verhindern sollen. Im Vergleich zum Schutzpuffer können höhermolekulare Stoffe wie Saccharose diese schützende Zeitspanne verlängern. Eine dem Effekt des Schutzpuffers ähnliche Wirkung wurden *ex vivo* an isolierten Rattennieren erzielt. Diese wurden mit einer hyperosmolaren Mannitollösung perfundiert und zeigten nach Immersionsfixierung und paraffinhistologischer Präparation offene kortikale und medulläre Tubuli mit glatten luminalen Zelloberflächen (35). Weiterhin wurde in einem Tiermodell zur Ischämie gezeigt, dass Mannitol im Gegensatz zu Dextran, Methylprednisolon und Allopurinol die Nekrosebildung im S3-Segment des proximalen Tubulus signifikant reduziert (37). Die Nutzung von Additiven wie Dextran, Mannitol, Polyvinylpyrrolidon, HES und Saccharose im Rahmen von physiologischen Experimenten wurde jedoch auch kritisch betrachtet. So wurden Auswirkungen einer intravenösen und subkutanen Applikation von Glukose, Mannitol, Dextran und Saccharose im Tierversuch an Ratten untersucht (38). Alle Stoffe führten zu einer starken Vesikelbildung im proximalen Tubulus, die bei Mannitol am stärksten ausgeprägt war. In einer anderen Arbeit wurde die Bedeutung von Kolloiden als Bestandteil in der Fixierlösung untersucht (27). Leber, Pankreas und Dünndarm zeigten nach Perfusionsfixierung von Ratten in Abwesenheit von kolloidosmotischen Stoffen wie Polyvinylpyrrolidon und Dextran eine makroskopisch sichtbare Schwellung. Der Zusatz von Dextran zur Fixierlösung verbesserte weiterhin die Fixierung des Nierenmarks; artifizielle Aufweitungen des Interstitiums ließen sich dadurch vermeiden (26).

1.5.2.3. Klinischer Zusammenhang

Morphologische Veränderungen in Nierenepithelien, wie sie nach Infusion von Kolloiden auftreten können, wurden unter dem Begriff „osmotische Nephrose“ zusammengefasst. Dies spielt auch klinisch im Rahmen von Infusionstherapien eine wichtige Rolle, da sie bis zum Nierenversagen führen können (39). Andererseits bieten sie einen gewissen Schutz vor den Folgen von Ischämie; Zellschäden im Rahmen des Transports von Nierentransplantaten können dadurch reduziert

werden. Dies verbessert die Erreichbarkeit von passenden Empfängern, da auch weite Wege zurückgelegt werden können. Eine Ursache der Reduktion von Ischämie-induzierten Tubulusschäden wurde mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie untersucht (36). Vor Entnahme eines Spenderorgans wurde die Zeitspanne zwischen einer Infusion mit Mannitol und dem Abklemmen der Nierenarterie von 30 auf 15 min. reduziert. Dieses verkürzte Intervall schützte die proximalen Tubuli vor dem Kollabieren und verbesserte den klinischen Verlauf der Empfänger. In einer Patentschrift wurde weiterhin eine Dextran-haltige Organperfusionslösung zur Konservierung von u.a. Nierentransplantaten beschrieben, die als Verbesserung gegenüber anderen Konservierungslösungen eine längere Ischämiezeit erlaubt (40).

1.6. Angepasste Gewebe- und Schnittpräparation für Nierenpräparate

Von der Perfusionsfixierung bis zur morphologischen Darstellung von Gewebe durch mikroskopische Verfahren hat jeder Arbeitsschritt Einfluss auf das Ergebnis. Hier können unerwünschte Veränderungen entstehen (Artefakte), aber auch gezielt Einfluss auf das gewünschte Ergebnis genommen werden (41).

1.6.1. Gewebepräparation

Bei der Entwässerung von Gewebe im Rahmen von Kunstharzeinbettungen werden Stoffe, die nicht durch eine Fixierung stabilisiert wurden, ausgewaschen; folglich können sie nicht ultrastrukturell dargestellt werden (42, 43). Zuckerverbindungen der endothelialen und podozytären Glykokalix sind ein Beispiel für Strukturen, die durch konventionelle Fixantien (s.o.) nur ungenügend fixiert werden. Eine Perfusionsfixierung mit Zusatz von *Lanthanum dysprosium glycosaminoglycan adhesion* stabilisierte die glomeruläre endotheliale Glykokalix von Ratten, wodurch sie als 200-400 nm dicker Saum im TEM erschien, die podozytäre Glykokalix zeigte sich als dünner Strich (44). Eine Perfusionsfixierung mit Zusatz von Gerbsäure erhöhte die Elektronendichte u.a. der glomerulären Filtrationsbarriere von Ratten, weiterhin ermöglichte sie die verbesserte Darstellung von Mikrotubuli (16).

In der klinischen Praxis spielt die Reihenfolge von Fixierungen und die Spezifität der zugrundeliegenden Reaktionen beim Umgang mit Nierenbiopsien eine wichtige Rolle. Eine frisch entnommene Biopsie – schwimmend in isotoner Salzlösung gelagert – kann als Grundlage für den Zuschnitt in der Pathologie genutzt werden. Dort wird ein Teil des Zylinders im Rahmen des Zuschnitts für die Elektronenmikroskopie direkt in Glutaraldehyd fixiert (45). Als weitere Möglichkeit kann vor dem Zuschnitt eine Fixierung des Zylinders in Formaldehyd erfolgen, die auch vereinbar mit längeren Transportzeiten ist. Für die Elektronenmikroskopie kann bei nur geringem Qualitätsverlust die anschließende Fixierung eines Teils des Zylinders mit Glutaraldehyd durchgeführt werden (46). Soll nach Einbettung des gesamten Materials in Paraffin eine Präparation für die Elektronenmikroskopie erfolgen, kann Material aus einem Paraffinblock

oder einem Paraffinschnitt in Kunstharz umgebettet werden, was jedoch mit erheblichen qualitativen Einbußen verbunden ist (47). Ursache hierfür ist der Verlust von ungenügend stabilisierten Lipiden und Proteinen im Rahmen der Paraffineinbettung. Für Anwendungen in Forschung und Diagnostik ist daher, wenn möglich, eine Lagerung von uneingebettetem Nierengewebe (fixiert nur in Formaldehyd) empfehlenswert, sofern eine spätere ultrastrukturelle Auswertung nicht ausgeschlossen werden kann (46).

1.6.2. Schnittpräparation

Eine ultrastrukturelle Auswertung von Nierengewebe am TEM erfordert neben einer guten Perfusionsfixierung und stabilen Kunstharzeinbettung eine qualitativ hochwertige Schnittpräparation, bestehend aus den Präparationsschritten der Ultramikrotomie und der Kontrastierung. Im Rahmen einer repräsentativen Auswertung von Nierengewebe muss dessen strukturelle Heterogenität mit mehr als 26 verschiedenen Zelltypen und einem komplex organisierten Tubulussystem berücksichtigt werden (48); dies erfordert größtmögliche Ultradünnschnittareale, frei von Artefakten wie *Chatter*, Falten und Verunreinigungen, um eine systematische ultrastrukturelle Untersuchung zu ermöglichen (49). Die Herstellung solcher Ultradünnschnitte wurde als die größte präparatorische Herausforderung im Rahmen der Arbeitsschritte beschrieben, die zum einen praktische Fähigkeiten und zum anderen ein ausführliches Wissen bezüglich der möglichen Artefakte erfordert (50). Ursächlich für die große Anfälligkeit von Ultradünnschnitten sind ihre geringe Schnittdicke von ca. 50 nm und ihre freie Lagerung – gestützt entweder durch *Mesh grids* oder befilmte Schlitz-*Grids* – um einen Durchtritt von Elektronen zu ermöglichen. In früheren Arbeiten wurden qualitätsentscheidende Parameter im Rahmen der Schnittpräparation beschrieben; darunter die Geometrie des Kunststoffblocks, Umgebungsfaktoren beim Schneideprozess, Anforderungen an die verwendeten Messer, Schnittaufnahme und die Kontrastierung (50-57) .

1.7. Herleitung der Fragestellung

Grundlage für eine adäquate morphologische Auswertung der strukturellen und funktionellen Heterogenität der Niere sind präzise Methoden zur Probenpräparation und der mikroskopischen Technik. Die verschiedenen mikroskopischen Auswertungen haben dabei jeweils spezielle Vor- und Nachteile; so fehlen bei einer primär morphologischen Auswertung mit starker Fixierung Informationen zur Biochemie von Zelle und Zellverband. Eine histochemisch auslesbare Markierung von Proteinepitopen, Enzymaktivität und Nukleinsäurekomponenten alleine erfordert andererseits eine vorsichtige, schwache Fixierung, die für hochauflösende elektronenmikroskopische Analysen ungeeignet sein kann. Um Gewebe hierfür in hoher Qualität erhalten zu können, wurde im Rahmen meiner Arbeit ein Schwerpunkt auf die kombinierte morphologische und histochemische Darstellung gelegt. Die Kombination von schwacher

Fixierung mit nachfolgender Aufteilung von Gewebe auch für stärkere Fixierung war hier Grundgedanke. Dies sollte mit zeitgemäßen Standard-Techniken durchführbar sein. Auch sollten neuartige mikroskopische Techniken wie *Super-Resolution*-Lichtmikroskopie einbezogen werden, die eine hochauflösende biochemische Charakterisierung auf Grundlage von *Tag*-basierten oder immunhistochemischen Markierungen mit elektronenmikroskopischen Ansätzen kombinieren (korrelieren) lässt. Weiterhin sollten diese kombinierten Ansätze jeweils mit nur einem Versuchstier durchführbar sein, um bei Gruppenversuchen separate Auswertungsgruppen zu vermeiden. Eine Aufteilung von Versuchstiergruppen in Untergruppen für jeweils unterschiedliche Methoden würde aufgrund interindividueller Schwankungen zu Einschränkungen der Vergleichbarkeit führen. Aufgrund bestehender Tierversuchsrichtlinien sind Genehmigungsverfahren mit großen Versuchstierzahlen heute auch schwer zu rechtfertigen (58). Hier sollte eine Vereinfachung Ziel der vorliegenden Untersuchungen sein.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden im Rahmen meiner Arbeit Anpassungen von Fixierungsprotokollen für die Niere vorgenommen, um letztlich mit nur einem Versuchstier eine breite Palette an morphologischen und histochemischen Methoden in hoher Qualität abdecken zu können. Als Grundlage hierfür wurden zwei Standardprotokolle etabliert, mit denen Rinde und äußeres Mark hochwertig fixiert werden können. Als Fixans wurde hier schwach fixierendes Formaldehyd gewählt, weil dieses in den nachfolgenden Arbeitsschritten immunhistochemische Markierungen erlaubt. Separates Gewebe für ultrastrukturell hochauflösende Darstellungen sollte nachfolgend ohne wesentlichen Qualitätsverlust zusätzlich stärker mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert werden. Für rein morphologische Ansätze wurde ein weiteres Standardprotokoll mit hoher Glutaraldehyd-Konzentration etabliert.

Einschränkungen der Auswertung von Nierengewebe können auch nach optimaler Fixierung und Gewebepräparation entstehen. Hier ist insbesondere eine mangelhafte Qualität der Ultradünnschnitte bei der ultrastrukturellen Auswertung am TEM limitierend. Durch optimierte Ultradünnschnittpräparationen und die Etablierung neuartiger elektronenmikroskopischer Techniken durch TEM- und REM-Ansätze konnte die licht- und elektronenmikroskopische Auswertung von Nierengewebe in meiner Arbeit daher entscheidend verbessert werden. Auch die Darstellung von Gehirngewebe konnte durch diese präparatorischen und technischen Ansätze optimiert werden. Limitationen der konventionellen Fotodokumentation von Nierengewebe am TEM zeigten sich aufgrund der nur punktuellen Auswertung von kleinen Ultradünnschnittarealen, der Zusammenhang zur mikroanatomischen Gewebestruktur ging hier allgemein verloren. Nachfolgende Auswertungen anhand der angefertigten Einzelbilder konnten allgemein nur ungenügend nachvollzogen werden. Hier ermöglichten hochauflösende Digitalisierungen von Ultradünnschnittarealen mit dem TEM und neuen REM-Ansätzen eine zusätzlich optimierte Auswertung. Insgesamt konnten diese licht- und elektronenmikroskopischen Verfahren an Gewebe von nur einem Versuchstier durchgeführt werden; zwei der „3R-

Grundsätze“ mit Reduktion (*Reduction*) und Verfeinerung (*Refinement*) konnten hierdurch erfolgreich umgesetzt werden (58).

2. Methodik

2.1. Verwendete Chemikalien, Geräte, Software, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial sowie Rezepturen

Die Bezugsquellen für das verwendete Material sind separat aufgelistet (2.9.; Tabelle 2-6).

2.2. Versuchstiere

Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Tierversuchsnummern: O024/96, G0220/12, O0124/96, O0124/96, G0285/10). Weiterhin wurde Gewebe im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen ausgewertet (AG Peters; G0010/08, AG Willnow; „cytopl. Tail von Megalin“).

2.3. Fixierung von Versuchstieren

Mäuse und Ratten wurden retrograd über die Aorta abdominalis perfusionsfixiert. Für die Präparation wurden die Versuchstiere betäubt und anschließend *in vivo* erst die Vorspüllösung und dann die Fixierlösung appliziert.

2.3.1. Vorbereitung der Versuchstiere

Es wurden männliche und weibliche Mäuse der Stämme BALB/c und Black 6 mit einem Gewicht von 10-40 g und Ratten der Stämme Sprague-Dawley und Wistar mit einem Gewicht von 150-250 g verwendet. Alle Versuchstiere hatten bis zur Betäubung freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.3.2. Durchführung der Anästhesie

Die Versuchstiere wurden inhalatorisch mit Isofluran betäubt und durch intraperitoneale Injektion von Nembutal anästhesiert (40 mg/kg Körpergewicht).

2.3.3. Präparation für Perfusionsfixierungen

Zur retrograden Perfusionsfixierung über die Aorta abdominalis wurde ein System mit hängenden 1 L-Infusionsflaschen verwendet. In eine Infusionsflasche wurden Vorspüllösung und in eine andere Infusionsflasche Fixierlösung gefüllt. Die Infusionsflaschen wurden über einen Dreiweghahn miteinander verbunden. Der Dreiweghahn wurde durch einen Infusionsschlauch mit einem Adapterstück verbunden (Abb. 1A). Ein Polypropylenschlauch (Aortenkatheter) wurde für Mäuse und kleine Ratten durch Ausziehen über einer Gasbrennerflamme von 0,95 auf ca. 0,5 mm Außendurchmesser reduziert und durch eine modifizierte Butterfly-Kanüle und einer 5 ml

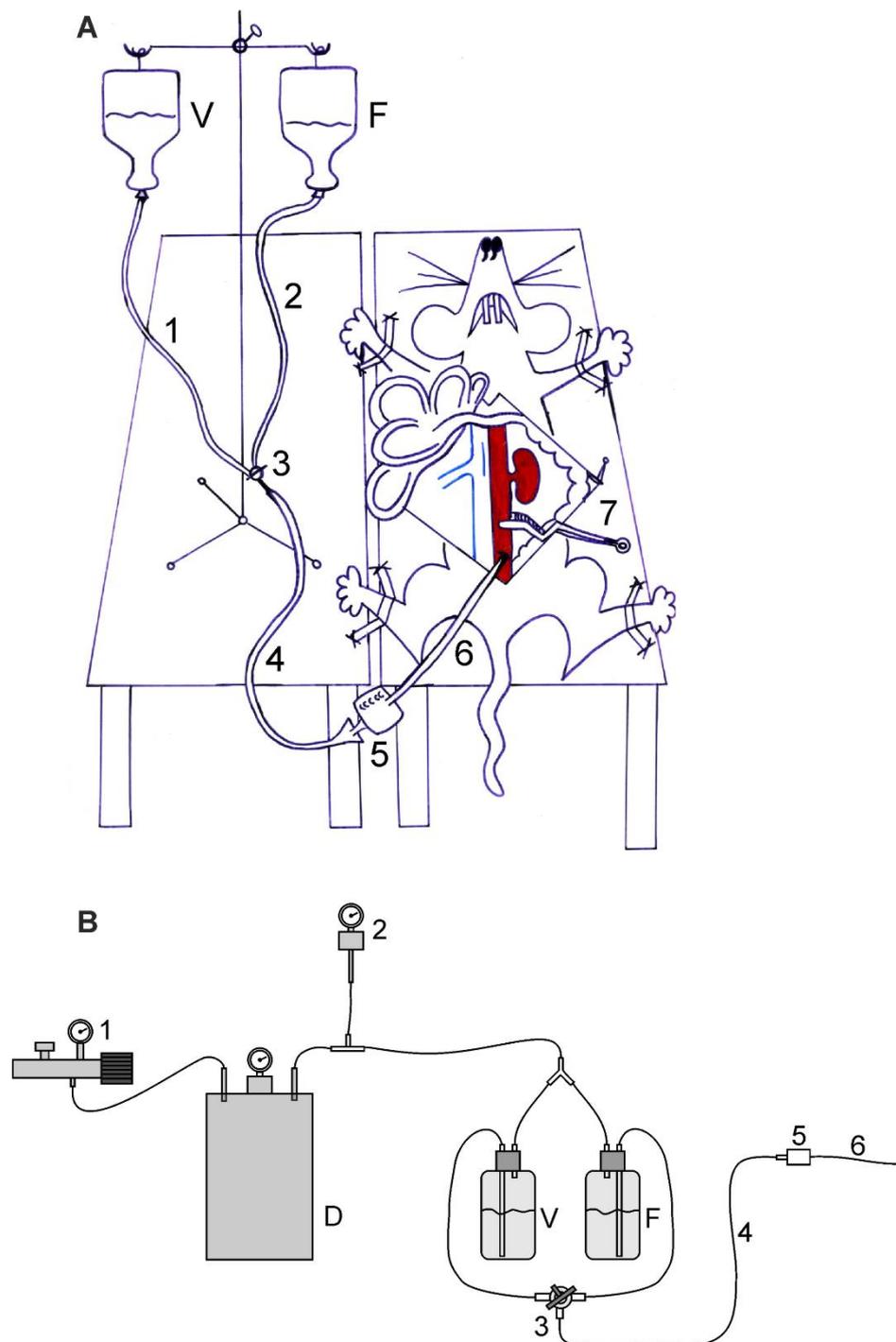


Abbildung 1. Apparaturen zur Perfusionsfixierung.

System mit hängenden Flaschen (A), Druckluftanlage (B). Operationssitus (A); es wurden eine Infusionsflasche für Vorspüllösung (V) und eine Infusionsflasche für Fixierlösung (F) verwendet. Beide Infusionsflaschen wurden über einen Verbindungsschlauch (1,2) an einen Dreiweghahn (3) angeschlossen. Über einen Infusionsschlauch (4) wurde ein Adapterstück befestigt (5), in das ein Aortenkatheter (6) gesteckt wurde. Aortenklammer (7). Die distale Gefäßklemme und der Zwirnsfaden (für die spätere Befestigung des Aortenkatheters) wurden aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Druckluftanlage (B); es wurde Druckluft aus einem Wandanschluss in einen Drucklufttank (D) geleitet. Dieser war über ein T-Stück mit einem Manometer (2) und über einen Verteiler mit zwei Glasflaschen verbunden; eine Glasflasche für Vorspüllösung (V) und eine Glasflasche für Fixierlösung (F). Über einen Dreiweghahn (3) wurden beide Glasflaschen mit einem Infusionsschlauch (4) verbunden, der über ein Adapterstück (5) mit dem Aortenkatheter (6) befestigt war.

Spritze mit einer Schlauchlösung (2.9.; Tabelle 6) befüllt. Der Aortenkatheter, zum Schutz vor Luftblasen weiterhin mit der Butterfly-Kanüle verbunden, wurde bis zum Einführen in die Aorta abdominalis griffbereit am Präparationstisch gelagert.

Mäuse und Ratten wurden allgemein auf gleiche Weise perfusionsfixiert, die Präparation von Mäusen und kleinen Ratten wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle durchgeführt, für größere Ratten hingegen war eine gute Beleuchtung allein ausreichend. Die Vorspülung wurde in ihrer Dauer an das Gewicht und die Größe der Versuchstiere angepasst und betrug bei Mäusen ca. 5 s und bei größeren Ratten zwischen 15-40 s.

Versuchstiere wurden in Rückenlage auf einer saugfähigen Unterlage positioniert und mithilfe von Klebeband an den Extremitäten fixiert (Abb. 1A). Ein Schmerzreiz wurde durch Kompression einer Pfote gesetzt und erst nach Ausbleiben einer Reaktion mit der Präparation begonnen. Die Bauchhöhle wurde durch eine mediane Laparotomie vom Xiphoid bis zur peritonealen Umschlagfalte der Blase eröffnet. Der abdominelle Situs wurde über gerade Scherenklemmen, die seitlich des Tieres gelagert wurden, für die folgende Präparation zugänglich gemacht. Mit Wattestäbchen wurden Dünndarm und Dickdarm mobilisiert und seitlich am Rand des Situs positioniert. Die Aorta abdominalis wurde durch stumpfe Präparation mit Wattestäbchen und Pinzetten (Typ #4 und #5) von Fettgewebe und Peritoneum befreit und in ihrem Verlauf vom Abgang der Nierenarterien bis zur Bifurkation sauber dargestellt. Die Harnblase wurde bei starker Füllung mit einer Kanüle (26 Gauge) punktiert und der Urin abgesaugt, um den distalen Verlauf der Aorta abdominalis komplett verfolgen zu können. Die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior (abdominelles Gefäßband) wurden proximal der Bifurkation mit einer schrägen Scherenklemme abgeklemmt und leicht angehoben. Weiter wurde die Aorta abdominalis direkt unterhalb der Nierenarterien mit einer geraden Gefäßklemme (Aortenklemme) abgeklemmt. Das abdominelle Gefäßband wurde nach der ventralen Positionierung im abgeklemmten Bereich erneut, bis zur sicheren Abgrenzung beider Strukturen, präparativ sauber dargestellt. Ein Zwirnsfaden, getränkt in 0,9% NaCl-Lösung, wurde mit spitzen Pinzetten (Typ #4) in der Adventitia dorsal des abdominalen Gefäßbands durchgeführt und ein lockerer Knoten für die spätere Befestigung des Aortenkatheters ventral vorbereitet. Die Aorta abdominalis wurde im distalen Bereich des abgeklemmten Areals mit einer Augenschere quer eröffnet und der vorbereitete Aortenkatheter bis zur Aortenklemme retrograd vorgeschoben. Mit dem vorbereiteten Zwirnsfaden wurde der Aortenkatheter in der Aorta abdominalis ligiert und sein freies Ende mit einer Schere an der Butterfly-Kanüle abgeschnitten und in das Adapterstück gesteckt. Anschließend wurde überprüft, dass bei diesem Vorgang keine Luft in das System eingedrungen war. Der Infusionsschlauch wurde in seinem Verlauf – vom Infusionsständer bis zum Präparationstisch – mit Klebeband punktuell fixiert. Der Aortenschlauch wurde fakultativ mit Klebeband auf der Maus und der saugfähigen Unterlage fixiert, um ein Herausgleiten aus der Aorta zu vermeiden. Der Perfusionsdruck wurde durch die Höhe der hängenden Flaschen

eingestellt; für Mäuse wurde eine Höhe von 160-200 cm Wassersäule und für Ratten eine Höhe von 180-240 cm Wassersäule gewählt. Die Perfusion wurde durch einen Einschnitt der Vena cava inferior, proximal der Nierenvenen, gestartet. Unmittelbar danach wurde die Aortenklemme eröffnet und gleichzeitig von einer zweiten Person durch Bedienung des Dreiwegehahns die Vorspülung initiiert. Die Dauer der Vorspülung betrug 5-10 s, je nach Körpergewicht und sichtbarem Erfolg der Perfusion durch Inspektion der Darm- und Lebergefäße. Das Volumen im Infusionsschlauch musste grundsätzlich eingerechnet werden. Nach der Vorspülung wurde über den Dreiwegehahn ohne Druckverlust auf die Fixierlösung umgestellt und für 5 min. fixiert. Die Nieren wurden – ohne Druck auf die Kapsel auszuüben – aus dem Situs herauspräpariert und auf Dentalwachs abgelegt. Fixierlösung wurde auf die Nieren getropft, um sie während des Zuschnitts vor Austrocknung zu schützen. Mit Rasierklingen wurden die Nieren entsprechend ihrer weiteren Verarbeitung in unterschiedlich große Gewebestücke zugeschnitten. Eine biochemische Analyse von Nierengewebe desselben Versuchstiers wurde bei Bedarf durch Abklemmen und Entfernen einer Niere vor der Perfusion ermöglicht. Fakultativ wurden weitere Organe wie Gehirn, Darmabschnitte und Leber entnommen.

Ein alternatives System zur Vorspülung und Perfusionsfixierung bestand aus einem Druckluftsystem (Abb. 1B). Es wurde Druckluft aus einem Wandanschluss mit einem Schlauch in einen 5 L-Drucklufttank geleitet. Der Perfusionsdruck des Druckluftsystems wurde bei Mäusen auf einen Druck von 200 mmHg und bei Ratten auf einen Druck von 220 mmHg eingestellt.

Neben den Perfusionsfixierungen wurden konventionelle Immersionsfixierungen durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die unfixierten Nieren wurden anschließend aus dem Versuchstier präpariert, auf Dentalwachs zugeschnitten und fixiert.

2.4. Verwendete Lösungen zur Vorspülung und Fixierung

Es wurden Fixierlösungen mit Formaldehyd für eine kombinierte morphologische und histochemische Darstellung (Kombinationsprotokolle; Protokoll 1 und 2) und mit Glutaraldehyd für eine rein morphologische Darstellung (Morphologie-Protokoll; Protokoll 3) verwendet. Detaillierte Angaben zu den Versuchstieren sind entsprechend der drei Protokolle (P1-3) zusammen mit ihren Variationen (V) aufgelistet (Tabelle 1).

2.4.1. Protokoll 1

Die Vorspüllösung bestand aus 0,1 M Na-Kakodylatpuffer (200 mOsmol) und 3% HES zur Anpassung des kolloidosmotischen Drucks, das einen Salzanteil von 92 mOsmol NaCl enthält. Die errechnete Gesamtosmolarität betrug 292 mOsmol. Die Fixierlösung wurde aus 0,063 M Na-Kakodylatpuffer (126 mOsmol), 0,0029 M Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 9 mOsmol), 2,7% HES (enthalten 83 mOsmol NaCl), 0,063 M Saccharose (63 mOsmol) und 1 M

Formaldehyd (3%; 1000 mOsmol) hergestellt; die errechnete Vehikelosmolarität betrug 281 mOsmol.

2.4.2. Variationen von Protokoll 1

Die Vehikelosmolarität von Protokoll 1 wurde auf ca. 250 mOsmol (P1 V1 in Tabelle 1) und auf ca. 220 mOsmol (P1 V2 in Tabelle 1) reduziert. Der kolloidosmotische Druck wurde durch eine auf 0,9% verringerte (P1 V3 in Tabelle 1) und auf 3,6% erhöhte (P1 V4 in Tabelle 1) HES-Konzentration variiert. Durch Verringerung der Formaldehydkonzentration auf 1,5% (P1 V5 und P1 V6 in Tabelle 1) wurde großer Einfluss auf die Gesamtosmolarität genommen. Fakultativ wurde der Fixierlösung 0,05% Glutaraldehyd zugesetzt (P1 V7 und P1 V8 in Tabelle 1). Es wurde weiterhin Archivmaterial (P1 V12 in Tabelle 1) ausgewertet, hier war im Vehikel der kolloidosmotische Druck auf eine HES-Konzentration von 7,2% (enthalten 221 mOsmol NaCl) erhöht worden; die errechnete Vehikelosmolarität betrug 283 mOsmol.

2.4.3. Protokoll 2

Die Vorspüllösung bestand aus 0,089 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 ; 178 mOsmol) und 0,048 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4 ; 96 mOsmol). Die errechnete Gesamtosmolarität betrug 274 mOsmol. Die Fixierlösung wurde aus dem gleichen Puffer unter Zusatz von 3% Formaldehyd (1000 mOsmol) hergestellt; die errechnete Vehikelosmolarität betrug 274 mOsmol.

2.4.4. Variationen von Protokoll 2

Die Vehikelosmolarität von Protokoll 2 wurde auf 200 mOsmol reduziert (P2 V1 in Tabelle 1; „200 mOsmol Schutzpuffer“ (25)). Weiterhin wurde ein alternativer Phosphatpuffer nur aus Dinatriumhydrogenphosphat angesetzt, mit einer Vehikelosmolarität von 200 mOsmol (P2 V2 in Tabelle 1; „200 mOsmol alternativ“) bzw. 230 mOsmol (P2 V3 in Tabelle 1; „230 mOsmol alternativ“). Fakultativ wurden der Fixierlösung von „200 mOsmol alternativ“ 0,05% Glutaraldehyd oder 0,05% Glutaraldehyd und 0,21% Pikrinsäure zugesetzt.

2.4.5. Protokoll 3

Die Vorspüllösung von Protokoll 3 wurde aus 0,1 M Na-Kakodylatpuffer (200 mOsmol), 1% HES (enthalten 31 mOsmol NaCl) und 0,0992 M Saccharose (99 mOsmol) hergestellt; die errechnete Gesamtosmolarität betrug 330 mOsmol. Die Fixierlösung wurde aus 0,1 M Na-Kakodylatpuffer (200 mOsmol), 1% HES (enthalten 31 mOsmol NaCl) und 2% Glutaraldehyd (200 mOsmol) hergestellt; die errechnete Vehikelosmolarität betrug 231 mOsmol.

2.4.6. Variationen von Protokoll 3

Die Vehikelosmolarität von Protokoll 3 wurde auf 323 mOsmol erhöht und ein erhöhter kolloidosmotischer Druck mit 4% HES verwendet (P3 V1 in Tabelle 1). Weiterhin wurde ohne Zusatz von HES und mit anderer Zusammensetzung der salinen Komponenten eine Vehikelosmolarität von 240 mOsmol (P3 V2 in Tabelle 1), 336 mOsmol (P3 V3 in Tabelle 1) und 150 mOsmol (P3 V4 in Tabelle 1) verwendet. Verstärkte Fixierlösungen wurden aus 5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd (P3 V5 in Tabelle 1) und aus 2,5% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd (P3 V6 in Tabelle 1) hergestellt.

2.5. Gewebepräparation

Gewebe wurde nach dem Zuschnitt für weitere Präparationen nachbehandelt. Zur Gewebepräparation wurden dabei Paraffineinbettung, Einfrieren für Gefrierschnitte, Kunstharzeinbettungen, Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu und die Präparation für konventionelle REM-Ansätze gezählt.

2.5.1. Paraffineinbettung

Ca. 3 mm dicke Nierenscheiben wurden bis zur Paraffineinbettung, mindestens aber über Nacht, in Formaldehyd-haltiger Fixierlösung (idR. die Fixierlösung der Perfusionsfixierung) nachfixiert. Die Paraffineinbettung wurde im Pathologischen Institut der Charité in einem Einbettungsautomaten durchgeführt.

2.5.2. Einfrieren für Gefrierschnitte

Ca. 3 mm dicke Nierenscheiben wurden über Nacht in einer Lösung von 0,6 M Saccharose und dem Puffer der Perfusionsfixierung (z.B. 0,1 M Na-Kakodylatpuffer; 800 mOsmol Gesamtosmolarität) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Nierenscheiben mit der späteren Schnittfläche nach oben auf Styroporblöckchen platziert. Mit einer langen Pinzette wurden die Styroporblöckchen in einem Plastik-Becherglas mit Stickstoffgekühltem Isopentan für ca. 3 s untergetaucht und anschließend für mindestens weitere 10 s an der Oberfläche schwimmen gelassen. Kryoröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und die Proben darin verschlossen. Die eingefrorenen Proben wurden bei -80 °C in einer Kühltruhe gelagert.

Tabelle 1. Übersicht der durchgeführten Perfusionsfixierungen und ihre Variationen.

Dunkelgrau; Zusammensetzung der Vorspüllösungen, Hellgrau; Zusammensetzung der Fixierlösungen.

Bezeichnung	T	n	Dunkelgrau			Hellgrau			Hellgrau		
			Puffer	% HES	Osm.	Puffer	% HES	Osm. Vehikel	Osm. Gesamt	% GA	% FA
P1	M	10	Ka	3	292	Ka	2,7	281	1286	-	3
P1 V1	M	1	Ka	3	242	Ka	2,7	249	1249	-	3
P1 V2	M	1	Ka	3	192	Ka	2,7	218	1218	-	3
P1 V3	R	1	Ka	1	231	Ka	0,9	279	1307	-	3
P1 V4	R	1	Ka	4	323	Ka	3,6	282	1382	-	3
P1 V5	R	1	Ka	1	231	Ka	0,9	279	807	-	1,5
P1 V6	R	1	Ka	4	323	Ka	3,6	282	782	-	1,5
P1 V7	M	3	Ka	3	292	Ka	2,7	281	1286	0,05	3
P1 V8 ¹	M	1	Ka	3	292	Ka	2,7	281	1286	0,05	3
P1 V9	R	1	Ka	1	330	Ka	0,68	279	2279	-	6
P1 V10	M	8	Ka	2	262	Ka	1,8	280	1280	-	3
P1 V11	R	7	Ka	5	354	Ka	4,5	287	1287	-	3
P1 V12	R	7	Ka	8	306	Ka	7,2	283	1283	-	3
P2	M	6	SP	-	274	SP	-	274	1274	-	3
P2 V1 ²	M	6	SP	-	274	SP	-	200	1200	-	3
P2 V2 ³	M	20	RA	-	280	PP	-	200	1500	0,05 ⁴	4
P2 V3 ⁵	M	4	RA	-	280	PP	-	230	1530	-	4
P3	B	10	Ka	1	330	Ka	1	231	431	2 ⁶	-
P3 V1	B	4	Ka	4	323	Ka	4	323	523	2	-
P3 V2	M	1	Ka	-	240	Ka	-	240	440	2	-
P3 V3	M	1	Ka	-	336	Ka	-	336	536	2	-
P3 V4	R	2	SÖ	-	150	SÖ	-	150	400	2,5	-
P3 V5	M	2	Ka	1	330	Ka	-	176	1976	5	4
P3 V6	M	2	Ka	1	330	Ka	-	176	1076	2,5	2
P3 V7	R	1	(Immersionsfixierung)			Ka	4	323	523	2	-

Abkürzungen: T; Tier, M; Maus, R; Ratte, B; beides (Maus und Ratte), Osm; Osmolarität, %GA; % Glutaraldehyd, %FA; % Formaldehyd, Ka; Na-Kakodylatpuffer, RA; Ringer-Acetat, SP; Phosphatpuffer (Schutzpuffer), PP; Phosphatpuffer (Dinatriumhydrogenphosphat), SÖ; Phosphatpuffer (nach Sörensen), P; Protokoll, V; Variation.

2.5.3. Epon-Einbettung

Ca. 1 mm dicke Nierenscheiben aus den Experimenten zur kombinierten morphologischen und histochemischen Darstellung (Protokoll 1 und 2) wurden über Nacht in 1,5% Glutaraldehyd, 1,5% Formaldehyd und 0,05% Pikrinsäure im jeweils verwendeten Puffer der Perfusionsfixierung eingelegt. Ca. 1 mm dicke Nierenscheiben aus den Experimenten zur rein morphologischen

¹ Hier wurde mit dem Ziel einer verbesserten Gehirnfixierung verkürzt perfusionsfixiert (5 min. statt 10 min.), weiterhin wurden die Gewebestücke für die anschließende Nachfixierung mit Glutaraldehyd dünner zugeschnitten.

² 200 mOsmol Schutzpuffer.

³ 200 mOsmol alternativ.

⁴ Fakultativ zugesetzt; 0,05% Glutaraldehyd (P2 V2/Glutaraldehyd) oder 0,05% Glutaraldehyd + 0,21% Pikrinsäure (P2 V2/ Glutaraldehyd + Pikrinsäure).

⁵ 230 mOsmol alternativ.

⁶ Fakultativ auch 2,5% Glutaraldehyd.

Darstellung (Protokoll 3) wurden über Nacht in Glutaraldehyd-haltiger Fixierlösung eingelegt (idR. die Fixierlösung der Perfusionsfixierung).

Die Nierenscheiben wurden in 0,1 M Na-Kakodylatpuffer ausgewaschen und zu Gewebeblöcken mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm zugeschnitten, die anschließend erneut in 0,1 M Na-Kakodylatpuffer ausgewaschen wurden. Die Gewebeblöcke wurden zur Osmierung 2 Std. nach Standardprotokoll in 2% Osmiumtetroxid in Aqua dest. oder mit reduziertem Osmium¹ in 1% Osmiumtetroxid + 0,08% Kaliumhexacyanoferrat ($K_3[Fe(CN)_6]$) + 0,1 M Na-Kakodylatpuffer eingelegt (59), in der aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und über Propylenoxid als Intermedium mit Epon 812 (2.9.; Tabelle 6) infiltriert. Die Gewebeblöcke wurden in Beem-Kapseln mit frischem Epon 812 eingeschlossen und bei 60 °C für 48 Std. in einem Wärmeschrank polymerisiert.

2.5.4. Einbettung in hydrophiles Kunstharz

Ca. 1 mm dicke Nierenscheiben wurden über Nacht in 3% Formaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd im jeweils verwendeten Puffer der Perfusionsfixierung eingelegt. Am nächsten Tag wurden die Nierenscheiben in Aufbewahrungspuffer (Puffer der Perfusionsfixierung mit Zugabe von 0.1% Natriumazid) ausgewaschen und zu Gewebeblöcken mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm zugeschnitten. Die Entwässerung mit Ethanol und Infiltration mit hydrophilem Kunstharz (*London resin; LR White*) wurde mit einem Tieftemperatur-Einbettungssystem zur Gefriersubstitution (Leica EM AFS) über einen Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt. Die Blöcke wurden in Gelatine kapseln eingeschlossen und unter UV-Licht (Wellenlänge 350 nm) über 48 Std. bei Raumtemperatur polymerisiert.

2.5.5. Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu

Ca. 1 mm dicke Nierenscheiben wurden in der Fixierlösung der Perfusionsfixierung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank nachfixiert. Am nächsten Tag wurden die Nierenscheiben in einem Aufbewahrungspuffer (Puffer der Perfusionsfixierung mit Zugabe von 0,02% Natriumazid) ausgewaschen und bis zur weiteren Verwendung, mindestens aber über Nacht, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Nierenscheiben wurden mit einer Rasierklinge zu Gewebeblöcken mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm zugeschnitten und mit 2,3 M Saccharoselösung (gelöst in Aqua dest.) über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank infiltriert. Die Gewebeblöcke wurden einzeln auf Aluminium-Pins platziert und überschüssige Saccharoselösung mit Filterpapier abgesaugt. Die Aluminium-Pins wurden in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in Kryoröhrchen in einem Vorratstank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

¹ Es findet eine chemische Reduktion durch das Kaliumhexacyanoferrat statt.

2.5.6. Konventionelle REM-Ansätze

Gewebeblöcke wurden bis zur aufsteigenden Ethanolreihe entsprechend der Epon-Einbettung behandelt und in einem Kritisch-Punkt-Trockner mit flüssigem CO₂ getrocknet. Hierfür wurden die Gewebeblöcke in kleinen Styroporboxen verschlossen. Die Kammer des Kritisch-Punkt-Trockners wurde mehrmals mit flüssigem CO₂ gespült und mit einem Wasserdurchlaufsystem auf den Siedepunkt von CO₂ erwärmt (31,8 °C bei einem Druck von 73,8 bar). Der Druck wurde über einen Zeitraum von 30 min. abgelassen. Es wurden jeweils 4-5 der getrockneten Gewebeblöcke mit doppelseitigem Kohlenstoff-Klebeband auf einen Aluminium-Probenteller geklebt. Die Proben wurden mit einem *Sputter coater* für 1 min. bei einer Stromstärke von 30 mA und einem Unterdruck von 5×10^{-2} mbar mit Gold-Palladium beschichtet.

2.6. Schnittpräparation

Gewebe wurde im Rahmen der Schnittpräparation für immunhistochemische/immunzytochemische Techniken und für rein morphologische licht- und elektronenmikroskopische Techniken vorbereitet.

2.6.1. Paraffinschnitte

Paraffinblöcke wurden an einem Rotationsmikrotom mit Einmalklingen geschnitten. 3-4 µm dünne Schnitte wurden auf einem kalten Wasserbad gesammelt, mit einem Objektträger aufgezogen und auf einem 48 °C warmen Wasserbad gestreckt.

2.6.2. Gefrierschnitte

Eingefrorene Gewebeblöcke wurden mit Kryogel bei -25 °C in einem Kryostaten auf Probenteller aufgefroren. 2-5 µm dünne Gefrierschnitte wurden bei -25 °C mit Einmalklingen geschnitten. Ein vorgekühlter Superfrost Plus Objektträger wurde plan auf die Gefrierschnitte gepresst, um diese aufzunehmen. Mit Daumendruck auf die Unterseite des Objektträgers wurden die Gefrierschnitte erwärmt und dadurch gestreckt. Die Gefrierschnitte wurden außerhalb des Kryostaten für mindestens 10 min. an der Luft angetrocknet.

2.6.3. Semidünnschnitte

Polymerisierte Eponblöcke wurden mit einer Mikrotomklinge aus ihren Beem-Kapseln gelöst, in einen Blockhalter eingespannt, unter einem Stereomikroskop mit einer Mikrotomklinge zu einer Pyramide getrimmt und anschließend an einem Rotationsmikrotom für Semidünnschnitte oder einem Ultramikrotom geschnitten. Der Anschnitt erfolgte mit einem Glasmesser (Schnittdicke 0,5-

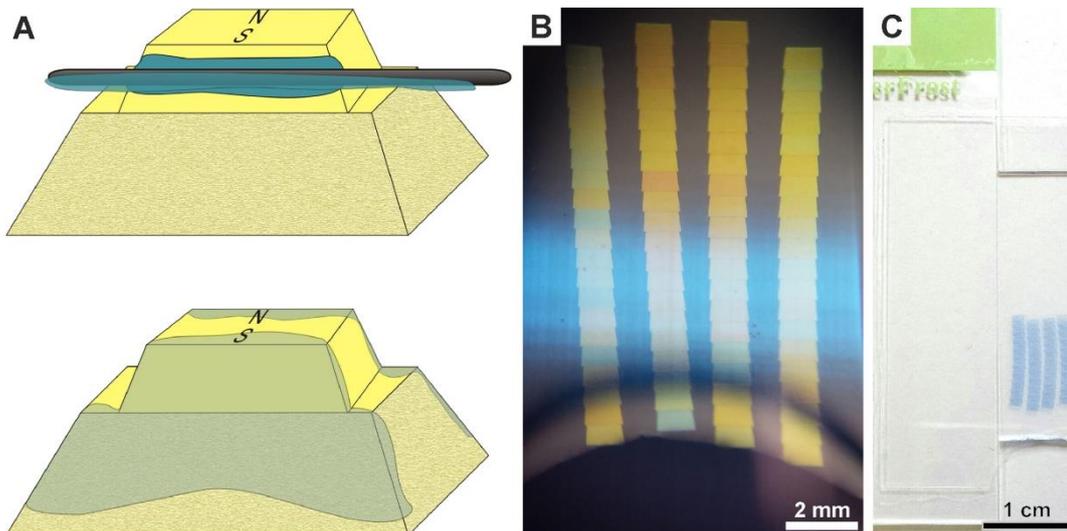


Abbildung 2. Anfertigung von Semidünnschnittserien.

Ein Eponblock wurde mit einem Trim 20° oder Trim 45° Diamantmesser zu einer Pyramide mit paralleler Ober (N)- und Unterkante (S) getrimmt (A); eine Pattlösung, 1:10 in Xylol verdünnt, wurde mit einer Stecknadel dünn auf beide Kanten aufgetragen. Um eine gleichmäßig dünne Beschichtung zu erreichen, wurde die Lösung großflächig – auch auf den nur grob getrimmten Bereich (dunkelgelb) – verteilt. 4 Schnittbänder (B; verwendete Schnittdicke 300 nm) wurden an der Grenze zwischen Wasser und Objektträgerstreifen positioniert. Objektträgerstreifen mit Semidünnschnitten wurden für spätere Verwendung am Lichtmikroskop an einen weiteren Objektträgerstreifen geklebt (C).

1 µm), die Semidünnschnitte wurden daraufhin mit einem Histo Diamantmesser angefertigt (Schnittdicke 0,5 µm). Die Semidünnschnitte wurden auf dem Wasserbad, das im Diamantmesser integriert ist, gesammelt und mit einem rund geschmolzenen Glasstab auf einen Tropfen Aqua dest. auf einen Objektträger übertragen. Auf Wärmeplatten wurden die Semidünnschnitte dann bei 120 °C kurz gestreckt, bei 80 °C für 5 min. angetrocknet und für weitere 15 min. bei 120 °C stabilisiert. Die Färbung mit Richardsons Färbelösung erfolgte bei 80 °C für 1 min., anschließend wurden die Semidünnschnitte mit Aqua dest. aus einer Spritzwasserflasche abgespült und getrocknet. Danach wurden die Semidünnschnitte mit Vitro-Clud Einschlussmedium unter Deckglas eingedeckt. Am Lichtmikroskop wurden dann Gewebebereiche von Interesse ausgewählt und die jeweiligen Eponblöcke auf diese Bereiche zur Anfertigung von Ultradünnschnitten zugetrimmt.

Zur hochauflösenden, lichtmikroskopischen dreidimensionalen Rekonstruktion von Nierengewebe wurden Semidünnschnittserien angefertigt (lichtmikroskopische *Array Tomographie*; LM-*Array Tomographie*¹). Hierbei wurde nach einem Protokoll von Blumer (60) verfahren, welches für die Verwendung eines kleinen Diamantmessers angepasst wurde (Abb. 2A-C). Objektträger wurden hierfür mit einem Glasschneider in ca. 10x20 mm große Streifen geschnitten und in einem *Sputter coater* durch Glimmentladung vor Gebrauch frisch

¹ Array Tomographie; Schnittpräparate werden hier üblicherweise auf hartes Trägermaterial (z.B. Objektträger oder Silizium) als Reihen bzw. Gruppen (*Array*) aufgezogen und können licht- und elektronenmikroskopisch sowie zweidimensional und dreidimensional (z.B. Schnittserien) ausgewertet werden.

hydrophilisiert. Hierfür wurde bei einem Unterdruck von 2×10^{-1} mbar und mit Argon als eingeleitetes Gas für 20 s bei 6,5 mA die Glimmentladung durchgeführt. Alternativ wurden Glasstreifen durch Lagerung in Aqua dest. (mindestens 24 Std.) hydrophilisiert. Eponblöcke wurden mit Trim 20° oder Trim 45° Diamantmessern zu einem Trapez mit exakt parallelen Ober- und Unterkanten getrimmt. Ein Gemisch aus Pattex und Xylol (1:10, frisch zubereitet) wurde mit einer Stecknadel auf Ober- und Unterkante des getrimmten Eponblocks aufgetragen und für 10 min. getrocknet. Auf die Unterkante wurde eine zweite Schicht aus Pattex-Xylol aufgetragen und für 15 min. getrocknet (Abb. 2A). Die hydrophilisierten Glasstreifen wurden dann schräg in das Wasserbecken eines UltraSemi 35° Diamantmessers gelegt und der Wasserstand auf ein niedriges Niveau eingestellt. Fertige Semidünnschnittbänder, jeweils bestehend aus 10-20 Einzelschnitten, wurden einzeln oder in Gruppen auf dem Glasstreifen ausgerichtet und durch weitere Absenkung des Wasserspiegels aufgezogen (Abb. 2B). Die Glasstreifen wurden dann auf einer Wärmeplatte bei 55 °C gestreckt und angetrocknet. Die Schnittbänder wurden nach dem gleichen Protokoll wie einzelne Semidünnschnitte gefärbt. Die Glasstreifen mit den gefärbten Schnittbändern wurden einzeln mit einem längs halbierten Objektträger durch Vitro-Clud Einschlussmedium unter einem Deckglas verbunden, um sie später in konventionelle Kreuztische von Lichtmikroskopen einspannen zu können (Abb. 2C).

2.6.4. Befilmung von TEM-Netzchen

Als Netzchen (*Grids*) wurden Schlitz-*Grids* und 75 Mesh *grids*¹ aus Kupfer sowie Nickel gewählt. Die generell stabileren Schlitz-*Grids* wurden vor der Befilmung gründlich gesäubert. Hierfür wurden sie in einem 15 ml Becherglas in einem Ultraschallbad jeweils 3x für 2 min. in Aceton, 100% unvergälltem Ethanol und Aqua dest. gereinigt und anschließend in einer Glas-Petrischale auf Filterpapier getrocknet. Zur Wiederbenutzung von früher befilmten, gebrauchten Schlitz-*Grids* wurden diese zu Beginn der Reinigungsprozedur zusätzlich 3x für 2 min. in Chloroform gesäubert. Für die Befilmung wurde entweder eine 1% Formvarlösung oder eine 0,65% Pioloformlösung in Chloroform verwendet. Zur Herstellung der Lösungen wurde der Kunststoff direkt in eine Glasflasche gewogen und mit Chloroform aufgefüllt, 3-5 Std. in der verschlossenen Glasflasche bei ca. 120 Umdrehungen/ min. gerührt und die Flasche über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die fertigen Lösungen wurden dann im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und vor Verwendung mindestens 3 Std. auf Zimmertemperatur erwärmt, um eine Verunreinigung der Lösung durch Wasserkondensation zu vermeiden.

Zur Herstellung des Films wurden Superfrost Objektträger verwendet. Sie wurden in 100% unvergälltem Ethanol getaucht und mit einem Kimberly-Clark Tuch getrocknet, anschließend bis zu 15x mit trockener Kernseife bestrichen und diese mit einem Baumwolltuch auf einer stabilen

¹ Die vorangestellte Zahl beschreibt bei *Mesh grids* die Anzahl der Maschen pro Zoll (1 Zoll entspricht 2,54 cm).

Unterlage und Filterpapier minutenlang zu einer homogenen Schicht verrieben. Sichtbare Staubpartikel wurden mit einem Kimberly-Clark Tuch entfernt. Der Objektträger wurde dann mit einer Metallklemme ca. 5 cm tief in einen die Befilmungslösung enthaltenden Messzylinder eingetaucht, bei gleichmäßiger Bewegung aus der Lösung herausgezogen, für weitere 15-25 s in der Gasphase des verschlossenen Messzylinders aufbewahrt und dann außerhalb des Messzylinders staubgeschützt für mindestens 1 min. getrocknet. Die Dicke des Films wurde durch die Geschwindigkeit, mit welcher der Objektträger aus der Lösung gezogen wurde (schnell= dick) und die Zeit, die er in der Gasphase belassen wurde (kurz= dick), bestimmt. Der Film auf der mit Kernseife behandelten Seite des Objektträgers wurde mit einer Rasierklinge an den langen Seiten ca. 2-3 mm von der Kante entfernt eingeritzt. Der Film an der Kante der kurzen Seite wurde vorsichtig – um die Bildung von Glassplintern zu reduzieren – abgeschabt und zusätzlich 3 mm von der Kante entfernt eingeritzt. Der Objektträger wurde, mit der behandelten Seite nach oben, in einem Winkel von 30-45° langsam in ein Wasserbad mit Aqua dest. eingetaucht. Zur Beurteilung des Films, auch bereits während des Ablösens vom Objektträger, wurde eine schwarze Unterlage für das Wasserbad verwendet und mit reflektierendem Licht gearbeitet. Die *Grids* wurden mit einer feinen Gegendruckpinzette mit der glatten Seite nach unten auf intakte, grau bis silber erscheinende Areale des Films aufgelegt. Die *Grids* wurden dann mit einem Parafilmstreifen, der vorsichtig auf die *Grids* gelegt wurde, aus dem Wasser gehoben und in einer Petrischale staubgeschützt getrocknet.

2.6.5. Ultradünnschnitte für TEM-Ansätze

Für die Anfertigung von Ultradünnschnitten wurden die getrimmten Eponblöcke am Ultramikrotom mit Ultra 35° oder UltraSemi 35° Diamantmessern bei einer Schnittdicke von ca. 200 nm angeschnitten. Bei 50-70 nm Dicke wurde anschließend ultradünn geschnitten. Anhand von Interferenzfarben wurden die Ultradünnschnitte nach ihrer Dicke ausgewählt (61). Mit einer Schneidgeschwindigkeit von 1 mm/s und einem Freiwinkel von 6° ließen sich gute Ultradünnschnitte erzeugen, bei schwer zu schneidenden Proben wurden diese Parameter angepasst. *LR-White*-Blöcke wurden mit niedrigerem Wasserstand als Eponblöcke geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit einer Wimper an einem Zahnstocher auf dem Wasserbad bewegt. Ultradünnschnitte mit Kompressionen, erkennbar an einer matten und faltigen Oberfläche, wurden mit Xyloidampf gestreckt, bis sie eine glatte und glänzende Oberfläche hatten. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte auf die *Grids* aufgezogen. Für speziell hochauflösende Untersuchungen wurden die Ultradünnschnitte auf unbefilmte, hexagonale 300 *Mesh grids* aus Nickel aufgezogen. Für Übersichtsaufnahmen oder schwer zu lokalisierende Strukturen wurden Ultradünnschnitte auf befilmte Schlitz-*Grids* (Kupfer oder Nickel) oder befilmte quadratische 75 *Mesh grids* (Nickel) aufgezogen. Zur Reduktion von Aufnahme-bedingter Faltenbildung wurden die *Grids* fakultativ mit einem *Sputter coater* durch Glimmentladung

hydrophilisiert (s.u.). Die aufgezogenen Ultradünnschnitte wurden staubgeschützt in einer Gridbox zum Trocknen gelagert.

2.6.6. Semidünnschnitte für Elektronentomographie

Für elektronentomographische Analysen wurden 200-300 nm dicke Semidünnschnitte mit einem UltraSemi 35° Diamantmesser angefertigt. Die Schneideparameter entsprachen denen der Ultradünnschnitte für die konventionellen TEM-Ansätze. Die Semidünnschnitte wurden mit Xyloldampf gestreckt, bis sie eine glatte und glänzende Oberfläche hatten und auf *Grids* aufgezogen. Für hohe Stabilität sowie Auflösung wurden bevorzugt unbefilmte 300 *Mesh grids* verwendet. Alternativ wurden befilmte Schlitz-*Grids* verwendet, um größere Schnittareale untersuchen zu können.

2.6.7. Ultradünnschnitte für TEM-Nanotomie

Es wurden Ultradünnschnitte wie für die konventionellen TEM-Ansätze angefertigt und für barrierefreie Darstellungen von großen Ultradünnschnittarealen von bis zu 300x300 µm auf Schlitz-*Grids* (Kupfer oder Nickel) aufgezogen. Zur Reduktion von Faltenbildung im Rahmen der Aufnahme und Antrocknung der Ultradünnschnitte wurden Schlitz-*Grids* 1 bis 3 Tage nach Befilmung mit Pioloform mit einem *Sputter coater* durch Glimmentladung hydrophilisiert (10 s bei 6,5 mA) und am gleichen Tag verwendet. Die Antrocknung der Ultradünnschnitte auf den *Grids* wurde stereomikroskopisch kontrolliert; eine Faltenbildung konnte hierdurch in den meisten Fällen bereits ausgeschlossen werden (Abb. 3A-D).

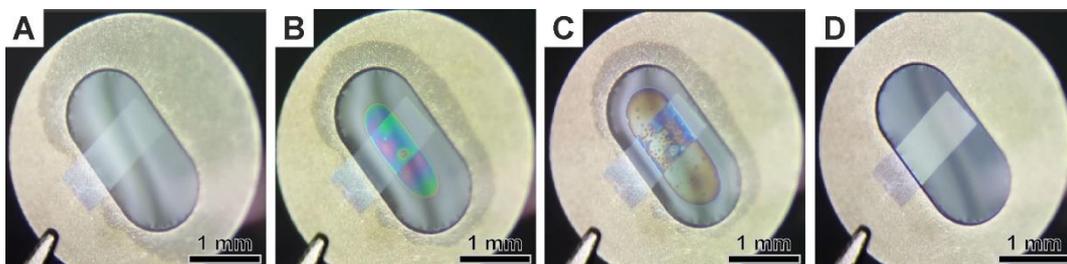


Abbildung 3. Anfertigung von Ultradünnschnittpräparaten für TEM-Nanotomie.

Für die TEM-Nanotomie wurden Ultradünnschnitte auf Pioloform-befilmte, hydrophilisierte Schlitz-*Grids* aufgezogen (A); für eine erhöhte Stabilität und erleichterte Positionierung wurden Ultradünnschnitte fakultativ überlappend auf einen oder beide Ränder der *Grids* aufgezogen. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde der Antrocknungsvorgang beobachtet, es haben sich auf der hydrophilisierten Oberseite – zentral beginnend – Newton-Ringe ausgebildet (B). Beim Antrocknungsvorgang konnten mikroanatomische Strukturen wie Nierentubuli differenziert werden (C), weiterhin konnten kleinste Verunreinigungen lokalisiert werden. Eine Faltenbildung konnte während dieser stereomikroskopischen Kontrolle weitestgehend ausgeschlossen werden (D).

2.6.8. Ultradünnschnitte für REM-Array Tomographie

Deckgläser wurden mit einem Glasschneider und einem Lineal in ca. 3x5 mm große Stücke geschnitten und in einem 50 ml Becherglas mit Aqua dest. gesammelt. Die Deckglasstücke wurden für 1 min. in 100% Ethanol (unvergällt) und anschließend für 1 min. in Aceton gereinigt und dann auf Rundfilter getrocknet. Die Glasstücke wurden am Tag der weiteren Präparation frisch mit Kohlenstoff bedampft, bis sie eine dunkelbraune, spiegelnde Oberfläche hatten. Für die Kohlenstoffbedampfung wurden 2-3 Paare Kohlenstoffäden in einen *Sputter coater* eingespannt und ein Unterdruck von 5×10^{-5} mbar aufgebaut. Es wurde mit der *Flash* Funktion (3-6 Stöße für je 1-2 s) die Kohlenstoffbedampfung durchgeführt. Die Glasstücke wurden mit der bedampften Seite nach oben staubgeschützt in einer Glas-Petrischale gelagert. Fakultativ wurden die Deckgläser mit einem *Sputter coater* durch zusätzliche Glimmentladung hydrophilisiert, um eine Aufnahme-bedingte Faltenbildung der Ultradünnschnitte zu reduzieren (Abb. 4A).

Alternativ wurden als leitfähiges Substrat 5x5 mm große Siliziumträger mit einer glatt geätzten Seite verwendet. Die Siliziumträger wurden mit Aceton und einem Kimberly-Clark Tuch abgewischt, anschließend mit einer Pinzette mehrmals in ein Becherglas mit Aceton eingetaucht und auf Rundfilter in einer Petrischale getrocknet. Zur Hydrophilisierung der glatt geätzten Oberseite wurde mit einem *Sputter coater* eine Glimmentladung für 60 s durchgeführt (Abb. 4B). Die Aufnahme von einzelnen Ultradünnschnitten oder Schnittbändern auf Kohlenstoffstoff-bedampften Deckgläsern und Siliziumträgern wurde wie für die TEM-Grids durchgeführt.

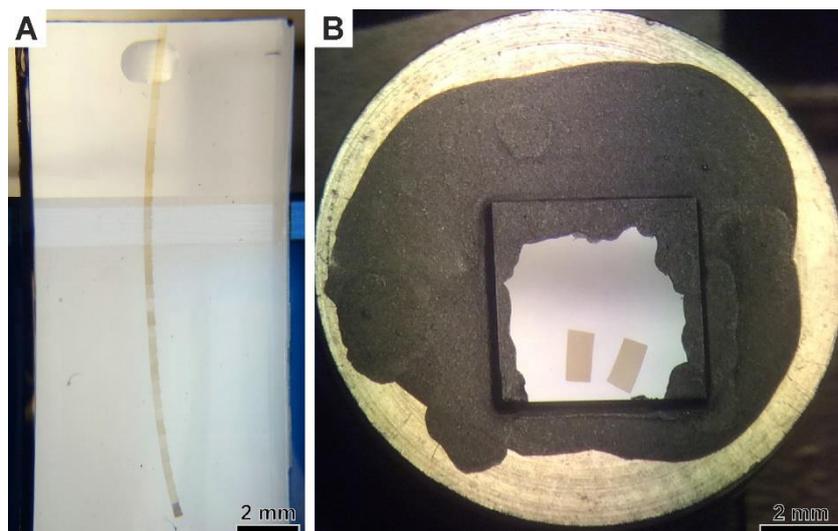


Abbildung 4. Anfertigung von Ultradünnschnittpräparaten für REM-Array Tomographie.

Für die REM-Array Tomographie wurden Ultradünnschnitte entweder auf Kohlenstoff-bedampfte Glasträger (A; Schnittserie mit 34 Einzelschnitten, Schnittdicke 50 nm) oder Siliziumträger (B; 2 Einzelschnitte, Schnittdicke 50 nm) aufgezogen. Das Trägermaterial wurde mit Leitsilber auf einen Aluminium-Probenteller aufgeklebt (B).

2.6.9. Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Vor der Kontrastierung mit 5% Uranylacetat (gelöst in 50% Ethanol; 2.9.; Tabelle 6) und Bleizitrat (nach Reynolds; 2.9.; Tabelle 6) wurde eine Vorbehandlung mit 1% wässrigem Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zur Reduktion von Präzipitaten durchgeführt (53). Diese Lösungen wurden kurz vor Verwendung filtriert und auf Parafilm, der in Glas-Petrischalen ausgelegt war, aufgetropft. Waschschritte für die *Grids* wurden wie folgt durchgeführt: Die *Grids* wurden einzeln mit einer selbstschließenden Pinzette gefasst und in schneller Bewegung 30x in Aqua dest. im 15 ml Becherglas eingetaucht und der Vorgang in zwei weiteren Bechergläsern wiederholt. Zur Bindung von CO₂ wurden Natriumhydroxid (NaOH)-Plättchen in der Glas-Petrischale mit Bleizitrat platziert, um die Bildung von Bleikarbonat-Präzipitaten (PbCO₃) zu vermeiden (62). Das Aqua dest. für die Waschschritte der Kontrastierlösungen wurde fakultativ kurz vor der Kontrastierung 5 min. lang abgekocht und bei einer Temperatur von ca. 50 °C verwendet, um ebenfalls eine CO₂-bedingte Präzipitatbildung zu vermeiden. Die *Grids* wurden mit der Schnittseite nach oben in Tropfen mit den verschiedenen Lösungen platziert. Es wurde für 4-5 min. in EDTA vorbehandelt, für 4-12 min. in Uranylacetat und dann für 1,5-3,5 min. in Bleizitrat kontrastiert. Nach jedem Schritt wurden die *Grids* gewaschen.

Ultradünnschnitte für die REM-Array Tomographie wurden auf ähnliche Weise kontrastiert. Kleine Glasstücke wurden mit der Schnittseite auf die Tropfen gelegt. Auf größere Glasstücke (Deckglas oder Objektträger) und Siliziumträger wurden die Lösungen aufgetropft. Die Glasstücke und Siliziumträger wurden entweder mit Leitsilber oder mit doppelseitigem Kohlenstoffklebeband auf Aluminium-Probenteller geklebt (Abb. 4B). Zur besseren Leitfähigkeit der Präparate wurde Leitsilber am Rand des Trägermaterials aufgetragen.

2.6.10. Immunhistochemie

Für immunhistochemische Markierungen wurden Paraffinschnitte und Gefrierschnitte verwendet. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe in Aqua dest. und anschließend in Zitratpuffer überführt. Die Gefrierschnitte wurden nach Lufttrocknung direkt in Zitratpuffer gestellt. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurden alle Schnitte mit 5% Milchpulver in PBS als Blockierlösung inkubiert. Der Primärantikörper wurde in Blockierlösung gelöst, auf die Schnitte aufgebracht und für 2 Std. bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 1-2 Std. mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Cy2, Cy3; Dianova) inkubiert. Verwendete Primärantikörper waren Annexin A1 (*rabbit; LS-C20640*, Lifespan Bioscience, Seattle, USA) und Natrium/ Phosphat Kotransporter (*rabbit anti-NaPi-IIa*). Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und filamentöses Aktin (f-Aktin) mit Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

2.6.11. Immunzytochemische Goldmarkierungen an hydrophilen Kunstharzschnitten

LR-White Ultradünnschnitte auf *Grids* wurden für 30 min. in Mikrotiterplatten mit 5% Milchpulver in 0,1 M PBS geblockt. Anschließend wurde die Lösung mit Filterpapier abgesaugt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Primärantikörper, verdünnt in 5% Milchpulver in PBS, in Mikrotiterplatten für eine Stunde bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die Ultradünnschnitte wurden dann in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit passendem Sekundärantikörper inkubiert, an den 1, 5 oder 10 nm große Goldpartikel (BBInternational) gebunden waren. Anschließend wurde der Sekundärantikörper für 15 min. mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS fixiert und die Ultradünnschnitte dann in PBS gewaschen. Das Signal wurde fakultativ mit einer Silberreaktion für eine bessere Detektion verstärkt. Hierfür wurden zwei fertige Lösungen aus einem Silbervergrößerungskit (Plano) mit Gummi Arabicum im Verhältnis 1:1:3 gemischt; für Semidünnschnitte wurde die Dauer lichtmikroskopisch kontrolliert, für Ultradünnschnitte wurde die Dauer empirisch ermittelt und lag bei ca. 2-5 min. Die Ultradünnschnitte wurden dann für 15 min. bei Raumtemperatur mit Phosphorwolframsäure kontrastiert und mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden sie für 15 min. bei Raumtemperatur mit 5% wässrigem Uranylacetat kontrastiert, mit Aqua dest. gewaschen und dann getrocknet.

2.6.12. Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu

In flüssigem Stickstoff tiefgekühlte Proben wurden in der Kammer eines Ultramikrotoms mit Kryo-Aufsatz auf -80 °C erwärmt. Aluminium-Pins mit aufgefrorener Probe wurden in den Probenhalter des Mikrotoms eingespannt und die Proben bei einer Temperatur von -80 °C, einer Schneidegeschwindigkeit von 50 mm/s und einer Schnittdicke von 300 nm mit einem Trim 45° Diamantmesser zu einer Pyramide mit parallelen, gleich langen Kanten getrimmt. Für Ultradünnschnitte eingesetzte Glasmesser wurden aus Glasleisten an einem Glasbrecher gebrochen und unter einem Stereomikroskop hinsichtlich ihrer Qualität kontrolliert. Bänder von Ultradünnschnitten (Schneidegeschwindigkeit von 1 mm/s, 70-100 nm Schnittdicke) wurden mit einer Wimper auf dem Messerrücken gesammelt. Eine Drahtschlinge wurde in eine *Pick up* Lösung aus 2% Methylzellulose und 2,3 M Saccharose, 1:1 gemischt, getaucht und in der Kammer des Mikrotoms heruntergekühlt, bis in der Mitte der Drahtschlinge die Lösung milchig-trübe wurde. In diesem Moment wurde in einer schnellen, geraden Bewegung die Drahtschlinge auf die Ultradünnschnitte gedrückt. Die *Pick up* Lösung wurde außerhalb der Kammer bei Raumtemperatur erwärmt und die Ultradünnschnitte auf ein befilmtes *Mesh grid* übertragen und bis zur Weiterbehandlung bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert.

2.6.13. Immunzytochemische Goldmarkierungen an Kryo-Ultradünnschnitten

Grids mit Ultradünnschnitten wurden gründlich in PBS gewaschen und 30 min. in 5% Milchpulver in PBS geblockt. Die weiteren Schritte bis zur Fixierung des Sekundärantikörpers mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS entsprachen denen der immunzytochemischen Goldmarkierung der *LR-White* Ultradünnschnitte. Die Ultradünnschnitte wurden danach mit Aqua dest. gespült und 3 min. in 5% wässrigem Uranylacetat bei 4 °C im Kühlschrank, dann für 3 min. mit einer Mischung aus 0,5% Uranylacetat, 2% Methylzelluloselösung und Aqua dest. im Verhältnis 1:7:2 im Kühlschrank kontrastiert. Anschließend wurden die *Grids* mit Drahtschlingen aus der Methylzelluloselösung aufgenommen und überschüssige Lösung mit Filterpapier aufgesaugt. Dieser Vorgang bestimmt die Dicke des verbleibenden Methylzellulose-Films und damit die Stabilität und Elektronendichte der Ultradünnschnitte. Die *Grids* wurden in den Drahtschlingen zum Trocknen aufgestellt und anschließend mit einer feinen Pinzette herausgelöst.

2.7. Mikroskopische Verfahren

Eine optimierte Darstellung von Gewebe auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene wurde durch gezielte Auswahl und ggf. Optimierung und Anpassung von mikroskopischen Verfahren erreicht.

2.7.1. Konventionelle LM-Ansätze

Histologische Präparate und Semidünnschnittserien wurden an einem Lichtmikroskop im Hellfeldmodus untersucht. Fotos wurden mit einer Zeiss CCD-Kamera und dem Programm AxioVision gemacht. Beleuchtungseinstellungen wurden durch Köhlern angepasst und die Aperturblende am Kondensator auf eine möglichst weite Position eingestellt. Nach jedem Objektivwechsel zur Fotografie wurde eine *Shadingkorrektur* zur Ausblendung von Artefakten im Strahlengang und inhomogener Beleuchtung durchgeführt; dafür wurde ein Bereich ohne Strukturen, aber mit Deckglas bedeckt, gewählt und bis zum Verschwinden von präparateigenen Artefakten defokussiert. Nach der *Shadingkorrektur* wurden ein manueller Weißabgleich und Helligkeitseinstellungen durchgeführt. Semidünnschnittserien wurden manuell fotografiert und durch Drehung der Kamera oder des Kreuztischs eine grobe Korrektur der Rotation vorgenommen. Fakultativ wurde durch Mittelwertaufnahmen das Hintergrundrauschen reduziert, was besonders bei hochauflösenden Aufnahmen (63x planapochromatisches Objektiv mit numerischer Apertur von 1,4) die Qualität der Rohbilder im Sinne einer Rauschreduktion verbesserte.

2.7.2. Konfokalmikroskopie

Schnitte mit immunhistochemischen Markierungen wurden an einem Zeiss *Laser scanning microscope* (Exciter 5) und dem Programm Zen untersucht. Die Markierungen wurden im

konventionellen Fluoreszenzmodus kontrolliert und Bereiche für konfokale Aufnahmen ausgewählt. Scan-Parameter der verwendeten Kanäle wurden entsprechend der Signalintensität aufeinander abgestimmt. Es wurde mit einem mittleren *Scanspeed* von 2-4, einer Bildgröße von 2048x2048 Pixel und einem Vergrößerungsfaktor von 0,5-2,5x gearbeitet.

2.7.3. Konventionelle TEM-Ansätze

Ultradünnschnitte wurden an einem Zeiss 906 und einem FEI Tecnai G2 mit Beschleunigungsspannungen von 80-200 KV untersucht. Am Zeiss 906 wurden analoge Filmnegative verwendet; es wurden pro Durchgang 40 Planfilme bei Rotlicht in Halterungsbleche gesteckt und diese in eine Filmkassette einsortiert. Nach Einschleusen der Filmkassette in das TEM wurde das Präparat am Leuchtschirm untersucht. Zur Fotografie wurde die kleinstmögliche Objektivblende für den besten Kontrast ausgewählt. Die Intensität des Elektronenstrahls wurde für Fotos auf einen Zielbelichtungswert von 1 s eingestellt. Die belichteten Negative wurden bei Rotlicht aus dem TEM ausgeschleust und in einer lichtundurchlässigen Verpackung in die Entwicklerkammer getragen. Unter Rotlicht wurden dort die Negative in Drahtgestelle eingespannt und für ca. 6 min. in ein Entwicklerbad gestellt. Zur Reduktion von Entwicklerartefakten (inhomogene Entwicklung; Streifen) wurden die Drahtgestelle jede Minute 10x vertikal im Entwicklerbad bewegt. Die Negative wurden zum Auswaschen 30x in eine Wanne mit fließendem Leitungswasser eingetaucht und dann für 6 min. in ein Fixierbad gestellt. Die Negative wurden dann – nach 10x Eintauchen in Leitungswasser – zum Auswaschen für 15 min. in die Wanne mit fließendem Leitungswasser gestellt und anschließend in einem belüfteten Trockenschrank für mindestens 30 min. bei 60 °C getrocknet. Die Negative wurden vorzugsweise direkt nach dem Herauslösen aus den Drahtgestellen einzeln in Negativhüllen einsortiert, um mechanische Schäden durch Aneinanderreiben der empfindlichen Gelatineoberfläche zu vermeiden. Die Negative wurden mit einem Flachbettscanner und Abstandshaltern, zur Vermeidung von Newton-Ringen, bei einer Auflösung von 900 dpi eingescannt.

Am FEI Tecnai G2 wurde mit einer Veleta CCD-Kamera (2kx2k Chipgröße¹) zum Suchen mit schnellem Livebild und mit einer Eagle CCD-Kamera (4kx4k Chipgröße²) für hochauflösende Bilder³ gearbeitet. Das FEI Tecnai G2 wurde mit dem Programm User Interface gesteuert. Die Kameras wurden mit dem Programm Tecnai Imaging & Analysis bedient. Es wurde in regelmäßigen Abständen die *Gain reference* der CCD-Kameras durch Bilder überprüft, indem "leere" Areale ohne Ultradünnschnitt und ohne Stützfilm fotografiert wurden.

¹ 2k entspricht einer Chipgröße von etwa 2000 Pixel.

² 4k entspricht einer Chipgröße von etwa 4000 Pixel.

³ Der Begriff „Auflösung“ bezieht sich in meiner Arbeit auf optische Auflösung (als Grundlage hierfür auch die präparationsbedingt notwendige Abgrenzbarkeit durch z.B. Grauwertunterschiede von Strukturen) und die Größe von digitalen Aufnahmen (z.B. Pixelanzahl von aufgenommenen Bildern).

2.7.4. Konventionelle REM-Ansätze

Präparate wurden an einem Zeiss DSM 982 untersucht. Der Probenstisch wurde in X/Y/Z-Achse manuell an Drehschrauben bewegt. Strukturen wurden mit *Scanspeed 1* (schneller Scan für Livebild) gesucht und mit *Scanspeed 3-4* (langsamer Scan für hohe Qualität) und einer Bildgröße von 1280x1024 oder 2560x2048 Pixel aufgenommen.

2.7.5. LM-Array Tomographie

Bildstapel von neonatalen, adulten und pathologischen adulten Glomeruli wurden in das jpg-Dateiformat konvertiert und mit dem Programm Bulk Rename Utility in aufsteigender Zahlenfolge nummeriert. In einer Textdatei wurden alle Dateinamen eines Bildstapels gespeichert und diese über den Import der Textdatei in Amira 5 geöffnet. Die Bilder wurden automatisch ausgerichtet und zu einem neuen Bildstapel exportiert. Es wurde durch manuelle Segmentierung eine Modellierung von glomerulären Kapillarlumina und fakultativ weiteren Strukturen (Macula densa, proximaler Tubulus, interstitielle Kapillaren) durchgeführt. Ein Datensatz von modellierten Kapillarschlingen eines adulten Glomerulus wurde in das stl-Dateiformat exportiert und mit einem 3D-Drucker im Filamentverfahren gedruckt (www.youin3d.de). Stützstrukturen wurden manuell mit einer Pinzette entfernt.

2.7.6. Elektronentomographie

Es wurde mit einem FEI Tecnai G2 und einer Beschleunigungsspannung von 200 KV gearbeitet. Mit der Veleta CCD-Kamera wurden Strukturen für die Elektronentomographie¹ gesucht. Zur Einstellung der euzentrischen Höhe wurde bei 10000x Vergrößerung zur Korrektur der Z-Achse *gewobbelt*. Es wurde dann zur Eagle CCD-Kamera gewechselt und die Kalibrierung des Elektronenstrahls mit den Parametern *Beam shift*, *Beam shift pivot points* und *Rotation center* durchgeführt. Anschließend wurde die Tomographie-Funktion geöffnet, die weitestgehend automatisch durch die Arbeitsschritte der Tomographie leitet. Es wurden Kippserien von +65° bis -65° in 1°-Schritten durchgeführt, das finale Datenpaket im mrc-Dateiformat gespeichert und an einer Grafik-Workstation bearbeitet. Mit Inspect 3D wurde die Volumenrekonstruktion durchgeführt und der fertige Datensatz mit Amira 5 betrachtet und bearbeitet.

2.7.7. TEM-Nanotomie

Es wurden Ultradünnschnittareale zwischen 5x5 und 350x350 µm mit einem FEI Tecnai G2 und der Photomontage-Funktion digitalisiert. Hierfür wurde mit der Eagle CCD-Kamera ein Foto in Übersichtsvergrößerung im LM-Modus² aufgenommen und der zu digitalisierende Bereich

¹ 200-500 nm dicke Kunstharzschritte werden hier in unterschiedlichen Winkeln an einem TEM durchstrahlt und mit nachfolgender Datenverarbeitung hochauflösend dreidimensional rekonstruiert.

² Hier: *Low magnification mode*.

manuell markiert. Anschließend wurden Kalibrierungen (gewünschte Vergrößerung, Einstellung der Blenden, *Gain reference*, Fokussierung, Strahlintensität) in einem benachbarten Areal durchgeführt, um Elektronenstrahlschäden in der *Region of interest* zu reduzieren. Die Photomontage-Funktion hat die Anzahl und Positionierung der Einzelbilder automatisch berechnet. Es wurde mit einer Überlappung der Einzelbilder zwischen 10-20% gearbeitet. Im Durchschnitt dauerte ein Foto mit der Eagle CCD-Kamera ca. 15 s. Bildserien von bis zu ca. 4300 Einzelbildern mit einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 Std. wurden direkt auf dem Support-PC gespeichert.

Für die TEM-Nanotomie¹ wurden die Einzelbilder mit der Software Fiji und dem Plug-in *TrakEM2* verarbeitet. Hierfür wurde zuvor mit Bulk Rename Utility eine automatisierte Nummerierung der Bilder durchgeführt. Für den Import in *TrakEM2* wurde die Anzahl der Bilder auf der X-Achse (Spalten) und Y-Achse (Zeilen) definiert und der verwendete Grad an Überlappung eingestellt. Die Einzelbilder wurden anschließend importiert und mit einem *Phase correlation alignment* oder einem *Least square alignment* Verzerrungen, verursacht z.B. durch Verformungen des Präparates im Rahmen der Aufnahmen, zu einem homogenen Datensatz verrechnet. *Alignment* beschreibt in diesem Kontext die Ausrichtung von Einzelbildern zueinander durch z.B. Rotation, Größenänderung und Verzerrung (bzw. Entzerrung) (63). Ein anschließender Helligkeitsausgleich wurde mit der Funktion *Match intensities* durchgeführt, wodurch Helligkeitsunterschiede einzelner Bilder, verursacht durch Belichtungsanpassungen der Eagle CCD-Kamera an Löcher oder elektronendichte Strukturen, weitestgehend herausgerechnet wurden.

2.7.8. REM-Array Tomographie; Einzelbilder

Präparate wurden an einem Zeiss Sigma mit einem *Inlense*-Sekundärelektronendetektor untersucht. Fokussierung und Astigmatismuskorrektur wurden aufgrund der Induktion von Elektronenstrahlschäden am Ultradünnschnitt mit Auflagerung von elektronendichten Elementen in einem Bereich neben der *Region of interest* durchgeführt. Bilder wurden mit einer Größe von 3072x2304 oder 1024x768 Pixel an einem Zeiss Sigma aufgenommen. Diese Bildgröße ist gebräuchlich für viele REM-Anwendungen. Als Einzelbilder werden bei der REM-Array Tomographie² in meiner Arbeit einzelne Bildaufnahmen mit dieser gebräuchlichen Bildgröße beschrieben und von hochauflösenden Aufnahmen (über 15000x15000 Pixel messend) abgegrenzt, welche mit speziellen Scan-Generatoren z.B. für REM-Nanotomie hergestellt werden können.

¹ Hochauflösende Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen an einem TEM.

² Analog zur LM-Array Tomographie werden hier Schnitte auf einen harten Träger aufgebracht und anschließend elektronenmikroskopisch mit einem REM entweder für 2D- oder 3D-Anwendungen digitalisiert.

2.7.9. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Einzelstrahl-REM

Nanotomie-Datensätze wurden mit einem Zeiss Ultra und einem Zeiss Merlin im Einzelstrahlverfahren erstellt. Es wurden Bildkacheln mit einem Überlappungsgrad von 10-20%, jeweils ca. 15000x15000 Pixel messend, bei einer Pixelgröße von 2-3 nm mit einem *Inlense*-Sekundärelektronendetektor, *Backscattered electron* (BSE)-Detektor oder *Energy selective Backscattered* (EsB)-Detektor digitalisiert. Diese Bildkacheln wurden mit der Software ATLAS 5, Adobe Photoshop CS4 oder Fiji (mit dem Plug-in *TrakEM2*) zu einem Panoramabild zusammengefügt. Weiterhin wurden kleinere Nanotomie-Datensätze mit einer Größe von 5000-15000 Pixel (Kantenlänge) in einem Durchgang, ohne Aufteilung der *Region of interest* in Bildkacheln, aufgenommen.

2.7.10. REM-Array Tomographie; 3D-Datensätze im Einzelstrahl-REM

Es wurde eine Schnittserie, bestehend aus 34 Ultradünnschnitten (je 50 nm dick, auf einen mit Kohlenstoff bedampften Objektträgerstreifen aufgezogen), im Demolabor von Carl Zeiss Microscopy in Oberkochen an einem Zeiss Sigma 500 mit einer Pixelgröße von 5 nm und einem Rückstreuungselektronendetektor (BSD4) aufgenommen. Die 34 Einzelbilder wurden mit der Software Fiji und dem Plug-in *TrakEM2* ausgerichtet, hierfür wurden die ca. 6000x5000 Pixel messenden Einzelbilder manuell per Maus erst grob ausgerichtet und anschließend ein *Least square alignment* mit Standardparametern für eine feine Ausrichtung der Einzelbilder zueinander durchgeführt. Die ausgerichteten Einzelbilder wurden durch die Exportfunktion in *TrakEM2* in das tif-Dateiformat exportiert und weiter in 3Dmod (64) bearbeitet. Hier wurde durch manuelle Segmentierung eine Modellierung von Strukturen durchgeführt.

2.7.11. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Mehrstrahl-REM

Nanotomie-Datensätze wurden mit einem Zeiss MultiSEM 505 im Mehrstrahlverfahren erstellt. Ultradünnschnitte wurden über eine Fläche von bis zu 1000x2000 µm und mit einer Pixelgröße von 4 nm mit einem Sekundärelektronendetektor digitalisiert. Zur Reduktion von Aufladungseffekten wurden die Ultradünnschnitte fakultativ mit Kohlenstoff bedampft. Die Bildkacheln wurden mit Fiji und *TrakEM2* (65-67) zusammengefügt und bearbeitet.

2.7.12. Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung wurde mit einem Lenovo ThinkPad T540p, per Mini display port an einen externen Eizo-Monitor angeschlossen, durchgeführt. Der Monitor wurde mit einem Vollspektrum-Farbsensor zur farbechten Darstellung kalibriert. Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS4 und Corel Draw 12 in Helligkeit, Kontrast und Intensität angepasst. Grauwerte wurden mit einer Tonwertkorrektur abgestimmt, um möglichst viele Details – besonders bei TEM-Bildern – differenziert darzustellen. Weiterhin wurde fakultativ, zur deutlicheren Darstellung von Details,

eine Unschärfmaske angewendet. Panoramabilder wurden in Adobe Photoshop CS4 mit der *Photomerge*-Funktion aus einzelnen, überlappenden Einzelfotos zusammengefügt. Für gleichartige Bearbeitungen an Bildstapeln (z.B. für eine 3D-Rekonstruktion aus bis zu 376 Semidünnschnitten) wurde die Stapelbearbeitung von Adobe Photoshop CS4 genutzt. Einzelne Bildausschnitte wurden zur Reduktion von Artefakten ausgetauscht, um möglichst viel Material der Semidünnschnittserien auswerten zu können und die anschließende manuelle Segmentierung mit Amira 5 zu erleichtern.

2.8. Nichteigene Arbeitsschritte

Im Rahmen meiner Arbeit wurde ich in Techniken der Probenpräparation und mikroskopischen Auswertung eingearbeitet und habe einige dieser Ansätze wie Elektronentomographie, TEM-Nanotomie und REM-Array Tomographie darüber hinaus im Labor eigenständig etabliert. Einzelne Techniken bzw. Arbeitsschritte dieser Techniken wurden von Mitarbeitern der AG Bachmann oder externen Wissenschaftlern in unterschiedlichem Ausmaß übernommen.

Perfusionsfixierungen und Organentnahmen von Versuchstieren wurden von Prof. Dr. Sebastian Bachmann, Dr. Kerim Mutig und Dr. Alexander Paliege unter Assistenz von Kerstin Riskowsky durchgeführt. Weiterhin wurden einzelne immunhistochemische Markierungen sowie die in meiner Arbeit gezeigte *in situ* Hybridisierung mit kombinierter Immunhistochemie und *preembedding* Techniken (Peroxidase-Reaktion mit nachfolgender Kunstharzeinbettung) von Kerstin Riskowsky durchgeführt. Die Maus-Zeichnung der Abbildung 1 wurde von mir leicht modifiziert, das Original wurde von Nese Yorguner erstellt. Weiterhin wertete ich im Rahmen meiner Doktorarbeit Bildmaterial aus, welches von Nese Yorguner im Rahmen ihrer Arbeit im Institut für Vegetative Anatomie (AG Bachmann) angefertigt wurde (P1 V12, Archivmaterial *in situ* Hybridisierung).

Kunstharzeinbettungen sowie Präparationen der konventionellen REM-Ansätze und immunzytochemische Markierungen wurden von Petra Schrade und John Horn in der Core Facility Elektronenmikroskopie der Charité durchgeführt, hier habe ich für ein besseres Verständnis der Techniken mehrmals Kunstharzeinbettungen begleitet. Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu habe ich im Rahmen des *Cryo-Royale workshops* der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Regensburg erlernt und auch mit den Geräten der Charité testweise umgesetzt, jedoch wurde diese Technik ansonsten ausschließlich von John Horn angewandt.

Die mikroskopische Auswertung von REM-Array Tomographie-Proben wurden von Eckhard Völcker (Penard Labs) an einem Zeiss Sigma in meinem Beisein in Berlin durchgeführt. REM-Array Tomographie Nanotomie-Datensätze im Einzelstrahlverfahren wurden von Dr. Irene Wacker in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rasmus Schröder (Centre for Advanced Materials, Universität Heidelberg) an einem Zeiss Merlin und einem Zeiss Ultra durchgeführt. REM-Array Tomographie Nanotomie-Datensätze im Mehrstrahlverfahren wurden von Dr. Anna Lena Eberle

und Tomasz Garbowski im Demolabor von Carl Zeiss Microscopy in Oberkochen durchgeführt. Hier wurde weiterhin von Dr. Geertje Bammert die Digitalisierung der REM-Array Tomographie-Schnittserie durchgeführt. In beiden REM-Nanotomie Ansätzen habe ich anteilig die Bearbeitung der Rohdaten übernommen.

2.9. Bezugsquellen

2.9.1. Chemikalien

Tabelle 2. Chemikalien.

Name [Ergänzende Bezeichnung]	Bezugsquelle
0,9% NaCl-Lösung	Braun, Melsungen, DEU
25% Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg, DEU
Aceton	Apotheke Charité
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, DEU
Aqua bidest.	Braun, Melsungen, DEU
Aqua Spüllösung	Braun, Melsungen, DEU
Azur II	Serva, Heidelberg, DEU
Bleinitrat	Merck, Darmstadt, DEU
Bleizitrat	Merck, Darmstadt, DEU
Borax	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt, DEU
Cytoseal 60	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DDSA [Härter für Epon, Dodecylbernsteinsäureanhydrid]	Serva, Heidelberg, DEU
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, DEU
Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung	Merck, Darmstadt, DEU
EDTA	Serva, Heidelberg, DEU
Einbettmedium	Leica microsystems, Nussloch, DEU
Ethanol [100%, unvergällt]	Serva, Heidelberg, DEU
Ethanol [96%, vergällt]	Roth, Karlsruhe, DEU
Formvar	Merck, Darmstadt, DEU
Glycerindiepoxyd [Epon 812]	Serva, Heidelberg, DEU
Heparin-Natrium [25000]	Ratiopharm, Ulm, DEU
Hydroxyethylstärke [10% ,200 kDa, in 0,9% NaCl]	Fresenius, Bad Homburg, DEU
Isofluran [Forene]	Abbott, Wiesbaden, DEU
Isopentan	Riedel-de Haen, Seelze, DEU
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, DEU
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung	Merck, Darmstadt, DEU
Leitsilber	Plano, Wetzlar, DEU
LR-White	Science Services, München, DEU
Methylenblau	Merck, Darmstadt, DEU
Milchpulver [skim milk]	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
MNA [Härter für Epon, Methyl nadic anhydride]	Serva, Heidelberg, DEU
Na-Kakodylatpuffer	Serva, Heidelberg, DEU
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumzitrathydrat	Merck, Darmstadt, DEU
Nembutal	Fagron, Barsbüttel, DEU
Neutol Liquid ne [print ne b&w print developer, Apne 41]	Agfa, Leverkusen, DEU
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, DEU
Pattex Compact Gel	Henkel, Düsseldorf, DEU
Phalloidin [Alexa Fluor 488]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphorwolframsäure	Merck, Darmstadt, DEU
Polyethylenglykol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Propylenoxid	Serva, Heidelberg, DEU
Pioloform	Plano, Wetzlar, DEU
Ringer-Acetat	Braun, Melsungen, Deutschland
Ringer-Acetat-Lösung	Serumwerk Bernburg, Bernburg, DEU
Saccharose	Roth, Karlsruhe, DEU
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DEU
Silbervergrößerungssset	Plano, Wetzlar, DEU

Tetenal superfix plus [Universalfixierbad]	Agfa, Leverkusen, DEU
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, DEU
Vitro-Clud	R.Langenbrick, Emmendingen, DEU
Xylol	Merck, Darmstadt, DEU

2.9.2. Geräte

Tabelle 3. Verwendete Geräte.

Name [Ergänzende Bezeichnung]	Bezugsquelle
Digitales Belichtungsgerät für Positive [Digital Timer]	Kaiser, Buchen, DEU
Eizo-Monitor [Eizo EV2736WFS-BK 68,6 cm LED]	Eizo, Hakusan, Japan
Entwicklerautomat für Positive [2150 RL]	Ilfolab, Mobberley, GBR
Externe Leuchtquelle für Präparation [KL 5120]	A.Krüss Optronik, Hamburg, DEU
FEI TEM Tecnai G2	FEI, Eindhoven, NLD
Flachbettscanner [Perfection V700 Photo]	Epson, Suwa, Japan
Glasbrecher [7800 Knifemaker]	Pharmacia LKB, Uppsala, SWE
Kritisch-Punkt-Trockner [E3000]	Gala Gabler, Wiesbaden, DEU
Kryo-Aufsatz für Ultramikrotom [EMFCS]	Leica, Wetzlar, DEU
Kryostat [CM3050]	Leica, Wetzlar, DEU
Lenovo ThinkPad T540p	Lenovo, Morrisville, USA
Lichtmikroskop für Fotodokumentation [DMRB]	Leica, Wetzlar, DEU
Manometer [Boso Clinicus]	Boso, Jungingen, DEU
Rotationsmikrotom für Paraffinschnitte	Leica, Wetzlar, DEU
Rotationsmikrotom für Semidünnschnitte [RM 2065]	Leica, Wetzlar, DEU
Rotator für Eponeinbettung [B7925]	Agar Scientific, Stansted, GBR
Sputter coater [MED 020]	Balzer, Bingen, DEU
Stereomikroskop für Perfusionsfixierungen	Carl Zeiss Jena, Jena, DEU
Trockenschrank für Negative	Kindermann, Eibelstadt, DEU
Ultramikrotom für Kryo-Ultradünnschnitte [Ultracut S]	Reichert, Leica, Wetzlar, DEU
Ultramikrotom für Kunstharzschnitte [Ultacut E]	Reichert Jung, Wetzlar, DEU
Vergrößerer für Positive [Universal Camera Repro, Laborator 54]	Durst, Brixen, ITA
Vollspektrum-Farbsensor [Spyder 4 Elite]	Datacolor, Luzern, Schweiz
Wärmeplatte für Semidünnschnitte	Medax, Neumünster, DEU
Wärmeschrank für Epon-Polymerisation [Typ UT20]	Heraeus, Hanau, DEU
Wasserbad für Paraffinschnitte [Typ 1052]	GFL, Leverkusen, DEU
Zeiss CCD-Kamera für Lichtmikroskop [AxioCam MRC]	Carl Zeiss, Jena, DEU
Zeiss Laser scanning microscope [Exciter 5]	Carl Zeiss, Jena, DEU
Zeiss REM DSM 982	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss REM Merlin	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss REM Ultra	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss REM Sigma	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
Zeiss TEM 906 [Leo]	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU

2.9.3. Software

Tabelle 4. Verwendete Software.

Name [Ergänzende Bezeichnung]	Bezugsquelle
3Dmod	Open source Software (http://bio3d.colorado.edu/imod/)
Adobe Photoshop CS4	Adobe, Mountain View, USA
Amira 5	FEI, Eindhoven, NLD
ATLAS 5	Carl Zeiss, Oberkochen, DEU
AxioVision	Carl Zeiss, Jena, DEU
Bulk Rename Utility	Freeware Software (http://www.bulkrenameutility.co.uk/)
Corel Draw 12	Corel, Ottawa, CAN
Fiji [inklusive Plug-in <i>TrakEM2</i>]	Open source (http://fiji.sc/)
Inspect 3D	FEI, Eindhoven, NLD
Tecnai image & acquisition	FEI, Eindhoven, NLD
User Interface	FEI, Eindhoven, NLD
Zen	Carl Zeiss, Jena, DEU

2.9.4. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5. Verwendetes Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial.

Name [Ergänzende Bezeichnung]	Bezugsquelle
10 cm Glas-Petrischalen	Biologie-Bedarf Thorns, Deggendorf, DEU
5 cm Glas-Petrischalen	Biologie-Bedarf Thorns, Deggendorf, DEU
5 ml Spritzen	BD, Franklin Lakes, USA
Aluminium-Pins	Plano, Wetzlar, DEU
Aluminium-Probenteller	Plano, Wetzlar, DEU
Augenschere [15003-08]	FST, Heidelberg, DEU
Beem-Kapseln	Plano, Wetzlar, DEU
Butterfly-Kanüle [Multifly Set]	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Dentalwachs	Omnident, Rodgau Nieder-Roden, DEU
Diamantmesser [Messer für Kryo-Ultradünnschnitte]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [Histo Jumbo]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [Trim 20°]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [Trim 45°]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [Ultra 35°]	Diatome, Nidau, CHE
Diamantmesser [UltraSemi 35°]	Diatome, Nidau, CHE
Dreiwegehahn	Pvb Medizintechnik, Kirchseeon, DEU
Einmalklingen [Kryostat, Typ 818]	Leica, Wetzlar, DEU
Einmalklingen [Paraffin, N35]	Feather, Osaka, JPN
Gefäßklemme [18050-50]	FST, Heidelberg, DEU
Glasleisten [für Anfertigung von Glasmessern]	Pharmacia LKB, Uppsala, SWE
Glasschneider [Diamant-Schreiber]	Usbeck, Radevormwald, DEU
Gridbox	Plano, Wetzlar, DEU
Kanüle 26 Gauge [Microlance 3]	BD, Franklin Lakes, USA
Kohlenstoff-Klebeband	Plano, Wetzlar, DEU
<i>Mesh grids</i> [hexagonal, 300 Mesh]	Plano, Wetzlar, DEU
<i>Mesh grids</i> [quadratisch, 200 Mesh]	Plano, Wetzlar, DEU
<i>Mesh grids</i> [quadratisch, 75 Mesh]	Plano, Wetzlar, DEU
Negativhüllen	Hama, Volketsvil, SWE
Objekträger [Superfrost plus]	Menzel-Gläser, Braunschweig, DEU
Objekträger [Superfrost]	Menzel-Gläser, Braunschweig, DEU
Parafilm [M]	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pinzette Typ #4 [11241-30]	FST, Heidelberg, DEU
Pinzette Typ #5 [91150-20]	FST, Heidelberg, DEU
Pinzette Standard [91100-12]	FST, Heidelberg, DEU
Pinzette gebogen [11009-13]	FST, Heidelberg, DEU
Pinzette lang [11010-17]	FST, Heidelberg, DEU
Planfilme [Electron Image Film SO-163, 8,3x10,2 cm]	Kodak, Rochester, USA
Polypropylenschlauch [0,95 cm Außendurchmesser]	Kronlab, Dinslaken, DEU
Puffertank für Perfusionsfixierung [Vollentsatzungspatrone]	Charité
Rasierklingen [Rotbart extra dünn]	Gillette, Boston, USA
Rundfilter	Whatman, Maidstone, GBR
Saugfähige Unterlage [Rechteck-Vorlagen 15x40 cm, Kolibri]	Igefa, Essenbach, DEU
Schere [14088-10]	FST, Heidelberg, DEU
Schere fein [14084-08]	FST, Heidelberg, DEU
Schere grob [14001-12]	FST, Heidelberg, DEU
Scherenklemme gebogen [91309-12]	FST, Heidelberg, DEU
Scherenklemme gerade [91308-12]	FST, Heidelberg, DEU
Schlitz-Grids	Plano, Wetzlar, DEU
Selbstschließend Pinzette [11261-30]	FST, Heidelberg, DEU
Siliziumträger, 5x5 mm [G3388]	Plano, Wetzlar, DEU

2.9.5. Rezepturen

Tabelle 6. Rezepturen.

<p>Bleizitrat nach Reynolds 1,33 g Bleinitrat und 1,76 g Natriumzitrathydrat wurden in einer 50 ml Glasflasche mit 30 ml Aqua dest. über 30 min. zu einer trüben Mischung aufgeschüttelt und durch Zugabe von 8 ml 1 N NaOH gelöst. Der pH wurde auf exakt 12,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt (68).</p>
<p>Epon 812 Gründliche Mischung von Lösung A (186 ml Glycerindiepidoxid und 300 ml DDSA; Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid) und Lösung B (250 ml Glycerindiepidoxid und 222 ml MNA; <i>Methyl nadic anhydride</i>). Lagerung bei -20 °C (69).</p>
<p>Richardson Färbelösung Es wurden 1% Methylenblau in 1% Boraxlösung zusammen mit 1% Azur in Aqua dest. im Verhältnis 1:1 gemischt.</p>
<p>Schlauchlösung Es wurden 1 ml Heparin-Natrium, 2 ml 0,9% NaCl-Lösung, 1 ml Procainhydrochlorid und 1 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$-Lösung (16%) gemischt.</p>
<p>Uranylacetat (5% Lösung in 50% Ethanol) Es wurde 0,75 g Uranylacetat mit 7,5 ml Aqua dest. gemischt und anschließend 7,5 ml Ethanol (100%, unvergällt) hinzugegeben. Die Lösung wurde in einer braunen Flasche (lichtgeschützt) im Kühlschrank gelagert.</p>
<p>10x PBS Stammlösung 400 g NaCl, 12 g KH_2PO_4, 89 g Na_2HPO_4, und 10 g KCL wurden in 5 L Aqua dest. gelöst und vor Gebrauch auf die nötige Konzentration verdünnt.</p>
<p>Basisrezept für Protokoll 1 (3% Formaldehyd in 0,063 M Na-Kakodylatpuffer und 2,7% HES) Lösung A) Na-Kakodylat-Saccharose-Puffer: Es wurden 21,4 g Na-Kakodylat und 34,23 g Saccharose gemischt, auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt und der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure eingestellt. Lösung B) Na-Kakodylat-HES: 700 ml von Lösung A wurde mit 300 ml HES und 0,66 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ gemischt. Lösung C) Formaldehyd-Ansatz: Für 1000 ml Fixans wurden 30 g Paraformaldehyd und 90 ml Aqua dest. auf einer Heizplatte bei 60 °C unter einem Abzug gemischt und das Lösen durch 1 N NaOH (10 bis 20 Tropfen) erleichtert. Mischung: Lösung C wurde durch Lösung B auf 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert mit NaOH oder HCL auf 7,4 eingestellt und zum Schluss filtriert.</p>

3. Ergebnisse

3.1. Perfusionsfixierung von Versuchstieren

Ziel der Perfusion war prinzipiell das schnelle Auftreffen der Lösungen im gesamten Gefäßbett der Niere einerseits, andererseits aber auch die Passage durch die glomeruläre Filtrationsbarriere, sodass grundsätzlich alle Tubulusepithelien von zwei Seiten rasch und effizient erreicht werden sollten. Eine erste direkte Qualitätsbeurteilung einer Perfusionsfixierung erfolgte durch die makroskopische Inspektion der Nieren *in situ*. Eine homogen gelbliche Oberfläche der Nierenkapsel sowie eine bei Formaldehyd mäßige, bei Glutaraldehyd ausgeprägte Härtung des Organs zeigten jeweils eine erfolgreiche Perfusion an. Eine inhomogene, dunkel-fleckige Oberfläche der Nieren oder weiche Konsistenz waren dagegen Kriterien einer schlechten Perfusionsfixierung.

Die Erfahrung in den vorgestellten Experimentreihen hat deutlich gemacht, dass die Arbeitsschritte der Perfusionsfixierung möglichen Verlaufsfehlern unterliegen, die, jeder für sich, den Erfolg der Fixierung tiefgreifend infrage stellen können. Daher war besonders in der Anästhesie und der chirurgischen Präparation der Versuchstiere eine Reihe von Punkten zu beachten, die im Verlauf der Experimente analysiert wurden.

3.1.1. Anästhesie

Mäuse und Ratten wurden im Allgemeinen nach dem Wiegen in einem Glasgefäß mit von oben über Zellstoff evaporierendem Isofluran (0,5-2 ml) leicht sediert, um die intraperitoneale Injektion von Nembutal zu erleichtern. Die Regeldosis von Nembutal (Richtwert: 40 mg/kg Körpergewicht) war vormittags in der Regel erfolgreich, am Nachmittag musste diese häufig um bis zu 50% erhöht werden. Eine ähnlich hohe Dosis war aufgrund ungenügender Ruhezeit nach dem Tiertransport notwendig; hier wurde aufgrund guter Erfahrungswerte eine Dauer von 6 Std. anvisiert. Bei Krankheitsmodellen war ein Überschreiten der Regeldosis deutlich kritischer für das Überleben als bei gesunden Tieren. Generell waren die Tiere nach ca. 5 min. Einwirkzeit operierbar. Aufgrund der atem- und kreislaufdepressiven Wirkung von Nembutal war eine Überdosierung mit der Gefahr von Hypoxie verbunden, welche die Nierendurchblutung gefährden und besonders proximale Tubuli in Mitleidenschaft ziehen konnte. Der Grad der Sauerstoffsättigung war durch Kontrolle der Atemfrequenz und Inspektion von Schnauze, Pfoten sowie abdominalen Organen leicht abschätzbar; eine rosa Farbe wurde als Kriterium einer ausreichenden Kreislauffunktion gewertet.

3.1.2. Chirurgische Präparation

Mäuse und junge Ratten wurden generell unter stereomikroskopischer Kontrolle und externer Glasfaserbeleuchtung perfundiert, bei größeren Ratten ab 100 g Körpergewicht war im Allgemeinen gute Beleuchtung allein ausreichend. Lebensalter und Fettvolumen machten es bei Mäusen und Ratten ggf. erforderlich, den Präparationsablauf erheblich anzupassen. So bereiteten junge und normalgewichtige Tiere deutlich weniger Schwierigkeiten als ältere und adipöse, bei welchen z.B. abdominales Fettgewebe den freien Blick auf die Gefäßachse verhinderte; eine aufwändigere und längere Präparation war dann erforderlich, bei welcher häufiger Blutungen eintraten. Um Verletzungen zu vermeiden, wurde hier ein Großteil der Gefäßdarstellung stumpf mit Wattestäbchen oder Zellstofflagen durchgeführt. Weiterhin können Gefäßvarianten das Setzen der proximalen Aortenklamme erschweren. Die Eröffnung der Aorta abdominalis durch queren Einschnitt barg die Gefahr einer paravasalen Einführung des Aortenkatheters in die umgebende Adventitia, was eine spätere Infusion der Lösungen verhinderte. Die Form des Aortenkatheters und seine exakte Lage innerhalb der Aorta spielten weiterhin eine wichtige Rolle. Eine zu dünn ausgezogene Spitze lieferte nicht den erforderlichen Fluss, während ein zu großer Durchmesser das Einführen in die Aorta erschwerte. Eine konische Form mit zu kurzer Spitze brachte die Gefahr des Herausgleitens des Katheters aus der Aorta. Die Qualität der Ligierung des Aortenkatheters durch Doppelknoten, der unter genauer Sichtkontrolle zusammengezogen wurde, war hier ebenfalls sehr bedeutsam. Der Einschnitt der Vena cava inferior proximal oder nahezu auf Höhe der Vena renalis-Eintritte musste so durchgeführt werden, dass sich ein guter Fluss ohne zu starken Druckverlust bilden konnte. Die danach erfolgende Entfernung der Aortenklamme musste mit geringstmöglichem Zeitverzug erfolgen, um eine kritische Senkung des renalen Blutflusses zu verhindern. Der Einsatz einer zweiten Person war hier für das Umlegen des Dreiwegehahns zur Freigabe der Vorspüllösung nach Klemmenentfernung vorteilhaft. Der gesamte Perfusionsvorgang profitierte generell von einer ruhigen Arbeitsplatzumgebung. Absauganlagen für entstehende Dämpfe aus den Fixierlösungen haben sich für die Experimentatoren sehr bewährt, sofern ihre Justierung die erforderliche Effizienz erbrachte.

3.1.3. Makroskopische Auswertung im Rahmen des Zuschnitts

Nach Entfernung der Nieren wurden diese makroskopisch oder durch Stereomikroskop einer Qualitätskontrolle unterworfen. Durch selektive Gewebeauswahl nach dem Zerteilen konnten hierdurch auch bei weniger gut fixierten Proben brauchbare Areale gewonnen werden. Es wurde routinemäßig eine Unterteilung der Nieren in Pol-, Längs- oder Querschnitte vorgenommen.

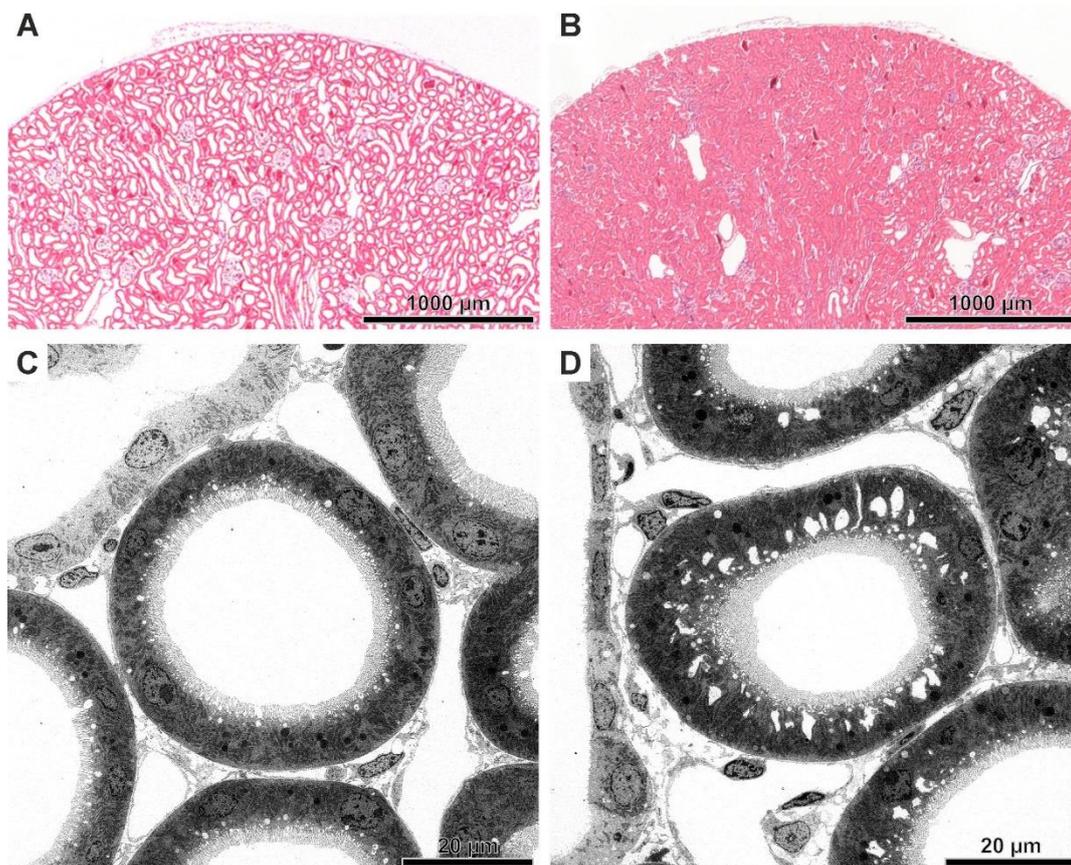


Abbildung 5. Kriterien zur Beurteilung der Mikroanatomie von Nierengewebe.

Paraffinhistologie (A,B), TEM-Morphologie bei Übersichtsvergrößerung (C,D). Während eine erfolgreiche Perfusionsfixierung mikroanatomisch durch gut perfundierte kortikale und medulläre Tubuli charakterisiert ist (A), zeigt eine schlechte Perfusionsfixierung, vergleichbar mit einer Immersionsfixierung, viele Areale von kollabierten Tubuli und Spaltbildungen im Tubulusepithel (B). Eine erfolgreiche Perfusionsfixierung zeigt weiterhin proximale Tubuli mit glatter luminaler und basaler Kontur und einem homogenen Zytoplasma (C), während eine schlechte Perfusionsfixierung, z.B. nach Schwankungen des Fixierflusses, verstärkt proximale Tubuli mit basolateraler Spaltbildung zeigt (D).

3.2. Strukturelle Bewertungskriterien

Für die morphologische Auswertung der zellulären Strukturen der Niere wurden einige Kriterien festgelegt. Generell wurde die Normalität der Gewebeerhaltung den Schäden, wie sie bei Verlust des Perfusionsdrucks, Hypoxie oder bei ungeeigneter Wahl der Osmolarität der Perfusionsmedien entstehen, gegenübergestellt. Zwei Bildtafeln mit LM- (Abb. 5A,B), TEM- (Abb. 5C,D, Abb. 6A-C) und REM-Techniken (Abb. 6D-F) veranschaulichen dies beispielhaft. Fehlerhafter Fluss bzw. Druck resultierte vielfach in einem allgemeinen Kollaps von Teilen oder der Gesamtheit der Nephronabschnitte, sodass zwar eine interstitielle Perfusion mit dem Fixiergemisch erreicht wurde, nicht aber eine Perfusion über die Filtrationsbarriere hinweg in das Tubulussystem (Abb. 5A,B). Auf der Gefäßebene wurde in solchen Fällen auch vielfach der Verschluss medullärer Vasa recta durch Anhäufung halbfixierter Erythrozyten in den Gefäßbündeln von Außen- und Innenstreifen beobachtet, die weitere Verschlechterung der Gewebeerhaltung mit sich brachte. Auch zeitweise Unterbrechung, Druckverlust oder andere,

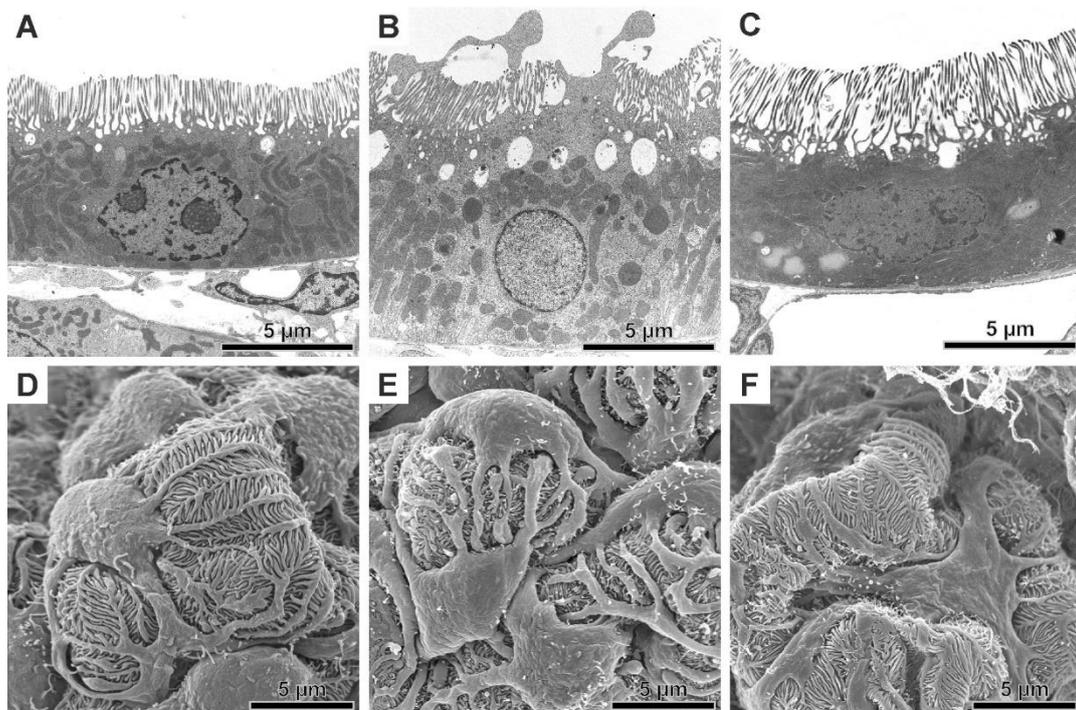


Abbildung 6. Kriterien zur Beurteilung der Ultrastruktur von Nierengewebe.

TEM-Morphologie (A-C) und REM-Morphologie (D-F). Typische morphologische Befunde von normalen (A,D), geschwollenen (B,E) und geschrumpften (C,F) Zellen. Kriterien von normalen Zellen sind glatt begrenzte Tubuli (A) mit guter Abgrenzbarkeit subzellulärer Strukturen von mäßig elektronenlichem Zytoplasma und gut erkennbaren Somata von Podozyten (D). Kriterien von geschwollenen Zellen sind kollabierte Tubuli mit sehr guter Abgrenzbarkeit subzellulärer Strukturen (B) von elektronenlichem Zytoplasma und gebläht wirkende Podozyten mit fleischigen Fortsätzen (E). Kriterien von geschrumpften Zellen sind glatt begrenzte, großlumige Tubuli mit schlecht sichtbaren subzellulären Details (C), schlechter Abgrenzbarkeit subzellulärer Strukturen von elektronendichtem Zytoplasma und geschrumpften Somata und Fortsätzen von Podozyten (F).

geringfügige Normabweichungen der Perfusion konnte zu Spaltbildung im Epithelgewebe und partiellem Kollaps vorzugsweise proximaler Epithelien führen (Abb. 5D, Abb. 6B).

Weiterhin zeigte die Strukturhaltung der Nierenzonen eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Osmolarität der Perfusionsmedien. Präparate mit *normalen* Strukturen – fixiert in einer isotonen Vehikellösung – zeigten eine gut erhaltene mikroskopische Anatomie mit offenen und luminal glatt begrenzten Tubuli und in der TEM-Morphologie eine gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Strukturen (Abb. 6A).

Infolge der Wahl einer hypotonen Vehikellösung kam es zum Anschwellen von Nephronepithelien, apikalem Platzen und Erguss von Zytosol mit Einengung der Tubuluslumina (Abb. 6B). Das intrazelluläre Detail der Epithelzellen war dennoch im TEM aufgrund der elektronenlichten Zusammensetzung vielfach gut abgrenzbar.

Umgekehrt kam es bei Wahl einer hypertonen Vehikellösung zur Schrumpfung von Zellverbänden bis zu einem maschenartigen, sehr lichten Gewebebild, abgeflachten Tubulusepithelien, dilatierten Lumina und kondensiertem Zellinneren mit schlechter Abgrenzbarkeit subzellulärer Strukturen (Abb. 6C). In der REM-Morphologie wirkte sich die Wahl der Vehikelosmolarität

entsprechend stark aus, indem besonders bei Zellschwellung luminale Epithelvorwölbungen im Tubulusepithel beobachtet wurden. Podozytensomata und deren Zellfortsätze zeigten gleichfalls eine starke Schwellung (Abb. 6E). Bei hyperosmolaren Bedingungen stellten sich Oberflächenstrukturen im Nephron eher günstig dar, jedoch waren die Podozyten und deren Fortsätze durch Schrumpfung auch hier stark verändert (Abb. 6F).

3.3. Optimierte Membrandarstellung durch reduzierte Osmierung

Die Abgrenzbarkeit von subzellulären Details hängt nicht nur vom beschriebenen Zusammenhang zwischen der Osmolarität der Vehikellösung und der daraus resultierenden zytoplasmatischen Elektronendichte ab (siehe 3.2). Auch die Nachbehandlung des Gewebes im Rahmen der weiteren Gewebepreparation ist ein wichtiger Faktor. Die Osmierung dient dabei primär der Fixierung von Lipiden, weiterhin findet eine Kontrastierung statt. Die Osmierung mit Standardprotokoll wurde 2%ig in wässriger Lösung durchgeführt, Membranen wurden hier jedoch mit den unten angegebenen Fixierungsprotokollen nur ungenügend dargestellt. Die Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat (Osmierung in 1% Osmiumtetroxid und 0,08% Kaliumhexacyanoferrat in 0,1 M Na-Kakodylatpuffer) mit dem Ergebnis einer reduzierten Osmierung (70, 71) konnte hier signifikante Verbesserung bringen. Hierdurch wurde im Vergleich zur Standardosmierung der Kontrast von Membranen in allen untersuchten Zelltypen stark erhöht (Abb. 7A-F). Generell erschien durch die reduzierte Osmierung auch das Zytoplasma homogener und etwas elektronenlichter, jedoch fiel ein stark verminderter Kontrast zwischen Hetero- und Euchromatin in einigen Zelltypen negativ auf (Abb. 7C,D).

3.4. Fixierungsprotokolle für kombinierte histochemische und morphologische Methoden

Zur Anwendung kamen zwei verschiedene Protokolle (Protokoll 1 und 2), die eine kombinierte Anwendung sowohl histochemischer und immunzytochemischer als auch morphologischer Methoden zum Ziel hatten.

3.4.1. Protokoll 1

Es wurde ein Protokoll mit dem Ziel erstellt, von ein und demselben Versuchstier sensitive immunhistochemische/immunzytochemische Methoden sowie rein morphologische licht- und elektronenmikroskopische Auswertungen der Niere zu ermöglichen.

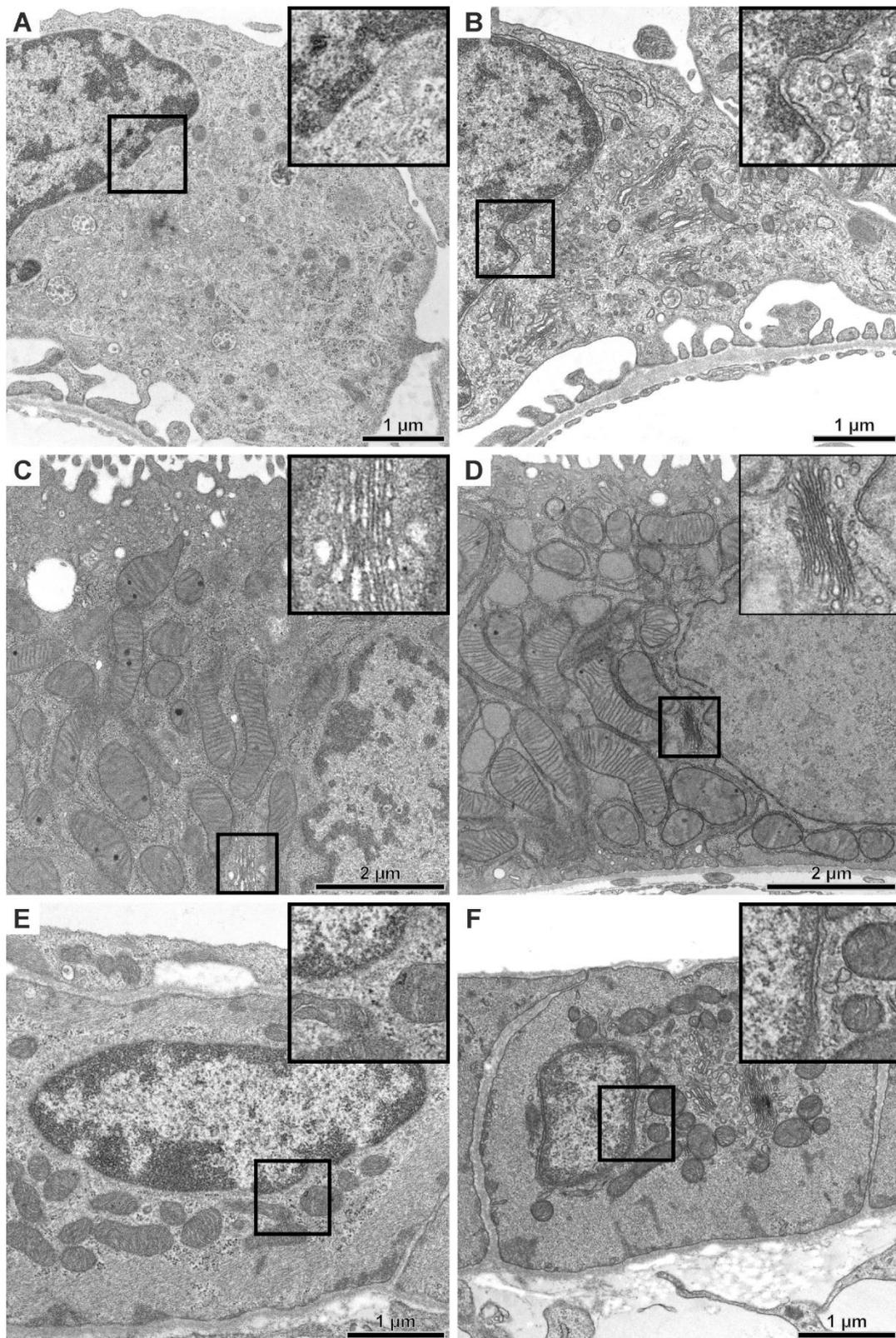


Abbildung 7. Optimierte Membrandarstellung durch reduzierte Osmierung.

TEM-Morphologie (A-F). Verbesserte Membrandarstellung von Podozyten (A,B), proximalen Tubuli (C,D) und glatten Muskelzellen (E,F) im TEM durch reduzierte Osmierung (B,D,F) im Vergleich zu Osmierung nach Standardprotokoll (A,C,E). Nach Standardprotokoll kann eine Membranstruktur durch benachbarte helle Zonen vorgetäuscht werden (Detailausschnitte: A,E; perinukleäre Zisterne, C; Golgi-Apparat). Nach reduzierter Osmierung zeigen sich Zellmembranen hier in ihrer typischen trilaminär kontrastierten Weise (Detailausschnitte; B,F; perinukleäre Zisterne, D; Golgi-Apparat).

3.4.1.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Mäuse und Ratten wurden nach Protokoll 1 perfusionsfixiert (Tabelle 1). Hierbei wurde zur Vorspülung eine Lösung aus Na-Kakodylatpuffer und dem Plasmaexpander HES (3%) mit einer Gesamtosmolarität von etwa 290 mOsmol angewandt. Die Fixierlösung enthielt die gleiche Lösung (Vehikellösung mit einer Osmolarität von ca. 280 mOsmol) unter Zusatz von Saccharose, Magnesiumchlorid und Formaldehyd (3%). Diese Zusammenstellung sollte eine gute licht- und elektronenmikroskopische Strukturhaltung von kortikalen und medullären Gewebsbereichen gewähren. Die im Methodenteil detaillierten Nachbehandlungsprotokolle wurden eingesetzt, um das beabsichtigte breite Spektrum immunhistochemischer, immunzytochemischer und morphologischer Aufarbeitung umzusetzen. Hierzu gehörten standardmäßig die Überführungen von Nierenscheiben a) in Saccharose-Gefrierschutzlösung zum Einfrieren für die Anfertigung von Gefrierschnitten, b) in Fixierlösung (Perfusionslösung) für anschließende Paraffinhistologie, c) in Pufferlösung oder Fixierlösung mit anschließender Nachbehandlung in Saccharose-Gefrierschutzlösung zum Anfertigen von Kryo-Ultradünnschnitten oder alternativ in Pufferlösung zur Lagerung und späteren Einbettung in *LR-White* (hydrophiles Kunstharz) und d) in Formaldehyd/Glutaraldehyd/Pikrinsäure-Lösung zum Nachfixieren für die Epon-Einbettung oder Entwässerung mit nachfolgender Kritisch-Punkt-Trocknung für konventionelle REM-Ansätze.

3.4.1.2. Auswertung im Rahmen von Perfusionsfixierung und Zuschnitt

In situ waren die Nieren nach Perfusion in ihrer Oberfläche homogen gelb gefärbt und von leicht gehärteter Konsistenz. Nierenscheiben zeigten nach Zuschnitt typische Kontraste der einzelnen Zonen mit gelber Rinde und weißlich hellem Mark. Blutansammlungen in den Gefäßbündeln des Marks, die gewöhnlich eine schlechte Perfusion anzeigen, fehlten.

3.4.1.3. Lichtmikroskopische Auswertung

Lichtmikroskopisch waren sowohl Tubulus- wie auch Gefäßlumen offen und weit und zeigten optimale histologische Strukturhaltung (Abb. 8A-C). Im Detail konnten bereits auf Semidünnschnittebene glomeruläre Zellen und Nephron- bzw. Sammelrohrepithelien gut bewertet werden. Der Harnraum der Bowman'schen Kapsel war weit und durchgängig gut abgrenzbar gegen das Schlingenkonvolut (Abb. 8A). Proximale Tubulusepithelien zeigten innerhalb ihrer Subsegmente gleichbleibende Strukturhaltung. Distale kortikale Tubuli (aufsteigende Schleifenschenkel, Macula densa, Post-Maculasegment, distales Konvolut, Verbindungstubulus) konnten anhand ihrer charakteristischen Morphologie gut zugeordnet werden. Sammelrohre waren geringfügig erweitert mit flacherem Epithel und schwach sichtbaren Schaltzellen. Strukturen des Interstitiums waren locker angeordnet und gut identifizierbar. Im Mark zeigte sich ebenfalls ein gut perfundiertes, lockeres Gesamtbild mit klar abgrenzbaren Epithelübergängen, gut ansprechbaren Segmentabschnitten und klar abgrenzbaren

peritubulären Kapillaren (Abb. 8B). Im Inneren Mark war die Strukturhaltung ebenfalls hervorragend mit typisch höheren, jedoch nicht geblähten Sammelrohrephelien und freien Lumina der dünnen Schleifenschenkel und der Gefäße (Abb. 8C).

Nachteile auf LM-Ebene zeigten sich in einer auffälligen Verdichtung von Zellen des Schlingenkonvoluts sowie in verschiedenen Formen von intra- und interzellulärer Spaltbildung proximaler und distaler Subsegmente; besonders im S3-Segment konnten intrazelluläre Spaltbildungen subapikal festgestellt werden. Medulläre aufsteigende Schleifensegmente zeigten öfters ausgedehnte hydropische Veränderungen im apikalen Epithelbereich. Charakteristisch war bei diesen Artefaktbildungen, dass sie häufig nur fokal auftraten und gelegentlich eine Zonierung im äußeren Mark zeigten; der Außenstreifen, hier besonders die Schleifensegmente, war in der Regel besser erhalten als der Innenstreifen.

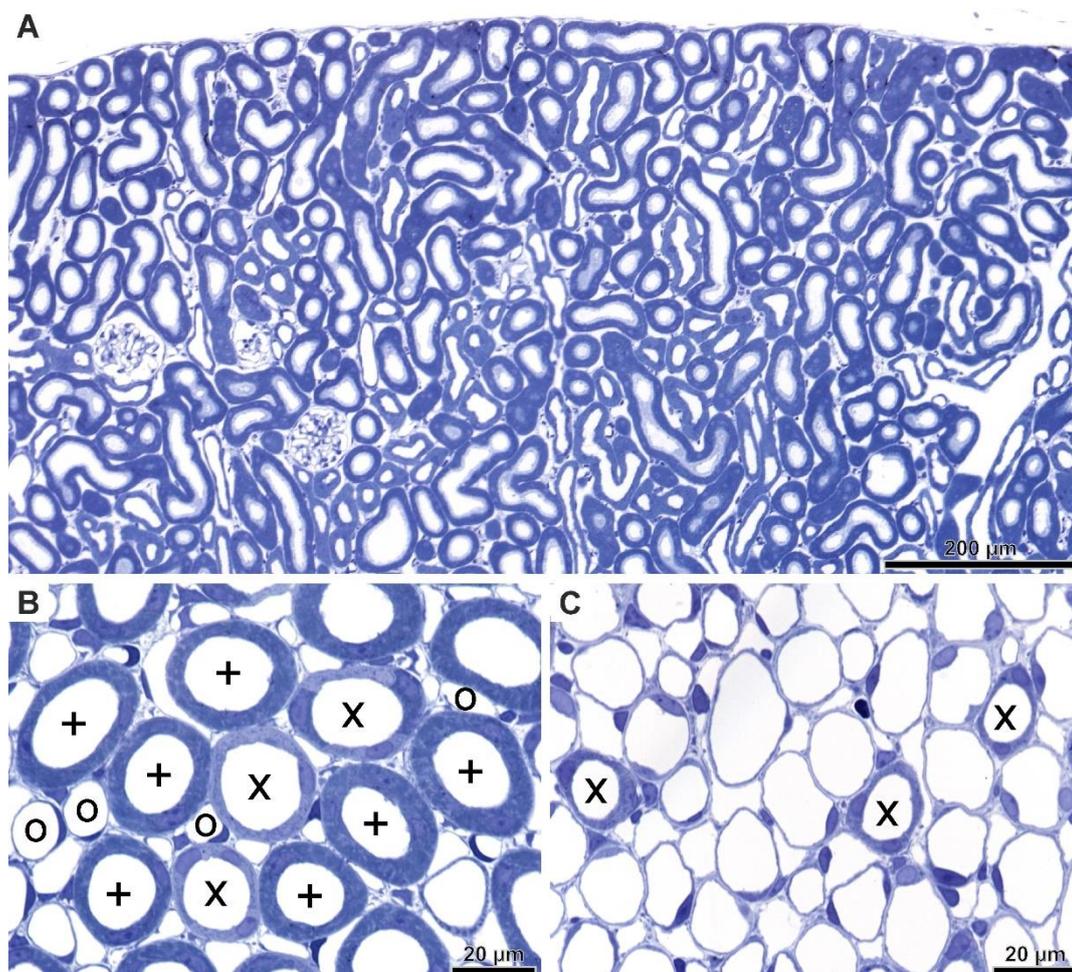


Abbildung 8. Protokoll 1; Semidünnschnitt-Morphologie.

Gewebe, das nach Protokoll 1 (ca. 280 mOsmol Vehikelosmolarität und 2,7% HES) perfusionsfixiert wurde. Es zeigen sich gut perfundierte kortikale (A) und medulläre (B; Innenstreifen, C; Innenzone) Tubuli. Sammelrohre (X), aufsteigende Schleifenschenkel (+) sowie peritubuläre Kapillaren (o) sind im Innenstreifen sowie in der Innenzone mit offenen Lumina gut fixiert.

3.4.1.4. Elektronenmikroskopische Auswertung

Ultrastrukturell zeigte sich im TEM eine überwiegend gute Strukturhaltung hinsichtlich der Darstellung von Membranen und Zellorganellen, die jedoch je nach Zelltyp und Nierenzone vielfach nicht ganz an die Qualität reiner Glutaraldehyd-Perfusionsfixierungen heranreichte. Das Zufügen von 0,05-0,1% Glutaraldehyd zur Fixierlösung brachte hier fallweise Verbesserungen. Im einzelnen erschienen Podozyten und Mesangialzellen stark kondensiert bis geschrumpft mit zu elektronendichtem Zytoplasma und damit verringerter Feinauflösung, während sich die Filtrationsbarriere allgemein recht gut darstellte, bei jedoch ebenfalls leicht kondensiertem Zytoplasma und schmalen Fußfortsätzen (Abb. 9A). Epithelien des proximalen Tubulus zeigten wiederum eine erhöhte Elektronendichte mit verringerter Feinauflösung und mäßige Erweiterungen intra- und interzellulärer Räume fokal bis generell (Abb. 9B,C). Distale Epithelien ließen sich ebenfalls segmenttypisch gut klassifizieren und zeigten vielfach ausgezeichnetes zelluläres Detail mit geringfügigen Schrumpfungen und Spaltbildungen (Abb. 9D,E). Im Mark war die Strukturhaltung neben fokal kollabierten Tubuli ähnlich wie in der Rinde, mit vielfach exzellenter Erhaltung auch des aufsteigenden Schleifensegments (Abb. 9F, Abb. 10A) und Sammelrohre (Abb. 10B). Im Außenstreifen zeigten die S3-Segmente oft ausgeprägte Entmischungen im Zytosol und lumenale Blasen freigesetzter Zytosolmassen. Das Interstitium von Rinde und Mark war gut auflösbar bis ins Detail fenestrierter Endothelien. Interstitielle Fibroblasten, besonders in der Rinde, waren fokal geschrumpft, sonst jedoch von guter Feinstruktur. Arteriolen Wandstrukturen waren von mäßiger bis guter Strukturhaltung, zeigten jedoch fokal auch hohe zytoplasmatische Verdichtung und leichte interzelluläre Aufweitung bzw. Lamellierung der Basalmembranen der Media. Im REM-Bild spiegelte sich der TEM-Befund mit guter Darstellung der Glomeruli und aller Tubulussegmente sowie Endothelien von der luminalen Perspektive her mit typischen Zellgrenzen, Mikrovilli- und Zilienbesatz (Abb. 10C-F). Das glomeruläre Schlingenkonvolut zeigte allerdings die auch im TEM offenbare Schrumpfung der Podozyten bei sonst passabler Auswertungsmöglichkeit (Abb. 10C). Laterale Epithelmembranen ließen sich durch Bruch sehr gut darstellen (Abb. 10D). Sammelrohrschaltzellen ließen sich ebenfalls hervorragend abbilden (Abb. 10F).

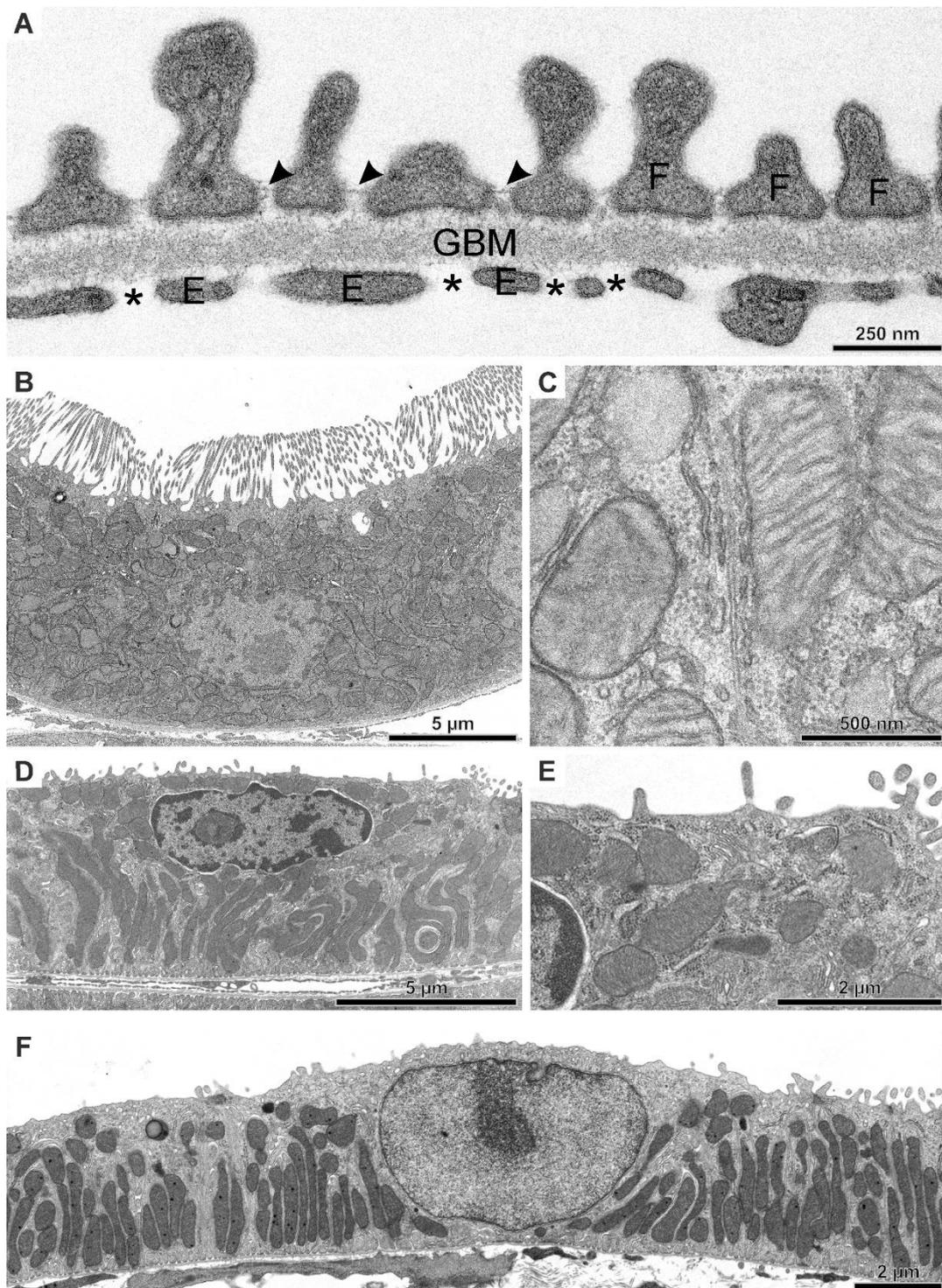


Abbildung 9. Protokoll 1; TEM-Morphologie.

Filtrationsbarriere (A); zwischen Podozytenfortsätzen (F) lassen sich Schlitzdiaphragmata (Pfeilspitzen) gut abgrenzen, weiterhin zeigt sich die glomeruläre Basalmembran (GBM) sowie das glomeruläre Kapillarendothel (E) mit Poren (*). Das Zytoplasma von Podozyten und Endothelzellen ist allgemein mittelgradig kondensiert, Zellmembranen lassen sich hier dennoch gut abgrenzen. Proximaler Tubulus in Übersicht (B) und Detail (C); aufgrund von elektronendichtem Zytoplasma können Organellen nur schwer abgegrenzt werden (B). Bei stärkerer Vergrößerung (C) zeigt sich dennoch eine gute Ultrastruktur. Distales Konvolut in Übersicht (D) und Detail (E); Organellen können gut abgegrenzt werden, es zeigen sich jedoch Anzeichen von Schrumpfungen. Aufsteigender Schleifenschenkel aus dem Außenstreifen (F); Organellen wie Mitochondrien und Lysosomen lassen sich gut vom elektronenlichten Zytoplasma abgrenzen.

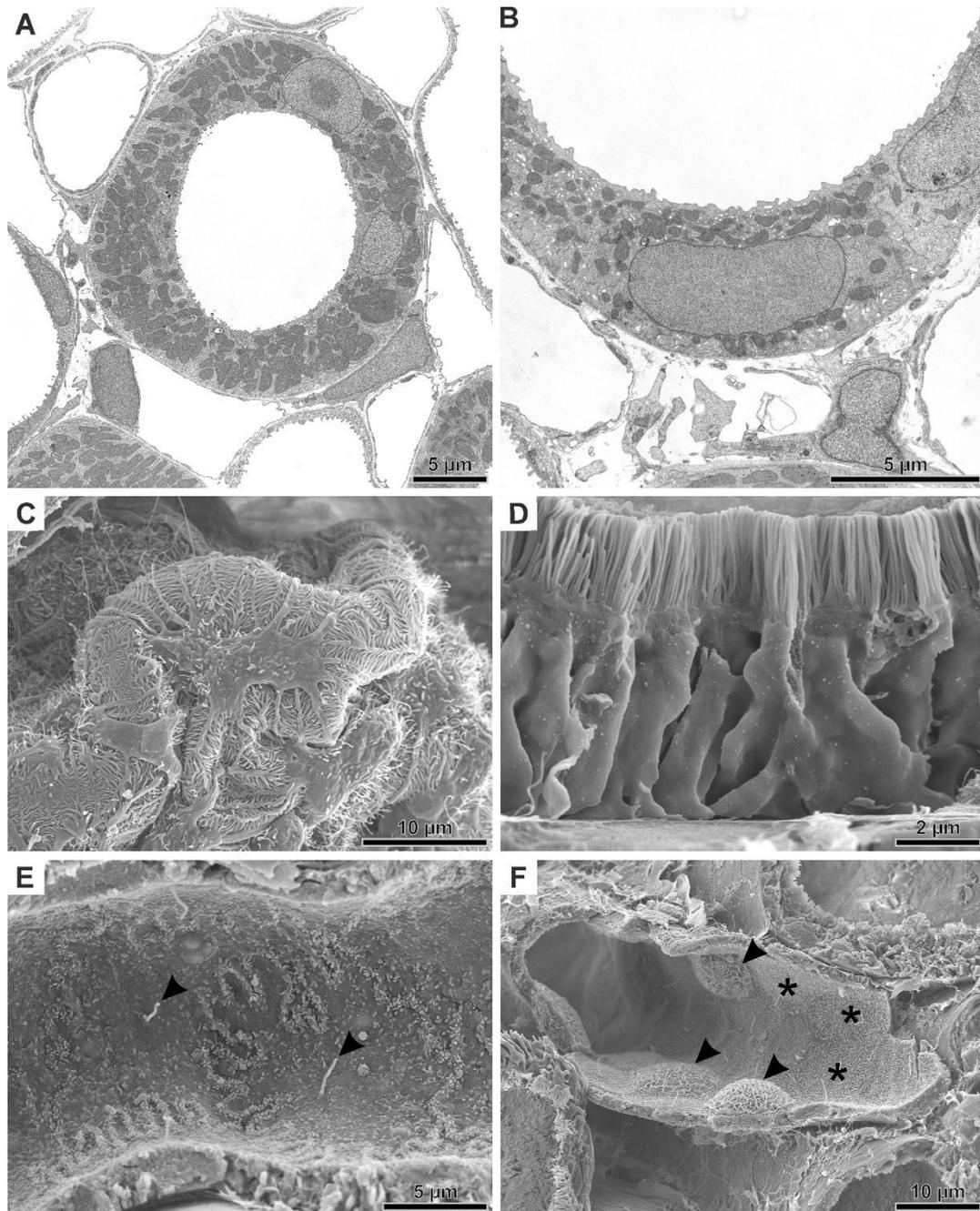


Abbildung 10. Protokoll 1; TEM- und REM-Morphologie.

TEM-Morphologie (A,B) und REM-Morphologie (C-F). Distale Tubulusepithelien im Innenstreifen zeigen eine glatte luminal und basale Kontur und eine gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Details (A,B). Podozyten zeigen geschwüpfte Somata (C), bei jedoch ansonsten typischer Oberflächenstruktur und guter Auflösbarkeit der interdigitierenden Fußfortsätze. Proximaler Tubulus mit Bürstensaum und glatten Bruchkanten entlang der interdigitierenden Zellmembranen (D). Aufsteigender Schleifenschenkel aus der Rinde (E) mit typischer Oberflächendifferenzierung; die Zellen zeigen meanderförmig verlaufende Zellgrenzen mit Ansammlungen von kleinen Mikrovilli und je ein zentrales Kinozilium (Pfeilspitzen). Kortikales Sammelrohr (F) mit gut abgrenzbaren Haupt- (Sterne) und Schaltzellen (Pfeilspitzen).

3.4.1.5. Immunhistochemische Auswertung

Eine vorsichtige, schwache Perfusionsfixierung mit Formaldehyd-Lösungen eröffnete ein breites Spektrum an immunhistochemischen Auswertungsansätzen. Präparatorische Grundlage hierfür waren Kryostat- und Paraffinschnitte. Generell empfahl sich ein Vergleich von Kryostat- und Paraffinschnitten bei komplexeren Markierungen. Histochemische Spezialfärbungen wie die PAS-Reaktion konnten zuverlässig durchgeführt werden (Abb. 11A). Immunhistochemische Färbungen wie auch radioaktiv und non-radioaktiv markierte *in situ* Hybridisierung (ISH) waren bei exzellenter Sensitivität und hoher Reproduzierbarkeit möglich (Abb. 11B-D).

Am Beispiel einer immunhistochemischen Markierung des Natrium/Phosphat Kotransporters (NaPi-2a) in proximalen Tubulusepithelien anhand von Gefrierschnitten zeigte sich fokal eine sensitive, auf den Bürstensaum beschränkte Markierung (Abb. 11B). Weiterhin konnten anhand von Gefrierschnitten kombinierte Darstellungen durch *in situ* Hybridisierung (ISH) und immunhistochemische Markierung durchgeführt werden. Am Beispiel der kombinierten Lokalisation von mRNA und Protein für Tamm-Horsfall-Protein zeigte sich hier eine Kolo-kalisation im aufsteigenden Schleifenschenkel (Abb. 11C,D).

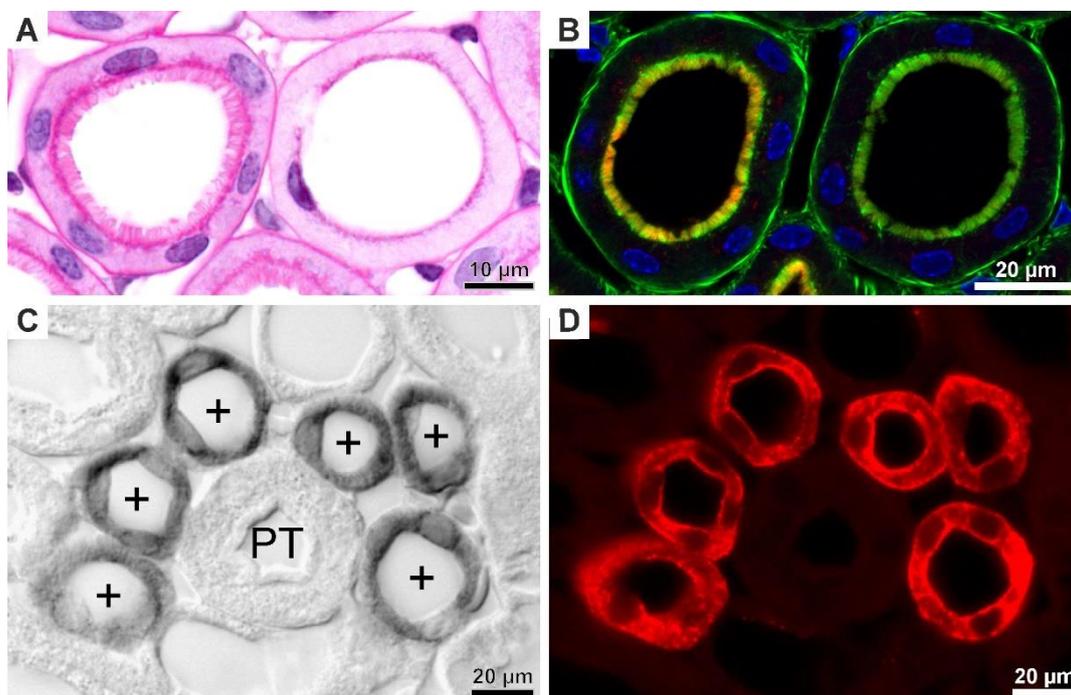


Abbildung 11. Protokoll 1 und Variation; Histochemie, Immunhistochemie und ISH.

Lichtmikroskopie (A-D). Protokoll 1 (A,B), Variation von Protokoll 1 (C,D; nicht in Tabelle 1 enthalten). Paraffinschnitt mit PAS-Reaktion (A); starke Färbung von Bürstensaum und Basalmembranen. Gefrierschnitt mit Immunmarkierung für NaPi-2a (B; rot, DAPI Kernfärbung; blau, Phalloidin-Färbung von f-Aktin; grün). Doppelmarkierung vom aufsteigenden Schleifenschenkel (+) im Außenstreifen; *in situ* Hybridisierung/ differentieller Interferenzkontrast (C) und Immunhistochemie (D) zeigen eine gemeinsame Lokalisation von mRNA und Protein für Tamm-Horsfall-Protein. Proximale Tubuli (PT) werden nicht markiert.

3.4.1.6. Immunzytochemische Auswertung

Immunzytochemische Markierungen auf Ultradünnschnittebene wurden für die Auswertung am TEM auf drei verschiedenen Wegen durchgeführt. Hydrophiles Kunstharz zeigte eine allgemein gute Schneidbarkeit, jedoch Einschränkungen bei einigen Immunmarkierungen. Am Beispiel einer Immunmarkierung von Megalin, ein an der Endozytose beteiligtes Protein, zeigte sich eine starke luminale und apikale Markierung in proximalen Tubulusepithelien (Abb. 12A; Einfachmarkierung). Kryo-Ultradünnschnitte nach Tokuyasu ermöglichten allgemein sehr sensitive Markierungen, waren jedoch sehr aufwändig in der Schnittpräparation (Abb. 12B; Doppelmarkierung von Tamm-Horsfall-Protein und Na-K-Cl-Kotransporter; pNKCC2). Alternativ zu Goldmarkierungen von Ultradünnschnitten wurden Peroxidase-Reaktionen anhand von Gefrierschnitten, Paraffinschnitten oder Vibratomschnitten durchgeführt und anschließend das Material für die Anfertigung von Ultradünnschnitten in Epon eingebettet (Abb. 12C,D).

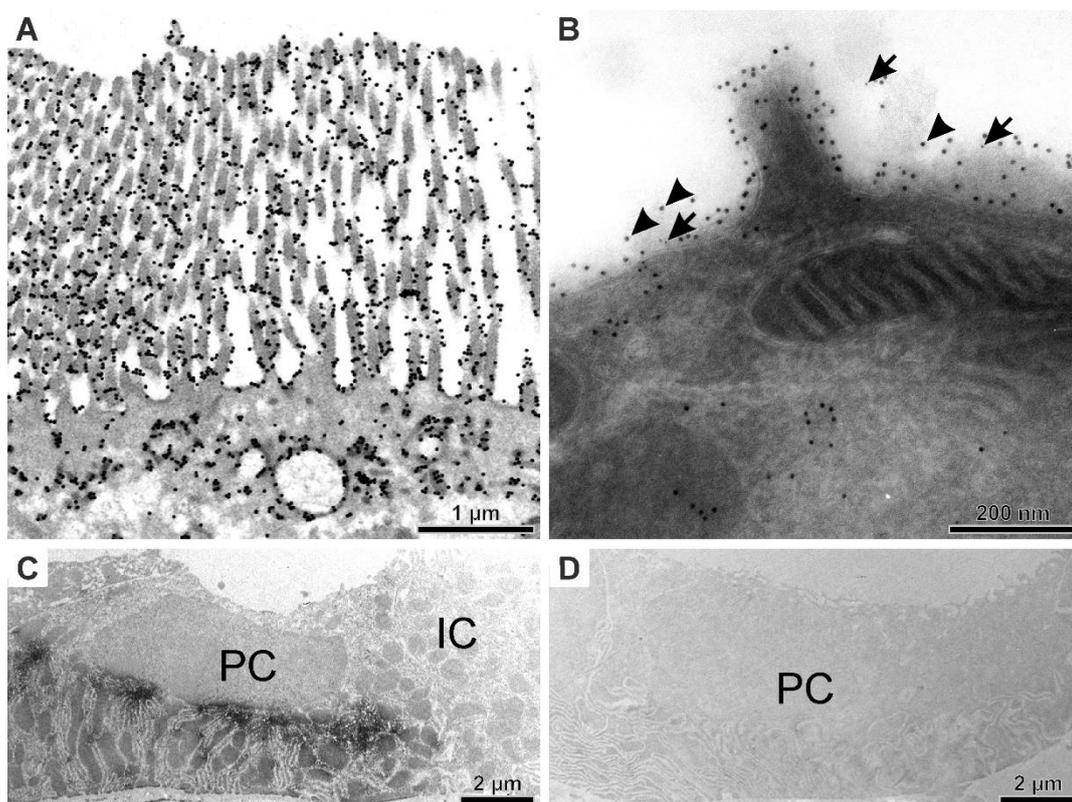


Abbildung 12. Variationen von Protokoll 1; Immunzytochemie.

Variation von Protokoll 1 (A,B; wie P1 V4 fixiert), Variation von Protokoll 1 (C,D; P1 V10 in Tabelle 1). Ultradünnschnitt mit proximaler Tubulusepithelzelle (A; hydrophiles Kunstharz), markiert mit Antikörper gegen Megalin (Sekundärantikörper mit 10 nm Goldpartikeln, Signalverstärkung mit Silberreaktion). Kryo-Ultradünnschnitt nach Tokuyasu (B) mit Tubulusepithelzelle des aufsteigenden Schleifenschenkels in der Rinde, Doppelmarkierung gegen Tamm-Horsfall-Protein (Sekundärantikörper mit 10 nm Goldpartikeln; Pfeilspitzen) und pNKCC2 (Sekundärantikörper mit 5 nm Goldpartikeln; Pfeile). Ultradünnschnitt einer Immunperoxidase *preembedding*-Reaktion für Caveolin 1 in Sammelrohrepiethelien (C,D); das Caveolin 1 Signal ist in den basolateralen Einfaltungen der Zellmembranen in Hauptzellen (PC) konzentriert (C; Wildtyp) und nicht vorhanden in Schaltzellen (C; IC) und Caveolin 1 *knockout* Mäusen (D).

3.4.2. Variationen von Protokoll 1

Ein Ziel der Variationen von Protokoll 1 war eine verbesserte Fixierung von Podozyten und proximalen Tubuli zur ultrastrukturellen Darstellung im TEM durch Reduktion der Vehikelosmolarität. Weiterhin sollten Variationen der HES-Konzentration die Strukturhaltung der Rinde verbessern. Einflussnahme auf die Viskosität der Fixierlösung würde einen verbesserten Durchfluss bei der Perfusionsfixierung bedeuten können. Eine qualitative Beeinträchtigung durch den Plasmaexpander wurde daher vermutet. Zum einen ist denkbar, dass das hohe Molekulargewicht von HES die Passage der Fixierlösung über die Filtrationsbarriere einschränkt und so zu einem Missverhältnis zwischen vaskulärer und tubulärer Fixierung mit den möglichen Folgen kollabierter und minderfixierter Tubuli führt. Zum anderen kann die erschwerte Passage durch das Schlingenkonvolut aufgrund der erhöhten Viskosität auch die Fixierung der nachgeschalteten vaskulären Abschnitte beeinträchtigen. Andererseits sollte eine verringerte Formaldehyd-Konzentration über niedrigere Gesamtosmolarität das Ausgangsvolumen von kortikalen Zellen besser konservieren. Der beobachtete, unerwartete Volumenverlust von Podozyten und kortikalen Tubulusepithelien nach Fixierung mit einer geringen Vehikelosmolarität von 220 bzw. 250 mOsmol (s.u.) ließ vermuten, dass der osmolare Beitrag von Formaldehyd hierfür ursächlich sein könnte; 3% entsprechen jedenfalls rein rechnerisch 1000 mOsmol (17).

3.4.2.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Es wurde eine gegenüber Protokoll 1 verringerte Vehikelosmolarität von etwa 250 (P1 V1 in Tabelle 1) bzw. 220 mOsmol (P1 V2 in Tabelle 1) verwendet. Bei unveränderter Osmolarität wurde für die Variationen der HES-Konzentration in der Vehikellösung eine niedrige HES-Konzentration von 0,9% (P1 V3 in Tabelle 1) und eine hohe HES-Konzentration von 3,6% (P1 V4 in Tabelle 1) verwendet. Im Rahmen von Vorversuchen zu Protokoll 1 wurde weiterhin eine verringerte Formaldehydkonzentration von 1,5% (P1 V6 in Tabelle 1) mit der 3%igen Lösung (P1 V4 in Tabelle 1) verglichen. Die Vehikelosmolarität lag in diesen beiden Fällen bei ca. 280 mOsmol, die HES-Konzentration bei 3,6%.

3.4.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Im Semidünnschnitt zeigten sich bei der gegenüber Protokoll 1 abgesenkten Vehikelosmolarität in beiden Fällen (250 mOsmol Vehikelosmolarität; Abb. 13A, 220 mOsmol Vehikelosmolarität; Abb. 13B) weiterhin geschrumpfte Podozyten und kondensierte kortikale proximale Tubuli, wenn auch allgemein alle kortikalen Epithelien bei 220 gegenüber 250 mOsmol besser aufgeheilt waren. Eine ultrastrukturelle Untersuchung dieser Proben im TEM wurde nicht durchgeführt, weil bereits im Semidünnschnitt das geschrumpfte Erscheinungsbild der Podozyten und proximalen Tubuli sichtbar war.

Im Semidünnschnitt zeigte sich bei niedriger HES-Konzentration von 0,9% (P1 V3 in Tabelle 1) in Vorspül- und Fixierlösung eine normale bis leicht verringerte Zellhöhe kortikaler Tubulusepithelien (Abb. 14A), eine hohe HES-Konzentration von 3,6% (P1 V4 in Tabelle 1) führte hingegen zu einer deutlich verringerten Zellhöhe kortikaler Tubulusepithelien, besonders von proximalen Tubuli und zu einem dilatierten Schlingenkonvolut (Abb. 14B). Ultrastrukturell zeigte sich bei der niedrigen HES-Konzentration (P1 V3 in Tabelle 1) eine schlechte Markperfusion mit

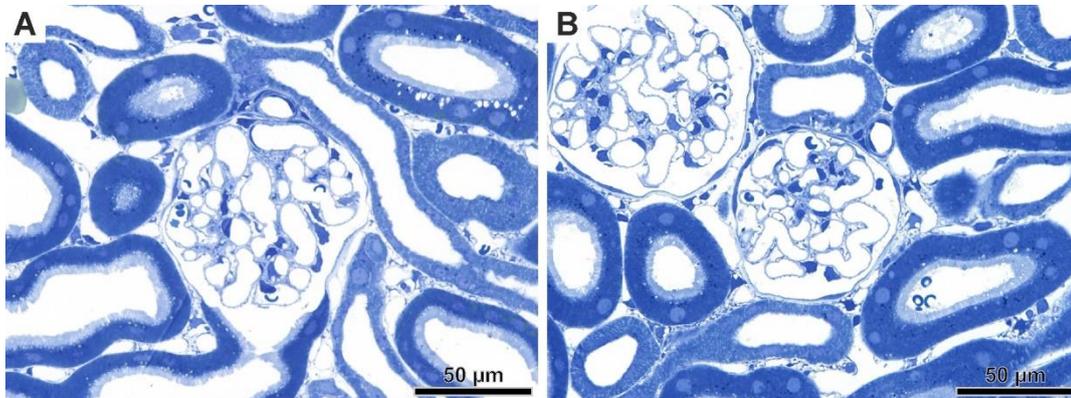


Abbildung 13. Variation von Protokoll 1; Semidünnschnitt-Morphologie.

Mäßig reduzierte Vehikelosmolarität (P1 V2 in Tabelle 1: A; ca. 250 mOsmol Vehikelosmolarität und 2,7% HES) und stark reduzierte Vehikelosmolarität (P1 V1 in Tabelle 1: B; ca. 220 mOsmol Vehikelosmolarität und 2,7% HES); beide Variationen zeigen offene kortikale Tubuli. Die Podozyten zeigen bei beiden Variationen Schrumpfungen, jedoch erscheint das Gesamtbild bei geringerer Vehikelosmolarität etwas turgeszenter (B).

erweitertem Interstitium und Schrumpfung der Kapillarwände (Abb. 14C). Eine hohe HES-Konzentration (P1 V4 in Tabelle 1) führte hingegen zu einer guten Markperfusion mit engem Interstitium und glatten interstitiellen Kapillaren (Abb. 14D).

Nierengewebe, das mit der verringerten Formaldehydkonzentration (P1 V6 in Tabelle 1) perfundiert war, zeigte auf Semidünnschnittebene weiterhin geschrumpfte kortikale Zellen. Im TEM zeigten Podozyten und proximale Tubuluszellen bei 1,5% und 3% Formaldehyd (1,5% Formaldehydkonzentration; P1 V6 in Tabelle 1, 3% Formaldehydkonzentration; P1 V4 in Tabelle 1) die bekannten Schwachstellen eines elektronendichten Zytoplasmas mit unzureichender Abgrenzbarkeit subzellulärer Details. Medulläre Tubuli zeigten nach Fixierung mit 1,5% Formaldehyd überdies vermehrt Artefaktbildungen; besonders im aufsteigenden Schleifenschenkel waren apikale Entmischungen des Zytoplasmas und geschwollene Mitochondrien erkennbar; die 3%ige Fixierung rät sich daher auch aus dem Blickwinkel allgemeiner Fixierungsqualität an.

3.4.3. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 1 und Variationen

Die Perfusionsfixierung nach Protokoll 1 ermöglicht eine zuverlässige und qualitativ hochwertige Gewebeerhaltung für licht- und elektronenmikroskopische Techniken in der experimentellen Nierenforschung. Mikroanatomische Auswertungen der verschiedenen Nierenzonen und histochemische sowie immunzytochemische Techniken lassen sich in voller Breite hervorragend umsetzen. Hochauflösende TEM-Ansätze werden durch Nachfixierung per Immersion ermöglicht, doch gibt es Einschränkungen durch starke Zellverdichtung und verschiedene Artefaktbildungen im Bereich der Glomeruli und einzelner Nephronepithelien. REM-Auswertung ist mit geringen Qualitätsdefiziten der Strukturhaltung von Zelloberflächen gut möglich. Durch verringerte Vehikelosmolarität (250 mOsmol Vehikelosmolarität; P1 V1 in Tabelle 1, 220 mOsmol Vehikelosmolarität; P1 V2 in Tabelle 1) und Variationen der Konzentration von HES (0,9% HES; P1 V3 in Tabelle 1, 3,6% HES; P1 V4 in Tabelle 1) bzw. Formaldehyd (1,5% Formaldehyd; P1

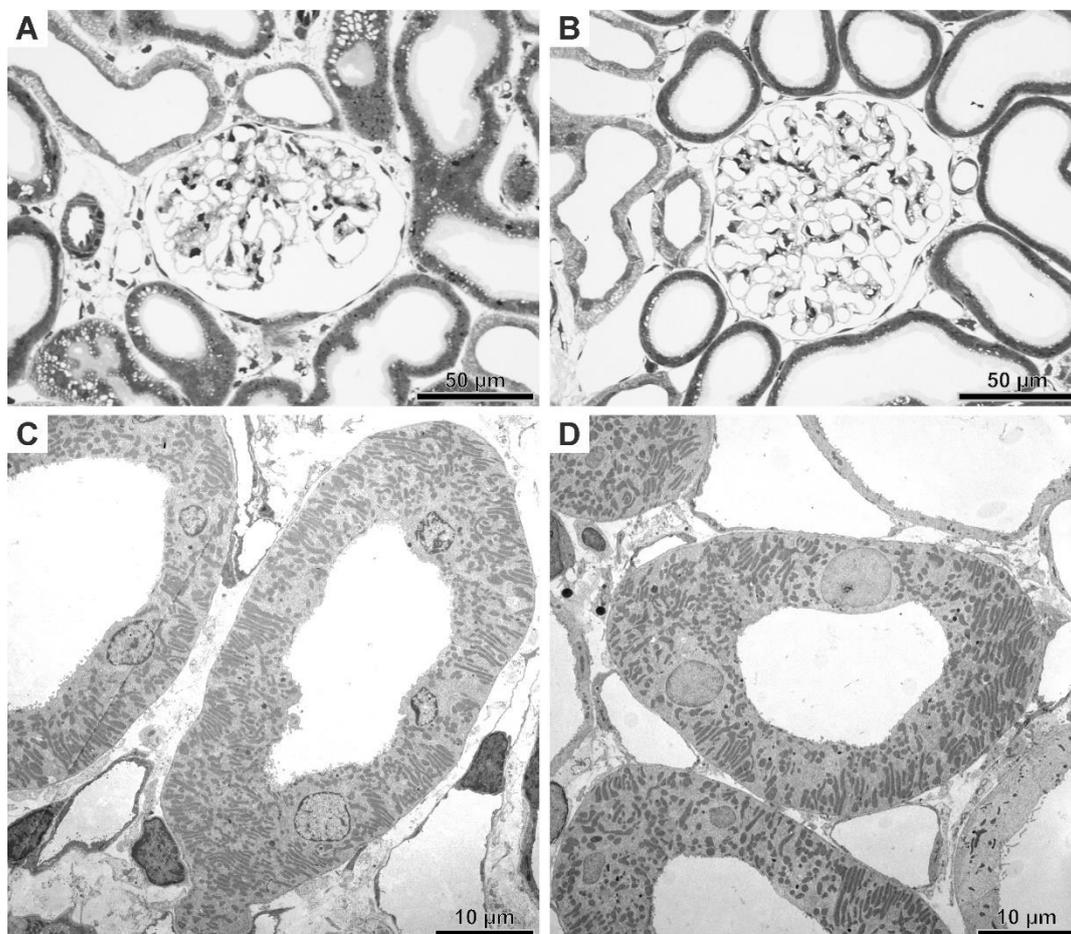


Abbildung 14. Variationen von Protokoll 1; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B) und TEM-Morphologie (C,D). Eine reduzierte HES-Konzentration (P1 V5 in Tabelle 1: 0,9% HES bei ca. 280 mOsmol Vehikelosmolarität) führt zu normal perfundierten kortikalen Tubuli (A) und verschlechterter Fixierung interstitieller Strukturen im äußeren Mark (C). Im Vergleich dazu führt eine hohe HES-Konzentration (P1 V10 in Tabelle 1: 3,6% HES bei ca. 280 mOsmol Vehikelosmolarität) zu dilatierten kortikalen Tubuli (B) und guter Fixierung interstitieller Strukturen im äußeren Mark (D).

V6 in Tabelle 1, 3% Formaldehyd; P1 V4 in Tabelle 1) konnte keine weiter verbesserte Strukturhaltung der Podozyten und kortikalen proximalen Tubuli erreicht werden.

3.4.4. Protokoll 2

Die beschriebenen Schwachstellen von Protokoll 1, vor allem eine eingeschränkte Abgrenzbarkeit von subzellulären Details der Podozyten und kortikalen proximalen Tubuli mit dem TEM, sollten mit einem angepassten Protokoll selektiv verbessert werden; dieses Protokoll wurde als Protokoll 2 bezeichnet. Mit diesem sollten weiterhin gleichzeitig sensitive histochemische, immunhistochemische, immunzytochemische und rein morphologische Auswertungen ermöglicht werden. Die Auswahl der verwendeten Komponenten für Protokoll 2 wurde auf Grundlage der Erkenntnisse von Protokoll 1 und seinen Variationen sowie von Informationen aus Literaturrecherchen getroffen. Im Gegensatz zu Protokoll 1 wurde kein HES verwendet; Grund für diese Entscheidung war der verbesserte Durchfluss der Fixierlösung bei herabgesetzter HES-Konzentration. Mögliche Nachteile in der Sicherheit des Perfusionsablaufs, der Entstehung von extrazellulären Flüssigkeitsansammlungen sowie Qualitätseinbußen der Markfixierung durch Weglassen von HES wurden in Kauf genommen, da mit Protokoll 2 primär kortikale Strukturen erhalten werden sollten. Auch sollte einer Dilatierung von glomerulären Kapillarschlingen, interstitiellen Kapillaren und der Abflachung kortikaler Epithelien, wie sie bei größeren HES-Konzentrationen auftreten, entgegengewirkt werden zugunsten eines physiologischeren Erscheinungsbildes.

3.4.4.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Für die Vorspül- und Fixierlösung wurde ein Phosphatpuffer, bestehend aus Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat, verwendet, der nach früheren Erkenntnissen im Allgemeinen einen schützenden Einfluss auf Tubulusepithelien hat (25). Die Wirkungsweise dieses „Schutzpuffers“ wurde mit der Wirkung von kolloidosmotischen Stoffen wie Saccharose und Dextran verglichen. Möglichen Schäden durch das Weglassen von HES sollte hier entgegengewirkt werden, ohne dass eine erhöhte Viskosität der Lösungen negative Auswirkung hätte. Die Vorspüllösung aus Phosphatpuffer hatte eine Osmolarität von etwa 270 mOsmol. Das Vehikel der Fixierlösung enthielt den gleichen Puffer unter Zusatz von 3% Formaldehyd. Mäuse und Ratten wurden mit Protokoll 2 perfusionsfixiert und entnommenes Gewebe auf gleiche Weise wie für Protokoll 1 nachbehandelt. Lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an Gefrier-, Paraffin- und Semidünnschnitten. Für die TEM-Technik wurden Ultradünnschnitte aus Epon-eingebettetem Material verwendet.

3.4.4.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Die makroskopische Beurteilung der Nieren *in situ* ergab nach Perfusion einen ähnlichen Befund wie bei Protokoll 1; die Nieren waren homogen gelb gefärbt und leicht gehärtet. Es konnten auch nach Zuschnitt keine Anzeichen einer schlechten Fixierung identifiziert werden. Paraffinhistologisch und auf Semidünnschnittebene war eine optimale mikroanatomische Strukturhaltung der Rinde, aber auch, trotz Abwesenheit von HES, des äußeren Marks erkennbar, und Tubuli und Gefäße waren weit offen (Abb. 15A,B). Im inneren Mark waren hingegen vermehrt apikal in den Epithelzellen Schwellungen und Zytoplasmablasen erkennbar. Im Detail zeigten die Glomeruli ein gegenüber Protokoll 1 verbreitertes Zytoplasma und glattere Außenkontur der Podozyten. Proximale Tubuli zeigten konstante Zellhöhe innerhalb ihrer Subsegmente, erschienen jedoch im Vergleich zu Protokoll 1 turgeszenter. Weiterhin waren weniger subapikale intrazelluläre Spaltbildungen im S3-Segment feststellbar. Proximale und distale Subsegmente zeigten in der Rinde und im Mark außerdem keine größeren basolateralen Spaltbildungen. Ultrastrukturell zeigte sich eine verbesserte Strukturhaltung von Podozyten; sie waren weniger kondensiert als bei Protokoll 1 und Zellorganellen konnten besser abgegrenzt werden (Abb. 15C,D), jedoch waren weiterhin deutliche Schrumpfszeichen wie irreguläre Konturen von Zellkern und Zellbegrenzung sichtbar (Abb. 15D). S1-Segmente des proximalen Tubulus waren geringgradig kondensiert bei mäßig beeinträchtigter Feinauflösung. Zellen der S2-Segmente des proximalen Tubulus waren besonders gut erhalten (Abb. 16A), hier waren keine deutlichen Schrumpfszeichen erkennbar. Distale Epithelien zeigten in der Rinde keine Beeinträchtigung durch Schrumpfsartefakte; subzelluläre Details konnten hier gut abgegrenzt werden. Epithelien der S3-Segmente des proximalen Tubulus wiesen im hierfür kritischen Außenstreifen des äußeren Marks nur selten Entmischungen im Zytosol auf, Blasen aus luminal freigesetzten Zytosolmassen zeigten sich selten (Abb. 16B). Im Innenstreifen waren unruhige luminale Abgrenzungen im apikalen Epithelbereich von aufsteigenden Schleifensegmenten erkennbar. Auch in der Innenzone waren alle Epithelien aufgehellert und zum Teil mäßig hydropisch.

3.4.5. Variationen von Protokoll 2

Variationen von Protokoll 2 hatten die selektive Verbesserung der Fixierung von Podozyten und S1/S2-Segmenten des proximalen Tubulus für hochauflösende Darstellung im TEM zum Ziel.

3.4.5.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Es wurde die Vehikelosmolarität der Fixierlösung von Protokoll 2 von ca. 270 auf 200 mOsmol bei sonst unveränderten Parametern gesenkt (P2 V1 in Tabelle 1; „200 mOsmol Schutzpuffer“). Eine weitere Variation wurde mit Vehikelosmolaritäten von 200 mOsmol (P2 V2 in Tabelle 1; „200 mOsmol alternativ“) bzw. 230 mOsmol (P2 V5 in Tabelle 1; „230 mOsmol alternativ“) erstellt, um

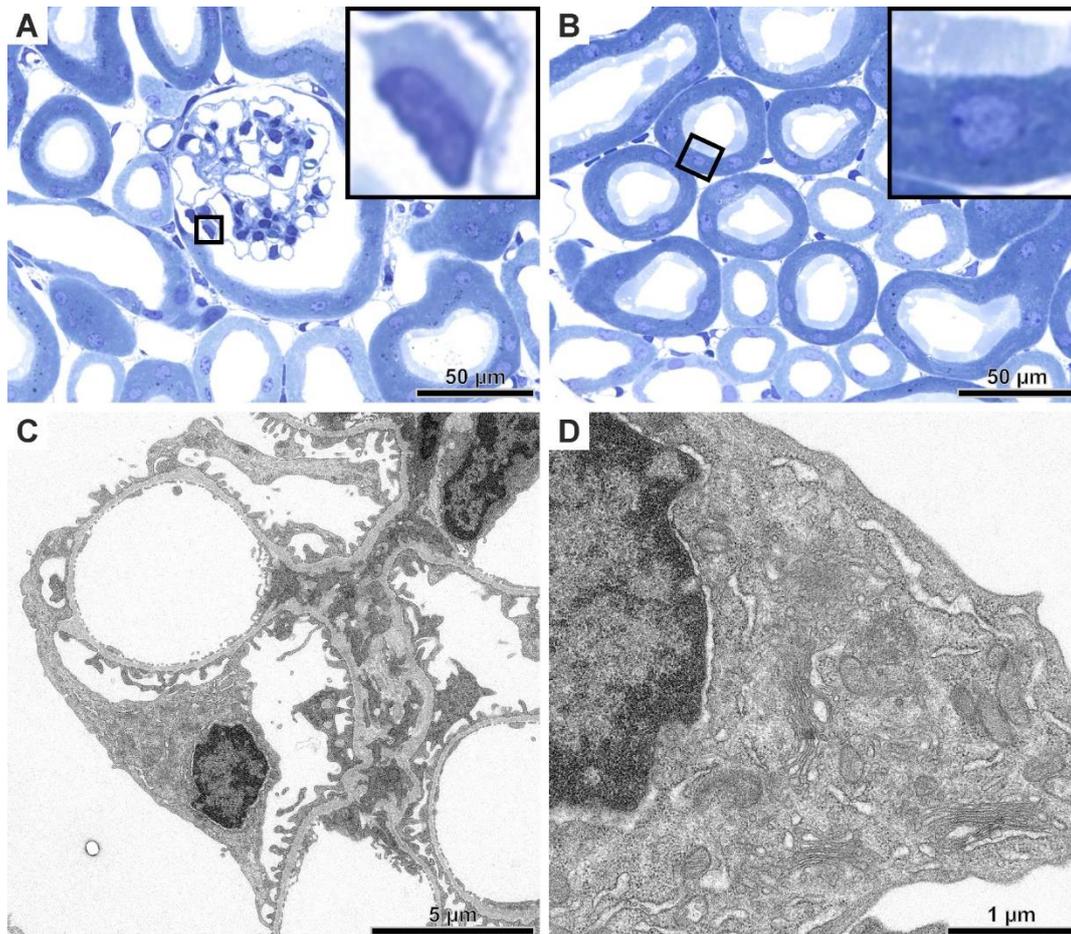


Abbildung 15. Protokoll 2; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B) und TEM-Morphologie (C,D). Morphologische Darstellung von Gewebe, das nach Protokoll 2 (ca. 270 mOsmol Vehikelosmolarität, kein HES) perfusionsfixiert wurde. Mäßig geschrunppte Podozyten (A), offene Tubuli mit glatt begrenzten Lumina in Rinde (A) und dem Übergang von Außenstreifen und Innenstreifen (B). Podozyt mit angrenzenden Glomeruluskapillarschlingen und Mesangium (C); gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Details wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und *Multivesicular bodies* (D).

eine breitere Streuung der Variablen zu ermöglichen; für diese alternativen Protokolle wurden Ringer-Acetat als Vorspülung und Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer als Vehikel für das in diesem Fall 4%ige Formaldehyd verwendet. Einer erwarteten, übermäßigen Zellschwellung bei dem „200 mOsmol alternativ“-Protokoll sollte neben der erhöhten Formaldehydkonzentration fakultativ durch Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd (P2 V2/Glutaraldehyd in Tabelle 1) bzw. 0,05% Glutaraldehyd und 0,21% Pikrinsäure (P2 V2/Glutaraldehyd + Pikrinsäure in Tabelle 1) begegnet werden. Es wurden Mäuse und Ratten mit diesen Variationen von Protokoll 2 perfusionsfixiert. Eine lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an Gefrierschnitten, Paraffinschnitten und Semidünnschnitten. Eine elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte anhand von Ultradünnschnitten von Epon-eingebettetem Material mit dem TEM und der REM-Array Tomographie, weiterhin anhand von Kritisch-Punkt-getrocknetem Material nach *Besputterung* mit

konventionellen REM-Ansätzen. Weiterhin wurden immunhistochemische Markierungen mit einem Annexin A1-Antikörper an Gefrierschnitten durchgeführt.

In situ waren die Nieren nach Perfusion mit einer Vehikelosmolarität von „200 mOsmol Schutzpuffer“ (P2 V1 in Tabelle 1) und „200 mOsmol alternativ“ (P2 V2 in Tabelle 1) in ihrer Oberfläche vermehrt dunkel gefleckt und von geringerer Härting im Vergleich zu Protokoll 2. Nierenscheiben zeigten nach Zuschnitt typischerweise Areale von dunklerer Färbung in Rinde und Mark als Zeichen tubulären Kollapses, sowie Blutansammlungen in den Gefäßbündeln des Marks. Die Verwendung von „230 mOsmol alternativ“ (P2 V3 in Tabelle 1) zeigte eine Verringerung dieser makroskopisch sichtbaren Schäden. Der Zusatz von geringen Konzentrationen Glutaraldehyd bzw. Glutaraldehyd und Pikrinsäure brachten makroskopisch nur geringfügige Verbesserungen.

3.4.5.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Histologisch zeigten sich im Semidünnschnitt bei einer Vehikelosmolarität von 200 mOsmol („200 mOsmol Schutzpuffer“; P2 V1 in Tabelle 1 sowie „200 mOsmol alternativ“; P2 V2 in Tabelle 1) im Vergleich zu den von Protokoll 2 verwendeten ca. 270 mOsmol kortikale und medulläre Tubuli mit einer deutlichen Zunahme ihrer Zelhöhe und in vermehrt kollabiertem Zustand. Fokal waren Tubulusepithelien jedoch auch mikroanatomisch gut erhalten und ohne stärkere Zellschwellung. Glomeruläre Strukturen waren im Vergleich zu Protokoll 2 in einem deutlich turgeszenter erscheinenden Zustand erhalten; Podozyten zeigten ein klar abgrenzbares Zytoplasma und glatte Konturen. S1-Segmente des proximalen Tubulus erschienen ebenfalls turgeszent, zeigten jedoch apikale, einer Quellung ähnliche Zytoplasmablasen. Kortikale distale Tubuli waren seltener und

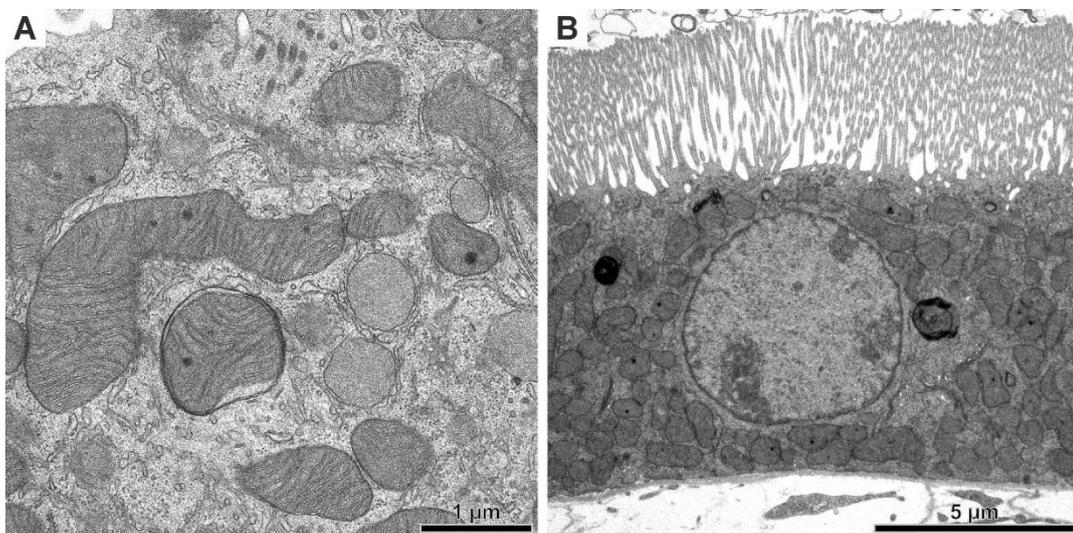


Abbildung 16. Protokoll 2; TEM-Morphologie.

Proximaler Tubulus mit guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details (A; S2-Segment, B; S3-Segment).

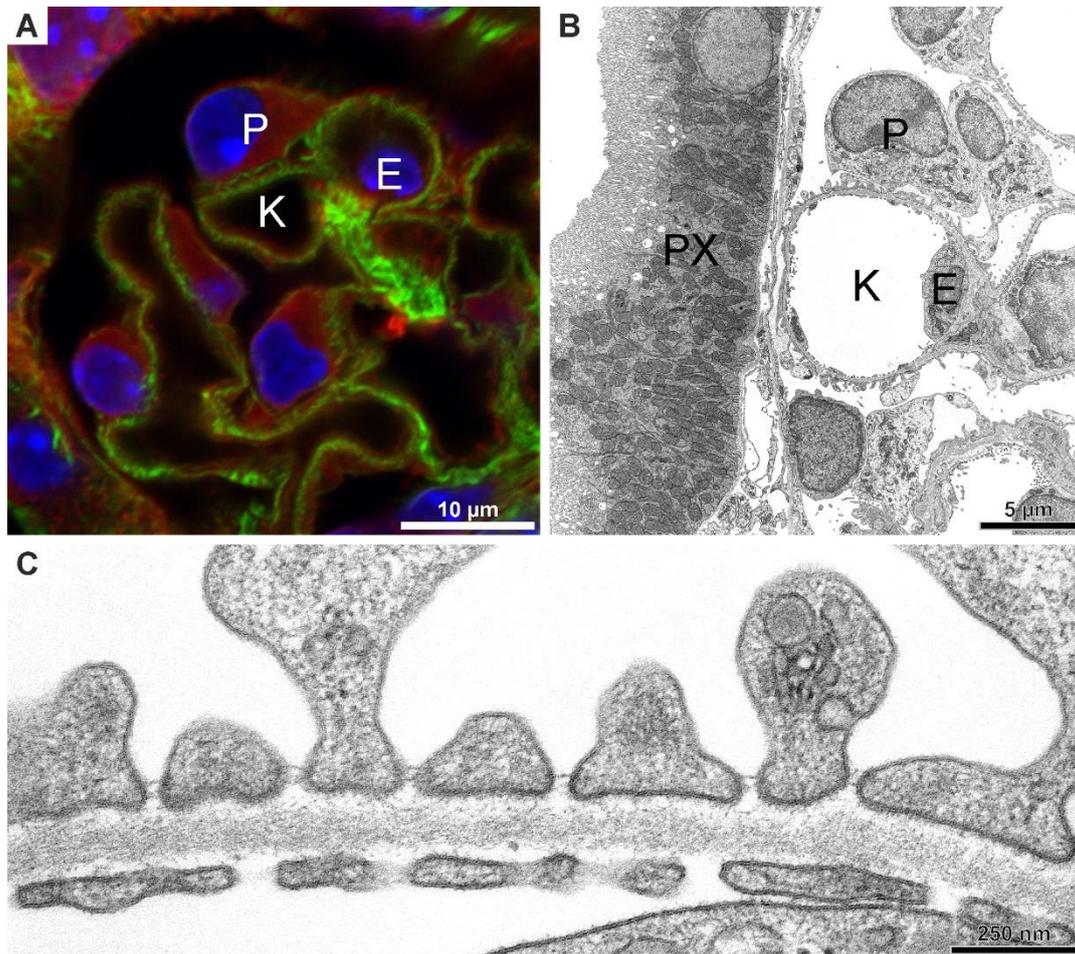


Abbildung 17. Variation von Protokoll 2; Immunhistochemie und TEM-Morphologie.

Immunhistochemie (A) und TEM-Morphologie (B,C). Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1: 200 mOsmol Vehikelosmolarität, „alternativer Puffer“). Gefrierschnitt mit immunhistochemischer Markierung (A: Annexin A1; rot, DAPI Kernfärbung; blau, Phalloidin-Färbung von f-Aktin; grün); die Podozyten (P) zeigen turgeszente Zelleiber und eine glatte Begrenzung. Weiterhin sind glomeruläre Endothelzellen (E) sowie die Kapillarlumina (K) gut abgrenzbar. Turgeszente glomeruläre Strukturen und proximale Tubuli (PX) mit guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details (B). Glomeruläre Filtrationsbarriere (C); Schlitzdialphragmata, Zellmembranen und subzelluläre Details wie Vesikel lassen sich sehr gut vom elektronenlichten Zytoplasma abgrenzen.

weniger stark kollabiert als proximale Tubuli und zeigten klar segmenttypische Differenzierung. Epithelien des äußeren und inneren Marks waren weitestgehend kollabiert und wiesen starke apikale Zytoplasmablasen bei einem insgesamt kompakten Gesamtbild auf. In der Immunhistochemie zeigte sich am Beispiel einer Annexin A1-Markierung mit Gegenfärbung von Zellkernen (DAPI) und f-Aktin über Phalloidinmarkierung ein sehr sensibles Signal, welches besonders stark im Zytoplasmasaum von Podozyten vorhanden war (Abb. 17A). Ultrastrukturell zeigten kortikale und medulläre Strukturen insgesamt ein elektronenlichtes Gesamtbild mit guter Abgrenzbarkeit von intrazellulären Strukturen, jedoch eine maskierte Chromatinstruktur der Zellkerne (Abb. 17,19,20). Glomeruläre Zellen zeigten ein elektronenlichtes Zytoplasma mit herausragend guter Strukturhaltung besonders in den Podozyten (Abb. 17B,18). Die Filtrationsbarriere stellte sich ebenso mit gut auflösbarer Substruktur dar (Abb. 17C). Epithelien

des proximalen Tubulus zeigten in den S1- und S2-Segmenten geringe Elektronendichte mit sehr guter Auflösung des zytoplasmatischen Details (Abb. 19A,B, Abb. 20A,B). Distale Epithelien zeigten kortikal in allen Segmenten ebenfalls ausgezeichnetes zelluläres Detail (Abb. 19C,D und Abb. 20C,D). Medulläre Epithelien und Fibroblasten waren aufgrund von schwellungsbedingten Veränderungen wenig gut erhalten.

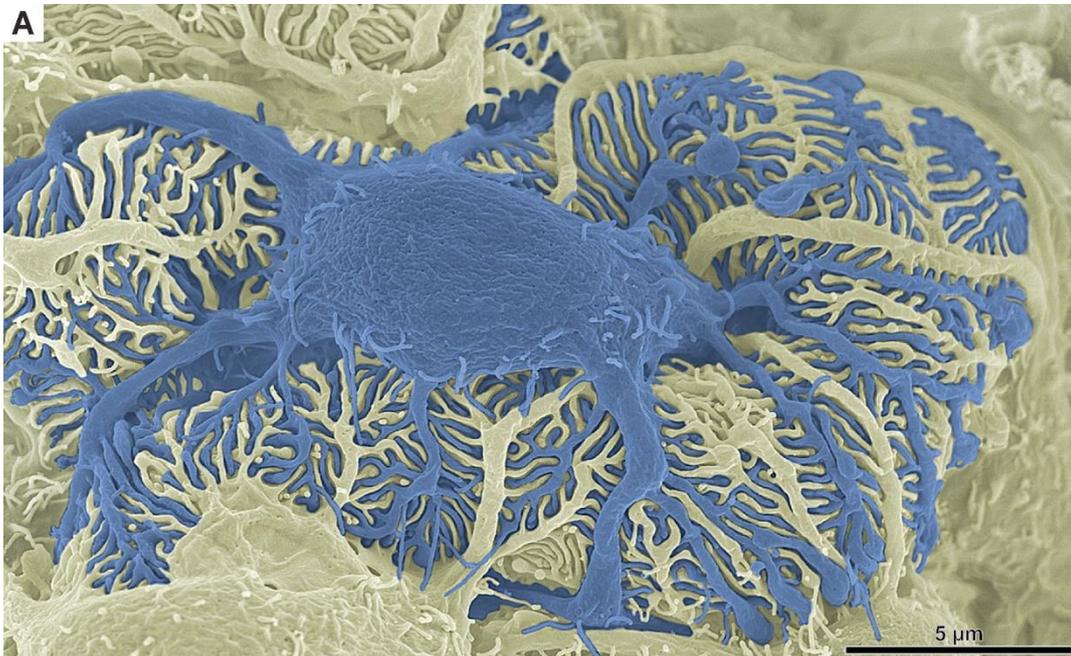


Abbildung 18. Variation von Protokoll 2; colorierte REM-Aufnahme eines Podozyten.

Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1: 200 mOsmol Vehikelosmolarität, „alternativer Puffer“). Die Interdigitiation von Podozytenfortsätzen zwischen benachbarten Podozyten ist klar erkennbar, der Podozyt zeigt einen turgeszenten Zelleib.

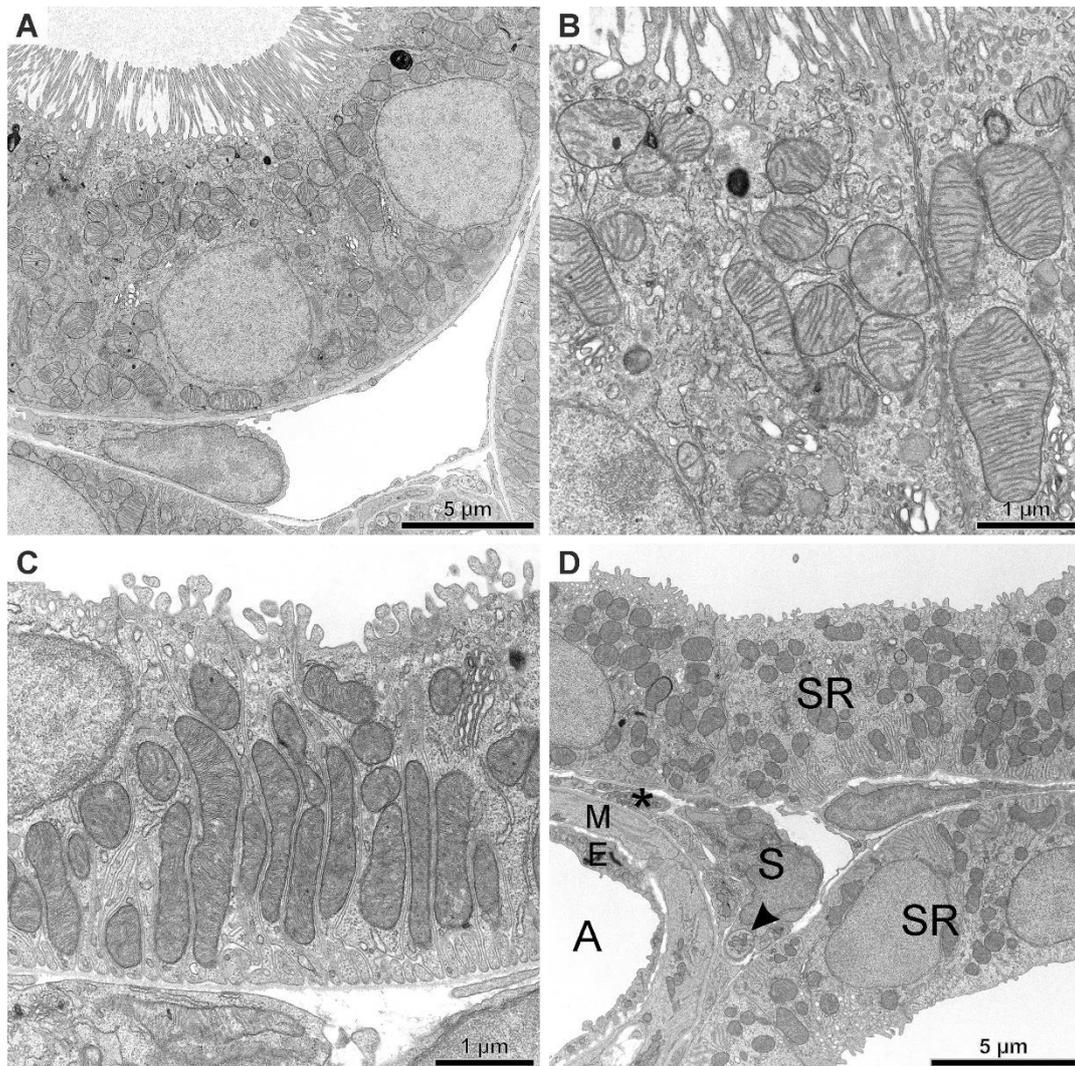


Abbildung 19. Variation von Protokoll 2; TEM-Morphologie.

Variation von Protokoll 2 (P2 V1 in Tabelle 1; 200 mOsmol Vehikelosmolarität). Es können proximale Tubuli (A,B) sowie aufsteigender Schleifenschenkel in der Rinde (C) in hoher Qualität dargestellt werden. Auch weitere kortikale Strukturen zeigen eine exzellente Auflösbarkeit von mikroanatomischer Struktur und ultrastrukturellen Details (D); Sammelrohre (SR), Arteriole (A) mit Endothel (E), Media (M) und Adventitia (*; Varikositäten-Nervenendigungen). Im Zentrum zeigt sich vermutlich eine Schwann-Zelle (S), welche ein Axon einer Nervenzelle (Pfeilspitze) umschließt.

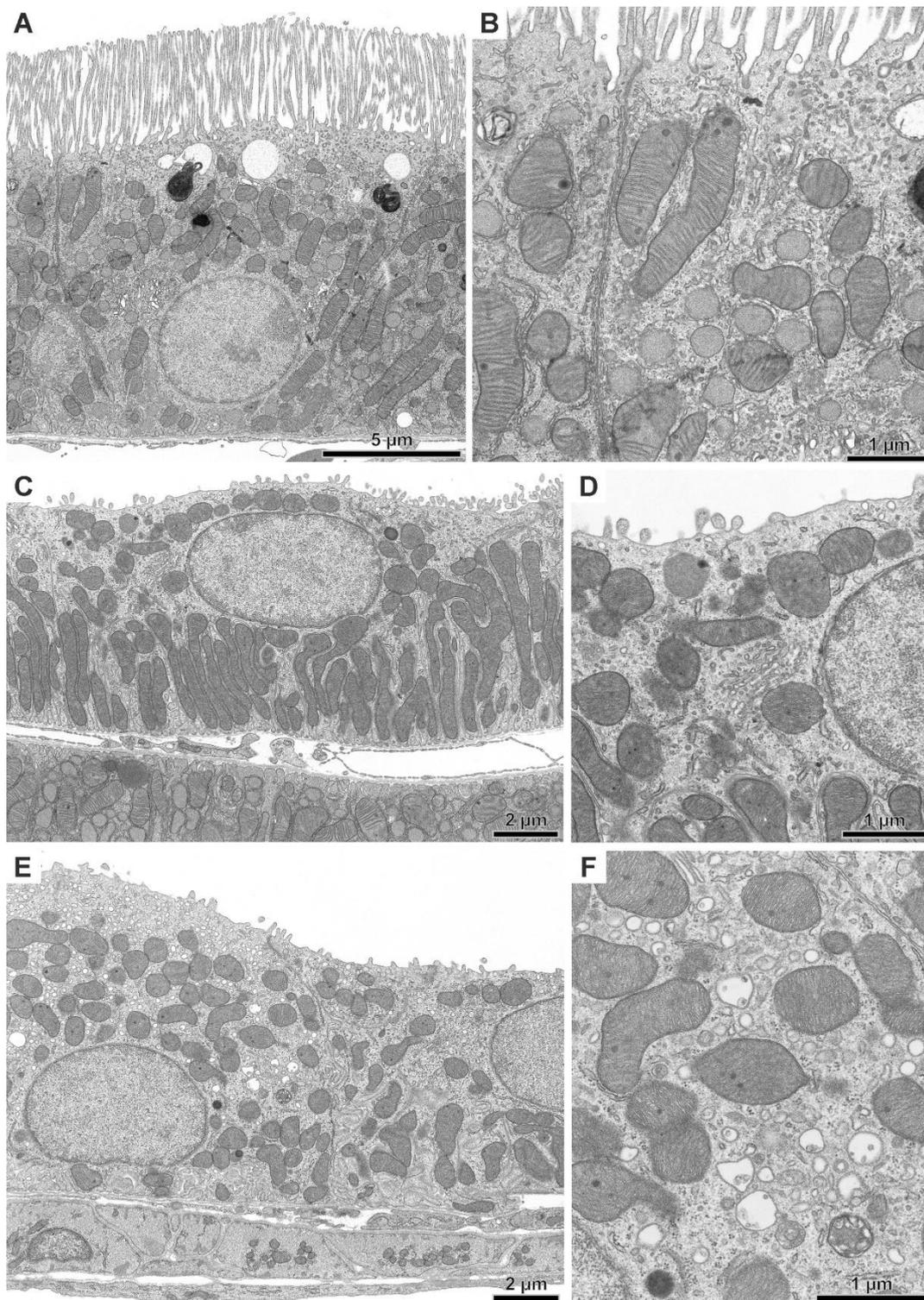


Abbildung 20. Variation von Protokoll 2; TEM-Morphologie.

Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1: 200 mOsmol Vehikelosmolarität und Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd, „alternativer Puffer“). Proximaler Tubulus in Übersicht (A) und Detail (B); es zeigt sich eine sehr gute mikroanatomische Strukturerhaltung mit ausgezeichneter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details. Post-Maculasegment des aufsteigenden Schleifenschenkels mit turgeszentem Gesamtbild in der Übersicht (C) und im Detail (D); der Zellkern zeigt eine glatte Kontur und eine verwaschene Chromatinstruktur. Sammelrohr in Übersicht (E) und Detail (F) mit guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details. Weiterhin ist eine Arteriole im Längsschnitt getroffen (E); es lassen sich Endothel, glatte Muskelzellen und Basalmembranen differenzieren.

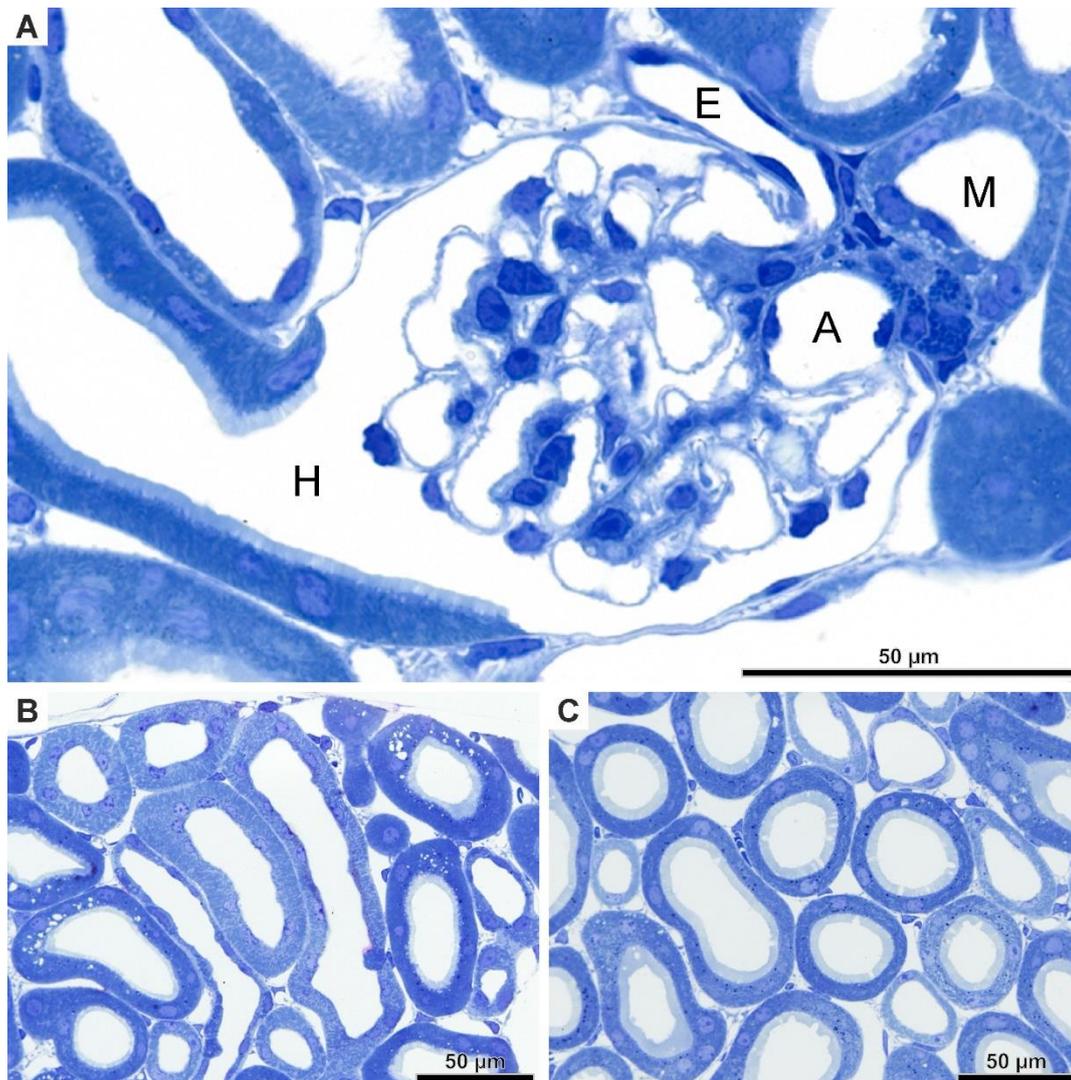


Abbildung 21. Variation von Protokoll 2; Semidünnschnitt-Morphologie.

Variation von Protokoll 2 (P2 V3 in Tabelle 1: 230 mOsmol Vehikelosmolarität, „alternativer Puffer“). Glomerulus (A) mit afferenter (A) und efferenter (E) Arteriole, Macula densa (M), gut perfundiertem Schlingenkonvolut und durchgängigem Harnpol (H); Podozyten zeigen mittelgradige Schrumpfungen. Kortikale Tubuli sind in turgeszentem Zustand erhalten und zeigen keine erkennbaren Schrumpfungen (A,B), jedoch fokal einige basolaterale Spaltbildungen (B). S3-Segmente des proximalen Tubulus zeigen eine weitestgehend gute Fixierung, mit nur wenigen subapikalen Spaltbildungen (C).

Nierengewebe von „230 mOsmol alternativ“ (P2 V3 in Tabelle 1) wurde ausschließlich lichtmikroskopisch anhand von Gefrierschnitten und Semidünnschnitten ausgewertet. Es zeigte sich hier gegenüber Protokoll 2 mit ca. 270 mOsmol Vehikelosmolarität eine ähnliche mikroanatomische Struktur auf Semidünnschnittebene mit gut perfundierten kortikalen und medullären Tubuli (Abb. 21A-C). Podozyten zeigten hier einen vergleichbaren Schrumpfungsgrad wie bei Protokoll 2 (Abb. 21A) und damit einen höheren Schrumpfungsgrad als beide Variationen mit 200 mOsmol („200 mOsmol Schutzpuffer“; P2 V1 in Tabelle 1, „200 mOsmol alternativ“; P2 V2 in Tabelle 1), wie anhand von Gefrierschnitten mit Annexin A1-Markierung und auf Semidünnschnittebene deutlich wurde. Proximale Tubuli zeigten kortikal eine gute

segmenttypische Strukturhaltung (Abb. 21B,C). Distale Epithelien zeigten bei 230 mOsmol (P2 V3 in Tabelle 1) kortikal eine höhere Turgeszenz und kleinere Lumina (Abb. 21B), während bei Protokoll 2 kortikale aufsteigende Schleifenschenkel, Post-Maculasegmente des aufsteigenden Schleifenschenkels und Sammelrohre vermehrt mittelgradig dilatiert waren und ein ausgedünntes Tubulusepithel zeigten. S3-Segmente des proximalen Tubulus waren weitestgehend sehr gut erhalten, zeigten jedoch stellenweise subapikale Spaltbildungen (Abb. 21C).

Der Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd zum Protokoll „200 mOsmol alternativ“ (P2 V2/ Glutaraldehyd in Tabelle 1, Abb. 20A-F) verbesserte die mikroanatomische Struktur stellenweise deutlich; es zeigten sich in kortikalen Tubulusepithelien weniger Entmischungen und luminale Blasen. Eine Fixierung ohne Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd (P2 V1 in Tabelle 1) ermöglichte ebenfalls eine ausgezeichnete Strukturhaltung der Rinde (Abb. 19A-D), aufgrund größerer Bereiche von kollabierten Tubuli jedoch mit quantitativen Einschränkungen. Der Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd und 0,21% Pikrinsäure zum Protokoll „200 mOsmol alternativ“ (P2 V2/ Glutaraldehyd + Pikrinsäure in Tabelle 1) zeigte eine zusätzliche Verbesserung gegenüber dem Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd allein.

3.4.6. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 2 und Variationen

Protokoll 1 ermöglicht eine gute Fixierung der meisten Strukturen in Rinde und Mark, jedoch sollte durch ein weiteres Standardprotokoll – Protokoll 2 – speziell eine verbesserte hochauflösende Strukturhaltung kortikaler Zellen ermöglicht werden. Die einfachere Zusammensetzung im Vergleich zu Protokoll 1 erleichtert und beschleunigt die Herstellung von Vorspül- und Fixierlösung. Die Lösungen enthalten außerdem keine Kolloide, die über rheologische Eigenschaften den Ablauf der Perfusionsfixierung beeinträchtigen können. Protokoll 2 ermöglicht somit eine gute Fixierung für LM- und besonders für TEM-Techniken, mikroanatomische Strukturhaltung sowie Hochauflösung werden erreicht. Die Struktur der Podozyten und kortikalen proximalen Tubuli ist gegenüber Protokoll 1 besser, allerdings um den Preis eines generell etwas unsichereren Fixierungserfolges. Die Herabsetzung der Vehikelosmolarität auf 200 mOsmol optimiert die Ultrastruktur von Podozyten und kortikalen proximalen Tubuli weiter, wenn auch bei reduzierter genereller Perfusionsqualität. Diese konnte allerdings wiederum durch Zusatz von Glutaraldehyd und weiter durch Zusatz von Glutaraldehyd und Pikrinsäure verbessert werden. Diese Variationen empfehlen sich als Spezialprotokolle für die hochauflösende Strukturuntersuchung von Podozyten und kortikalen proximalen Tubuli im TEM. Die mittlere Vehikelosmolarität von 230 mOsmol erhöhte die Turgeszenz kortikaler Epithelzellen, ließ jedoch die Podozyten und fokal kortikale proximale Tubuli geschrumpft erscheinen und empfiehlt sich daher nicht für eine selektiv verbesserte Fixierung dieser Zelltypen.

3.5. Fixierungsprotokolle für rein morphologische Methoden

Zur Anwendung kam ein Fixierungsprotokoll (Protokoll 3), das rein morphologische Methoden zum Inhalt hatte.

3.5.1. Protokoll 3

Zusätzlich zu den Formaldehyd-basierten Fixierungsprotokollen 1 und 2 wurden Perfusionsfixierungen mit höheren Glutaraldehydkonzentrationen durchgeführt. Morphologische Auswertungen in hoher Qualität standen hier im Vordergrund. Hierdurch sollte überdies eine vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Qualitätsbewertung der Protokolle 1 und 2 erreicht werden.

3.5.1.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Mäuse und Ratten wurden nach Protokoll 3 perfusionsfixiert. Hierbei wurde zur Vorspülung eine Lösung aus Na-Kakodylatpuffer, Saccharose und HES (1%) mit einer Gesamtosmolarität von etwa 330 mOsmol angewandt (Tabelle 1). Die Fixierlösung enthielt die gleiche Lösung als Vehikel, jedoch ohne Zusatz von Saccharose, dazu enthielt sie 2% Glutaraldehyd. Nierenscheiben wurden standardmäßig für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung über Nacht in Perfusionslösung nachfixiert und für TEM- bzw. REM-Ansätze konventionell weiterbehandelt. Epon-eingebettetes Material wurde lichtmikroskopisch anhand von Semidünnschnitten und elektronenmikroskopisch anhand von Ultradünnschnitten ausgewertet. Weiteres Material wurde nach Kritisch-Punkt-Trocknung und *Besputterung* mit konventionellen REM-Ansätzen ausgewertet.

3.5.1.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

In situ waren die Nieren nach Perfusion auf der Oberfläche homogen gelb gefärbt und von stark gehärteter Konsistenz. Nierenscheiben zeigten nach Zuschnitt zonentypische Helligkeiten und waren weitestgehend frei von Blutansammlungen in den Gefäßbündeln des Marks. Auf Semidünnschnittebene zeigte sich eine hervorragende Strukturhaltung. Gut perfundierte Tubuli und Gefäße von Rinde und äußerem Mark wurden bis zum Übergang vom Außenstreifen zum Innenstreifen angetroffen (Abb. 22A,B). Im Detail war das Schlingenkonvolut der Glomeruli gut perfundiert und glomeruläre Zellen konnten eindeutig identifiziert werden. Podozyten zeigten ein deutlich abgrenzbares Zytoplasma und glatte Zellumrisse (Abb. 22A). Proximale S1- und S2-Segmente zeigten eine glatte luminale und basale Kontur und eine gleichbleibende Zellhöhe. Distale Segmente stellten sich in ihrer Zelltyp-spezifischen Morphologie gut dar. Im äußeren Mark zeigten sich gut erhaltene S3-Segmente und aufsteigende Schleifensegmente mit homogener Zytoplasmaverteilung (Abb. 22B). Im tiefen Innenstreifen und vermehrt im inneren Mark zeigten sich allerdings hydropische Veränderungen in den Epithelien.

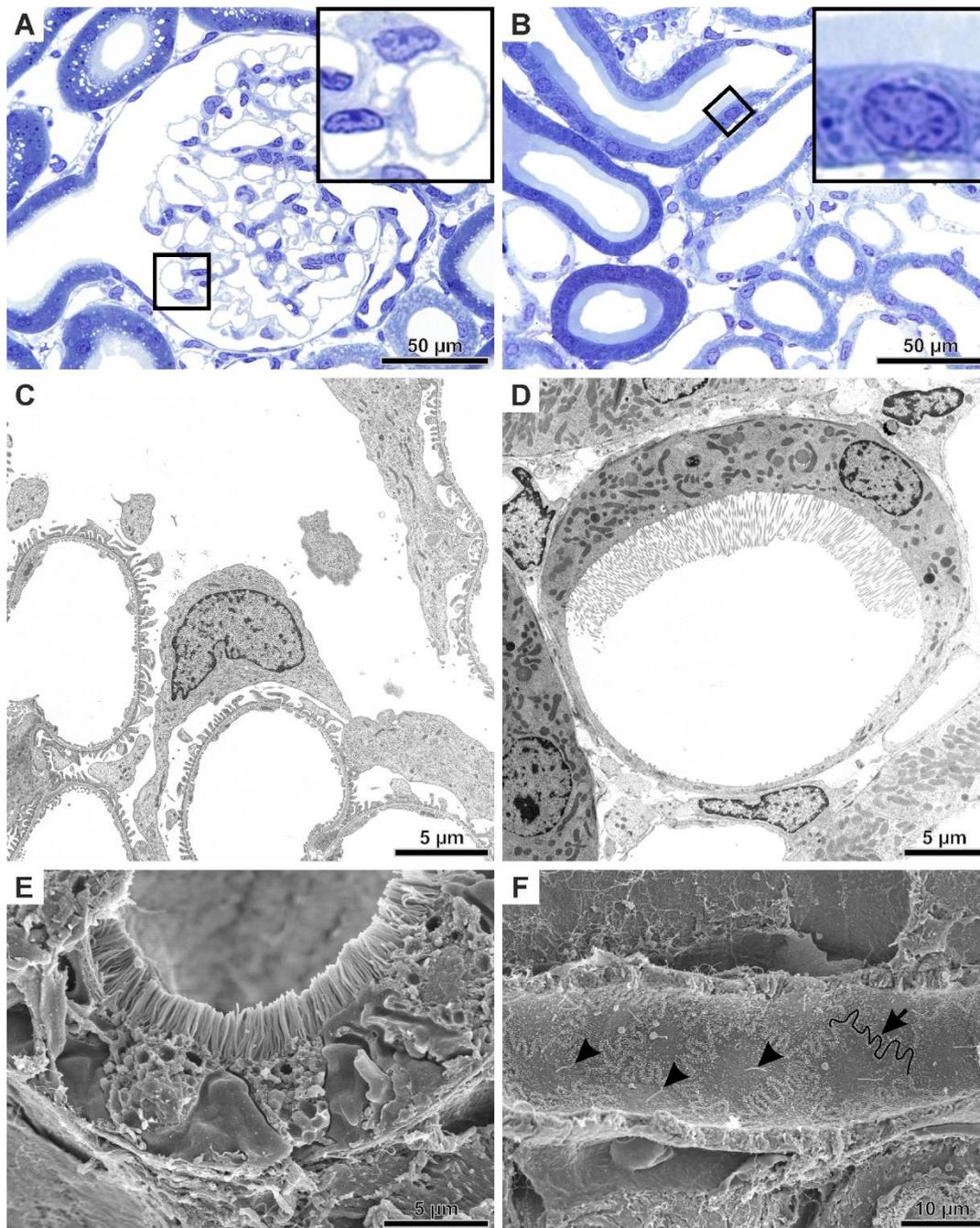


Abbildung 22. Protokoll 3; Semidünnschnitt-, TEM- und REM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B), TEM-Morphologie (C,D) und REM-Morphologie (E,F). Morphologische Darstellung von Gewebe, das nach Protokoll 3 (ca. 230 mOsmol Vehikelosmolarität und 1% HES) perfusionsfixiert wurde. Geringgradig geschrumpfte Podozyten (A), offene Tubuli mit glatt begrenzten Lumina in Rinde (A) und im Bereich des Übergangs vom Außenstreifen zum Innenstreifen mit guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details (B). Podozyt mit zugehöriger Kapillarschlinge (C); normaler Zelleib mit glatter Begrenzung. S3-Segment des proximalen Tubulus am Übergang zum dünnen absteigenden Schleifensegment, die Abgrenzbarkeit subzellulärer Details wie Mitochondrien ist gut (D). Proximaler Tubulus mit Bürstensaum und Bruchkanten im Bereich der interdigitierenden Zellmembranen (E) und durch die Zellen. Aufsteigendes, kortikales Schleifensegment mit gut erhaltener Oberflächendifferenzierung (F); die Zellen zeigen meanderförmig verlaufende Zellgrenzen (Pfeil) mit Ansammlungen von kleinen Mikrovilli und weiterhin je ein zentrales Kinozilium (Pfeilspitzen).

Ultrastrukturell zeigte sich im TEM eine gute Strukturhaltung sämtlicher Zelltypen in Rinde und äußerem Mark. Einschränkungen bestanden jedoch in den S1 und S2-Segmenten in Gestalt von zytoplasmatischer Verdichtung und verringerter Abgrenzbarkeit des subzellulären Details. Hinsichtlich der Darstellung von Membranen, Zellorganellen und Chromatinstruktur zeigten sich die in 3.3. beschriebenen charakteristischen Unterschiede zwischen Standardosmierung und reduzierter Osmierung (Abb. 7A-F); eine deutlich verbesserte Abgrenzbarkeit von subzellulären Details, auch bei S1- und S2-Segmenten, konnte durch reduzierte Osmierung erreicht werden. Im REM zeigte das Gewebe eine intakte, zelltypische Oberflächendifferenzierung der Glomeruli und aller Tubulussegmente sowie der Endothelien (Abb. 22E,F).

3.5.2. Variationen von Protokoll 3

Eine selektiv verbesserte Fixierung medullärer Tubulusepithelien sollte durch Verwendung von erhöhter Vehikelosmolarität und HES-Konzentration erreicht werden. Weitere Variationen hatten die verbesserte Fixierung sowohl von kortikalen als auch medullären Strukturen ohne Zusatz von HES zum Ziel, um eine mögliche Passagestörung durch die Filtrationsbarriere zu vermeiden und einen verbesserten Durchfluss des Fixans zu ermöglichen. Weiterhin sollte hierdurch eine verbesserte Reproduzierbarkeit von Perfusionen geprüft werden, da die Zusammensetzung von HES seitens des Herstellers mehrfach geändert wurde und dies einen Unsicherheitsfaktor darstellte.

3.5.2.1. Perfusion und Gewebeaufarbeitung

Es wurde für die Vorspüllösung eine gegenüber Protokoll 3 erhöhte Gesamtosmolarität von etwa 320 mOsmol und eine erhöhte HES-Konzentration von 4% verwendet. Die gleiche Lösung wurde für das Vehikel der Fixierlösung unter Zusatz von 2% Glutaraldehyd (P3 V1 in Tabelle 1) verwendet. Die HES-freien Lösungen wurden mit einer mittleren (P3 V2 in Tabelle 1), hohen (P3 V3 in Tabelle 1) oder geringen (P3 V4 in Tabelle 1) Vehikelosmolarität zusammengestellt. Als Vorspüllösung wurden für die mittlere Vehikelosmolarität Na-Kakodylatpuffer und Natriumchlorid mit einer Gesamtosmolarität von 240 mOsmol verwendet, für die hohe Vehikelosmolarität wurde diese Lösung auf 336 mOsmol eingestellt; die gleichen Lösungen wurden jeweils auch als Vehikel für die Fixierlösung unter Zusatz von 2% Glutaraldehyd verwendet. Für die niedrige Vehikelosmolarität wurde Phosphatpuffer nach Sörensen mit einer Gesamtosmolarität von 150 mOsmol verwendet. Die gleiche Lösung wurde auch als Vehikel für die Fixierlösung, unter Zusatz von 2,5% Glutaraldehyd, verwendet.

3.5.2.2. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Die im Vergleich zu Protokoll 3 erhöhte Vehikelosmolarität und HES-Konzentration (P3 V1 in Tabelle 1; Abb. 23A,B) führte zu einer verbesserten Markfixierung, kortikale Epithelien zeigten

jedoch lichtmikroskopisch eine Schrumpfung. Im Übergangsbereich zwischen Außenstreifen und Innenstreifen waren S3-Segmente des proximalen Tubulus ebenfalls stark kondensiert und abgeflacht, während aufsteigende Schleifenschenkel gut fixiert waren (Abb. 23B). Im inneren Mark waren die Sammelrohre und Vasa recta gut perfundiert, stellenweise jedoch mit hydropischen Veränderungen im apikalen Epithelbereich. Ultrastrukturell bestätigte sich für die Rinde eine Epithelschrumpfung, indem das intrazelluläre Detail verschlechtert abgrenzbar war (Abb. 23C). Medulläre Segmente waren mit Ausnahme der S3-Segmente des proximalen Tubulus jedoch gut fixiert und zeigten keine erkennbaren Schrumpfungen (Abb. 23D). Im REM zeigten sich kortikale und medulläre Tubulusepithelien mit zelltypischer Oberflächendifferenzierung (Abb. 24). Podozyten hatten einen geschrumpften Zelleib bei sonst guter Auflösbarkeit ihrer Fußfortsätze.

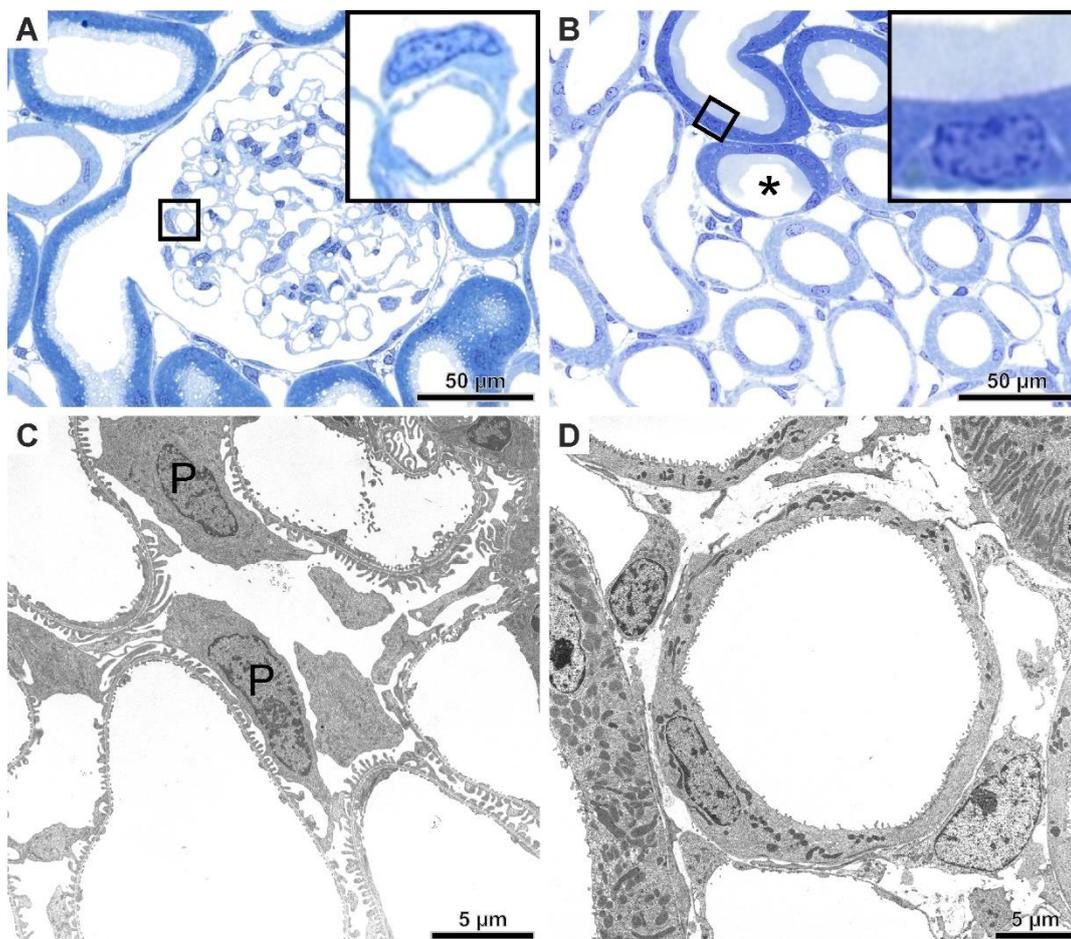


Abbildung 23. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B) und TEM-Morphologie (C,D). Variation von Protokoll 3 (P3 V1 in Tabelle 1: Ca. 320 mOsmol Vehikelosmolarität und 4% HES). Geschrumpfte Podozyten und offene kortikale Tubuli mit glatt begrenzten Lumina in der Rinde (A). Offene Tubuli mit schlechter Abgrenzbarkeit subzellulärer Details im Bereich des Übergangs vom Außenstreifen zum Innenstreifen (B;*). Geschrumpfter Podozyt mit elektronendichtem Zytoplasma (C). Offenes, glatt begrenztes Lumen eines dünnen absteigenden Schleifenschenkels im Innenstreifen (D).

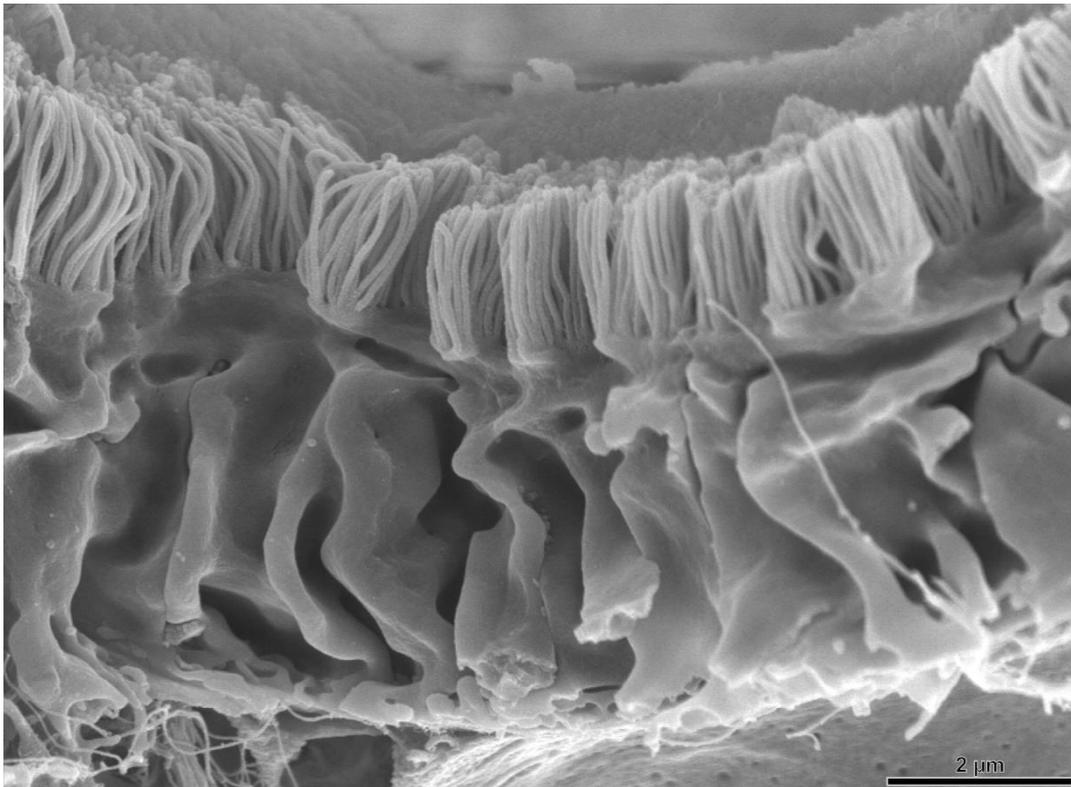


Abbildung 24. Variation von Protokoll 3; REM-Morphologie.

Variation von Protokoll 3 (P3 V1 in Tabelle 1: Ca. 320 mOsmol Vehikelosmolarität und 4% HES). Proximaler Tubulus mit Bürstensaum und glatten Bruchkanten entlang der interdigitierenden Zellmembranen.

Die im Vergleich zu Protokoll 3 ähnlich hohe (mittlere) Vehikelosmolarität (P3 V2 in Tabelle 1), ohne HES-Zusatz, führte auf Semidünnschnittebene zu gut perfundierten Tubuli bis zum Übergang vom Außenstreifen zum Innenstreifen (Abb. 25A,B). Podozyten erschienen turgeszent und zeigten ein deutlich abgrenzbares Zytoplasma bei abgerundeter Zellkontur (Abb. 25A). S1- und S2-Segmente des proximalen Tubulus waren gut perfundiert. Distale kortikale Tubuli zeigten hohes Epithel bei charakteristischer Morphologie. Im Außenstreifen zeigten S3-Segmente und aufsteigende Schleifensegmente eine gute Struktur ohne Beeinträchtigungen durch Schrumpfungen oder Zytoplasmainhomogenitäten (Abb. 25B). Ultrastrukturell zeigten glomeruläre Zellen klar abgrenzbare Zelldifferenzierungen; Podozyten zeigten ein deutlich ausgebildetes Zytoplasma mit guter Abgrenzbarkeit von Zellorganellen (Abb. 25C). Endothelzellen und glatte Muskelzellen zeigten eine typische Ultrastruktur (Abb. 25D). Im Außenstreifen und Innenstreifen waren die Tubulusepithelien in guter Ultrastruktur erhalten; es waren keine Zytoplasmainhomogenitäten oder apikale Zellschwellungen sichtbar (Abb. 25E,F). Im inneren Mark waren jedoch vermehrt Schwellungen und Zytoblastmablasen mit Vorwölbung in das Tubuluslumen erkennbar.

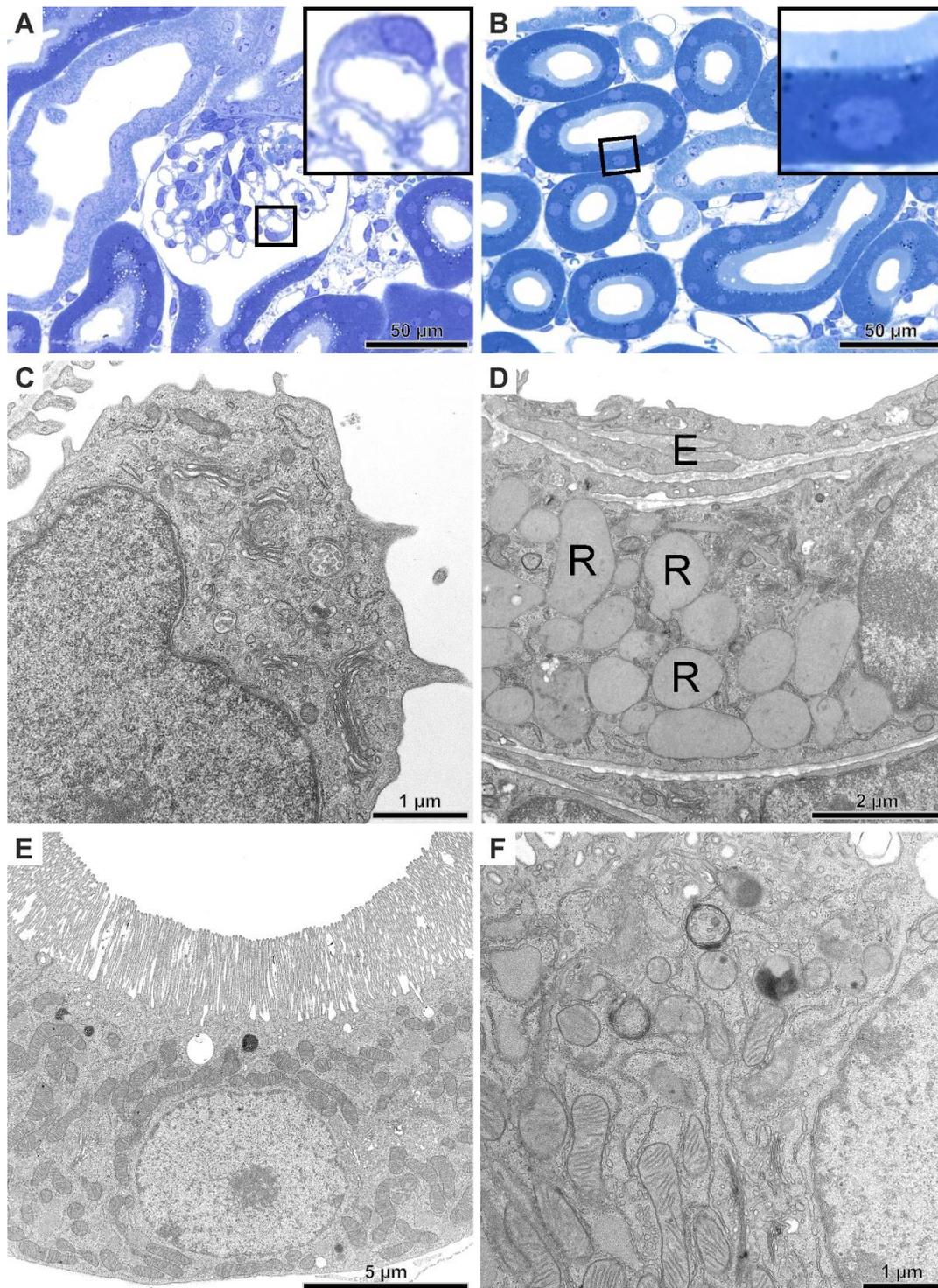


Abbildung 25. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B) und TEM-Morphologie (C-F). Variation von Protokoll 3 (P3 V2 in Tabelle 1: 240 mOsmol Vehikelosmolarität, kein HES). Geringgradig geschrumpfte Podozyten (A), offene Tubuli mit glatt begrenzten Lumina in Rinde (A) und im Bereich des Übergangs vom Außenstreifen zum Innenstreifen (B). Podozyt mit guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details wie Mitochondrien und Golgi-Apparat vom elektronenlichten Zytoplasma (C). Afferente Arteriole (D) mit Endothel (E) und Renin-produzierender Zelle, dicht gepackt mit Renin-Granula (R). Proximaler Tubulus mit schlechter Abgrenzbarkeit von Membranorganellen nach Standardosmierung (E), deutlich verbesserte Abgrenzbarkeit von Membranorganellen nach reduzierter Osmierung (F).

Die im Vergleich zu Protokoll 3 erhöhte Vehikelosmolarität (P3 V3 in Tabelle 1), ohne HES-Zusatz, führte auf Semidünnschnittebene zu vermehrten Schrumpfungen von Podozyten, kortikalen Tubuli sowie S3-Segmenten im Außenstreifen; Tubulusepithelien zeigten hier eine verringerte Zellhöhe bei vergrößertem Lumen (Abb. 26A,B). Im Außenstreifen waren aufsteigende Schleifensegmente ohne verstärkte Schrumpfungen sichtbar, während sie im Innenstreifen fokal Zellschwellungen zeigten. Ultrastrukturell zeigte sich im TEM das Zytoplasma von Podozyten, kortikalen proximalen Tubulusepithelien sowie S3-Segmenten des proximalen Tubulus im Außenstreifen im Vergleich zur mittleren Vehikelosmolarität (P3 V2 in Tabelle 1) eher elektronendicht, mit der Folge von erschwerter Abgrenzbarkeit des intrazellulären Details. Kortikale distale Tubulusepithelien sowie aufsteigende Schleifensegmente im äußeren Mark waren gut erhalten.

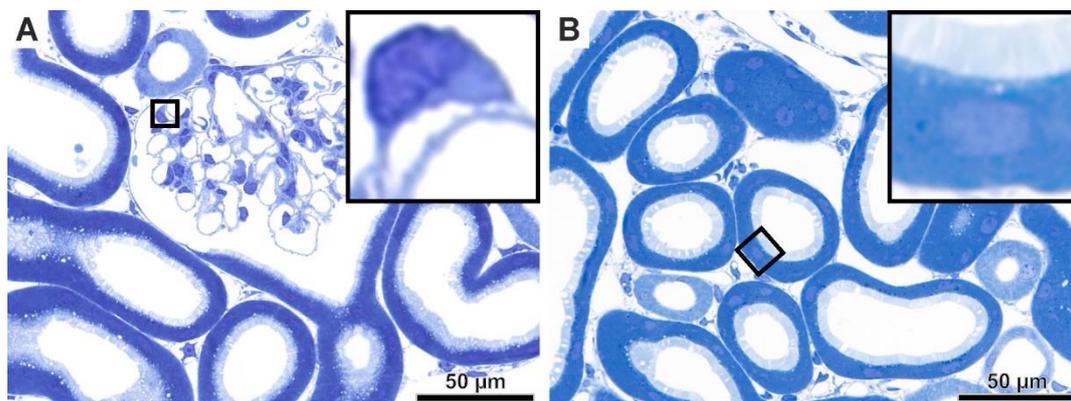


Abbildung 26. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt-Morphologie.

Variation von Protokoll 3 (P3 V3 in Tabelle 1: Ca. 340 mOsmol Vehikelosmolarität ohne HES). Eine hohe Vehikelosmolarität führte zu geschrumpften Podozyten und dilatierten kortikalen (A) und medullären Tubuli (B).

Die Variante mit im Vergleich zu Protokoll 3 stark verringerter Vehikelosmolarität (P3 V4 in Tabelle 1) erhöhte im Vergleich zur mittleren Vehikelosmolarität (P3 V2 in Tabelle 1) die Turgeszenz von Podozyten und kortikalen Tubuli (Abb. 27A,B) weiter. Proximale kortikale sowie medulläre Tubuli waren weitestgehend kollabiert und zeigten eine vergrößerte Zellhöhe mit apikalen Schwellungen und Zytoplasmablasen. Ultrastrukturell war im TEM die zytoplasmatische Elektronendichte sämtlicher kortikaler und medullärer Zellen im Vergleich zur mittleren Vehikelosmolarität (P3 V2 in Tabelle 1) stark verringert (Abb. 27C,D). Im REM zeigten sich in kortikalen und medullären Tubuli überwiegend luminale Zellabschnürungen; in proximalen Tubuli war dies besonders stark ausgeprägt (Abb. 27E), während kortikale distale Tubuli und Sammelrohre meist nur geringgradige Schwellungszeichen zeigten (Abb. 27F).

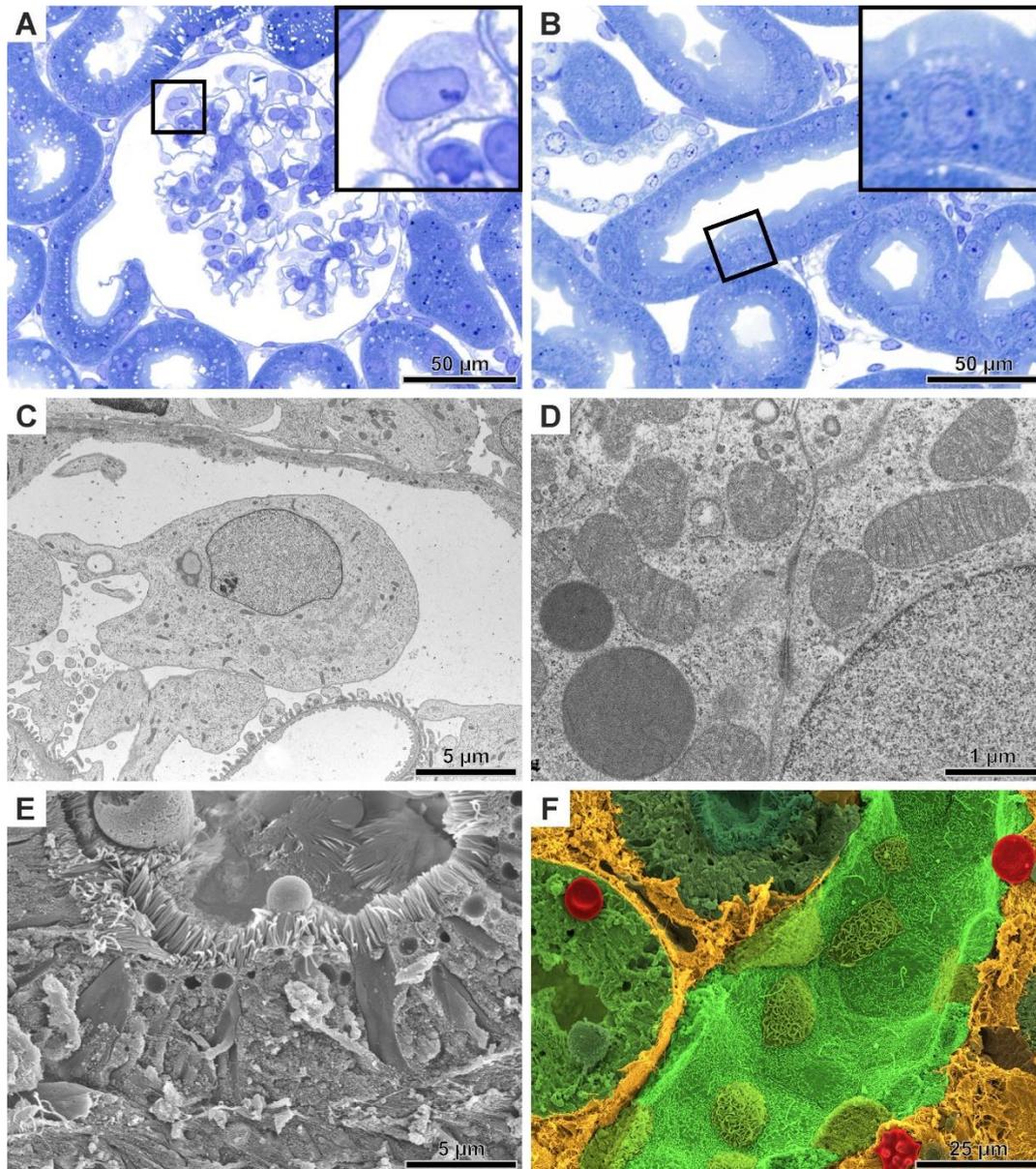


Abbildung 27. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt-, TEM- und REM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B), TEM-Morphologie (C,D) und REM-Morphologie (E,F). Variation von Protokoll 3 (P3 V4 in Tabelle 1: 150 mOsmol Vehikelosmolarität ohne HES). Eine niedrige Vehikelosmolarität führt zu geschwollenen Podozyten und geschwollenen kortikalen und medullären Tubuli (A,B). Geschwollener Podozyt (C) und proximaler Tubulus (D) mit elektronenlichtem Zytoplasma, Mitochondrien und Lysosomen zeigen eine gute Strukturhaltung (C,D; Standarddosmierung). Proximaler Tubulus mit Bürstensaum und Bruchkanten im Bereich der interdigitierenden Zellmembranen und durch die Zellen; artifizelle apikale Abschnürungen wölben sich in das tubuläre Lumen (E). Nachkolorierte Aufnahme eines kortikalen Sammelrohrs mit typischer Oberflächendifferenzierung (F; Hauptzellen hellgrün, Schaltzellen dunkelgrün).

3.5.3. Zusammenfassende Beurteilung von Protokoll 3 und Variationen

Protokoll 3 ermöglicht eine hochwertige Fixierung für rein morphologische licht- und elektronenmikroskopische Techniken. Mikroanatomisch können so Tubulusepithelien kortikal und medullär bis zum Übergangsbereich zwischen Außenstreifen und Innenstreifen gut fixiert werden. Die ultrastrukturelle Auswertung mit dem TEM ist gut möglich, Einschränkungen durch eine leicht

erhöhte zytoplasmatische Elektronendichte von kortikalen proximalen Tubuli konnten durch reduzierte Osmierung weitestgehend kompensiert werden. Eine im Vergleich zu Protokoll 3 erhöhte HES-Konzentration und Vehikelosmolarität (P3 V1 in Tabelle 1) ermöglicht eine verbesserte licht- und elektronenmikroskopische Darstellung von distalen Tubulusepithelien des Innenstreifens sowie von Sammelrohrethelien der Innenzone. Aufgrund von erheblichen Schrumpfungen kortikaler Zellen war hier besonders die elektronenmikroskopische Auswertung mit dem TEM eingeschränkt, während mit dem REM weiterhin zelltypische Oberflächendifferenzierungen aufgelöst werden können. Eine im Vergleich zu Protokoll 3 ähnlich hohe (mittlere) Vehikelosmolarität, ohne Zusatz von HES (P3 V2 in Tabelle 1), ermöglicht eine vergleichbar gute Fixierung von kortikalen und medullären Strukturen. Eine im Vergleich zu Protokoll 3 verringerte (P3 V4 in Tabelle 1) Vehikelosmolarität, ebenfalls ohne Zusatz von HES, konnte keine entscheidenden Verbesserungen in der Fixierung der Rinde erwirken. Eine erhöhte Vehikelosmolarität (P3 V3 in Tabelle 1) verbesserte die Fixierung von äußerem und innerem Mark.

3.6. Orientierende vergleichende Beurteilung der vorgestellten Fixierungsprotokolle

Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag auf der licht- und elektronenmikroskopischen Charakterisierung von Fixierungsprotokollen (Standardprotokollen) sowie ihrer Variationen. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Versuchstieren für die jeweiligen Protokolle sowie nur fokal systematisch variierten Parameter (siehe Tabelle 1) kann eine vergleichende morphologische Beurteilung der Fixierungsprotokolle nur orientierend erfolgen (siehe Tabelle 7). Die Essenz der Gegenüberstellung kann anhand der Kriterien zur Beurteilung der Ultrastruktur von Nierengewebe (Abb. 6) zusammengefasst werden.

Allgemein erscheinen Zellen bzw. Tubulussegmente nach Fixierung mit isotoner Lösung ultrastrukturell normal (Abb. 6), so wurden die meisten kortikalen Tubuli bei Verwendung einer Vehikelosmolarität von ca. 220-240 mOsmol gut fixiert. Für lichtmikroskopische Kriterien einer guten Fixierung (insbesondere offene Tubuli) eignen sich leicht hyperosmolare Lösungen; 240-280 mOsmol fixieren die meisten kortikalen Tubuli mit offenem Lumen. Dieser Zusammenhang gilt für Fixierlösungen mit Formaldehyd sowie Glutaraldehyd. Weiterhin gilt dies für Fixierlösungen mit sowie ohne Zusatz von Kolloiden.

Nach Fixierung von Zellen bzw. Tubulussegmenten mit hypoosmolarer Lösung (z.B. 200 mOsmol Vehikelosmolarität für kortikale Tubuli und Zellen) können subzelluläre Details wie Membranorganellen und Komponenten des Zytoskeletts idR. sehr gut abgegrenzt werden. Nachteilig wirkt sich dies jedoch mit überwiegend kollabierten Tubuli aus.

Tabelle 7. Orientierende vergleichende morphologische Beurteilung ausgewählter Fixierungsprotokolle.

Dunkelgrau; Zusammensetzung Fixierungsprotokolle, hellgrau mitte; Semidünnschnitt-Morphologie, hellgrau rechts; TEM-Morphologie.

Bezeichnung	Osm.	Osm.	%	%	%	Rinde	AS	IS	Rinde	AS	IS
	Veh	Ges	HES	GA	FA						
P1	281	1286	2,7	-	3	++	+++	+++	+	++	+++
P1 V2	218	1218	2,7	-	3	+++	++	+	n.a.	n.a.	n.a.
P1 V1	249	1249	2,7	-	3	+++	++	++	n.a.	n.a.	n.a.
P2	274	1274	-	-	3	+++	+++	+++	++	++	++
P2 V3	230	1530	-	-	4	+++	++	++	n.a.	n.a.	n.a.
P2 V1	200	1200	-	-	3	-	--	---	+++	---	---
P3 V3	336	536	-	2	-	++	+++	+++	-	++	+++
P3 V1	323	523	4	2	-	++	+++	+++	-	++	+++
P3 V2	240	440	-	2	-	+++	++	++	++	++	+
P3	231	431	1	2	-	+++	+++	++	++	++	++
P3 V5	176	1976	-	5	4	+	++	++	+	++	++
P3 V6	176	1076	-	2,5	2	+	+	+	+	++	++
P3 V4	150	400	-	2,5	-	--	--	--	+	--	--

Abkürzungen: Osm; Osmolarität, %GA; % Glutaraldehyd, %FA; % Formaldehyd, P; Protokoll, V; Variation, +++; sehr gute Strukturerehaltung, ++; gute Strukturerehaltung, +; befriedigende Strukturerehaltung, -; unbefriedigende Strukturerehaltung, --; schlechte Strukturerehaltung, ---; sehr schlechte Strukturerehaltung

3.7. Fixierungsprotokolle für andere Organe

Fixierlösungen und Präparationen wurden für eine optimale Strukturerehaltung von Nierengewebe ausgewählt. Eine gute Fixierung von weiteren Organen, die fakultativ entnommen und parallel zum Nierengewebe verarbeitet wurden, sollte jedoch ebenfalls ermöglicht werden. Spezielle Anforderungen an die Perfusionsfixierung bzw. die verwendeten Lösungen konnten für diese Organe daher jedoch nur bedingt berücksichtigt werden. Von einigen Versuchstieren wurde selektiv Gewebe von Gehirn, Dünndarm und Leber entnommen und ausgewertet, um eine Orientierung für organspezifische Strukturerehaltung nach Anwendung der Protokolle 1-3 zu geben. Weiterhin wurden Anpassungen durchgeführt, um gezielt die Fixierung von Gehirngewebe und Dünndarm zu optimieren.

3.7.1. Fixierung von Gehirngewebe

Empfehlungen zur Fixierung von Gehirngewebe sehen die Fixierung mit einer hohen Konzentration von Glutaraldehyd vor, auch in Kombination mit einer hohen Konzentration von Formaldehyd (72). Solche Fixierlösungen bringen offenbar keine Vorteile in der Perfusionsfixierung von anderen Organen, vielmehr können sie hier sogar schädliche Auswirkungen zeigen. Für eine allgemein flexible Auswahl sollte daher die Ultrastruktur von Gehirngewebe nach Fixierung mit einem Formaldehyd-basierten sowie einem Glutaraldehyd-basierten Standardprotokoll untersucht werden. Eine Modifikation des Glutaraldehyd-basierten

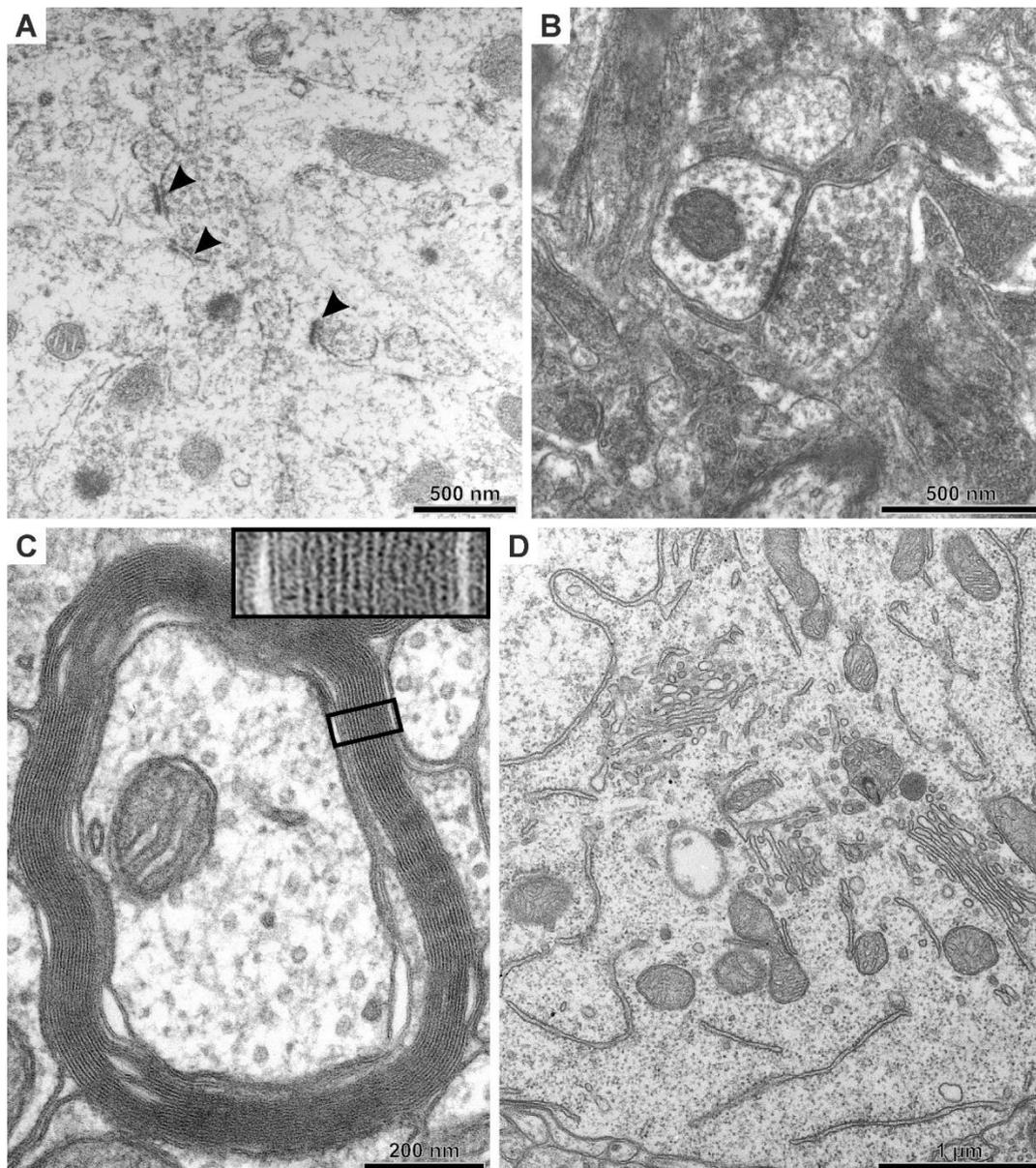


Abbildung 28. Fixierung von Gehirngewebe, TEM-Morphologie.

Variation von Protokoll 1 (P1 V7 in Tabelle 1: A: Protokoll 1 mit Zusatz von 0,05% Glutaraldehyd); stark ausgewaschenes Neuropil, Synapsen sind lediglich an ihren Verdichtungen (schwarze Pfeilspitzen) zu erkennen. Deutlich bessere Morphologie nach verkürzter Perfusionsfixierung (5 min. statt 10 min.) und Zuschnitt in besonders dünne Gewebescheiben (P1 V8 in Tabelle 1: B); deutlich bessere Erhaltung von Synapsen mit erkennbaren synaptischen Vesikeln, Membranbegrenzungen und dichtem Neuropil. Variation von Protokoll 3 (P3 V6 in Tabelle 1: C,D; ca. 175 mOsmol Vehikelosmolarität, fixiert mit 2,5% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd); geringgradige Lamellierung von ZNS-Myelinscheiden mit guter Erhaltung von Axonen, Mitochondrien und Mikrotubuli (C). Gute Darstellung von subzellulären Details in einer Nervenzelle; es lassen sich Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat auflösen (D).

Standardprotokolls mit erhöhter Konzentration von Glutaraldehyd sowie einem Zusatz von Formaldehyd sollte eine darüber hinaus optimierte Gehirnfixierung ermöglichen.

3.7.1.1. Perfusionsfixierung mit Formaldehyd

Es wurden Mäuse mit einer Variation von Protokoll 1 (P1 V7 in Tabelle 1; Protokoll 1 unter Zugabe von 0,05% Glutaraldehyd) für 10 min. perfusionsfixiert. Das Gewebe wurde in Glutaraldehyd nachfixiert und nach Standardprotokoll osmiert. Das Neuropil war ultrastrukturell sehr lückenhaft und das Gehirngewebe erschien stark ausgewaschen (Abb. 28A). Nervenzellen waren nur anhand ihrer großen Zellkerne identifizierbar und Membranorganellen waren nicht abgrenzbar. Synapsen waren nur anhand ihrer Verdichtungen identifizierbar, Begrenzungen durch Zellmembranen waren nicht sichtbar.

Eine verbesserte ultrastrukturelle Qualität sollte durch verkürzte Perfusionsfixierung erreicht werden (P1 V8 in Tabelle 1; 5 min. Perfusionsfixierung), um hierdurch eine frühere Nachfixierung mit dem stärker vernetzenden Glutaraldehyd erreichen zu können. Weiterhin wurden die Gewebelöcke besonders klein zugeschnitten (Kantenlänge unter 1 mm), um die Nachfixierung zu beschleunigen. Das Neuropil war im Vergleich zur 10-minütigen Perfusionsfixierung (P1 V7 in Tabelle 1) ultrastrukturell dichter und es konnten Synapsen, Mikrotubuli und synaptische Vesikel verbessert abgegrenzt werden (Abb. 28B).

3.7.1.2. Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd

Es wurden Mäuse mit Protokoll 3 für 5 und 10 min. perfusionsfixiert. Nach 5- bzw. 10-minütiger Perfusionsfixierung war das Neuropil qualitativ hochwertig erhalten. Myelinscheiden zeigten eine kompakte Schichtung mit geringgradiger Lamellierung. Perikaryen von Nervenzellen waren mit gut abgrenzbaren Organellen wie Golgi-Apparat, rauem endoplasmatischem Retikulum und Mikrotubuli erhalten. Synapsen konnten eindeutig anhand der Verdichtung und der synaptischen Vesikel identifiziert werden. Kapillaren hatten glatte Lumina. Das perikapilläre Bindegewebe war als dünner, kontinuierlicher Streifen – ohne artifiziellen Virchow-Robin-Raum – erhalten. Mitochondrien von Nervenzellen, Astrozyten und Endothelzellen waren fokal geschwollen und manchmal geplatzt. Eine verbesserte Strukturhaltung von Mitochondrien und Myelinscheiden in Gehirngewebe sollte durch eine verstärkte Fixierung, bestehend aus 5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd (P3 V5 in Tabelle 1; „vollständiges Griffith-Gemisch“), erreicht werden. Alternativ wurde die halbe Konzentration der Fixantien verwendet (P3 V6 in Tabelle 1; „halbiertes Griffith-Gemisch“, Abb. 28C,D). Es wurde bei allen Tieren die Vorspülung von Protokoll 3 verwendet; 0,1 M Na-Kakodylatpuffer, 1% HES und Zusatz von Saccharose bis zu einer Gesamtosmolarität von 330 mOsmol. Als Vehikel der Fixierlösung wurden 0,08 M Na-Kakodylatpuffer und Kalziumchlorid mit einer Gesamtosmolarität von 175 mOsmol verwendet. Es wurde jeweils ein Tier mit dem vollständigen und dem halbierten Griffith-Gemisch für 5 bzw. 10 min. perfusionsfixiert. Das Gewebe wurde im Fixans über Nacht nachfixiert und reduziert osmiert. Die Fixierung mit dem vollständigen Griffith-Gemisch verbesserte die Strukturhaltung von Mitochondrien deutlich, es konnten keine geschwollenen oder geplatzen Mitochondrien

gefunden werden. Eine deutliche Qualitätsverbesserung durch längere (10-minütige) Perfusionsfixierung konnte bei den Griffith-Gemischen nicht festgestellt werden. Die Fixierung mit dem halbierten Griffith-Gemisch (P3 V6 in Tabelle 1) zeigte nur geringfügig mehr Artefakte in Form von geschwollenen Mitochondrien und Lamellierung von Myelinscheiden im Vergleich zum vollen Gemisch (P3 V5 in Tabelle 1; Abb. 28C,D). Beide Griffith-Gemische führten zu einer starken Gewebehärtung von Gehirn, Niere und Leber. Nierengewebe und Lebergewebe zeigten nach Fixierung mit diesen Gemischen ein ultrastrukturell dichtes Erscheinungsbild, wie es sonst nur bei einer hohen Vehikelosmolarität beobachtet wurde.

3.7.2. Fixierung von Dünndarm

Lichtmikroskopisch zeigte sich auf Semidünnschnittebene nach Perfusionsfixierung mit einer Variante von Protokoll 1 (P1 V12 in Tabelle 1; enthält 7,2% HES, Abb. 29A) sowie nach Immersionsfixierung mit einer Variante von Protokoll 3 (P3 V7 in Tabelle 1; enthält 4% HES) eine intakte Epithelschicht der Lamina epithelialis mucosae. Es konnten Enterozyten und Becherzellen gut abgegrenzt werden. Die Lamina propria mucosae zeigte gut perfundierte Gefäße und ein zellreiches Interstitium mit dicht gepackten Zellen. Nach regelhafter Perfusionsfixierung mit den anderen Varianten von Protokoll 1 (z.B. P1 V4 in Tabelle 1; enthält 3,6% HES, Abb. 29B) oder mit Protokoll 3 zeigte sich eine starke basolaterale Spaltbildung der Enterozyten. Weiterhin war die Lamina propria mucosae durch erweitertes Interstitium und sternförmige, dunkle Zellen charakterisiert. Kapillaren waren jedoch gut perfundiert.

3.7.3. Fixierung von Lebergewebe

Während der Perfusionsfixierung von Mäusen und Ratten mit Protokoll 1-3 sowie ihren Variationen konnte makroskopisch bei erfolgreicher Perfusion der Leber ein Abblassen der Organoberfläche beobachtet werden. Typischerweise erfolgte dabei ein Farbwechsel von rötlichbraun zu rötlichgelb. Eine unvollständige Perfusion führte hier zu einer rot gefleckten Organoberfläche.

3.7.3.1. Protokoll 2 und Variationen

Lichtmikroskopisch auf Semidünnschnittebene zeigten Lebergefäße nach Fixierung mit Protokoll 2 gut perfundierte Lumina bei nur seltenen und fokal erkennbaren Blutansammlungen. Es zeigten sich eine charakteristische mikroanatomische Struktur von Hepatozyten und Sinusoiden; Endothelzellen sowie Makrophagen konnten differenziert werden. Die Strukturen der Glisson'schen Trias mit Arteria interlobularis, Vena interlobularis und Ductus biliferi interlobulares waren in ihrer typischen mikroanatomischen Anordnung und Substruktur darstellbar. Bei hoher Auflösung zeigte sich lichtmikroskopisch eine fein differenzierte Substruktur von Hepatozyten; Zellkerne zeigten eine glatte Begrenzung, einen klar erkennbaren Nucleolus und fein gezeichnete

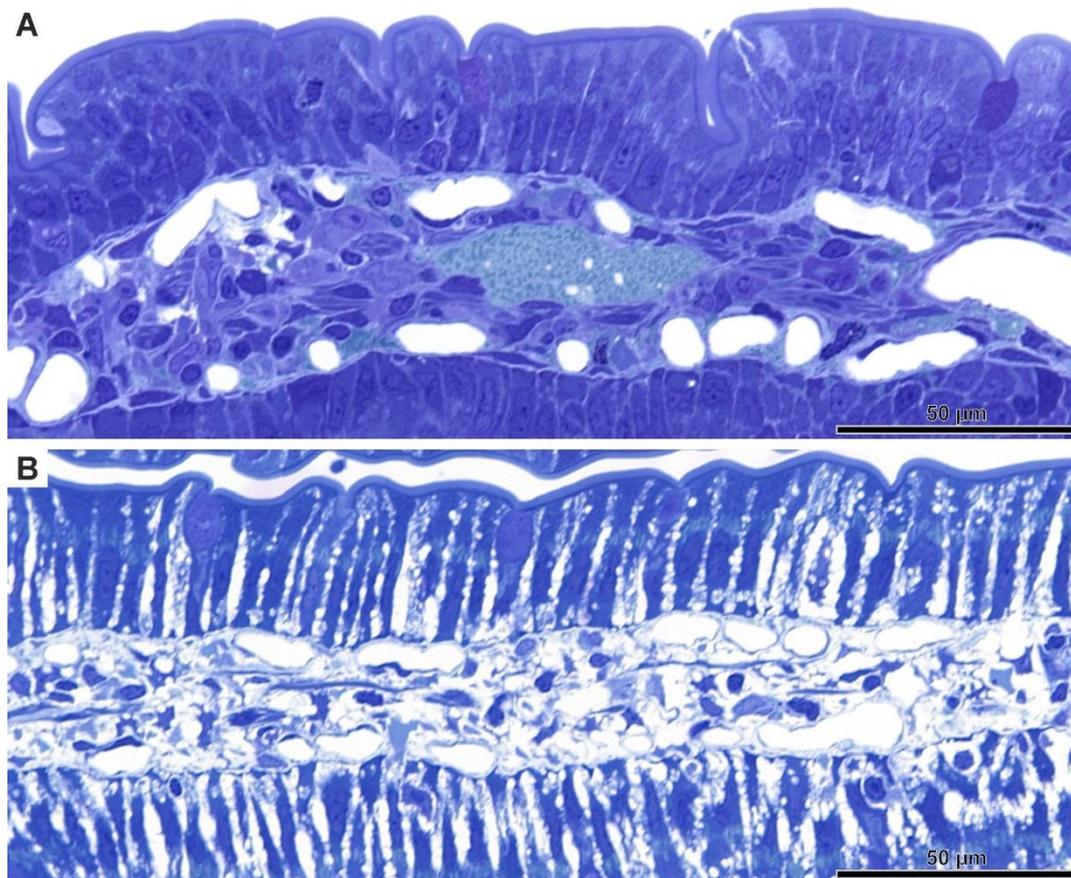


Abbildung 29. Fixierung von Dünndarm, Semidünnschnitt-Morphologie.

Variation von Protokoll 1 (P1 V12 in Tabelle 1: A; enthält 7,2% HES); Dünndarmzotte mit intakter Epithelschicht und Interstitium. Variation von Protokoll 1 (P1 V4 in Tabelle 1: B; enthält 3,6% HES); Dünndarmzotte mit starker intraepithelialer Spaltbildung und artifizieller Erweiterung des Interstitiums.

Heterochromatinschollen. Weiterhin konnten homogene, helle Areale (vermutlich Glykogen; vergleichbar mit Abb. 30C) sowie dunklere Schollen (vermutlich raues endoplasmatisches Retikulum) abgegrenzt werden. Mitochondrien waren erkennbar. Nach Fixierung mit „200 mOsmol Schutzpuffer“ (P2 V1 in Tabelle 1) zeigten Zellkerne eine lichtmikroskopisch leicht gequollene Struktur mit weniger Heterochromatinschollen als bei Protokoll 2. Die Substruktur der Hepatozyten war sonst vergleichbar gut erhalten.

3.7.3.2. Protokoll 3 und Variationen

Nach Perfusionsfixierung mit Protokoll 3 waren Lebergefäße lichtmikroskopisch gut perfundiert. Im Semidünnschnitt konnten Organellen voneinander abgegrenzt werden (Abb. 30A). Nach Perfusionsfixierungen mit einer verringerten Vehikelosmolarität (P3 V4 in Tabelle 1; 150 mOsmol Vehikelosmolarität) zeigten Hepatozyten im Semidünnschnitt verbessert abgrenzbare Organellen, besonders Mitochondrien und Glykogen zeigten einen starken Kontrast gegenüber dem hellen Zytoplasma (Abb. 30B). Hier zeigten Zellkerne von Hepatozyten eine hydropische Struktur mit verwaschenem Chromatin. Ultrastrukturell zeigten die Hepatozyten ein

elektronenlichtes Bild (Abb. 30C). Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und Glykogenpartikel konnten gut abgegrenzt werden; aufgrund der hier durchgeführten Standardosmierung konnten Zellmembranen jedoch nicht in ihrer typischen Struktur abgegrenzt werden (Abb. 30C).

Nach Perfusionsfixierung mit dem vollständigen bzw. halbierten Griffith-Gemisch (P3 V5 und P3 V6 in Tabelle 1; 5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd bzw. 2,5% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd), welches, wie bei 3.7.1.2. beschrieben, für eine optimierte Strukturhaltung von Gehirngewebe verwendet wurde, waren Hepatozyten und Erythrozyten im Semidünnschnitt geschrumpft. Ultrastrukturell zeigten Hepatozyten ein elektronendichtes Bild, bei jedoch guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details wie Mitochondrien und rauem endoplasmatischem Retikulum. Diese unerwartet gute Abgrenzbarkeit kann vermutlich auf die hier durchgeführte reduzierte Osmierung zurückgeführt werden.

3.7.4. Zusammenfassende Beurteilung der Fixierung von anderen Organen

Gehirngewebe kann nach 5-minütiger Perfusionsfixierung mit Protokoll 1 und Nachfixierung in Glutaraldehyd bei geringen Einschränkungen hochauflösender TEM-Ansätze gut ausgewertet werden. Weiterhin wird Gehirngewebe nach Perfusionsfixierung mit Protokoll 3 ultrastrukturell sehr gut erhalten. Einschränkungen zeigen sich hier bei der Fixierung von Mitochondrien und Myelinscheiden. Diese Einschränkungen können durch verstärkte Fixierung mittels vollständigem sowie halbiertem Griffith-Gemisch deutlich reduziert werden, jedoch mit negativem Einfluss auf die Ultrastruktur von Nieren- und Lebergewebe in Form von eingeschränkter Abgrenzbarkeit des intrazellulären Details. Eine gute Perfusionsfixierung für die mikroanatomische und ultrastrukturelle Auswertung von Dünndarmgewebe benötigt eine Fixierlösung mit einem sehr hohen kolloidosmotischen Druck. Eine zu geringe HES-Konzentration führt hier bei Perfusionsfixierung zu starker intraepithelialer Spaltbildung innerhalb der Zotten. Lebergewebe kann mit allen angewandten Protokollen mikroanatomisch gut fixiert werden. Eine gute ultrastrukturelle Darstellung wird bei geringer bis mittlerer Vehikelosmolarität erreicht und weiterhin durch reduzierte Osmierung deutlich verbessert.

3.8. Mikroskopische Verfahren zur optimierten Auswertung von Nierengewebe

Eine optimierte Auswertung von Nierengewebe sollte zusätzlich zu den beschriebenen Fixierungsprotokollen auch durch gezielte Auswahl und ggf. Anpassung von mikroskopischen Verfahren ermöglicht werden. Hierfür wurde eine Auswahl von licht- und elektronenmikroskopischen Verfahren hinsichtlich ihres Potentials untersucht, den komplexen mikroanatomischen und ultrastrukturellen Aufbau von Nierengewebe verbessert darzustellen. Präparatorische Grundlage der ausgewählten mikroskopischen Verfahren waren Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte von Gewebe, das in Epon eingebettet wurde.

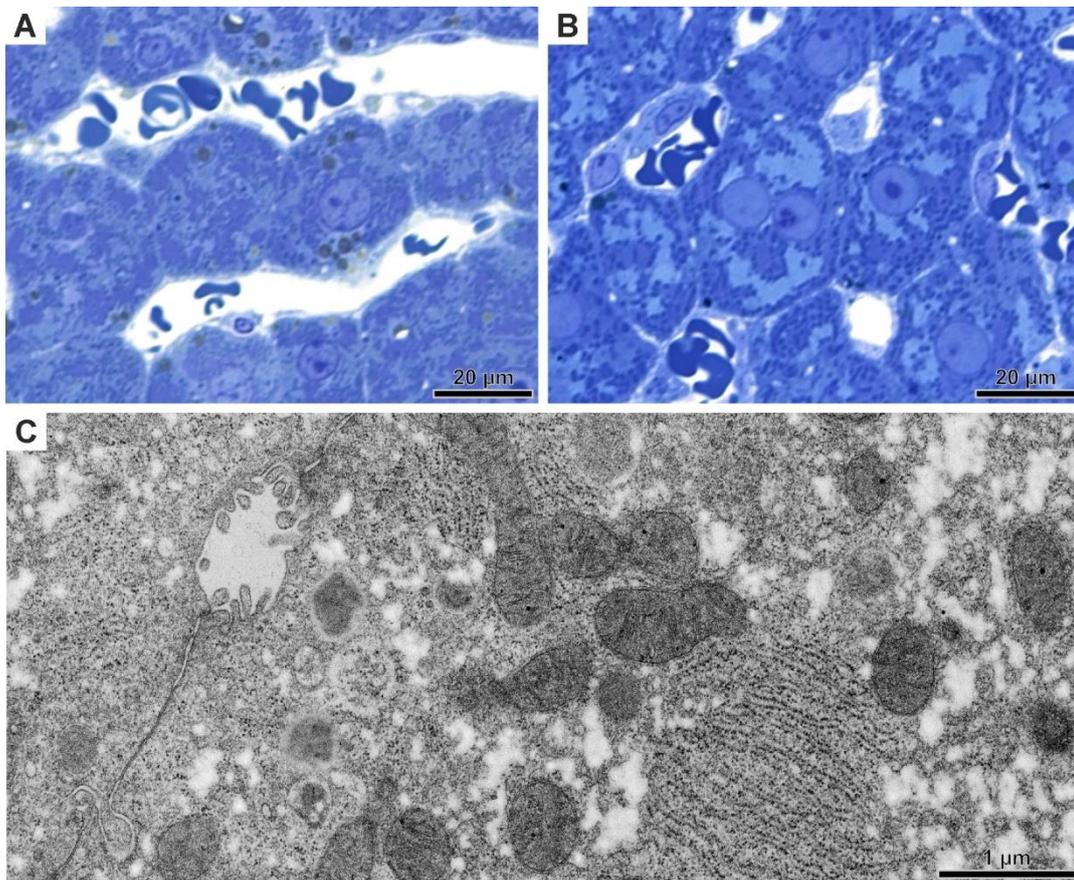


Abbildung 30. Fixierung von Lebergewebe, Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.

Semidünnschnitt-Morphologie (A,B) und TEM-Morphologie (C). Protokoll 3 (A; ca. 230 mOsmol Vehikelosmolarität); Hepatozyten mit guter Abgrenzbarkeit von Zellstrukturen. Variation von Protokoll 3 (P3 V4 in Tabelle 1: B,C; ca. 150 mOsmol Vehikelosmolarität); verbesserte Abgrenzbarkeit von Zellstrukturen. Ultrastrukturell zeigen sich gruppierte Zonen mit rauem endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien, ein Gallenkanälchen mit Mikrovilli sowie Glykogen (unkontrastiert; helle Inseln).

Charakteristika von Fixierungsprotokollen sowie Arbeitsschritte der Gewebe- und Schnittpräparation, die sich im Rahmen dieser Versuche als qualitätsbestimmend herausstellten, wurden außerdem bewertet.

3.8.1. LM-Array Tomographie

Zur dreidimensionalen Auswertung auf lichtmikroskopischer Ebene wurden Semidünnschnittserien angefertigt. Hierdurch sollte eine präzise morphologische Darstellung vom hochaufgelösten lichtmikroskopischen Detail neonataler, adulter und pathologischer adulter Glomeruli ermöglicht werden. Es wurden hierfür Bildpunkte (Pixel) von geringer Größe in X- und Y-Achse angestrebt; die Kombination eines 63x Planapochromat Objektivs und einer CCD-Kamera mit verwendeter Bildgröße von 1388x1040 Pixel ergab eine Pixelgröße von ca. 150 nm. Weiterhin wurden Pixel von geringer Größe auch in Z-Achse (entspricht Schnittdicke) angestrebt, hierfür wurden 300 nm dünne Semidünnschnitte angefertigt. Es ergaben sich durch diese Werte räumliche Pixel (Voxel) mit einer Kantenlänge von 150x150x300 nm. Weiterhin dienten die

Semidünnschnittserien der Etablierung von Protokollen, die neben einer lichtmikroskopischen Auswertung zusätzlich auch die Möglichkeit einer elektronenmikroskopischen Auswertung durch REM-Array Tomographie erlauben.

3.8.1.1. Optimale Fixierung für Segmentierungen luminaler Strukturen

3D-Modellierungen anhand von 2D-Schnittbildern setzen eine Markierung von Strukturen voraus (Segmentierung), welche anschließend als 3D-Modell visualisiert werden können. Daher sollte für eine geplante Segmentierung von Lumina, wie z.B. von Glomeruluskapillarschlingen, eine Fixierung gewählt werden, welche diese Strukturen im offenen Zustand erhält. Zur Perfusionsfixierung von adulten und neonatalen Ratten wurden daher Protokoll 3 (231 mOsmol Vehikelosmolarität) und eine Variation von Protokoll 3 mit erhöhter Vehikelosmolarität und HES-Konzentration verwendet (P3 V1 in Tabelle 1; 323 mOsmol Vehikelosmolarität). Pathologische Glomeruli wurden am Beispiel einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose anhand von adulten Ratten untersucht. Hierfür wurde mit 3% Formaldehyd in PBS fixiert (nicht in Tabelle 1 enthalten; ca. 275 mOsmol Vehikelosmolarität). Diese hier verwendete mittlere (Protokoll 3 und PBS) bzw. hohe Vehikelosmolarität (P3 V1 in Tabelle 1) fixierte glomeruläre Kapillarschlingen sowie kortikale Tubuli mit offenen, großen Lumina. Die nachfolgende Segmentierung war hierdurch gut möglich, eine geringe Vehikelosmolarität hätte hier zu hohen Epithelien mit Obstruktion der Lumina geführt und dadurch die Qualität des 3D-Modells stark beeinträchtigt.

3.8.1.2. Gewebe- und Schnittpräparation für LM-Array Tomographie

Eponblöcke wurden zu Pyramiden mit paralleler Ober- und Unterkante getrimmt. Durch Auftragen von Pattex-Klebstoff auf die Ober- und Unterkante konnten Schnittbänder von Semidünnschnitten erzeugt werden. Durch Entfernung von weichen Arealen aus reinem Epon konnte eine hohe Stabilität der Semidünnschnittbänder erreicht werden. Weiterhin konnte eine sehr homogene und dünne Klebeschicht durch Mischung von Xylol und Pattex Gel Kompakt unmittelbar vor dem Auftragen erreicht werden. Eine gute Lösung von homogener Konsistenz wurde durch Erwärmen auf ca. 50°C und kräftiges Schütteln erreicht. Die Lösung wurde unmittelbar nach dem Mischvorgang, noch warm, mit einer Nadel aufgetragen (Abb. 2A). Die Haftung einzelner Semidünnschnitte innerhalb der Schnittbänder war stark abhängig von der aufgetragenen Pattex-Klebeschicht (Dicke, Homogenität) und der Blocksymmetrie (Abb. 2A,B). Eine zu dick aufgetragene Klebeschicht auf der Oberkante wurde vom UltraSemi 35° Diamantmesser nicht abgelöst, eine zu dünne Schicht führte zu instabilen Semidünnschnittbändern. Weiterhin wurden gerade und stabile Semidünnschnittbänder nur bei symmetrischer Streckung der Semidünnschnitte produziert. Blockareale mit großen Gefäßen, purem Epon oder kollabierten Tubuli ließen aufgrund von verändertem Streckverhalten krumme Semidünnschnittbänder mit stellenweise auftretender Ablösung der Pattexverbindung entstehen.

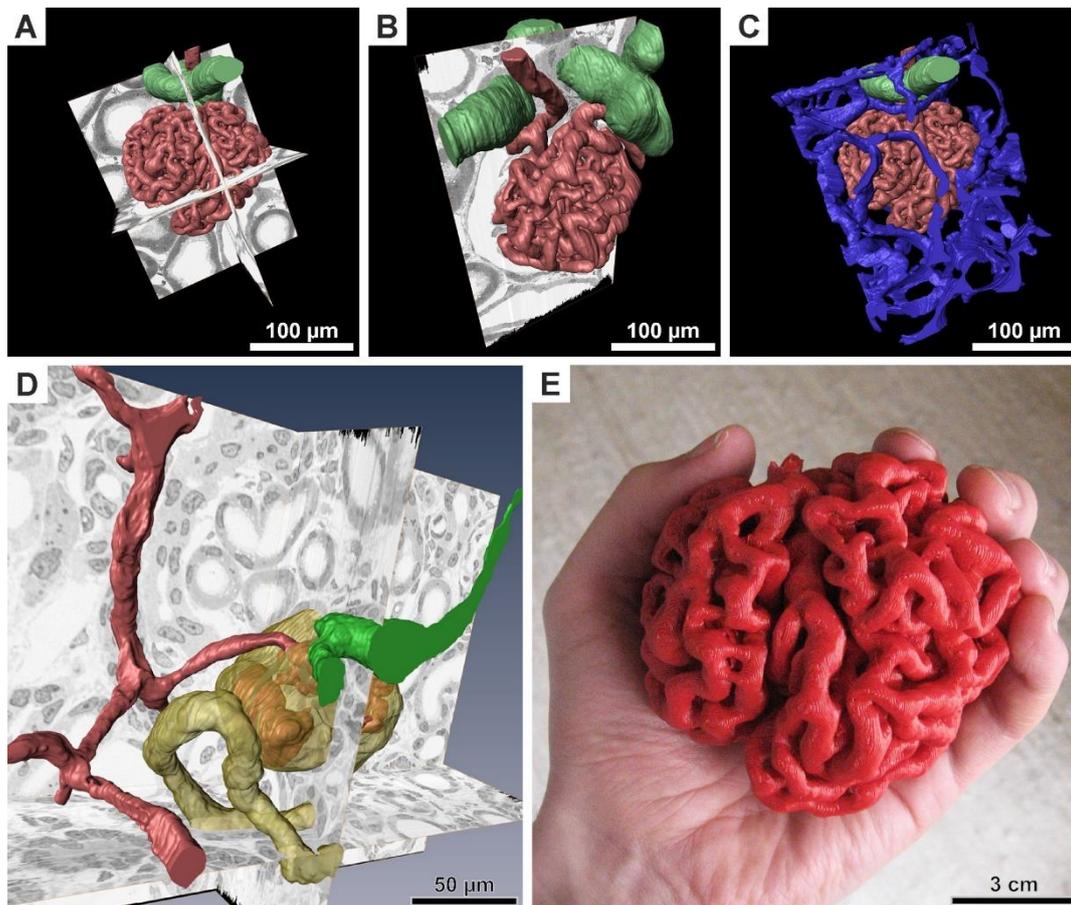


Abbildung 31. 3D-Rekonstruktionen anhand von Semidünnschnittserien.

LM-Array Tomographie von Semidünnschnittserien zur 3D-Rekonstruktion eines adulten (A-C, E) und eines neonatalen (D) Glomerulus mit umgebenden Strukturen. Es wurden Glomeruluskapillarschlingen (rot) und die Macula densa (grün) zusammen mit 3 Schnittebenen visualisiert (A; frontal die native Schnittebene, senkrecht dazu zwei rekonstruierte Ebenen). In schräger Orientierung rekonstruierte Ebene (B), Modellierung von interstitiellen Kapillaren (C; blau). Digitales Modell von Glomeruluskapillarschlingen mit zuführendem Gefäß (rot), Macula densa (grün), Harnpol/ Lumen des proximalen Tubulus (gelb) zusammen mit 3 Schnittebenen (D). Der Datensatz der modellierten Glomeruluskapillarschlingen des adulten Glomerulus wurde in das stl-Dateiformat exportiert und mit einem 3D-Drucker im Filamentverfahren gedruckt (E).

3.8.1.3. Auswertungen der 3D-Datensätze

Das in Amira 5 zusammengesetzte Gewebenvolumen ermöglichte eine Rekonstruktion von digitalen Schnittebenen senkrecht zur realen Schnittebene sowie schräge Ebenen mit frei wählbarer Orientierung (Abb. 31B). Die dreidimensionale Darstellung modellierter Strukturen wie Glomeruluskapillarschlingen, Macula densa, interstitiellen Kapillaren und Übergänge der Bowman'schen Kapsel in den proximalen Tubulus hat eine exakte Beurteilung von Größenverhältnissen und räumlichen Beziehungen erlaubt (Abb. 31A-C). Im virtuellen dreidimensionalen Gefäßmodell des adulten Glomerulus konnte eine Lappchenstruktur der Glomeruluskapillarschlingen visualisiert werden. Die reale Modellierung dieses Modells durch 3D-Druckverfahren (Abb. 31E) hat zusätzlich die dreidimensionale morphologische Beurteilung verbessert. Das virtuelle dreidimensionale Gefäßmodell von neonatalen Präparaten zeigte

Kaliberschwankungen von Gefäßanschnitten unterschiedlicher Größe (Abb. 31D). Hier war am Semidünnschnitt keine klare Zuordnung der beobachteten Anschnittmuster möglich. Die Herstellung dieser 3D-Datensätze war aufgrund der vielen manuellen Arbeitsschritte allgemein sehr zeitaufwändig. Der 3D-Datensatz des adulten Glomerulus (Abb. 31A-C,E), welcher aus 376 Einzelschnitten zusammengesetzt wurde, benötigte insgesamt ca. 40 Std.; die Schnittpräparation dauerte ca. 8 Std. (ca. 800 Einzelschnitte), die Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder ca. 12 Std. und die Segmentierungen zur Modellierung ca. 20 Std. Aufgrund dieses hohen Zeitaufwands wird daher die Verwendung von optimiert fixiertem Gewebe sowie allgemein eine präzise Fragestellung zur Ausrichtung der Aufnahmeparameter und der nachfolgenden Bildbearbeitung entscheidend.

3.8.2. Elektronentomographie

Bergeron et al. beschrieben Zelltyp-abhängige morphologische Unterschiede von glattem endoplasmatischem Retikulum (gER) in renalen Tubuluesepithelien (73). Eine Osmium-Imprägnierung des Gewebes erlaubte eine selektive Kontrastierung dieser Organellen, welche anhand von 300-1000 nm dicken Kunstharzschnitten im TEM dargestellt wurden. In proximalen Tubuluesepithelien war das gER basolateral besonders dicht ausgeprägt, es konnte eine netzartige Struktur mit sehr regelmäßig angeordneten, ca. 50 nm durchmessenden Fenestrierungen (porenartige Strukturen) dargestellt werden.

Dieses gER konnte in meiner Arbeit mit dem TEM nach Fixierung mit einer Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1; 200 mOsmol Vehikelosmolarität) und Protokoll 3 (ca. 230 mOsmol Vehikelosmolarität) bereits in der Übersicht hervorragend abgegrenzt werden (Abb. 19B, Abb. 20B). Eine Darstellung der Fenestrierungen war in meiner Arbeit durch konventionelle TEM-Ansätze aufgrund des geringen Durchmessers anschnittsbedingt jedoch nur stellenweise möglich. Grund hierfür sind die im Vergleich zur Porengröße relativ dicken Ultradünnschnitte, die routinemäßig 50-70 nm dünn geschnitten wurden. Die Fenestrierungen konnten daher nur bei idealer Orientierung der Ultradünnschnitte dargestellt werden. Weiterhin konnten Nachbarschaftsbeziehungen zu anderen Organellen, wie Mitochondrien und dem Golgi-Apparat, nicht aufgelöst bzw. von Überlagerungen dieser Strukturen abgegrenzt werden. Um die Substruktur des gER sowie seine Nachbarschaftsbeziehungen exakt auflösen zu können, wurden daher dreidimensionale Rekonstruktionen durch die Elektronentomographie von 200-250 nm dicken Semidünnschnitten durchgeführt. Im Allgemeinen werden bei der Elektronentomographie Kippungen des Präparats von ca. +65 bis -65° als Serie durchgeführt und die Projektionen als Rohdatensatz aufgenommen (74). Dieser Datensatz wird anschließend durch Datenverarbeitung zu einem digitalen Volumen mit einer Voxelgröße im Subnanometerbereich verrechnet. Eine digitale Schnittdicke von wenigen Nanometern ermöglichte in meiner Arbeit eine adäquate Auflösung der Substruktur des gER (Abb. 32). Elektronentomographien von Nierengewebe,

welches mit einer Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1) angefertigt wurde, konnten nach Rekonstruktion des Volumens durch Inspect3D mit Amira 5 betrachtet werden; hier war eine Darstellung des Volumens in jeder gewünschten digitalen Schnittrichtung, ähnlich wie bei einer Computertomographie, möglich. Die Membranen des gER konnten exakt durch das Schnittvolumen verfolgt werden (Abb. 32A-D); hierdurch konnte ihre netzartige Struktur im Vergleich zur konventionellen Darstellung mit dem TEM (Abb. 20B) verbessert dargestellt werden. Weiterhin konnten Nachbarschaftsbeziehungen, wie eine Verbindung zum Golgi-Apparat und eine Fortsetzung des gER um Mitochondrien herum, sicher aufgelöst und von Überlagerungen abgegrenzt werden. Die beschriebenen Vorteile in der hochauflösenden Darstellung durch Elektronentomographie im Vergleich zu konventionellen TEM-Ansätzen, besonders in Verbindung mit verbesserter Auflösung von Volumeninformationen, mussten in meiner Arbeit mit der zeitaufwändigen Generierung von Kippserien (ca. 2,5 Std. pro Serie) sowie der nachfolgenden Datenverarbeitung (ca. 2 Std. pro Serie) abgewogen werden. Daher wurden in meiner Arbeit insgesamt nur ca. 20 Elektronentomographien angefertigt, primär zur technischen Etablierung dieser Methode.

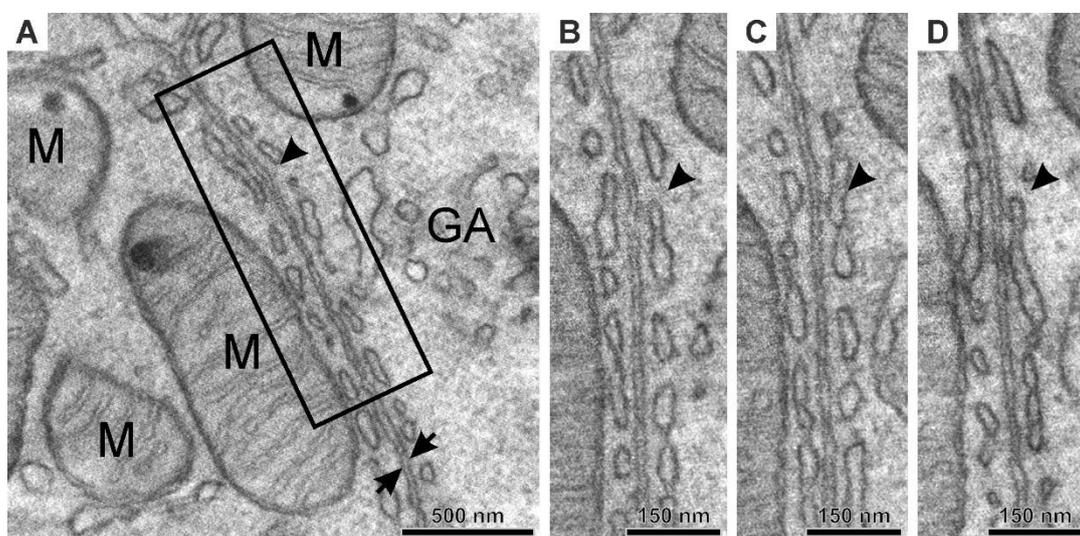


Abbildung 32. Elektronentomographie von Membranzisternen des gER.

Digitale Schnittebene (A) mit Mitochondrien (M), Golgi-Apparat (GA), diagonal verlaufenden Zellgrenzen (Pfeile) und Zisternen von gER in einer proximalen Tubuluszelle. Ausschnitte von 3 digitalen Schnittebenen durch das rekonstruierte Volumen; Zisternen des gER zeigen abwechselnd eine Verbindung und sind in tieferen Schichten getrennt (Pfeilspitzen; A-D).

3.8.3. TEM-Nanotomie

Die konventionelle Auswertung meiner Daten am TEM erforderte grundsätzlich repräsentative Aufnahmen unter Verwendung verschiedener Vergrößerungsstufen; in Übersichtsaufnahmen wurden zur Orientierung mikroanatomische Strukturen wie gesamte Glomeruli fotografiert, während intrazelluläre Strukturen mit höchster Vergrößerung dargestellt wurden. Eine solche repräsentative Auswertung anhand von Einzelbildern war im Falle von Nierengewebe, besonders wenn mehrere Zelltypen berücksichtigt werden sollten, zeitaufwändig. Die Einzelbilder wurden anfangs am Zeiss 906 mit analogen Planfilmen und später am FEI Tecnai G2 mit CCD-Kameras angefertigt. Planfilme ermöglichten grundsätzlich eine Abbildung in sehr hoher Qualität, jedoch war ihre Verwendung durch hohe Kosten von über einem Euro pro Foto und ein nur 40 Planfilme fassendes Magazin limitiert. CCD-Kameras ermöglichten verbesserte und vielfältigere Auswertungsmodalitäten, da hier Bildaufnahmen nicht mit zusätzlichen Kosten und Magazin-Wechseln verbunden sind. Die digitalen Fotos waren in ihrer optischen Qualität und Auflösung jedoch allgemein den analogen Planfilmen unterlegen. Konventionelle Auswertungen anhand von Einzelbildern konnten in meiner Arbeit durch CCD-Kameras jedoch allgemein gut durchgeführt werden. Die dadurch jedoch nur punktuell durchführbare Auswertung mit Verlust des exakten mikroanatomischen Zusammenhangs, bei nur mittlerer Bildgröße, blieb allerdings ein Schwachpunkt des konventionellen Ansatzes per CCD-Kamera.

Eine verbesserte ultrastrukturelle Auswertung sollte daher durch Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen erreicht werden (TEM-Nanotomie). Auf diesem Wege sollte die Auswertung von z.B. kompletten Glomeruli nach Digitalisierung auch unabhängig von einem TEM ermöglicht werden. Hierfür wurden bei mittlerer bis starker Vergrößerung überlappende Einzelfotos angefertigt, durch nachfolgendes Zusammenfügen der Einzelfotos wurden hochauflösende Datensätze mit einer Größe von bis zu 40 Gigapixel erstellt.

Konventionell angefertigte TEM-Präparate eigneten sich für diese großflächigen Digitalisierungen nicht, weil hier natürlicherweise Artefakte wie Falten oder Präzipitate sowie Balken von *Mesh grids* Ultradünnschnittareale in unterschiedlichem Ausmaß verdeckten. Es sollten für die TEM-Nanotomie daher durch Anpassungen der Ultradünnschnittpräparation besonders hochwertige Präparate hergestellt werden. Grundlage dieser Präparate waren Schlitz-*Grids*, die mit Pioloform befilmt wurden, welches stabilere Filme als Formvar ermöglicht und daher keine nachträgliche Beschichtung durch Kohlenstoff benötigt. Eine intensive Reinigung der *Grids* sowie die Vermeidung einer Kontamination der Befilmungslösung durch Wasser reduzierte allgemeine Filmartefakte wie Löcher, weiße Punkte und Schlieren. Eine Hydrophilisierung dieser Schlitz-*Grids* innerhalb von 1-3 Tagen nach Befilmung ermöglichte ein faltenfreies Antrocknen von Ultradünnschnitten, wodurch weiterhin auch die anschließend durchgeführte Kontrastierung deutlich verbessert wurde. Durch diese präparativen Anpassungen konnten zuverlässig große

Ultradünnschnittareale hergestellt werden, die frei von Falten und Präzipitaten waren (Abb. 3A-D) und sich daher besonders gut für TEM-Nanotomie eigneten.

Es wurden komplette Ultradünnschnitte von Nierengewebe und Gehirngewebe manuell in Übersichtsvergrößerung abfotografiert (Abb. 33A,C). Ultradünnschnittareale wurden bei mittlerer Vergrößerung mit ca. 500 Einzelfotos (im Einzelfall über 4300 Einzelfotos) qualitativ hochwertig digitalisiert (Abb. 33B,D). Die Datensätze von Glomeruli und Gehirngewebe konnten mit *TrakEM2* virtuell bis zum hochaufgelösten Detail mikroskopiert werden, bei erhaltener räumlicher Orientierung durch einen zusammenhängenden Datensatz. Innerhalb von digitalisierten Glomeruli konnten subzelluläre Details wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und raues endoplasmatisches Retikulum gut abgegrenzt werden, Schlitzdiaphragmata waren ebenfalls darstellbar.

Die Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen ermöglichte in dieser Arbeit eine deutlich verbesserte Auswertung von Nierengewebe. Für eine Digitalisierung von kortikalen Strukturen eignete sich im Besonderen Nierengewebe, welches mit den Standardprotokollen (1-3) fixiert wurde, weil hier kortikale Strukturen mikroanatomisch sowie ultrastrukturell gut erhalten wurden. Die Vorteile der TEM-Nanotomie mussten mit der hierfür notwendigen Aufnahmezeit (ca. 2,5 Std. für 500 Bilder) und der nachfolgenden Datenverarbeitung (ca. 2 Std. pro Serie) abgewogen werden. Die Wahl einer angemessenen Auflösung musste weiterhin berücksichtigt werden. Eine Verdopplung der Pixelgröße (z.B. von 2 nm auf 1 nm) benötigt allgemein eine Vervierfachung der Bildaufnahmen.

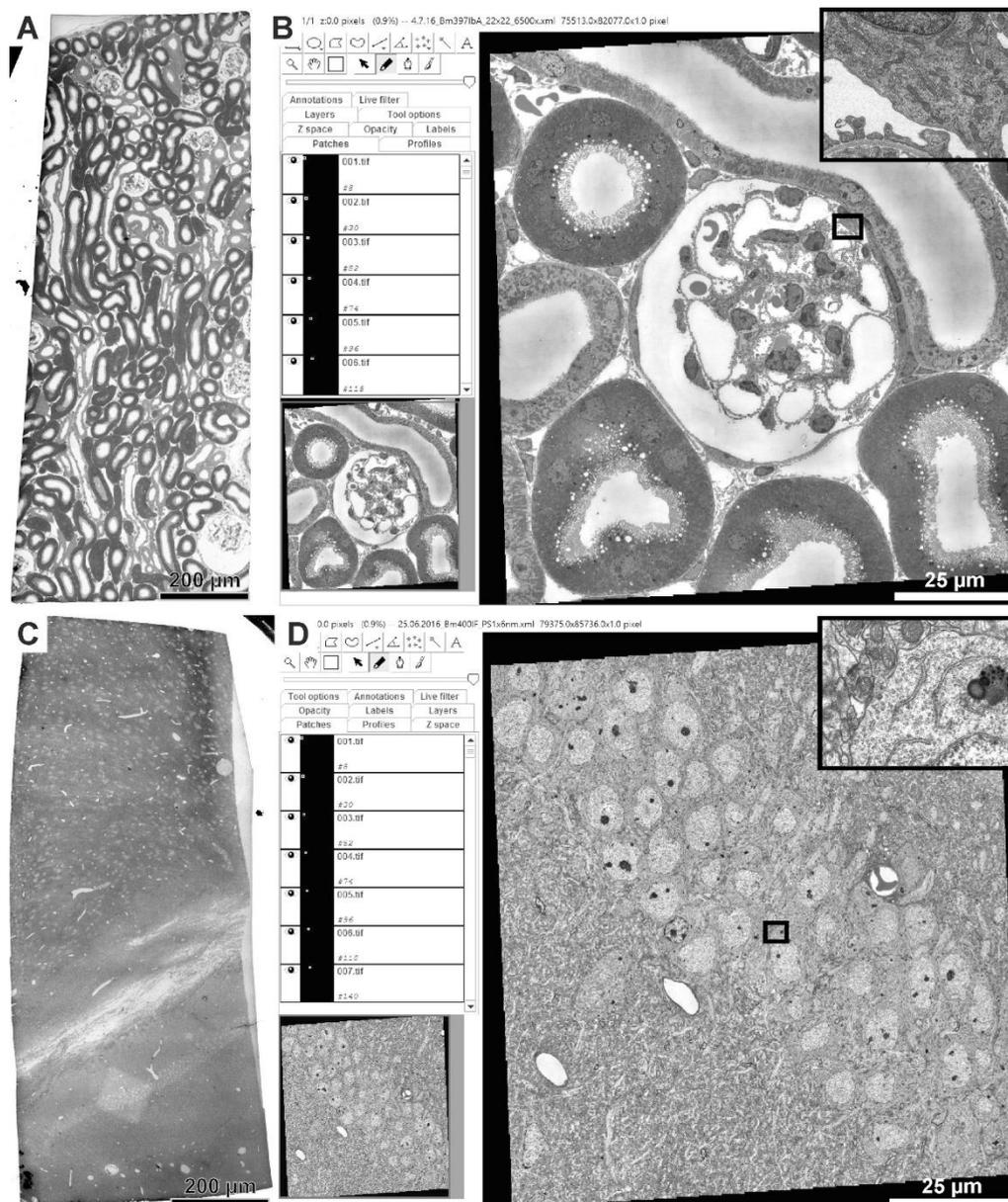


Abbildung 33. TEM-Nanotomie von Nieren- und Gehirngewebe.

TEM-Nanotomie von Ultradünnschnitten, aufgezo-gen auf Pioloform-befilmte Schlitz-Grids. Nierengewebe (A,B), Gehirngewebe (C,D). Übersichtsaufnahme; 31 manuell angefertigte TEM-Aufnahmen wurden mit Fiji/ *TrakEM2* zusammengesetzt (P3 V2 in Tabelle 1: A; Pixelgröße ca. 70 nm). TEM-Nanotomie Datensatz eines Glomerulus; 484 automatisch angefertigte TEM-Aufnahmen wurden mit Fiji/ *TrakEM2* zusammengesetzt (P3 V2 in Tabelle 1: B; Pixelgröße ca. 1,7 nm); gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Details wie Golgi-Apparat und Mitochondrien (Ausschnitt). Übersichtsaufnahme; 18 manuell angefertigte TEM-Aufnahmen wurden mit Fiji/ *TrakEM2* zusammengesetzt (P3 V6 in Tabelle 1: C; Pixelgröße ca. 110 nm). TEM-Nanotomie Datensatz von Gehirngewebe; 484 automatisch angefertigte TEM-Aufnahmen wurden mit Fiji/ *TrakEM2* zusammengesetzt (P3 V6 in Tabelle 1: D; Pixelgröße ca. 1,7 nm); gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Details wie raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen (Ausschnitt). Die TEM-Nanotomie Datensätze konnten in *TrakEM2* mit einem stufenlosen Zoom schnell und komfortabel betrachtet werden. *TrakEM2* ermöglichte ein nahezu überblendungsfreies Zusammensetzen der Einzelbilder mit Helligkeitsausgleich, wodurch sichtbare Bildübergänge weitestgehend herausgerechnet wurden.

3.8.4. REM-Array Tomographie

Ansätze für verbesserte Auswertungen von Ultradünnschnitten wurden mit REM-Array Tomographie getestet. Hierfür wurden Ultradünnschnitte auf leitfähige, harte Träger wie Siliziumstücke und Kohlenstoff-bedampfte Deckglaser aufgezogen und kontrastiert.

Die Auswertung von Ultradünnschnitten am TEM setzt die Durchstrahlbarkeit der Präparate voraus; die nur 50-70 nm dünnen Ultradünnschnitte sind allgemein sehr anfällig für die Bildung von Falten und Präzipitaten (Abb. 34B). Hinzu kommen Trägerfilm-eigene Verunreinigungen wie Ablösungsartefakte, Löcher und weiße Punkte. Die Verformbarkeit der Trägerfilme verstärkt diese Problematik zusätzlich; im Rahmen meiner Arbeit konnte bei der Schnittaufnahme eine Ursache der Faltenbildung stereomikroskopisch beobachtet werden. Ein punktuelles Antrocknen von Ultradünnschnitten mit nachfolgenden Relativbewegungen zwischen Trägerfilm und Ultradünnschnitt führte zu Faltenbildungen. Diese Falten führten im Rahmen der Kontrastierung wiederum vermehrt zu Präzipitaten. Aufgrund dieser präparatorischen Limitationen war selbst eine für die TEM-Nanotomie optimierte Schnittpräparation fallweise mit vielen Artefakten verbunden. Weiterhin war im Rahmen meiner Arbeit keine hochwertige Abbildung von Strukturen bei sehr schwacher Vergrößerung (z.B. kompletter Glomerulus; Durchmesser 100 μm) am TEM durch Einzelbilder möglich. Ursächlich hierfür ist das Linsensystem eines konventionellen TEM, welches allgemein für höhere Vergrößerungen ausgelegt ist.

Die Verwendung von Ultradünnschnitten am REM ermöglichte den Einsatz von harten Trägersubstraten wie Glas und Silizium (Abb. 34C). Die Oberfläche dieser Stoffe erlaubte eine gründliche Reinigung inklusive Hydrophilisierung durch Glimmentladung, während Artefakte von Trägerfilmen für Schlitz-Grids nicht entfernt werden konnten. Weiterhin konnten hierdurch Trägerfilm-eigene Artefakte vermieden werden. Die massiven Trägersubstrate können weiterhin nicht durch Wechselwirkungen mit der Oberflächenspannung von Wasser verformt werden, was die Faltenbildung im Rahmen der Schnittantrocknung zusätzlich reduzierte (Abb. 34C). Die Stabilität von Ultradünnschnitten auf massiven Trägersubstraten ermöglichte außerdem eine erleichterte Kontrastierung; Waschschritte konnten intensiver und ohne Gefahr von Verformungen oder Zerreißen durchgeführt werden.

3.8.4.1. Präparation für REM-Array Tomographie

Es konnten qualitativ sehr hochwertige Präparate für die REM-Array Tomographie hergestellt werden. Die Verwendung der harten Trägersubstrate, welche in variabler Größe (bis zu 25x10 mm) zugeschnitten wurden, ermöglichte weiterhin das Auftragen von mehreren großen Ultradünnschnitten sowie Schnittbändern. Schlitz-Grids für das TEM limitierten aufgrund des ca. 1x2 mm großen Lochs das Auftragen größerer Ultradünnschnitte sowie Schnittbänder deutlich. Auf einen harten Träger (z.B. 5x5 mm messende Siliziumstücke) wurden im Rahmen meiner

Arbeit üblicherweise 2-4 Ultradünnschnitte aufgezogen (Transfereinheit¹), deren Fläche aufgrund geringer Artefaktbildung zu fast 100% ausgewertet werden konnte. Die sehr hydrophile und ebene Oberfläche der harten Träger ermöglichte ein Antrocknen der Ultradünnschnitte in sehr flacher Orientierung (parallel zum Trägersubstrat), wodurch die Entstehung von Falten im Ultradünnschnitt vermieden werden konnte. Im Gegensatz dazu führte das Antrocknen auf hydrophoben Oberflächen wie Schlitz-Grids oder harten Trägersubstraten, die nicht durch Glimmentladung hydrophilisiert wurden, zu deutlicher Faltenbildung. Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Stereomikroskop des Ultramikrotoms während der Trocknung kontrolliert (Farbwechsel von grau nach hellgelb) und konnten vor der Kontrastierung hinsichtlich ihrer Qualität somit gut beurteilt werden. Für die Auswertung mit der REM-Array Tomographie wurden nur 1-2 Transfereinheiten pro Gewebeblock benötigt; dies beschleunigte den Schneideprozess und die Kontrastierung und reduzierte den Verschleiß der Diamantmesser. Eine faltenfreie Antrocknung der Ultradünnschnitte auf den harten Trägern einerseits und eine Kontrastierung mit effektivem Auswaschen und schonender Trocknung andererseits ermöglichten die Herstellung von faltenfreien und nahezu Präzipitat-freien Ultradünnschnitten (Abb. 3, Abb. 35).

3.8.4.2. REM-Array Tomographie; Einzelbilder

Die Anfertigung von Einzelbildern mit normaler Bildgröße (3072x2304 oder 1024x768 Pixel) wurde mit einem Zeiss Sigma und einem *Inlense*-Sekundärelektronendetektor durchgeführt. Große Strukturen konnten durch Übersichtsaufnahmen in hoher Qualität aufgenommen werden (Abb. 35). Im Vergleich zu Übersichtsaufnahmen am TEM (Einzelbilder) wurden keine Qualitätseinbußen aufgrund der geringen Vergrößerungen beobachtet. Die stabile Präparation der REM-Array Tomographie ermöglichte eine gut reproduzierbare Herstellung von nahezu perfekten Einzelbildern (Abb. 35-37). Eine ähnliche Qualität konnte mit TEM-Präparationen im Rahmen meiner Arbeit bei vergleichbar geringem Aufwand nicht erzielt werden. Es waren Aufnahmen von großen Arealen (Abb. 35) in hoher Qualität – ohne Falten und Präzipitate – möglich. Auch Aufnahmen bei mittleren Vergrößerungen (Abb. 36) waren in hoher Qualität möglich. Aufgrund einer großen Auswahl von Motiven und einer erhaltenen Mikro-Ultra-Korrelation wurden spezifische Tubulussegmente oder Zellen in einer gewünschten Schnittrichtung sehr schnell gefunden. Höchste Vergrößerungen waren möglich (Abb. 37), jedoch aufgrund von Aufnahmezeiten zwischen 3-5 min., verbunden mit einer hohen Anfälligkeit für Vibrationsartefakte, limitiert. Membranen wurden mit der REM-Array Tomographie sehr kontrastreich dargestellt, ihre typische trilaminäre Struktur war jedoch weniger deutlich auflösbar als mit dem TEM (Abb. 37).

¹ Hiermit wird die präparatorische Grundlage für die Kontrastierung und nachfolgende Schritte beschrieben (Trägersubstrat und 1-x Ultradünnschnitte).

Die Aufnahmen durch REM-Array Tomographie waren durch Elektronenstrahl-induzierte Kontaminationen und eine betonte Darstellung von weiteren Oberflächen-nahen Artefakten (z.B. Scharten) bei Verwendung des *Inlense*-Sekundärelektronendetektors limitiert. Um die Abbildung dieser Kontaminationen auf Bildern zu vermeiden, wurden Fokussierung und Astigmatismuskorrektur in benachbarten Regionen durchgeführt (Abb. 36, Abb. 37). Durch Verwendung von mehreren Einzelschnitten oder Schnittbändern (bis zu 150 Ultradünnschnitte auf einem Objektträgerstreifen) konnte weiterhin, im Falle von artifiziell veränderten Ultradünnschnittarealen, auf benachbarte Ultradünnschnitte ausgewichen werden. Alternativ konnte durch Verwendung eines EsB- oder BSE-Detektors (an einem Zeiss Merlin bzw. an einem Zeiss Sigma 500 verwendet) eine Unterdrückung der oberflächennahen Artefakte erfolgen, bei jedoch geringgradig verringerter Auflösung und längerer Aufnahmezeit.

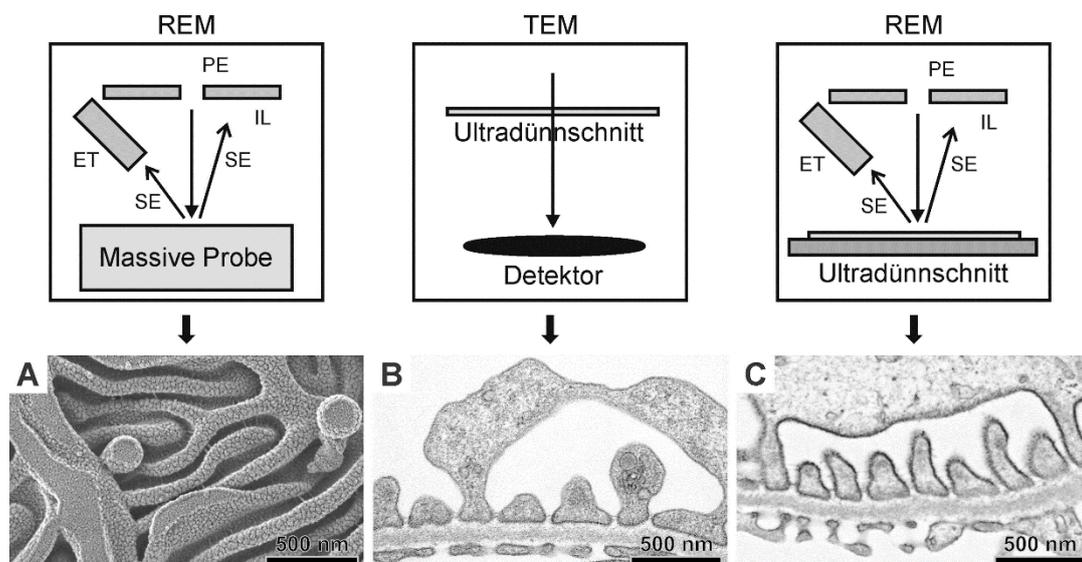


Abbildung 34. Funktionsweise der REM-Array Tomographie.

Ultrastruktur von Gewebe, welches mit einem konventionellen REM-Ansatz (A), konventionellen TEM-Ansatz (B) und mit der REM-Array Tomographie (C) dargestellt wurde. Im konventionellen REM-Ansatz wird eine massive Probe – *besputtert* mit leitfähigem Material – mit einem Primärelektronenstrahl abgerastert und so ein Bild mit topografischen Informationen erzeugt (A; interdigitierende Fortsätze von Podozyten). Im konventionellen TEM-Ansatz wird ein Ultradünnschnitt mit einem Elektronenstrahl durchleuchtet – ein Projektionsbild der gesamten Volumeninformation entsteht und mit einem Detektor abgebildet (B). In der REM-Array Tomographie wird ein Ultradünnschnitt auf eine leitfähige Unterlage aufgetragen. Mit einem Primärelektronenstrahl wird das Präparat abgerastert; das Bild ist vergleichbar mit dem des konventionellen TEM-Ansatzes (C). Abkürzungen: PE; Primärelektronen, ET; Everhard-Thornley-Detektor, SE; Sekundärelektronen, IL; *Inlense*-Detektor.

3.8.4.3. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Einzelstrahl-REM

Bei der Auswertung von konventionellen Ultradünnschnitten im TEM wurden zwei Arten von Elektronenstrahl-induzierten Veränderungen der Präparate festgestellt. Die Bestrahlung von Ultradünnschnittarealen führte zur Abblassung des jeweiligen Areals; diese war umso deutlicher sichtbar, je homogener die Struktur des Areals war (stark ausgeprägt z.B. bei Gewebe-freiem Hintergrund wie Gefäßlumina) und je stärker die Strahlintensität eingestellt war. Weiterhin waren im Live-Modus der Veleta CCD-Kamera Bewegungen des Präparats feststellbar, welche als Elektronenstrahl-induzierte Verformungen des Präparats gewertet wurden. Im Rahmen von großflächigen Digitalisierungen durch TEM-Nanotomie konnten diese Elektronenschäden durch vorherige Bestrahlung („Stabilisierung“) des Präparats und durch Reduktion der Strahlintensität reduziert werden, jedoch erschwerten auch verbleibende geringgradige Elektronenstrahlenschäden am Präparat das Zusammensetzen der Einzelbilder zu homogenen Datensätzen.

Die hohe Stabilität der Präparation von Ultradünnschnitten auf festem Trägermaterial bei der REM-Array Tomographie zeigte gegenüber der Verwendung von konventionellen TEM-Präparaten entscheidende Vorteile bei der Digitalisierung großflächiger Ultradünnschnittareale. Hier konnten auf einfache Weise viele Ultradünnschnitte (ein *Array*, vergleichbar mit der hohen Dichte von untersuchbaren Einheiten eines *Microarrays*) auf einem Trägermaterial platziert werden, sodass Ultradünnschnitte einfacher ausgewertet werden konnten. Es wurden komplette physiologische und pathologische Glomeruli bis zu einer Größe von ca. 150x150 µm und einer Pixelgröße von 3 nm digitalisiert (Abb. 38). Es wurden mikroanatomische Strukturen sowie auch subzelluläre Details in hoher Qualität abgebildet. Die Datensätze wurden bis zu einer Größe von ca. 2 GB im tif- oder jpg-Dateiformat gespeichert und mit Fiji betrachtet. Analog zu den TEM-Nanotomie Datensätzen konnten auch die Datensätze der REM-Array Tomographie nach einem initialen Ladevorgang mit stufenloser Vergrößerung betrachtet und unabhängig von einem Elektronenmikroskop bearbeitet werden (virtuelle Elektronenmikroskopie).

Vergleichbar mit den Elektronenstrahl-induzierten Schäden an TEM-Präparaten waren auch an Präparaten der REM-Array Tomographie Veränderungen nach Kontakt mit dem Elektronenstrahl feststellbar. Speziell bei Verwendung des *Inlense*-Sekundärelektronendetektors, welcher besonders das oberflächliche Volumen der Schnittpräparate darstellt, zeigten sich elektronendichte Kontaminationen. Diese Zonen wurden in meiner Arbeit stellenweise manuell mit Adobe Photoshop CS4 in ihrer Helligkeit an umgebende Zonen angepasst. Die Verwendung eines BSE- sowie eines EsB-Detektors reduzierte die Darstellung dieser elektronendichten Kontaminationen, weil diese Detektoren tieferliegende Volumina der Schnittpräparate darstellen.

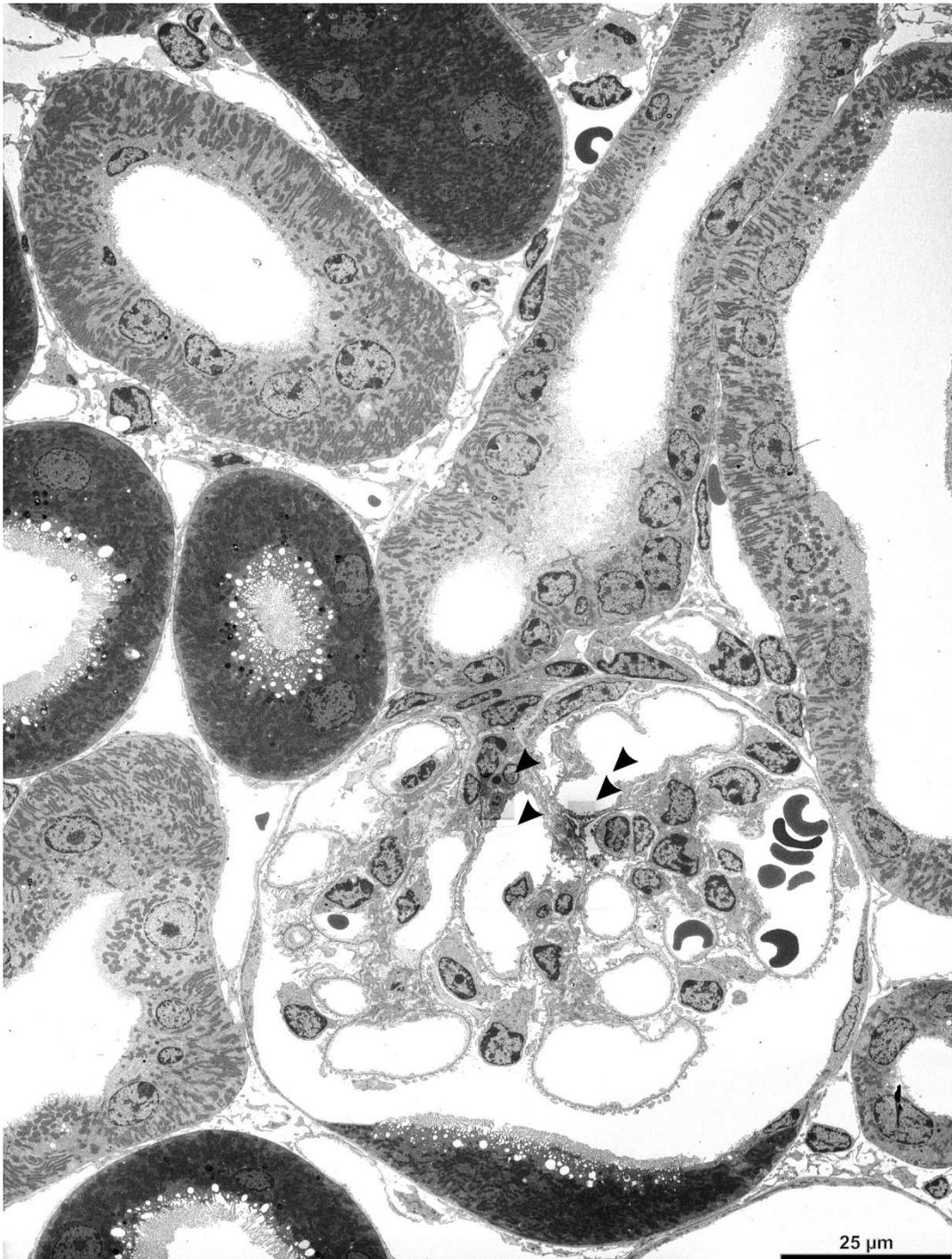


Abbildung 35. REM-Array Tomographie, Einzelbild.

REM-Array Tomographie Einzelbild eines Glomerulus (Protokoll 3); der Ultradünnschnitt wurde auf ein mit Kohlenstoff bedampftes Deckglas aufgezogen. Die digitalisierte Fläche entspricht ca. 130x170 μm , der originale Datensatz besteht aus 3072x2304 Pixel (Pixelgröße; ca. 55 nm). Es wurde ein *Inlense*-Sekundärelektronendetektor verwendet, wodurch oberflächennahe Artefakte wie geringgradige elektronendichte Kontaminationen (Pfeilspitzen), induziert durch den Elektronenstrahl bei der Fokussierung, abgebildet wurden. Ansonsten war der gesamte Ultradünnschnitt, bis auf sehr vereinzelte Falten und wenige Verunreinigungen, über die komplette Fläche auswertbar.

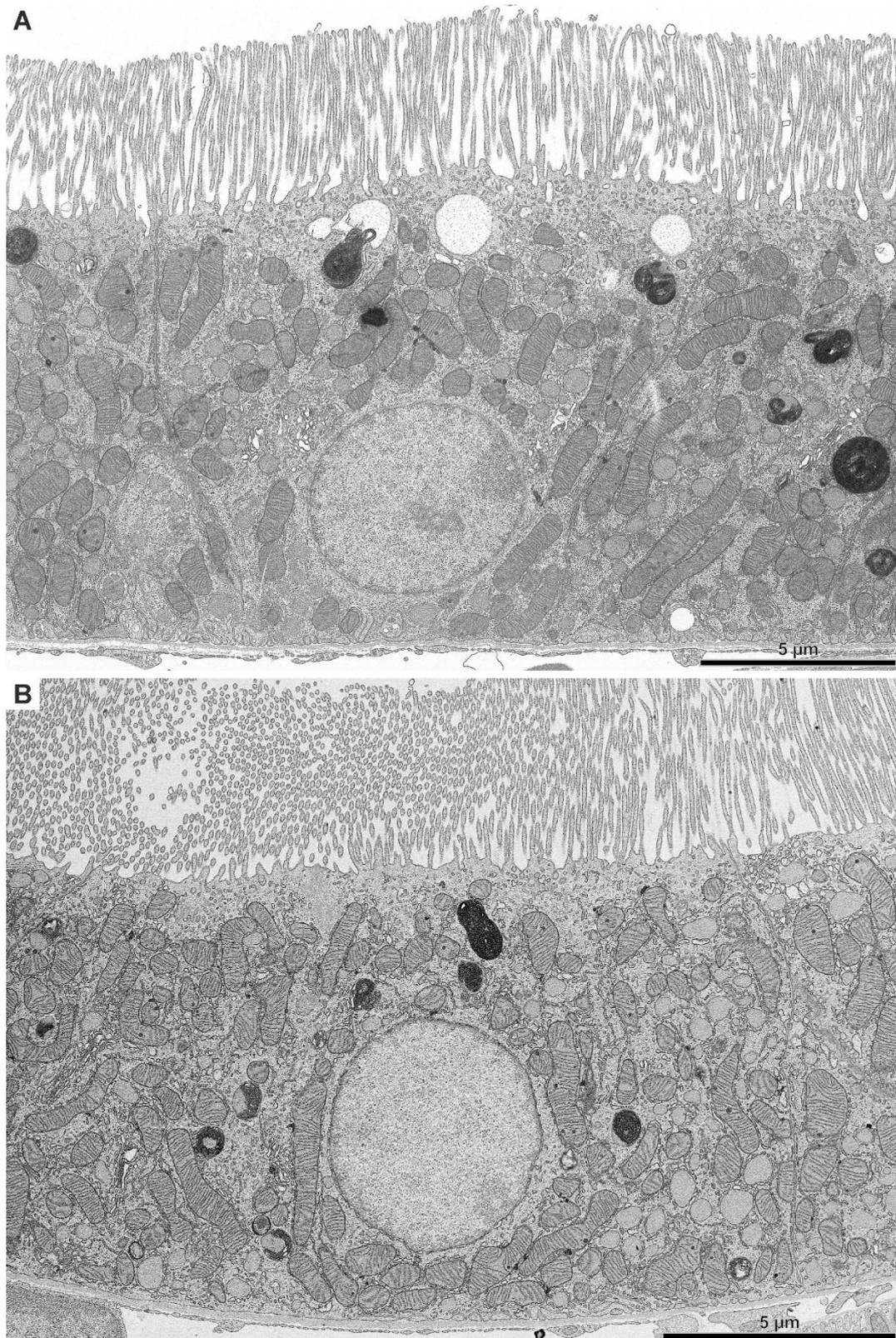


Abbildung 36. Vergleich von konventionellem TEM-Ansatz mit REM-Array Tomographie. Einzelbild einer proximalen Tubuluszelle; konventioneller TEM-Ansatz (A) und REM-Array Tomographie (B) bei mittlerer Vergrößerung. Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1; 200 mOsmol Vehikelosmolarität). Der Ultradünnschnitt wurde auf ein mit Kohlenstoff bedampftes Deckglas aufgezogen. Zwischen TEM-Ansatz und REM-Array Tomographie besteht kaum ein morphologischer Unterschied, Membranen erscheinen bei der REM-Array Tomographie allgemein etwas deutlicher (B).

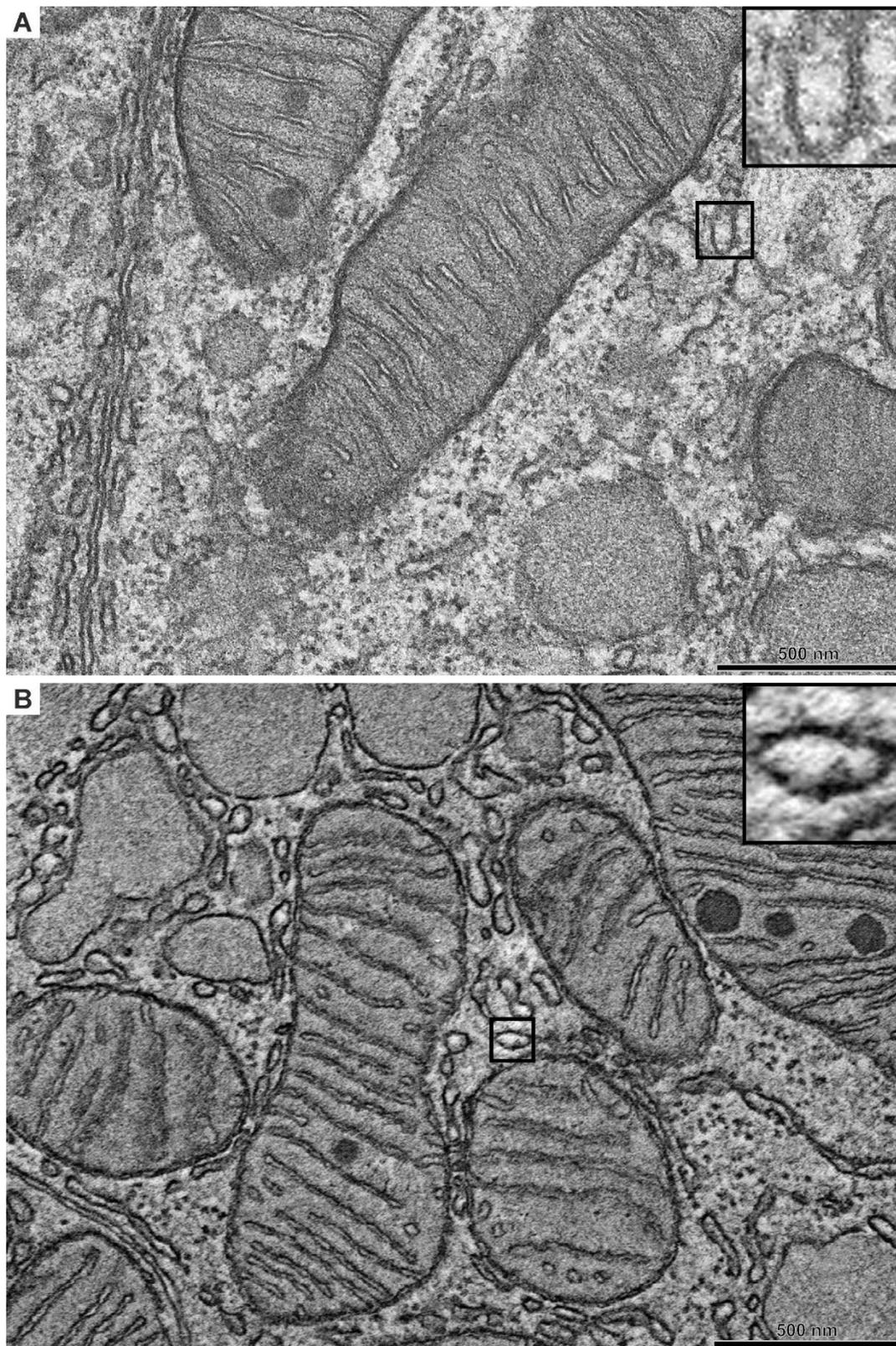


Abbildung 37. Vergleich von konventionellem TEM-Ansatz mit REM-Array Tomographie. Konventioneller TEM-Ansatz (A) und REM-Array Tomographie (B) bei hoher Vergrößerung, Detailausschnitte aus Abb. 36. Membranen erscheinen in der REM-Array Tomographie allgemein etwas deutlicher (B), ihre typische trilaminäre Struktur (A; Bildausschnitt) ist jedoch weniger deutlich abgrenzbar. Weiterhin ist das allgemeine Erscheinungsbild der REM-Array Tomographie weniger "körnig".

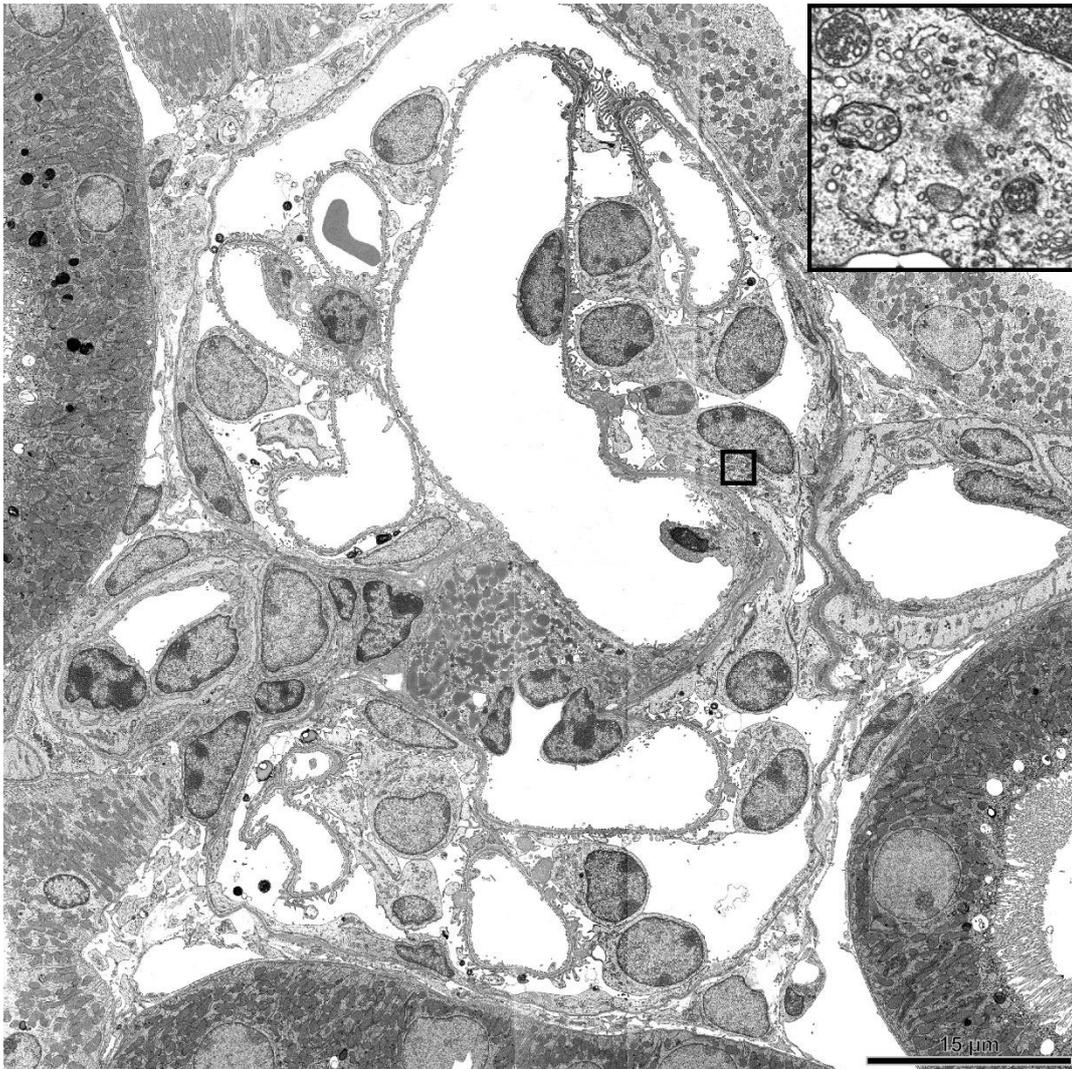


Abbildung 38. REM-Array Tomographie, Nanotomie-Datensatz im Einzelstrahl-REM.

Digitalisierter Glomerulus, Variation von Protokoll 2 (P2 V2 in Tabelle 1; 200 mOsmol Vehikelosmolarität), aufgenommen im Einzelstrahlverfahren. Der Ultradünnschnitt wurde auf ein Siliziumplättchen aufgezogen. Es wurden 4 hochauflösende Einzelbilder automatisch angefertigt und mit Adobe Photoshop CS4 zusammengesetzt. Die digitalisierte Fläche entspricht ca. 80x80 μm, der originale Datensatz besteht aus ca. 30000x30000 Pixel (Pixelgröße 3 nm). Es wurde ein EsB-Detektor verwendet, wodurch oberflächennahe Artefakte wie Scharten, Präzipitate und Elektronenstrahl-induzierte Kontaminationen deutlich abgeschwächt dargestellt wurden. Fokale Helligkeitsunterschiede im Bereich der Überlappungen wurden manuell reduziert. Der Bildausschnitt zeigt das zytoplasmatische Detail eines Podozyten; subzelluläre Details wie zwei Zentriolen und ein Golgi-Apparat sind vom elektronenlichten Zytoplasma gut abgrenzbar.

Die Aufnahmezeit bei der REM-Array Tomographie Nanotomie war vergleichbar mit der TEM-Nanotomie und lag bei ca. 1-2 Std. für eine Fläche von 100x100 μm (Pixelgröße 3 nm, BSE-Detektor; Demozentrum von Carl Zeiss Microscopy in Oberkochen). Allerdings war die Aufnahmezeit bei der REM-Array Tomographie Nanotomie stark abhängig von den eingestellten Parametern und den verwendeten Detektoren. Eine eingestellte hohe *Dwell time*¹ (z.B. 25 μs) und die Verwendung eines EsB-Detektors für eine verbesserte Aufnahmequalität erhöhten im

¹ Verweildauer des Elektronenstrahls eines REM pro Pixel.

Rahmen dieser Arbeit die Aufnahmezeit im Einzelfall auf bis zu ca. 20 Std. Im Vergleich zur TEM-Nanotomie wurden mit der REM-Array Tomographie deutlich größere Bildkacheln erzeugt. Diese waren mit bis zu ca. 16000x16000 Pixel (TEM-Nanotomie; 4096x4096 Pixel) ca. 16x größer. Hierdurch konnten überlappende Bereiche und damit die Aufnahmezeit reduziert werden. Das nachfolgende Zusammenfügen per *TrakEM2* wurde hierdurch ebenfalls beschleunigt und auch qualitativ verbessert, da weniger anpassende Berechnungen durchgeführt werden mussten.

3.8.4.4. REM-Array Tomographie; 3D-Datensätze im Einzelstrahl-REM

Eine räumliche Darstellung von glomerulären und tubulären Strukturen durch Semidünnschnittserien ermöglichte in meiner Arbeit eine Auflösung von mikroanatomischen Details, jedoch konnten subzelluläre Details hierdurch auflösungsbedingt nur ungenügend dargestellt werden. Auf ultrastruktureller Ebene zeigten konventionelle Ultradünnschnitte am TEM auf der Basis von angepassten Präparationen ausgezeichnet fixierte Zellstrukturen, jedoch konnten Organellen anschnittsbedingt nur in einer Ebene zweidimensional bzw. als Summation des Ultradünnschnittvolumens dargestellt werden. Serienschnitte zur 3D-Rekonstruktion wären mit dem TEM-Ansatz zwar möglich gewesen, jedoch bei allgemein äußerst hohem Aufwand und zahlreichen Präparationsartefakten sowie weiteren Limitationen aufgrund mangelnder Probenstabilität. Elektronentomographien ermöglichten eine sehr hohe räumliche Auflösung, jedoch war diese Technik durch die verwendete Schnittdicke von ca. 250 nm limitiert, bei weiterhin kleinem *Field of view*¹, limitiert durch den Chip der CCD-Kamera. Konventionelle REM-Ansätze boten in meiner Arbeit den Vorteil einer allgemein hohen räumlichen Auflösung, jedoch konnten die hier erlangten Informationen nicht in einen Kontext zum subzellulären Detail wie Organellen und Zellmembranen gesetzt werden.

Durch die REM-Array Tomographie konnte eine dreidimensionale Darstellung auf ultrastruktureller Ebene bei großem *Field of view* und mittlerer X/Y/Z-Auflösung erreicht werden. Es wurde ein Volumen von ca. 30x25x1,7 µm mit einer Pixelgröße von 5 nm digitalisiert (Abb. 39A-G). Hierdurch konnten Organellen wie Zellkerne, Mitochondrien, Autophagosomen und Lysosomen innerhalb einer Zelle des aufsteigenden Schleifenschenkels aufgelöst und in einem mikroanatomischen Kontext betrachtet werden. Es zeigte sich nach Segmentierung und Modellierung die vernetzte Struktur von Mitochondrien. Weiterhin zeigte sich ein räumlicher Zusammenhang zwischen Autophagosomen und dem rauen endoplasmatischen Retikulum; sichelförmige Membranstrukturen der Autophagosomen zeigten hier einen Kontakt mit den Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Jedoch war aufgrund der gewählten mittleren Auflösung in X/Y/Z nur eine orientierende Beurteilung der Membranenzisternen möglich (Abb. 39C-G).

¹ Der Begriff *Field of view* beschreibt die einsehbare Gewebefläche eines mikroskopischen Präparats (Gesichtsfeld).

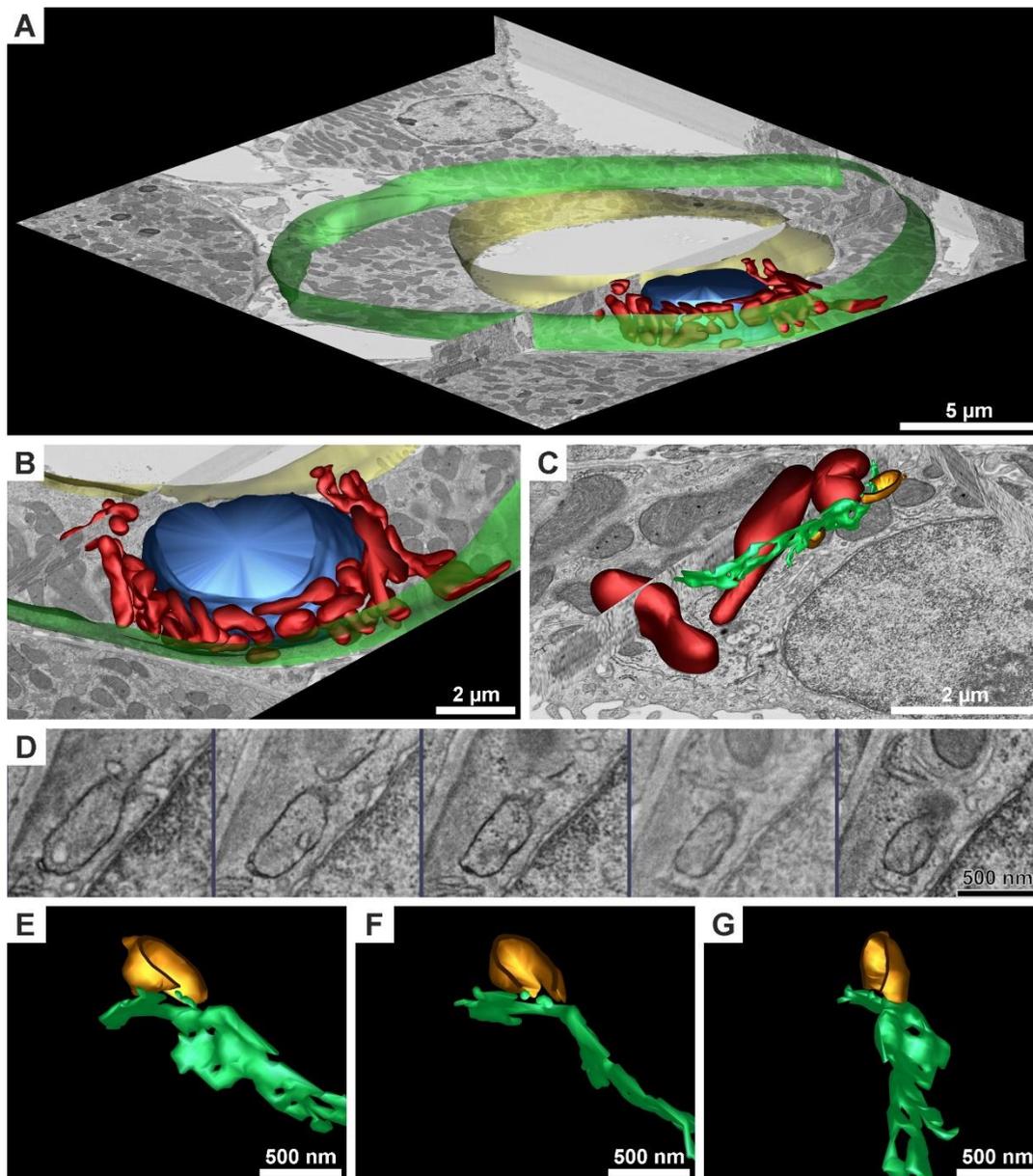


Abbildung 39. REM-Array Tomographie, 3D-Datensatz.

Das Gewebe wurde mit einer Variation von Protokoll 2 fixiert (P2 V2/ Glutaraldehyd in Tabelle 1: 200 mOsmol Vehikelosmolarität). Es wurden 34 Ultradünnschnitte durch hochaufgelöste Einzelbilder (ca. 6000x5000 Pixel) einer Zelle eines aufsteigenden Schleifenschenkels mit einer Pixelgröße von 5 nm digitalisiert. Es wurden äußere Tubulusbegrenzung (grün), innere Tubulusbegrenzung (Gelb), ein Zellkern (blau) und Zellkern-nahe Mitochondrien (rot) für eine 3D-Darstellung modelliert (A,B). Anhand des 3D-Modells konnten der vernetzte Aufbau der Mitochondrien exakt nachverfolgt sowie Nachbarschaftsbeziehungen zu anderen Organellen festgestellt werden (B). In einer weiteren 3D-Darstellung wurden zwei Autophagosomen modelliert (gelb; C, E-G), hier kann die Nachbarschaftsbeziehung zum rauen endoplasmatischen Retikulum (grün) visualisiert werden. Die native Pixelgröße in X/Y von 5 nm (C; horizontal) zeigt das hochaufgelöste ultrastrukturelle Detail der Zelle; anhand einer rekonstruierten Schnittebene (C; vertikal) ist die geringere Pixelgröße in Z von ca. 50 nm mit größerer Struktur feststellbar. Die Auflösung in X/Y/Z ist für die Auflösbarkeit von Membranzisternen nicht optimiert, es können jedoch die Membranen von Autophagosomen (D; *Multi slice view* in 3Dmod) orientierend aufgelöst werden.

3.8.4.5. REM-Array Tomographie; Nanotomie-Datensätze im Mehrstrahl-REM

Ultradünnschnittdigitalisierungen durch TEM- und REM-Ansätze stellten in meiner Arbeit aufgrund der langen Aufnahmezeiten eine Limitation dar, welche die Einsetzbarkeit dieser Techniken deutlich einschränkte. Eine routinemäßige Anwendung zur Auswertung der Fixierungsprotokolle war mit der TEM-Nanotomie daher nicht möglich. Der kooperationsbasierte Zugang zur REM-Array Tomographie schränkte diesen Ansatz zusätzlich ein. Das Potential der Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen schätzte ich jedoch aufgrund der verbesserten Auswertungsmöglichkeiten als außerordentlich hoch ein. Auf der Grundlage meiner Vorarbeiten bot sich mir die Möglichkeit, im Demozentrum von Carl Zeiss Microscopy in Oberkochen ein neuartiges REM zu testen, welches zur Digitalisierung 61 Elektronenstrahlen simultan nutzt und damit die Aufnahmezeit um das ca. 100-fache reduziert (Zeiss MultiSEM 505). Ziel hierbei war die Beurteilung der Bildqualität von Standard-Ultradünnschnittpräparaten der REM-Array Tomographie, weil u.a. spezielle neuartige Detektorsysteme im Mehrstrahl-REM eingesetzt werden und daher eine orientierende Testung ohne Anpassung der Kunstharzpräparation für eine erste Beurteilung sinnvoll erschien. Hierfür wurden Ultradünnschnitte auf Siliziumplättchen untersucht. Aufgrund von Aufladungsartefakten in Form von verdunkelten und unscharfen Bildarealen wurden die Präparate fakultativ mit Kohlenstoff bedampft. Komplette Ultradünnschnitte wurden mit einer Pixelgröße von 4 nm innerhalb von nur 20-30 min. digitalisiert. So wurden z.B. mikroanatomische Strukturen wie Glomeruli mit typischem Erscheinungsbild ihrer Zellen und Auflösbarkeit von subzellulären Details dargestellt. Eine optimierte Schnittpräparation mit einem neuwertigen UltraSemi 35° Diamantmesser zur Anfertigung einer glatten Oberfläche und eine optimierte Aufnahmetechnik ermöglichten eine qualitativ hochwertige Digitalisierung von ca. 150x150 µm großen Ultradünnschnittarealen innerhalb von ca. 1 min. (Abb. 40A,B). Die Auflösung der Präparate wurde jedoch durch oberflächennahe Artefakte limitiert; Schnittartefakte und Präzipitate wurden durch den verwendeten Sekundärelektronendetektor sehr deutlich dargestellt. Diese konnten weiterhin nicht durch alternative Detektorsysteme wie einen BSE-Detektor reduziert werden, weil lediglich ein Sekundärelektronendetektor für das Gerät verfügbar ist. Weiterhin wurde das Bild durch Aufladungsartefakte verschlechtert. Dennoch konnten große Ultradünnschnittareale ohne spezielle Anpassung der Fixierung oder Kunstharzeinbettung innerhalb sehr kurzer Zeit qualitativ hochwertig digitalisiert werden (Abb. 40A,B).

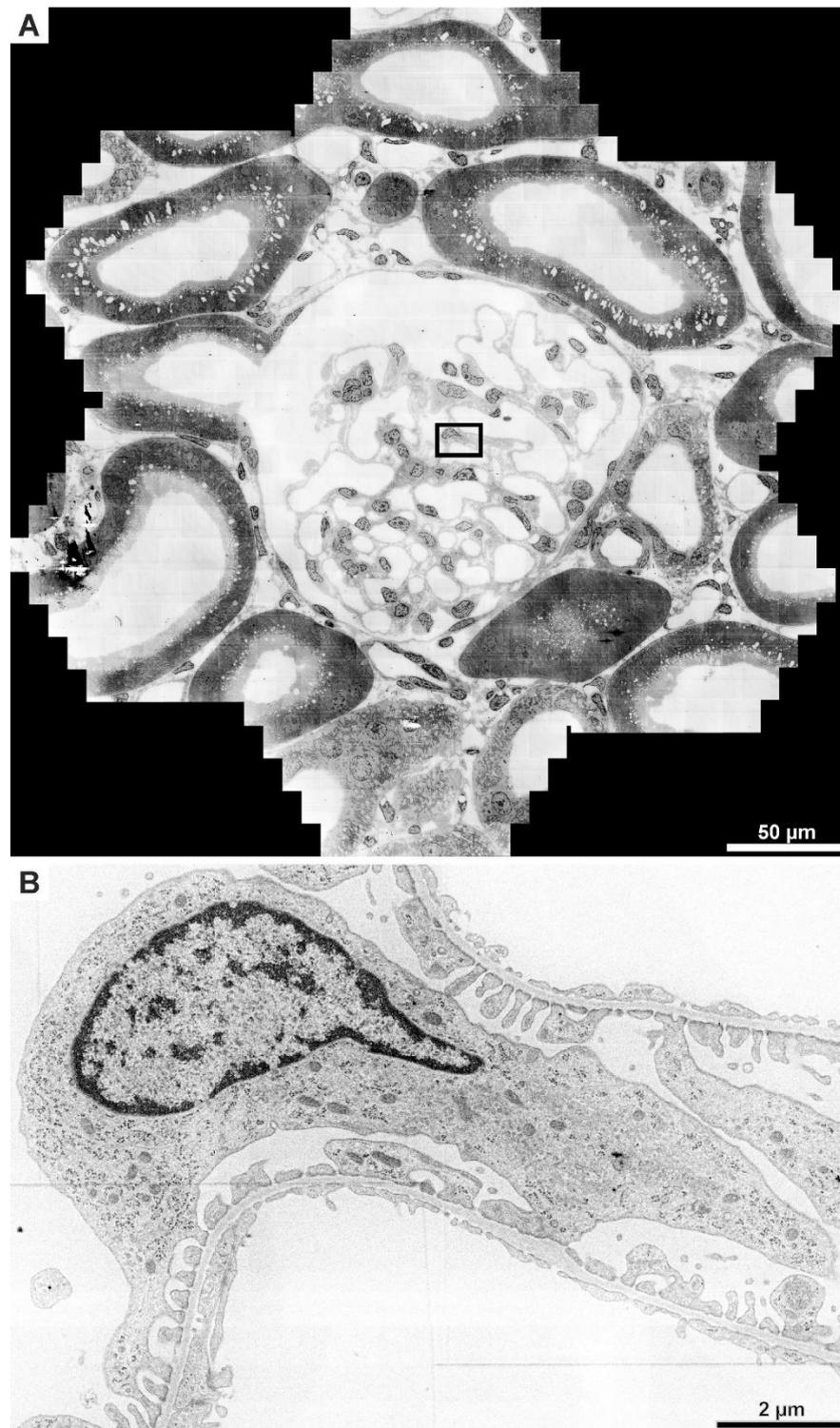


Abbildung 40. REM-Array Tomographie, Nanotomie-Datensatz im Mehrstrahl-REM.

Digitalisierter Glomerulus, Protokoll 3 (ca. 230 mOsmol Vehikelosmolarität, Osmierung nach Standardprotokoll). Der Ultradünnschnitt wurde auf ein Siliziumplättchen aufgezogen. Es wurden 7 hexagonale Bilder, bestehend aus jeweils 61 Einzelbildern, automatisch innerhalb von ca. 1 min. angefertigt und anschließend mit Fiji/*TrakEM2* zusammengesetzt. Die digitalisierte Fläche entspricht ca. 250x250 µm, der originale Datensatz besteht aus ca. 65000x65000 Pixel (Pixelgröße 4 nm). Es wurde ein Sekundärelektronendetektor verwendet. Der Glomerulus zeigt eine der TEM-Morphologie ähnliche Erscheinung mit guter mikroanatomischer Struktur; verbliebene geringgradige Helligkeitsunterschiede zwischen den Einzelbildern sind erkennbar. Im Detail können subzelluläre Details wie Mitochondrien sowie die Komponenten der Filtrationsbarriere abgegrenzt werden (fenestriertes Endothel, Basalmembranen, Podozytenfortsätze und Schlitzmembranen).

3.8.5. Zusammenfassende Beurteilung der mikroskopischen Verfahren

Semidünnschnittserien ermöglichten eine hochauflösende lichtmikroskopische dreidimensionale Rekonstruktion von Strukturen wie Tubuli und kompletten Glomeruli. Damit erlaubten sie eine Anfertigung von virtuellen Schnittebenen in gewünschter Orientierung und eine virtuelle Modellierung, wodurch die komplexe Struktur von Glomeruli verbessert visualisiert werden konnte. Limitierend ist die LM-Array Tomographie jedoch durch eine Vielzahl von zeitaufwändigen manuellen Arbeitsschritten wie Präparation, Bildaufnahme und Segmentierung.

Die REM-Array Tomographie ermöglichte eine hochauflösende ultrastrukturelle dreidimensionale Rekonstruktion zellulärer und subzellulärer Strukturen, war jedoch durch lange Aufnahmezeiten am REM limitiert. Eine weiter gesteigerte Auflösung für dreidimensionale Rekonstruktionen wurde durch Elektronentomographie ermöglicht, jedoch war diese durch das geringe Schnittvolumen von ca. 250 nm, einer langen Aufnahmezeit und einer sehr aufwändigen Datenverarbeitung nicht als Routineanwendung nutzbar.

Die zweidimensionale Digitalisierung von großen Ultradünnschnittarealen mit der TEM-Nanotomie ermöglichte Auswertungen auch unabhängig von einem Elektronenmikroskop. Diese Technik ermöglichte den Erhalt von räumlichen Beziehungen zwischen mikroanatomischer und ultrastruktureller Ebene und somit eine verbesserte morphologische Auswertung der strukturellen Heterogenität von Nieren- und Hirngewebe. Limitationen zeigten sich im Rahmen meiner Arbeit in Form von Präparationsartefakten und dem zeitlichen Aufwand bei Anfertigung und Verarbeitung der Datensätze. Die REM-Array Tomographie erleichterte die Anfertigung von qualitativ hochwertigen Präparaten für großflächige Digitalisierungen. Einzelbilder konnten in hoher Qualität von geringer bis hoher Vergrößerung angefertigt werden, bei guter Auffindbarkeit auch seltener kortikaler und medullärer Strukturen durch barrierefreie Ultradünnschnittdarstellung. Hochauflösende Nanotomie-Datensätze konnten weiterhin im Vergleich zur TEM-Nanotomie durch stabilere Präparation verbessert erzeugt werden. Durch Verwendung eines Mehrstrahl-REM konnte außerdem die Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen um den Faktor 100 beschleunigt werden, wodurch in Zukunft die Verfügbarkeit der Ultradünnschnitt-Digitalisierung deutlich verbessert werden könnte.

4. Diskussion

Im Rahmen meiner Arbeit konnte durch Anpassung von Protokollen zur Formaldehyd-basierten Perfusionsfixierung sowie der Gewebe- und Schnittpräparation eine optimierte morphologische und histochemische Auswertung von Nierengewebe erreicht werden. Das primär durch schwach vernetzende Formaldehydlösung fixierte und entsprechend der weiteren Methoden aufgearbeitete Material erlaubt eine Verwendung der in meiner Arbeit vorgestellten mikroskopischen Verfahren an nur einem Versuchstier. Hierdurch können zwei der "3R-Grundsätze" mit Reduktion (*Reduction*) und Verfeinerung (*Refinement*) getroffen werden (58). Die Verwendung von nur einem Versuchstier für alle Methoden ermöglichte eine stringenter Korrelation untersuchter Parameter. Weiterhin konnte Nierengewebe in dieser Arbeit durch Verwendung neuer mikroskopischer Verfahren wie TEM-Nanotomie und REM-Array Tomographie (75, 76) verbessert ultrastrukturell ausgewertet werden. Wie ausführlich in den Methoden dieser Arbeit beschrieben, beinhaltet eine Standardpräparation für TEM- und REM-Ansätze eine Vielzahl an Arbeitsschritten; von der Zusammensetzung der Perfusionslösungen bis zur Auswertung der Bilder am PC muss jeder Schritt als Variable mit potentielltem Einfluss auf das finale morphologische Erscheinungsbild angesehen werden; dieses ist dabei als Summation aller Arbeitsschritte zu sehen, zu denen auch die Bildentstehung per CCD-Kamera und die Darstellung per Monitor gehören. Diese Variablen zu identifizieren und hinsichtlich ihres Einflusses auf das finale morphologische Erscheinungsbild zu charakterisieren stellt eine kritische Aufgabe dar und soll im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Fixierungsprotokolle zur optimierten morphologischen und histochemischen Auswertung der Niere

Organspezifische physiologische und morphologische Eigenheiten der Niere können bekanntermaßen durch Perfusionsfixierung am besten berücksichtigt werden; so kann ohne Druckverlust ein schnelles Auftreffen der Fixierlösung ermöglicht und Nierengewebe in einem lebensnahen Zustand erhalten werden (9, 13, 15, 24). In umfangreichen Untersuchungen wurden zuvor Parameter der Perfusionsfixierung und verwendete Lösungen in früheren Arbeiten untersucht; als Fixans wurde hier zumeist hochvernetzendes Glutaraldehyd verwendet (9, 15, 24-27). Durch eine starke Fixierung per Glutaraldehyd konnten hierdurch Protokolle für hochauflösende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen etabliert werden, jedoch eignet sich so fixiertes Gewebe aufgrund der Maskierung von Antigenen generell nicht für histochemische Untersuchungen (19). Hierfür wurde klassischerweise in einem separaten Ansatz durch Organentnahme an getöteten Versuchstieren Material in Formaldehyd per Immersion fixiert (77); die hieraus resultierenden negativen Folgen wie Kollaps von Tubuli und allgemeine Zellschwellung mit eingeschränkter ultrastruktureller Auswertbarkeit konnten auch in meiner

Arbeit gezeigt werden. In früheren Arbeiten wurden bereits Formaldehyd-Fixierungen durch entsprechende Nachbehandlungen mit TEM-Ansätzen kombiniert (24), jedoch bisher ohne Untersuchung von methodischen Ansätzen mit dem Ziel einer verbesserten ultrastrukturellen Darstellung dieses Materials. Hierfür zuverlässige Standardprotokolle zu erstellen und zu diskutieren war zentrales Ziel im ersten Abschnitt meiner Arbeit. Durch Variationen dieser Protokolle konnten weiterhin Ansatzpunkte für eine selektiv weiter verbesserte Ultrastruktur spezieller Nierenzonen und Zelltypen erreicht werden.

4.1.1. Perfusionsfixierung

Eine Perfusionsfixierung kann aufgrund der vielen Präparationsschritte und der damit verbundenen Labor-eigenen Handhabungen im Rahmen der Vorbereitung generell als erschwert reproduzierbar betrachtet werden (9, 14, 15). Ausgangspunkt meiner Experimente waren im Labor bereits gut etablierte Techniken für Perfusionsfixierungen und nachfolgende Präparationen. Auf dieser Grundlage konnte durch gezielte Anpassung von Arbeitsschritten eine Qualitätsoptimierung durchgeführt werden. Die Orientierung an publizierten Ergebnissen diente als eine Form der Qualitätskontrolle.

4.1.1.1. Präparatorische Standards

Eine Orientierung an Labor-eigenen Erfahrungswerten zu Perfusionsfixierungen ermöglichte eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimente. Hier wurden speziell die Anästhesie und die chirurgische Präparation als entscheidende Punkte der Perfusionsfixierung abgegrenzt. Die Inspektion der Nierenoberfläche im Rahmen der Präparation der Perfusionsfixierung sowie kurz vor und nach Infusion der Vorspüllösung und Fixierlösung war dabei zentraler Bestandteil der makroskopischen Qualitätsbeurteilung. Auch in früheren Arbeiten wurde durch makroskopische und stereomikroskopische Inspektion der Nierenoberfläche während der Perfusionsfixierung eine erste Qualitätseinschätzung unternommen (9, 15). Hierdurch konnten verschiedene Einflussgrößen wie Anästhesietiefe, Blutverlust, Vasokonstriktion und Gefäßokklusion beurteilt werden.

4.1.1.2. Anästhesie

Versuchstiere haben im Rahmen der Experimente meiner Arbeit z.T. sehr unterschiedlich auf die Anästhesie mit Isofluran und Nembutal reagiert (3.1.1.; Anästhesie). Ziel der Anästhesie war generell eine sehr tiefe Sedierung mit Ausbleiben einer Reaktion nach Setzen eines Schmerzreizes. Bei Verwendung von deutlich höherer Dosierung von Nembutal (Richtwert: 40 mg/kg Körpergewicht), wie sie z.B. bei fettleibigen Tieren nötig war, wurde vermehrt eine fleckige Nierenoberfläche beobachtet. In einer früheren Arbeit wurde dieser Zusammenhang bereits beschrieben; es wurden Blutdruckschwankungen und damit auch Schwankungen des renalen

Blutflusses als Ursache von kollabierten proximalen Tubuli vermutet (15, 24). In früheren Arbeiten wurden die Versuchstiere ebenfalls mit Nembutal anästhesiert (9, 13, 24-27, 34, 78, 79), die verwendete Dosis betrug 35-50 mg/kg Körpergewicht.

Alternativ zu Nembutal wurde in meiner Arbeit Ketanest (Ketamin) als Anästhetikum gewählt, da dieses allgemein eine verbesserte hämodynamische Stabilität bietet. Hierdurch sollte die Durchblutung der Nieren verbessert und dadurch Artefakte wie kollabierte Tubulussegmente reduziert werden. Es zeigten sich hier jedoch häufiger eine fleckige Nierenoberfläche und damit Anzeichen von ischämischen Schäden. Dies ist vermutlich auf einen erhöhten Tonus der Nierengefäße mit Neigung zur Vasokonstriktion zurückzuführen.

In einer früheren Arbeit wurden negative Auswirkungen einer Äther-Anästhesie auf das Nierenmark beschrieben (26). Eine vor-Sedierung mit Isofluran, wie in meiner Arbeit zur erleichterten nachfolgenden Injektion von Nembutal durchgeführt, wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht beschrieben (9, 13, 24-27, 34, 78, 79).

4.1.1.3. Chirurgische Präparation und Perfusionsdruck

Einige Autoren haben unmittelbar nach dem Start der retrograden Perfusionsfixierung proximal der Aa. renales eine Gefäßklemme an der Aorta abdominalis gesetzt (subdiaphragmale Klemme) (9, 15, 25). Die Präparation dieses Areal ist jedoch aufgrund der zarten Gefäße und der unmittelbaren Nähe zu den Nierenarterien sowie den Nieren selbst zeitaufwändig und bringt eine Blutungsgefahr mit sich. Daher wurde dieser Arbeitsschritt in meiner Arbeit nicht durchgeführt, auch wenn hierdurch ein verbesserter Fluss der Vorspül- und Fixierlösung durch die Nieren zu erwarten wäre, da der Weg über die Aorta abdominalis in die kraniale Körperregion durch die subdiaphragmale Klemme versperrt ist. In der Folge wäre auch eine verbesserte Perfusion der Nieren denkbar. Im Rahmen meiner Arbeit konnten jedoch auch ohne subdiaphragmale Klemme und die damit erhöhte Blutungsgefahr exzellente und reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden.

Neben dem kompletten Kollaps von proximalen Tubuli in Folge von Druckverlust wurde in meiner Arbeit eine starke Abhängigkeit der Zellhöhe sowie des Tubulusdurchmessers vom applizierten Perfusionsdruck beobachtet. Dieser wurde neben der Höhe der Infusionsflaschen bzw. des eingestellten pneumatischen Drucks offenbar auch stark durch die Geometrie des Aortenkatheters, seiner Lage innerhalb der Aorta sowie die Größe der Inzision in der Vena cava inferior bestimmt. Die besonders hohe Sensitivität von proximalen Tubuli gegenüber ungeeignet justierten Parametern der Perfusionsfixierung wurde zuvor beschrieben (9, 25, 80). In einer früheren Arbeit konnte weiterhin die Abhängigkeit der Zellhöhe von proximalen Tubulusepithelien vom intratubulären Perfusionsdruck im Molch (*Necturus*) gezeigt werden; durch Okklusion eines Glomerulus wurde hier der Perfusionsdruck im nachgeschalteten Nephron selektiv reduziert, während eine Okklusion im distalen Nephron den Perfusionsdruck in proximalen Segmenten

erhöhte. Ein erhöhter intratubulärer Druck führte hier zu abgeflachten proximalen Tubulusepithelien, während ein reduzierter intratubulärer Druck eine Zunahme ihrer Höhe bewirkte (29). Vergleichbare Beobachtungen wurden bei der Mikroperfusion von Nephronen *in vivo* gemacht (24); durch Glaspipetten wurde hier Glutaraldehyd selektiv in proximale Tubuli injiziert. Ein erhöhter intratubulärer Perfusionsdruck zeigte in der TEM-Ultrastruktur neben einer Abflachung der proximalen Tubulusepithelien eine schräge Orientierung der Mitochondrien. Ähnliche Beobachtungen habe ich in meiner Arbeit gemacht. Besonders proximale Tubulusepithelien zeigten nach Fixierung mit deutlich supraphysiologischem Perfusionsdruck eine starke Abflachung. Als positive Auswirkung zeigten sich jedoch auch weniger Tubulussegmente kollabiert.

4.1.2. Artefaktbildung während der Perfusionsfixierung

Im Rahmen von Perfusionsfixierungen konnte stereomikroskopisch indirekt die Bildung von Artefakten wie Tubuluskollaps anhand von Flecken auf der Nierenoberfläche beobachtet werden. Diese Beobachtungen decken sich weitestgehend mit Beschreibungen in früheren Arbeiten (15). Auf mikroskopischer Ebene anhand von Schnittpräparaten beobachtete ich darüber hinaus weitere Artefakte wie interzelluläre Spaltbildungen sowie Schwellungen und Schrumpfungen von Zellen. Diese betrafen die verschiedenen Nephronabschnitte in unterschiedlichem Ausmaß. Im Folgenden sollen für einige Zelltypen bzw. Tubulussegmente typische Artefakte sowie ihre mögliche Entstehung diskutiert werden. Podozyten und proximale Tubulusepithelien sind hierbei von besonderer Bedeutung, weil diese Zelltypen einerseits sehr sensibel auf suboptimale Fixierbedingungen reagieren und andererseits durch ihre Veränderungen großen Einfluss auf jeweils stromabwärts gelegene Nephronabschnitte haben.

4.1.2.1. Podozyten

Podozyten waren nach den meisten Fixierungen in meiner Arbeit entweder geschrumpft (z.B. Protokoll 1 und 2; ca. 280 mOsmol Vehikelosmolarität) oder geschwollen (z.B. Variationen von Protokoll 2 und 3 mit einer Vehikelosmolarität von 200 mOsmol oder weniger). Eine physiologische Struktur mit turgeszent erscheinendem Zelleib einerseits, ohne Zeichen von schwellungsbedingten Veränderungen wie aufgequollenem (elektronenlichtem) Heterochromatin oder deutlich elektronenlichtes Zytoplasma andererseits, konnte allgemein nicht zuverlässig erreicht werden. Ursächlich hierfür könnte ihre große Oberfläche in Form von Podozytenfortsätzen und ihr enger Kontakt zum Kapillarlumen und dem Harnraum mit hierdurch allgemein schneller Reaktion auf Fixierlösungen sein. Weiterhin sind die Zelleiber der Podozyten nicht wie die Tubulusepithelien über Zellkontakte verbunden, sodass fixierabhängige Veränderungen ihres Volumens sich daher stärker auswirken könnten. In früheren Arbeiten wurden diese Überlegungen bisher nicht offen diskutiert.

Neben dem direkten Einfluss einer suboptimalen Fixierung auf die Morphologie von Podozyten in Form von Artefakten zeigte sich in meiner Arbeit eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Schwellungsgrad der Podozyten und dem Perfusionserfolg von nachgeschalteten Tubulussegmenten. Podozyten mit stark turgeszenter Erscheinung, wie nach Fixierung mit Variationen von Protokoll 2 und 3 (200 mOsmol Vehikelosmolarität oder weniger), zeigten überwiegend kollabierte Tubulussegmente. Ursächlich hierfür könnte einerseits ein direkter Einfluss einer hypoosmolaren Fixierlösung auf die Tubulussegmente mit der Folge von Zellschwellung sein. Andererseits könnte auch ein Anschwellen von Podozytenfortsätzen die Filtration der Fixierlösung über die Filtrationsbarriere einschränken und hierdurch zu einem intratubulären Druckverlust führen. Hierzu passend zeigten sich in meiner Arbeit nach Perfusion mit einer hypoosmolaren Fixierlösung plumpe Podozytenfortsätze mit elektronenlichtem Zytoplasma. Nach Perfusion mit einer hyperosmolaren Fixierlösung waren die Podozytenfortsätze hingegen „spinnenbeinartig“ ausgedünnt und ihr Zytoplasma elektronendicht. Eine weitere Reduktion des intratubulären Flusses ist auch durch Anschwellen von Endothelzellen mit teilweiser Obstruktion des Kapillarlumens oder Veränderung des Porenendothels zu erwarten. Möglicherweise ist hier eine Kombination beider Faktoren die wahrscheinlichste Ursache. In einer früheren Arbeit konnte nach Perfusion einer hyperosmolaren Mannitollösung über die Filtrationsbarriere eine Reduktion des Flusswiderstands festgestellt werden (35), die Folge war ein verbesserter intratubulärer Fluss. Die morphologische Grundlage dieses intravital feststellbaren Phänomens wird möglicherweise eine Ausdünnung der Podozytenfortsätze in Folge des Kontakts mit der hyperosmolaren Mannitollösung sein, vergleichbar mit der in meiner Arbeit festgestellten Ausdünnung im Rahmen einer Perfusionsfixierung mit hyperosmolarer Fixierlösung.

Der Kollaps von Nierentubuli in Folge einer Perfusionsfixierung mit einer hypoosmolaren Fixierlösung ist daher sehr wahrscheinlich auf die kombinierte Wirkung eines verminderten Perfusionsflusses sowie einer Schwellungsreaktion von Tubulusepithelien zurückzuführen (15).

4.1.2.2. Proximale Tubuli

Der proximale Tubulus gilt allgemein als ein sehr sensibler Nephronabschnitt, welcher stark auf suboptimale Fixierbedingungen reagiert. Ich konnte zwei typische Artefakte in proximalen Tubulusepithelien voneinander abgrenzen, die in sehr unterschiedlichem Ausmaß auftraten; nämlich basolaterale Spaltbildungen und kollabierte Tubuli.

Basolaterale Spaltbildungen in proximalen Tubulusepithelien betrafen sowohl kollabierte als auch offene Tubuli. Sie konnten vereinzelt, gruppiert sowie großflächig verteilt beobachtet werden. Weiterhin entstanden sie nach Perfusionsfixierung mit Formaldehyd sowie Glutaraldehyd. Ähnliche Artefakte wurden als Folge von Perfusionsfixierungen mit einem hyperosmolaren Vehikel beschrieben (15); hier wurde weiterhin von einer eingeschränkten Abgrenzbarkeit

subzellulärer Details aufgrund eines elektronendichten Zytoplasmas berichtet. Auch eine Unterbrechung des Perfusionsdrucks für 2 min. zwischen Vorspülung und Applikation der Fixierlösung führte zur Bildung von basolateralen Spalten im proximalen Tubulus (25). In einer anderen Arbeit wurde eine mögliche Ursache hierfür beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen sei der intratubuläre Druck höher als der intravaskuläre (24), nach Druckverlust würde sich dies umkehren und der intratubuläre Fluss sistieren, mit der Folge eines Tubuluskollapses. Eine Perfusionsfixierung in diesem Zustand würde diese Tubuli wieder eröffnen, wobei die artifiziellen basolateralen Spalten entstehen würden. Ähnliche Beobachtungen wurden weiterhin nach mechanischer Manipulation der Nierenoberfläche während einer Auftropffixierung beschrieben; nach Rubbeln der Nierenoberfläche mit einer Glaspipette während der Fixierung konnten vermehrt basolaterale Spalten im proximalen Tubulus festgestellt werden, andere Tubulussegmente waren hiervon nicht betroffen (13). Auf Grundlage dieser Veröffentlichung ist anzunehmen, dass ähnliche Artefakte auch nach einer nur 5-minütigen Perfusionsfixierung mit (allgemein schwach fixierendem) Formaldehyd induziert werden können. Daher wurde der Zuschnitt von Nierengewebe in meiner Arbeit sehr vorsichtig und ohne Ausübung von Druck durchgeführt.

Eine fleckige Nierenoberfläche konnte stereomikroskopisch im Rahmen meiner Arbeit gehäuft nach stärkeren Blutungen des Versuchstiers, bei eingeschränkter Respiration, nach verspätetem Start der Vorspülung und bei Verwendung einer hypotonen Fixierlösung beobachtet werden. Diese Beobachtungen decken sich mit Beobachtungen durch Maunsbach (15); hier traten diese Veränderungen nach zu tiefer Anästhesie und eingeschränkter Respiration bei Ratten ebenfalls gehäuft auf. Nach der Perfusionsfixierung zeigten diese Areale beim Zuschnitt unter dem Stereomikroskop kollabierte proximale Tubuli, die gruppiert kapselnah lokalisiert werden konnten. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Griffith et al. beschrieben (9); durch Auflichtmikroskopie konnten *in vivo* kapselnah Tubuli untersucht werden. Proximale Tubuli wurden durch ihren Bürstensaum identifiziert, distale Tubuli durch glatte lumenale Kontur. Nach Abklemmen der Arteria renalis waren alle proximalen Tubuli innerhalb von 5 s kollabiert, während die distalen Tubuli weiterhin ein offenes Lumen zeigten. 4-5 min. nach Wiedereröffnung der Arteria renalis war der ursprüngliche Zustand mit offenen proximalen Tubuli wiederhergestellt.

Der genaue Zeitpunkt des Tubuluskollapses während der Perfusionsfixierung konnte in der Arbeit von Griffith et al. nicht festgestellt werden. Areale mit gruppierten kollabierten Tubuli entstehen möglicherweise schon vor dem Start der Perfusionsfixierung als Folge eines Druckverlusts (9). Denkbar wäre weiterhin auch Inaktivität von Nephronen bzw. Nephrone mit verändertem funktionellem Status (9). In der Arbeit von Griffith et al. wurde vermutet, dass sich Versuchstiere als Folge von Anästhesie und invasiver Operationsprozedur im Rahmen der Perfusionsfixierung generell in einem antidiuretischen Zustand befinden.

Um basolaterale Spaltbildungen sowie den Kollaps von proximalen Tubuli zu vermeiden, achtete ich auf einen schnellen und reibungslosen Ablauf der ganzen Prozedur, besonders aber den Start der Perfusionsfixierung; Druckverlust durch verspäteten Start und Gefäßokklusion durch verschleppte Fremdkörper standen im Verdacht für kollabierte Tubulusareale. Ein Verschluss von Nierengefäßen durch Luftblasen mit segmentalen Arealen von kollabierten Tubuli wurde beschrieben (15). Als Ursache wären hier ebenfalls agglutiniertes Blut oder größere Fremdpartikel als Verunreinigung in den verwendeten Lösungen denkbar. Durch Verwendung von heparinierter Schlauchlösung und einer Vorspülung sowie generell filtrierten Lösungen konnten die letzten beiden Punkte in eigenen, vorangehenden Untersuchungen jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden. Luftblasen wurden bei einigen Präparationen zwar beobachtet, jedoch konnte kein klarer Zusammenhang mit kollabierten Tubulusarealen hergestellt werden. Eine klare Differenzierung bezüglich des Entstehungszeitpunktes von kollabierten Tubuli konnte in meiner Arbeit allgemein nicht getroffen werden. Denkbar wäre hier eine Einschätzung anhand der unterschiedlichen Schwere an ischämischen Schäden; ein Kollaps von Tubuli zu einem frühen Zeitpunkt der Perfusionsfixierung hätte bis zur Stabilisierung der Morphologie durch das Fixans eine schlechtere Ultrastruktur erwarten lassen, als ein Kollaps zu einem Zeitpunkt gegen Ende der Perfusionsfixierung. Allgemein konnten in meiner Arbeit jedoch keine deutlichen qualitativen Abstufungen bei Gruppen von kollabierten proximalen Tubuli beobachtet werden; licht- und elektronenmikroskopisch waren sie entweder sehr gut fixiert oder im Falle von kollabierten Gruppen sehr schlecht. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Griffith et al. beschrieben (9); eine Auftropffixierung von Nieren unmittelbar nach Abbinden der Arteria renalis zeigte eine vergleichbar schlechte Ultrastruktur wie 5 min. nach dem Abbinden. Proximale Tubuli zeigten apikale Zytoplasmablasen und waren komplett kollabiert. Aufgrund dieser stark ausgeprägten ultrastrukturellen Schäden, selbst bei früher Fixierung, kann davon ausgegangen werden, dass die von Griffith et al. beschriebene wiederhergestellte Nierenstruktur nach Reperfusion bei ultrastruktureller Darstellung des Gewebe deutliche Zeichen von Ischämie gezeigt hätte (9). Ultrastrukturelle Schäden nach Reperfusion wurden auch von anderen Autoren beschrieben (81, 82); initiale ultrastrukturelle Schäden wie ein Verlust des Bürstensaumbesatzes waren in S1- und S2-Segmenten reversibel, während S3-Segmente besonders sensibel auf den ischämischen Schaden reagierten und Zeichen von irreversibler Zellschädigung zeigten. Als Schlussfolgerung dieser Überlegungen muss davon ausgegangen werden, dass besonders proximale Tubuli vor und während der Perfusionsfixierung sehr anfällig gegenüber unpassenden Perfusionsparametern sind und auf verschiedene Störungen des Fixierablaufs mit Kollaps oder basolateraler Spaltbildung reagieren. Weiterhin ist anzunehmen, dass ischämische Schäden proximaler Tubulusepithelien im Rahmen einer Perfusionsfixierung nur bedingt reversibel sind, auch wenn sie unmittelbar vor Beginn oder sogar während der Perfusionsfixierung entstehen.

4.1.2.3. Distale Tubuli und Sammelrohre

Distale Tubuli waren in meiner Arbeit allgemein seltener kollabiert als proximale Tubuli. Häufig zeigten Nephrone, in welchen die proximalen Tubuli kollabiert waren, offene distale Tubuli. Hier waren jedoch ähnliche Artefakte wie in proximalen Tubuli identifizierbar, nur schwächer ausgeprägt; nach Perfusion mit einer hyperosmolaren Fixierlösung (z.B. Protokoll 1; ca. 280 mOsmol Vehikelosmolarität) zeigten kortikale distale Schleifensegmente erweiterte Interzellularräume, welche jedoch in der Regel gleichartig und symmetrisch ausgeprägt waren. Zellen der Macula densa zeigten nach Verwendung von hypotonen sowie hypertonen Fixierlösungen ihre typischen basolateralen Erweiterungen. Jedoch waren nach Fixierung mit einer hyperosmolaren Fixierlösung bei beiden distalen Segmenten weitere Zeichen einer hyperosmolaren Schädigung sichtbar, wie eine erweiterte perinukleäre Zisterne und ein allgemein elektronendichtes Zytoplasma. Ähnliche Schrumpfungsräume waren auch im distalen Schleifenkonvolut nach Fixierung mit einer hyperosmolaren Fixierlösung sichtbar. Sammelrohre und Verbindungstubuli zeigten speziell nach Fixierung mit hyperosmolaren Fixierlösungen häufig ein besonders weites Lumen und z.T. zum Lumen hin spitz zulaufende apikale Zellpole, wodurch ein „sägezahnartiges“ Muster entstand. Die Zugabe von HES verstärkte diesen Effekt weiter. In früheren Arbeiten zeigten sich distale Tubuli allgemein weniger sensibel gegenüber suboptimalen Fixierbedingungen als z.B. proximale Tubuli. Sie benötigten für eine optimale Strukturhaltung zwar vergleichbar mit proximalen Tubuli eine für ihre Zone typische Osmolarität, jedoch schienen sie deutlich robuster gegenüber Schwankungen der Osmolarität und des Perfusionsdrucks zu sein (9, 26).

4.1.3. Kombinierte histochemische und morphologische Methoden

Perfusionsfixierungen mit Glutaraldehyd-haltigen Fixierungsgemischen führten in meiner Arbeit allgemein zu besseren morphologischen Ergebnissen als mit Formaldehyd-haltigen Fixiergemischen. Nierengewebe konnte hier mikroanatomisch sowie ultrastrukturell in hoher Qualität erhalten werden; z.B. führten Fixierungen mit Protokoll 3 (ca. 230 mOsmol Vehikelosmolarität) zuverlässig zu einer guten mikroanatomischen Struktur in Rinde und äußerem Mark, auch ultrastrukturell konnten hier sämtliche Zelltypen sehr gut ausgewertet werden. Ein Formaldehyd-haltiges Protokoll mit vergleichbarer Vehikelosmolarität (P2 V3 in Tabelle 1; ca. 230 mOsmol) ermöglichte nur innerhalb der Rinde eine gute mikroanatomische Strukturhaltung, darüber hinaus war die Reproduzierbarkeit in Form von vermehrt geschwollenen oder geplatzten Tubulusepithelien eingeschränkt.

Die Ursache dieser allgemein schlechteren Strukturhaltung durch Formaldehyd-haltige Fixierlösungen liegt vermutlich in der schwachen und zeitverzögerten Fixierreaktion von Formaldehyd. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass Formaldehyd in wässriger Lösung fast zu 100% in seiner hydratisierten Form, als Aldehydhydrat, vorliegt (18). Dieser Form verdankt

es seine schnelle Gewebediffusion, jedoch findet die Fixierung nur als Formaldehyd statt, wobei es im Rahmen der vernetzenden Fixierung aus dem chemischen Gleichgewicht entfernt wird und seine Nachlieferung aus dem Aldehydhydrat begünstigt wird. Aufgrund dieser Dynamik ergibt sich eine Zeitspanne von ca. 24 Std., bis Formaldehyd ein Gewebe selbst bei vernachlässigbar geringer Diffusionsstrecke stark fixiert (18). Daher ist auch bei einer Perfusionsfixierung, die ein schnelles Durchtränken mit Fixierlösung erlaubt, keine sofortige Stabilisierung von Zellen und Tubuli zu erwarten. Während der in meiner Arbeit üblichen 5-minütigen Perfusionsfixierung und des anschließenden Zuschnitts wäre daher eine Induktion zahlreicher Artefakte denkbar. Glutaraldehyd hingegen ermöglicht eine stärkere Stabilisierung von Zellen und Tubuli durch Perfusionsfixierung, wodurch weniger Artefakte im Rahmen der Fixierung und des Zuschnitts induziert werden (19, 20). Als Konsequenz dieser Überlegungen ergibt sich für eine Perfusionsfixierung mit Formaldehyd-haltigen Fixiergemischen eine allgemein höhere Anfälligkeit für Artefakte, welche man durch Anpassungen der Fixierlösung, wie in meiner Arbeit geschehen, reduzieren kann. Durch Einbettung einer größeren Anzahl von Gewebeblöcken kann darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, gut fixierte Gewebeareale zu erreichen, welche nach Kunstharzeinbettung durch Inspektion der Semidünnschnitte lokalisiert und für folgende Ultradünnschnittpräparationen ausgewählt werden können. Eine verbesserte Ultradünnschnittpräparation mit weniger Falten und Präzipitaten ermöglicht weiterhin eine beschleunigte und verbesserte ultrastrukturelle Auswertung.

Immunmarkierungen konnten zuverlässig an Gefrier- und Paraffinschnitten durchgeführt werden, jedoch wurden hier bevorzugt Gefrierschnitte aufgrund besserer Antigen-Erhaltung verwendet. Generelle Aussagen über die Eignung von Fixierungen oder Gewebepräparationen für bestimmte Immunmarkierungen konnten aber nicht getroffen werden. Hier hat sich jeweils eine Austestung mit verschiedenen Präparationen und Verdünnungen der Antikörper bewährt. Allgemein kann aber aufgrund der schonenderen Verarbeitung von Gefrierschnitten von einem nativeren Gewebezustand ausgegangen werden, da Gewebe im Rahmen der Paraffineinbettung mit Ethanol und Xylol behandelt und über mehrere Stunden bei 60°C in Paraffin inkubiert wird (83). Antigen *Retrieval* Methoden ermöglichen jedoch auch optimierte immunhistochemische Markierungen an Paraffinschnitten (84). Hierdurch kann ihr Vorteil einer besseren Histomorphologie mit verbesserten immunhistochemischen Markierungen verbunden werden (85). Im Vergleich zu immunhistochemischen Markierungen bereiteten immunzytochemische Markierungen in meiner Arbeit generell größere Probleme. Hier war eine Balance zwischen guter Strukturhaltung (hohe Glutaraldehyd-Konzentration) und guter Immunmarkierung (geringe Glutaraldehyd-Konzentration) stets schwer zu erreichen. Hydrophiles Kunstharz wurde aufgrund einer einfacheren Schnittpräparation der Tokuyasu-Technik häufig vorgezogen. Bei sensiblen Markierungen konnte durch die Tokuyasu-Technik jedoch oft ein besseres Ergebnis erreicht werden. Gründe hierfür sind vermutlich der stärker hydratisierte Zustand (nativere

Antigenkonformation) und eine verbesserte Antikörperbindung (größere Schnittfläche) im Vergleich zu Kunstharzschnitten (86). Die Bedeutung einer kombinierten immunzytochemischen und ultrastrukturellen Darstellung hat in den letzten Jahren aufgrund korrelativer Techniken (s.u.) deutlich zugenommen. Collman et al. verbesserten Protokolle der Gefriersubstitution, wodurch eine exzellente Strukturhaltung von Gehirngewebe mit Möglichkeit von Immunmarkierungen erreicht wurde (7). Das Potential für Verbesserungen von Immunmarkierungen und Strukturhaltung auch von Nierengewebe kann daher als sehr hoch angesehen werden, wodurch in Zukunft auf Grundlage von optimierten Präparationsprotokollen vielversprechende Ansätze für korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie etabliert werden können.

4.1.3.1. Standardprotokolle und Variationen

Mit der Etablierung von Standardprotokollen zur Perfusionsfixierung von Nieren verfolgte ich mehrere Ziele. Eine gründliche morphologische Analyse des Nierengewebes auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene sollte eine detaillierte Charakterisierung von Protokoll 1 und Protokoll 2 ermöglichen. Hierdurch konnten die spezifischen Vor- und Nachteile beider Protokolle exakt beschrieben werden. Hierdurch konnte die Zonen- und Zell-spezifische Strukturhaltung dokumentiert werden, sodass für zukünftige Fragestellungen eine Orientierung an der hier beschriebenen, zu erwartenden Morphologie ermöglicht wird. Vergleichbare Methodensammlungen wurden bisher für Nierenfixierung mit einem Schwerpunkt auf rein morphologische Methoden (13, 15, 24-27, 38) sowie auch für andere Organe und Gewebe verfolgt (14, 22, 72, 87-91).

Standardprotokolle zeigten in meiner Arbeit jedoch auch Nachteile; speziell der sehr heterogene Aufbau der Niere mit zonen- und zellspezifischen Anforderungen an die Fixierung verhinderte die Etablierung eines „magischen Protokolls“, welches sämtliche Komponenten ideal erhält. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in früheren Arbeiten beschrieben, speziell für die Niere benötigt man genaue, zonenspezifische Anpassungen der Fixierlösung (15, 24, 26). Dennoch konnte ich durch eine Formaldehydfixierung mit einer mittleren Vehikelosmolarität (Protokoll 1 und 2) ein breites Areal von Nierenrinde bis zum äußeren Mark gut fixieren. Ultrastrukturell ermöglichte im TEM-Ansatz dieser Protokolle die reduzierte Osmierung eine verbesserte Abgrenzbarkeit subzellulärer Details. Die Vorteile dieser Osmierung wurden in früheren Arbeiten beschrieben. In meiner Arbeit zeigten sich jedoch auch Nachteile, wie eine deutliche Härtung des Gewebes. In der Folge musste das Anschneiden der Eponblöcke mit deutlich verringerter Schnittdicke erfolgen (0,5-1 µm anstatt 2-5 µm wie nach der Standardosmierung). Weiterhin zeigten sich nach reduzierter Osmierung ultrastrukturell im TEM häufiger Löcher und Risse im Gewebe, bevorzugt traten diese an stark osmierten Strukturen wie Membranorganellen und insbesondere Myelinscheiden in Gehirngewebe auf. Diese Artefakte wurden in früheren Arbeiten als Zeichen einer ungenügenden Gewebeentwässerung und

mangelhafter Kunstharzinfiltration beschrieben (92, 93). Durch Anpassung der Präparation, wie durch reduzierte Blockgröße und verlängerte Infiltrationszeiten, können diese Artefakte jedoch reduziert werden.

In meiner Arbeit war die Vehikelosmolarität der wichtigste Faktor für die Anpassung von Fixierlösungen. Die Art des verwendeten Puffers oder der Zusatz von Additiven wie HES hatte deutlich weniger Einfluss auf das morphologische Ergebnis. Diese Beobachtungen decken sich mit Beschreibungen in früheren Arbeiten (9, 15, 26); hier zeigten sich weiterhin wichtige Ansatzpunkte für die Verwendung von speziellen Puffern (z.B. Na-Kakodylatpuffer zur Vermeidung von *Embedding pepper* (94)) oder für den Zusatz von kolloidosmotisch aktiven Substanzen (z.B. für eine verbesserte Strukturhaltung des Interstitiums der Niere und des Pankreas (27)). Dennoch wurde auch in diesen Arbeiten die Vehikelosmolarität als der wichtigste Parameter beschrieben (15, 26).

Die Verwendung von HES-haltigen Fixierlösungen zeigte in meiner Arbeit unterschiedliche Auswirkungen. Während der Perfusion war aufgrund der hohen Viskosität der Fixierlösungen eine allgemein verminderte Flussrate im Vergleich zu HES-freien Fixierlösungen feststellbar. Mikroanatomisch zeigten sich hier vermehrt dilatierte Kapillarschlingen und Tubuli, Zellen hatten ultrastrukturell außerdem ein elektronendichteres Zytoplasma. Letzteres konnte durch eine reduzierte Osmierung zwar z.T. kompensiert werden, jedoch zeigte sich kein natürlich-turgeszenter Eindruck der Zellen und Tubuli. Protokoll 2 ermöglichte auch ohne Zusatz von HES eine qualitativ hochwertige Fixierung, bei nur geringgradig verminderter Reproduzierbarkeit. Es zeigte sich hier ein insgesamt turgeszenteres Zellbild im Vergleich zu Protokoll 1. HES wird üblicherweise als Bestandteil von Infusionslösungen zur Anpassung des kolloidosmotischen Drucks verwendet (33). Sie besteht aus Ketten von Stärkemolekülen, welche mit Hydroxyethylgruppen (Substitution) ergänzt werden (95). Kettenlänge (Angabe in kDa) und Substitutionsgrad (Hydroxyethylgruppen pro Glukosemolekül) wurden in den letzten Jahren seitens des Herstellers mehrfach verändert. Ein Grund hierfür ist das weiterhin unbekannte Ausmaß an Nebenwirkungen durch HES. Aufgrund der wechselnden Zusammensetzung und der komplexen Bauweise sowie Größe dieses Stoffs mit unbekanntem Verhalten bezüglich der Perfusionsfixierung und Gewebeverarbeitung (ggf. Abbau zu Monomeren mit veränderten osmotischen Eigenschaften) wurde mit Protokoll 2 ein alternatives Protokoll ohne Zusatz von HES eingeführt. Grund für die Wahl eines alternativen, HES-freien Protokolls waren weiterhin frühere Arbeiten, in denen schädliche Auswirkungen einer Infusion von diversen kolloidosmotisch aktiven Substanzen wie Saccharose, Dextran und Mannitol beschrieben wurden (38). Hier wurden diese Substanzen zwar *in vivo* per Infusion oder subkutan vor Durchführung der Perfusionsfixierung appliziert, jedoch zeigten sich hier Tubulusschäden, welche auch in anderen Arbeiten unter dem Begriff „osmotische Nephrose“ beschrieben wurden (96).

4.1.4. Rein morphologische Methoden

Für Perfusionsfixierungen mit Glutaraldehyd wurde ein zuverlässiges Standardprotokoll (Protokoll 3) zur hochauflösenden Elektronenmikroskopie etabliert, weiterhin ermöglichten Variationen eine selektiv verbesserte Fixierung ausgewählter Nierenzonen und Zellen. Eine Orientierung war aufgrund von vielfältigen Vorarbeiten auf dem Gebiet der hochauflösenden elektronenmikroskopischen Darstellung von Glutaraldehyd-fixiertem Nierengewebe möglich.

Glutaraldehyd-fixiertes Gewebe wurde in meiner Arbeit weiterhin als Vergleichsmaterial für Fixierungen mit Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen benötigt. Es bestand auch angesichts neuer Techniken wie der hochauflösenden Elektronentomographie vermehrt Nachfrage für zuverlässige rein morphologische Darstellungen. Die zonale Heterogenität der Strukturhaltung von Nierengewebe war nach Fixierung mit Glutaraldehyd-haltigen Fixierlösungen in meiner Arbeit allgemein weniger stark ausgeprägt als nach Fixierung mit Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen. Nach Glutaraldehyd-Fixierung zeigten jedoch bevorzugt proximale Tubuli eine Tendenz für Zytoplasmakondensationen mit besonders eingeschränkter Abgrenzbarkeit von Membranorganellen, dies war nach Standardosmierung deutlich stärker ausgeprägt als nach reduzierter Osmierung. In früheren Arbeiten war nach Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd-haltigen Fixierlösungen bei vergleichbarer Vehikelosmolarität die Abgrenzbarkeit von Membranorganellen in Tubulusepithelien auch nach Standardosmierung besser als in meiner Arbeit (15, 26). In diesen Arbeiten wurde jedoch häufig eine Glutaraldehyd-Konzentration von nur 1% verwendet, während ich mit 2% gearbeitet habe. Eine um 1% erhöhte Glutaraldehyd-Konzentration erhöht die rechnerische Gesamtosmolarität um 100 mOsmol, auf Grundlage der Maunsbach-Formel (17) erhöht sich hier die effektive Osmolarität jedoch nur um 30 mOsmol. Ursächlich für das in meiner Arbeit nach Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd-haltigen Fixierlösungen allgemein elektronendichtere Zytoplasma von kortikalen proximalen Tubuli ist daher vermutlich auch eine verstärkte Fixierung ihres Zytoplasmas. Dies würde die Abgrenzbarkeit subzellulärer Details einschränken (97). Ähnliche Beobachtungen habe ich im Rahmen meiner Arbeit nach Fixierung mit dem vollständigen Griffith-Gemisch (5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd) gemacht. Bei hier nur geringer Vehikelosmolarität (ca. 175 mOsmol) hat diese Fixierung zu einem unerwartet elektronendichten Zytoplasma von kortikalen Zellen geführt, dies lässt sich unter anderem mit einer verstärkten Fixierung erklären. Vergleichbare Beobachtungen wurden in früheren Arbeiten nach Gefrierimmobilisierung durch *High-pressure freezing* gemacht; eine nur geringgradige Extraktion von Zytoplasma, wie sie im Rahmen der Entwässerung durch Gefriersubstitution allgemein typisch ist, wurde hier als Grund für eine reduzierte Abgrenzbarkeit von Membranorganellen beschrieben (97). In meiner Arbeit stieg durch die sehr hohe Konzentration von Formaldehyd und Glutaraldehyd jedoch auch die effektive Osmolarität an. Während beim halbierten und vollständigen Griffith-Gemisch die Vehikelosmolarität nur bei ca. 175 mOsmol liegt, beträgt die effektive Osmolarität nach

Berechnung mit der Maunsbach-Formel beim halben Griffith-Gemisch 351 mOsmol und beim vollen Griffith-Gemisch 455 mOsmol.

4.1.3.1. Standardprotokolle und Variationen für rein morphologische Methoden

Die Verwendung von HES stellte in meiner Arbeit bei Protokoll 3, vergleichbar mit Protokoll 1, ebenfalls einen Unsicherheitsfaktor dar. Als Variation von Protokoll 3 wurden daher ebenfalls Fixierungen ohne Zusatz von kolloidosmotischen Stoffen durchgeführt. Eine geringe Vehikelosmolarität von 150 mOsmol (P3 V4 in Tabelle 1) resultierte in einem hohen kortikalen Zellvolumen, mit der Folge eines turgeszenten Erscheinungsbildes. Eine hohe Vehikelosmolarität von 332 mOsmol (P3 V3 in Tabelle 1) resultierte in einem geringen kortikalen Zellvolumen und verbesserte selektiv die Fixierung von tiefer gelegenen Nierenzonen wie dem Innenstreifen und dem inneren Mark. Meine Ergebnisse von Variationen der Vehikelosmolarität bei Glutaraldehyd-Fixierung entsprechen damit weitestgehend den Ergebnissen früherer Arbeiten (15, 26). In einer Arbeit von Maunsbach zeigten sich nach Perfusionsfixierung mit einer Vehikelosmolarität von 181 mOsmol (stark hypoton) stark geschwollene proximale Tubuli mit geplatzten Zellen und sehr elektronenlichem Zytoplasma (15). Eine Vehikelosmolarität von 235 mOsmol (leicht hypoton) ermöglichte eine optimale Fixierung von proximalen Tubuli mit glatten Lumina und intakten Zellen bei elektronenlichem Zytoplasma und guter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details. Eine leicht hypertone Vehikelosmolarität von 298 mOsmol führte in proximalen Tubuli zu erweiterten Extrazellularräumen. Eine stark hypertone Vehikelosmolarität von 532 mOsmol führte zu stark erweiterten Extrazellularräumen, ausgedünnten Zelleibern und einem sehr elektronendichten Zytoplasma mit stark eingeschränkter Abgrenzbarkeit von subzellulären Details.

4.2. Morphologische Beurteilung nach chemischer Fixierung und Gefriermethoden

Zu Beginn meiner Arbeit bestand die Vermutung, dass aufgrund der Vielzahl an Arbeitsschritten für die Perfusionsfixierung und nachfolgende Präparationen das finale morphologische Erscheinungsbild der Niere nicht exakt und zuverlässig beherrscht werden kann. Trotz diverser Unterschiede zwischen den Versuchstieren (z.B. Alter, Gewicht, Geschlecht, Art) und Parametern der Perfusionsfixierung (z.B. individueller Ablauf, exakte Größe und Position des Aortenkatheters) konnten die drei vorgestellten Standardprotokolle jedoch zuverlässig reproduziert werden.

4.2.1. Das Äquivalentbild

Die morphologischen Unterschiede von Podozyten und Tubulusepithelien nach Fixierung mit Lösungen unterschiedlicher Vehikelosmolarität demonstrieren den starken Einfluss der Fixierung auf die mikroanatomische sowie ultrastrukturelle Morphologie. Ein verbesserter Membrankontrast durch reduzierte Osmierung verdeutlicht weiterhin auch den Einfluss der nachfolgenden Präparation auf das finale morphologische Erscheinungsbild. Vergleichbare Abhängigkeiten

zwischen Präparation und Morphologie wurden bereits in frühen Zeiten der Histologie ausführlich diskutiert. Nissl prägte dabei den Begriff „Äquivalentbild“ (98). Ein mikroskopisches Präparat sei als Maßstab der lebendigen Zelle zu betrachten, welches aufgrund reproduzierbarer Präparationsschritte als gleichwertig, äquivalent, mit dieser anzusehen sei.

4.2.2. Gefriermethoden

Während chemische Fixierungen starke Veränderungen im Gewebe oder an Zellen verursachen, bieten Gefriermethoden Ansätze, eine lebensnahe Morphologie „einzufrieren“ und in der Folge licht- und elektronenmikroskopisch darzustellen (99, 100). Hierdurch können zwar verbessert Informationen über eine lebensnahe Ultrastruktur erhalten werden, jedoch sind diese Ansätze häufig durch eingeschränkte Reproduzierbarkeit oder neue Artefakte limitiert (99-101).

Gefrierschnitte, Einbettung in hydrophiles Kunstharz und Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu ermöglichten in meiner Arbeit als Gefriermethoden Ansätze für eine verbesserte lebensnahe Strukturhaltung. Allgemein können durch Gefriersubstitution (Entwässerung bei tiefen Temperaturen für z.B. Einbettung in hydrophiles Kunstharz) Artefakte, welche beim Entwässerungsvorgang bei Raumtemperatur entstehen, reduziert werden (102). Weiterhin können Antigene in hydrierter Umgebung erhalten werden, wodurch sie ihre natürliche Konformation behalten und allgemein sensitivere Immunmarkierungen ermöglichen. Ohne spezielle Vorbehandlung der Proben, wie Infiltration mit Gefrierschutzstoffen, bilden sich bei diesen Techniken jedoch Eiskristalle, die angrenzende Gewebeareale verdrängen und dadurch die Gewebestruktur zerstören (100).

4.2.2.1. Strukturhaltung durch Gefriermethoden

Für Kryo-Ultramikrotomie nach Tokuyasu wurde in meiner Arbeit Gewebe nach vorangegangener Fixierung in 2,3 M Saccharoselösung als Gefrierschutz infiltriert (103). Generell werden penetrierende (z.B. Glycerin und Ethylenglykol) und nicht-penetrierende Gefrierschutzstoffe (z.B. HES und Dextran) unterschieden (104); penetrierende Gefrierschutzstoffe haben dabei besonders aufgrund von osmotischen Wirkungen ein größeres Schadenspotential. Ultradünnschnitte nach Tokuyasu haben verschiedene Vorteile; Immunmarkierungen können aufgrund der natürlicheren Konformation der Antigene mit sensitiverer Reaktion durchgeführt werden. Weiterhin ist die Oberfläche der Gefrierschnitte deutlich größer im Vergleich zu Kunstharzschnitten, wodurch mehr Antikörper binden können (103). In meiner Arbeit stellten sich Membranen mittels dieser Technik aufgrund der fehlenden Osmierung allgemein als elektronenlichte Strukturen dar, welche sich in stark schwankender Qualität vom elektronendichten Hintergrund abgrenzen ließen. Vermutlich war dies auch eine Folge von Schwankungen der Schnittdicke sowie der Dicke der Methylzellulose-Schicht. Ein Ansatz für einen verbesserten Membrankontrast durch Osmierung von Ultradünnschnitten wurde

beschrieben (105, 106); hierdurch wurde eine hohe Sensitivität der Immunmarkierung mit einem guten Membrankontrast verbunden. Die Umsetzung dieser Technik ermöglichte in meiner Arbeit einen verbesserten Membrankontrast, bei jedoch reduzierter Qualität der Immunmarkierung. Der Einsatz der Tokuyasu-Technik war allgemein durch eine sehr zeitaufwändige Schnittpräparation limitiert. Die Verwendung von hydrophilem Kunstharz (*LR-White*) ermöglichte eine Schnittpräparation mit vergleichbarem Zeitaufwand wie Epon. Das Gewebe wurde hierfür nach Infiltration mit 0,8 M Saccharoselösung als Gefrierschutz auf -80°C abgekühlt. Das hydrophile Kunstharz ermöglicht einen Restwasser-Anteil im Gewebe, wodurch Antigene in einem naturnahen Zustand erhalten werden konnten (107). Weiterhin reagiert das hydrophile Kunstharz im Gegensatz zum Epon nicht mit den biologischen Komponenten des Gewebes, sodass die Antigene nicht maskiert werden (108). Es zeigten sich in meiner Arbeit deutliche Limitationen hinsichtlich der Qualität der Strukturhaltung bei Verwendung von *LR-White*; im Vergleich zur sehr hochwertigen Strukturhaltung bei konventioneller Einbettung in Epon war diese generell unbefriedigend. Ähnliche Erfahrungen wurden in früheren Arbeiten beschrieben (7, 107). Durch Anpassung von Fixierungsprotokollen sowie der Gefriersubstitution konnte z.B. durch Collman et al. (7) eine deutlich verbesserte Strukturhaltung mit dem hydrophilen Kunstharz *Lowicryl* erreicht werden, bei sehr sensitiv erhaltener Antigenität. Eine vergleichbare Anpassung von Protokollen zur Gefriersubstitution und Einbettung in hydrophiles Kunstharz könnte auch die Qualität von Nierengewebe deutlich verbessern. Auf Grundlage der früheren Arbeiten ergeben sich hierfür zwei konkrete Ansatzpunkte. Der Gefriersubstitution-Lösung können diverse fixierende Additive wie Uranylacetat zugesetzt werden, welche im Gegensatz zu Osmiumtetroxid die Antigenität nicht reduzieren, mit dem Ergebnis einer verbesserten Strukturhaltung. Weiterhin empfiehlt sich eine Polymerisation des hydrophilen Kunstharzes bei tiefen Temperaturen, wodurch subzelluläre Details mit geringeren Strukturschäden die Infiltration und Polymerisation überstehen können.

Goldstandard zur lebensnahen Strukturhaltung ist das Einfrieren ohne vorhergehende chemische Fixierung; hier werden verschiedene Methoden unter dem Begriff *Ultrarapid freezing* zusammengefasst (99, 100). Die Abkühlung verläuft bei diesen Techniken so schnell, dass die Wassermoleküle vor der Formierung zu sichtbaren Eiskristallen einfrieren (*Plunge freezing*, *Slam freezing*, *Jet freezing*), beim *High-pressure freezing* wird zusätzlich mit hohem Druck gearbeitet. Das Ergebnis dieses Prozesses ist amorphes (vitrifiziertes) Eis. Das bei diesem Vorgang entstehende Eis wirkt auf tiefere Schichten jedoch isolierend, wodurch Gewebe nur bis in eine Tiefe von ca. 200 µm vitrifiziert werden kann (99, 100). Gegen den Gebrauch des Hochdruckgefrierens sprachen in meiner Arbeit vor allem die zu erwartenden mechanischen und ischämischen Schäden des Nierengewebes vor dem Zeitpunkt des Einfrierens, wie sie besonders bei Exzision und Zuschnitt von Nierengewebe induziert werden (9, 101, 109). Weiterhin wäre das Probenvolumen und damit die räumliche Reproduzierbarkeit bei Verwendung von

Mikrobiopsiesystemen deutlich eingeschränkt (ca. 200 µm im Durchmesser), wodurch sich Limitationen der internen Reproduzierbarkeit (s.u.) bei Nierenfixierungen ergeben hätten (90).

In meiner Arbeit hätte die Anwendung einer anderen Gefriermethode diverse Vorteile für eine lebensnahe Strukturdarstellung erbringen können; die *Cryo in vivo* Fixierung. Hiermit kann Gewebe mit flüssigem Stickstoff im Situs des lebendigen Tieres eingefroren werden (78), was Artefakte durch die Entnahme vermeiden würde. Für diverse Organe wurde nach *Cryo in vivo* Fixierung mit nachfolgender Gefriersubstitution eine glattere Membranstruktur im Vergleich zu konventionellen Präparationen festgestellt (79, 110, 111). Neben primär morphologischen Vorteilen wurde für diese Methode auch eine Immobilisierung von Antigenen in ihrer natürlichen Lokalisation beschrieben (110, 111). Durch diese Präparation könnten daher verbesserte Lokalisationsstudien an renalen Tubulusepithelien durchgeführt werden, da bei einer chemischen Fixierung bis zu mehrere Minuten vergehen können bis sichtbare Bewegungen – damit auch Antigene und subzelluläre Kompartimente – innerhalb von Zellen zum Erliegen kommen (100). In meiner Arbeit entschied ich mich gegen die *Cryo in vivo* Fixierung, weil ultrastrukturell erkennbare Gewebeschäden aufgrund von Eiskristallbildung hier allgemein ab einer Gewebetiefe von nur 5 µm (78, 79) entstehen. Ähnliche Limitationen wurden bei einer vergleichbaren Gefrierfixierung von Lungengewebe 1982 durch Weibel et al. beschrieben (90). Hierbei wurde durch flüssigen Stickstoff Lungengewebe von lebendigen Versuchstieren eingefroren und im Rahmen einer Gefriersubstitution in Epon eingebettet. Zur Bewertung der Methoden wurden durch Weibel et al. externe Qualitätsstandards (z.B. Vereinbarkeit mit bekannter Struktur von Zellen und Geweben) und interne Qualitätsstandards (Reproduzierbarkeit, Homogenität, vergleichbare Ergebnisse bei verschiedenen Methoden) unterschieden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Gefrierfixierung ermöglichte stellenweise zwar eine Strukturhaltung, die vergleichbar mit dem etablierten Äquivalentbild war, jedoch nur mit eingeschränkter Reproduzierbarkeit; dies wurde speziell für morphometrische Studien als unpassend beschrieben, sodass die Gefrierfixierung für Lungengewebe nicht empfohlen wurde.

Eine optimierte Nierenfixierung, wie sie mit den drei vorgestellten Standardprotokollen in meiner Arbeit erreicht werden konnte, zeichnete sich ebenfalls durch ihre gute Reproduzierbarkeit aus. Eine gute Strukturhaltung von Nierengewebe über ein größtmögliches Volumen erlaubte hier auch eine gute Auswertung seiner strukturellen Heterogenität mit einer Vielzahl an Zelltypen und Tubulusdifferenzierungen. Eine selektiv optimierte Strukturhaltung von Podozyten sowie S1- und S2-Segmenten des proximalen Tubulus zur hochauflösenden Darstellung mit dem TEM, wie es durch Variationen von Protokoll 2 mit einer Vehikelosmolarität von 200 mOsmol möglich war, musste daher gegen eine hier eingeschränkte Reproduzierbarkeit abgewogen werden.

4.2.3. Zusammenfassung bezüglich lebensnaher Strukturierung

Neben direkten Beobachtungen von Nierengewebe *in vivo* oder an vitrifiziertem Material können auch durch Vergleiche von verschiedenen Fixiertechniken wie Immersionsfixierung, *Dripping in vivo*, Gefriertechniken oder Perfusionsfixierung Qualitätskriterien einer lebensnahen Struktur definiert werden (9). Strukturen, die nach einer Fixierung unter schlechten Bedingungen sichtbar sind (z.B. lange Ischämiezeit), nicht aber nach einer Fixierung unter guten Bedingungen, können mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als artifiziell beschrieben werden (15, 24).

Aufgrund einer fehlenden idealen Fixierung sind Aussagen über lebensnahe bzw. gute oder schlechte Ultrastruktur daher ein Ergebnis von Konsens und dem Vergleich verschiedener Methoden. So schrieb Gilkey 1986 in dem Artikel "Advances in Ultrarapid Freezing for the Preservation of Cellular Ultrastructure" (100): "We believe that, on the basis of intuition, common sense, and the cumulative experience of 40 years of progress in ultrastructural studies, it is possible to define a few reasonable conditions that must be met by a fixation technique if it is to yield a good approximation of the "true nature" of the living state." Für eine morphologische Untersuchung von Nierengewebe muss jedoch ebenso die von Weibel et al. für Lungenfixierungen beschriebene Reproduzierbarkeit und Homogenität einer Fixierung beachtet werden (90). Durch eine chemische Perfusionsfixierung war dies für Nierengewebe am besten umsetzbar.

4.3. Optimierte Strukturierung von anderen Organen und Geweben

Standardprotokolle ermöglichten in meiner Arbeit eine gute Strukturierung von Nierengewebe. Weiterhin war durch sie auch eine gute Fixierung von Gehirngewebe und Lebergewebe möglich, Organ-typische Fixieranforderungen für beste Strukturierung konnten hierbei jedoch nur eingeschränkt berücksichtigt werden.

4.3.1. Optimierte Strukturierung von Gehirngewebe

Für eine optimale ultrastrukturelle Qualität benötigte Gehirngewebe in meiner Arbeit eine besonders starke Fixierung mit einer hohen Konzentration von Glutaraldehyd, welche ich mit Formaldehyd kombinierte (Griffith-Gemisch (72)). Hierdurch war, im Vergleich zu Protokoll 3 mit 2% Glutaraldehyd, eine verbesserte Strukturierung mit reduzierter Zahl von geschwollenen Mitochondrien möglich. Der Nutzen einer selektiv verbesserten Fixierung von Gehirngewebe muss jedoch mit den Nachteilen abgewogen werden; in meiner Arbeit zeigten kortikales Nierengewebe sowie Lebergewebe nach Fixierung mit dem vollständigen sowie dem halbierten Griffith-Gemisch eine schlechte Abgrenzbarkeit von subzellulären Details aufgrund von elektronendichtem Zytoplasma. Diese Spezialprotokolle für eine optimierte rein morphologische Gehirnfixierung sind daher nicht vergleichbar gut für Auswertungsansätze an mehreren Organsystemen verwendbar wie die vorgestellten Standardprotokolle. Grund für das

elektronendichte Zytoplasma und weitere allgemeine Schrumpfungszeichen sind vermutlich eine hohe effektive Osmolarität der Fixierlösung sowie eine starke Fixierung des Zytoplasmas durch die Griffith-Gemische.

In einer früheren Arbeit wurde für eine Immersionsfixierung von Gehirngewebe ebenfalls eine verbesserte Fixierung durch Verwendung einer hohen Konzentration (4% und 6%) im Vergleich zu einer normalen Konzentration (2%) von Glutaraldehyd beschrieben (112). Die verbesserte Ultrastruktur wurde jedoch auf die hierdurch erhöhte Osmolarität zurückgeführt.

In einer anderen Arbeit wurden verschiedene Vehikelosmolaritäten und Konzentrationen von Glutaraldehyd im Rahmen von Perfusionsfixierungen getestet (113). Hier zeigten hypertone Fixierlösungen (als Ergebnis einer hohen Vehikelosmolarität sowie durch hohe Glutaraldehydkonzentrationen) allgemein einen besseren Perfusionsfluss als hypotone Fixierlösungen. Als Ursache für den schlechteren Perfusionsfluss wurde eine bereits makroskopisch sichtbare Ödembildung vermutet, wodurch die Gefäße komprimiert würden. Eine hohe rechnerische Osmolarität als Folge einer hohen Konzentration von Glutaraldehyd führte in dieser Arbeit zu keinen ultrastrukturellen Schrumpfungszeichen, während eine hohe rechnerische Osmolarität als Folge einer hohen Vehikelosmolarität zu deutlichen Schrumpfungen mit erweiterten Extrazellularräumen und elektronendichten sowie ausgedünnten Zellfortsätzen führte. Für eine gute Gehirnfixierung wurde in dieser Arbeit eine leicht hypertone Fixierlösung zwischen 400-600 mOsmol empfohlen.

In einer Arbeit von Palay et al. wurde eine spezielle Perfusionsfixierung (mit Lösungen von Osmiumtetroxid) inklusive artifizieller Respiration beschrieben, mit welcher das Ischämieempfindliche Gehirngewebe verbessert erhalten werden konnte (14). In meiner Arbeit wurde eine vergleichbar aufwändige Perfusionsfixierung nicht durchgeführt, dennoch konnte eine sehr gute Strukturhaltung erreicht werden. Limitationen zeigten sich in meiner Arbeit besonders bei der Perfusionsfixierung von Gehirngewebe mit Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen wie Protokoll 1. Ultrastrukturell zeigte Gehirngewebe hier, nachfixiert mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid im Rahmen der Kunstharzpräparation, häufig eine stark ausgewaschene Ultrastruktur. Eine verbesserte Strukturhaltung mit Protokoll 1 wurde durch eine verkürzte Perfusionsfixierung erreicht, hier sollte eine frühere Nachfixierung mit Glutaraldehyd erreicht werden. Meine Annahme war hier eine während der Perfusionsfixierung eingeschränkte Diffusion von Formaldehyd über die Blut-Hirn-Schranke. In einer früheren Arbeit wurde die Abhängigkeit der Strukturhaltung von der beobachteten Hirnzone beschrieben; endokrin aktive Areale mit gut durchgängiger Blut-Hirn-Schranke, wie die Eminentia mediana, zeigten eine gute Strukturhaltung bei Verwendung von Fixierlösung mit einer isotonen Vehikelosmolarität. Hirnzonen mit dichter Blut-Hirn-Schranke hingegen zeigten hier deutliche Schwellungen mit erweiterten Extrazellularräumen (114).

4.3.2. Optimierte Strukturhaltung von Dünndarm

Dünndarm konnte in meiner Arbeit nach Perfusionsfixierung mit einer hohen Konzentration von HES (P1 V12 in Tabelle 1; enthält 7,2% HES) gut erhalten werden, ein vergleichbar gutes Ergebnis gelang ebenfalls durch Immersionsfixierung. In beiden Fällen zeigte sich als Zeichen einer guten Fixierung eine intakte Epithelschicht der Lamina epithelialis mucosae. Die Fixierqualität der Immersionsfixierung war jedoch sehr heterogen; in Richtung des Darmlumens zeigten die Dünndarmzotten eine artifizielle Abhebung der Lamina epithelialis mucosae, während periphere Zottenanteile besser fixiert waren. Die Perfusionsfixierung mit der hohen HES-Konzentration wirkte sich jedoch negativ auf die Nierenfixierung aus, ursächlich hierfür war vermutlich die sehr hohe Viskosität der Fixierlösung. Dies zeigte sich als reduzierter Durchfluss während der Perfusion sowie durch das Vorkommen von dilatierten Kapillarschlingen und Tubuli im Semidünnschnitt. Daher ist dieses Spezialprotokoll mit stark erhöhter HES-Konzentration nicht geeignet für Auswertungsansätzen an anderen Organsystemen. In einer Arbeit von Shimo et al. wurden verschiedene Fixiertechniken für eine optimierte Strukturhaltung von Dünndarm der Maus verglichen (111). Hier zeigte sich nach Perfusionsfixierung mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer ebenfalls eine starke basolaterale Spaltbildung, die nach Immersionsfixierung nicht beobachtet wurde. Weiterhin wurde hier Gewebe nach Exzision sowie *in vivo* mit flüssigem Stickstoff eingefroren und für Schnittpräparationen verarbeitet. Auch hier konnte keine vergleichbare basolaterale Spaltbildung beobachtet werden. Die basolaterale Spaltbildung wurde von Shimo et al. auf einen erhöhten interstitiellen Druck während der Perfusionsfixierung mit artifiziell hohem Perfusionsdruck zurückgeführt. Möglicherweise liegt dieser Anfälligkeit des Dünndarms gegenüber Veränderungen des Perfusionsdrucks auch das relativ durchlässige fenestrierte Kapillarendothel zugrunde.

4.3.3. Optimierte Strukturhaltung von Lebergewebe

Lebergewebe zeigte in meiner Arbeit nach Fixierung mit verschiedenen Fixierlösungen eine gute Strukturhaltung und war daher weniger aufwändig in hoher Qualität zu fixieren als Nierengewebe und Hirngewebe. Bei Verwendung einer Fixierlösung mit sehr geringer Vehikelosmolarität (P3 V4 in Tabelle 1; 150 mOsmol) war eine qualitativ hochwertige Fixierung auf mikroanatomischer und ultrastruktureller Ebene möglich; subzelluläre Details konnten gut vom elektronenlichten Zytoplasma abgegrenzt werden. Mikroanatomisch zeigte das Lebergewebe keine geplatzten Zellen, jedoch machte es einen insgesamt turgeszenten Eindruck in Form von voluminösen Zellen, welche bereits auf mikroanatomischer Ebene im Semidünnschnitt eine Abgrenzung von subzellulären Details wie Mitochondrien ermöglichten. Auch eine Fixierung bei mittlerer Vehikelosmolarität (Protokoll 3; 231 mOsmol) und hoher Vehikelosmolarität (P3 V1 in Tabelle 1; 323 mOsmol) zeigte mikroanatomisch eine gute Strukturhaltung mit Abgrenzbarkeit von subzellulären Strukturen; weiterhin zeigten Zellkerne in

beiden Fällen glatte Konturen und einen großen Anteil von Euchromatin. Auch nach Perfusionsfixierung mit Formaldehyd-haltigen Fixierlösungen konnte eine gute Strukturhaltung von Lebergewebe erreicht werden. Fixierungen mit geringer Vehikelosmolarität (P2 V1 in Tabelle 1; 200 mOsmol) bzw. mit mittlerer Vehikelosmolarität (Protokoll 2; ca. 270 mOsmol) zeigten mikroanatomisch runde Zellkerne mit einem großen Anteil von Euchromatin und eine gute Abgrenzbarkeit von subzellulären Strukturen. Ursächlich für diese Vielfalt an Fixierlösungen, die sich für eine gute Strukturhaltung von Lebergewebe eignen, könnte eine im Vergleich zu Nierengewebe geringere zelluläre und osmolare Heterogenität sowie eine weniger sensible Blutdruckregulation sein (89). Somit ist die Qualität der Leberfixierung primär von der Zusammensetzung der Fixierlösung abhängig, wodurch die Leber allgemein eine deutlich größere Robustheit als die Niere zeigt. Immersionsfixierungen, wie sie im Rahmen meiner Arbeit auch durchgeführt wurden, konnten Lebergewebe ultrastrukturell ebenfalls gut erhalten. Hier zeigte sich jedoch eine Schichtung mit Arealen unterschiedlicher Gewebequalität; äußere Bereiche und das Zentrum von immersionsfixiertem Lebergewebe waren schlecht fixiert, dazwischenliegende Zonen waren deutlich besser erhalten. Durch eine langsame Diffusion von Glutaraldehyd werden oberflächliche Gewebeschichten bei Immersionsfixierungen allgemein früher fixiert, während zentrale Schichten durch die späte Fixierung bereits autolytische Schäden zeigen. In einer Arbeit von Petersen wurde anhand von menschlichen Leberbiopsien eine vergleichbare Schichtung der Fixierqualität beschrieben (12). Die äußere (erste) Schicht des Biopsiezylinders war durch mechanische Schäden im Rahmen der Entnahme zerstört, ultrastrukturell zeigten die Zellen hier Schwellungen und geplatze Zelleiber. Die darunterliegende zweite Schicht zeigte die beste Fixierqualität, Zellorganellen waren gleichförmig fixiert. In der dritten Schicht waren vermehrt geschwollene Mitochondrien sichtbar, in der vierten Schicht (Zentrum des Biopsiezylinders) zeigten sich deutlich geschwollene Mitochondrien mit ausgewaschener Matrix und fragmentiertes endoplasmatisches Retikulum.

Maunsbach zeigte in einer Arbeit, dass Lebergewebe durch Immersionsfixierung sogar nach einem Zeitintervall von 6 Stunden sehr gut fixiert werden kann (16). Nach Exzision von Lebergewebe wurde dieses bei 4°C gelagert und anschließend mit 2% Osmiumtetroxid in Phosphatpuffer durch Immersion fixiert. Erst nach 24 Stunden bei 4°C bzw. nach 6 und 24 Stunden bei 22°C Lagerung zeigten sich deutliche postmortale ultrastrukturelle Veränderungen wie geschwollene Mitochondrien und ein fragmentiertes endoplasmatisches Retikulum. Diese Experimente zeigen, dass Organe sehr unterschiedliche Ansprüche an optimale Fixierbedingungen haben und postmortale Veränderungen in der Leber erst relativ spät entstehen. Weiterhin zeigen diese Experimente, dass das Zeitintervall zwischen Exzision und Fixierung, zumindest bei Lebergewebe, nicht alleine entscheidend für die Fixierqualität ist. In einer anderen Arbeit von Maunsbach zur Fixierung von Nierengewebe wurde ein möglicher Grund für die häufig schlechte Ultrastruktur von immersionsfixiertem Gewebe diskutiert (15, 24).

Zellen in tiefen Gewebeschichten würden vor dem Zeitpunkt einer ausreichenden Stabilisierung durch ein Fixans durch eine geringe Konzentration des Fixans strukturell geschädigt werden. Durch verschiedene Techniken können Limitationen der Immersionsfixierung z.T. aufgehoben werden. Wisse et al. beschrieben eine verbesserte Ultrastruktur von Lebergewebe durch Injektion von Fixierlösung in das Gewebe (89). Weiterhin erlaubt eine Behandlung mit Mikrowellenstrahlung eine nicht-thermische Beschleunigung der Fixierung. Dieser Ansatz kann deutlich verbesserte Fixierungen in Sonderfällen ermöglichen, die keine konventionelle Perfusionsfixierung erlauben (z.B. in der pathologischen Diagnostik und bei sehr kleinen Organismen wie Embryonen, Zebrafischen oder *Caenorhabditis elegans*) (115, 116).

4.4. Optimierte Gewebe- und Schnittpräparation

Allgemein können nicht alle Gewebekomponenten nach Fixierung mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd stabilisiert werden (18, 20). Der Zustand nach initialer Fixierung mit Formaldehyd sollte daher als ein Rohzustand angesehen werden, der durch anschließende Nachfixierung mit Glutaraldehyd und weitere Behandlung mit Additiven oder Osmierung stark beeinflusst werden kann. Bei der nachfolgenden Entwässerung werden Stoffe, welche nicht durch Fixierungen stabilisiert wurden, ausgewaschen. In meiner Arbeit konnte eine optimierte Strukturhaltung durch reduzierte Osmierung durchgeführt werden; hierdurch ließen sich Membranen verdeutlicht darstellen. Weiterhin konnten durch eine verbesserte Schnittpräparation Schnittartefakte deutlich reduziert und damit die Auswertung der Präparate am TEM optimiert werden.

4.4.1. Osmierung

In meiner Arbeit war eine deutlich verbesserte Darstellung von Membranen durch Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat zum Osmiumtetroxid möglich. Auf Grundlage einer früheren Arbeit (59) wurde hier zusätzlich eine Pufferung durch Na-Kakodylatpuffer durchgeführt, während im Rahmen der Standardosmierung nur Aqua dest. verwendet wurde. In meiner Arbeit konnte durch die reduzierte Osmierung eine herausragende Verbesserung des Membrankontrasts aller untersuchten Zelltypen im Vergleich zur Standardosmierung erreicht werden. Die Verwendung der reduzierten Osmierung machte in meiner Arbeit jedoch auch eine Anpassung weiterer Präparationsschritte notwendig; Eponblöcke zeigten eine erhöhte Brüchigkeit während des Anschneidens, weiterhin erschien das Kunstharz gehäuft ungenügend polymerisiert. Die reduzierte Osmierung wurde bereits für verschiedene Zell- und Gewebetypen beschrieben (70, 71, 117); eine selektive Kontrastierung von Membrankompartimenten für Ultradünnschnittmaterial sowie eine allgemein verbesserte Membranstruktur wurde hierdurch erreicht. Weiterhin wurde eine sehr gute Membranerhaltung proximaler Tubulusepithelien durch reduzierte Osmierung beschrieben (16). Die herausragende Qualitätsverbesserung verschiedener Zelltypen der Niere, wie sie im Rahmen meiner Arbeit im direkten Vergleich mit

der Standardosmierung präsentiert wurde, wurde bisher jedoch nicht gezeigt. Als Konsequenz empfiehlt sich daher generell die Evaluation einer Anwendung der reduzierten Osmierung für perfusionsfixiertes Nierengewebe. Die nachteiligen Auswirkungen einer reduzierten Osmierung auf die Gewebepreparation, wie eine erhöhte Gewebehärte mit eingeschränkter Diffusion von Einbettungslösungen, wurden auch in früheren Arbeiten beschrieben (92); Präparationsartefakte wurden hier durch Mikrowellensysteme und durch Verwendung von nur 100-200 µm dünnen Vibratomschnitten reduziert. Durch Verringerung der Blockgröße auf ca. 1x1x0,5 mm konnte ich in meiner Arbeit jedoch auch ohne Mikrowelleneinbettung eine verbesserte Diffusion der Einbettungslösungen erreichen.

4.4.2. Schnittpräparation

Die Verwendung von hexagonalen 300 *Mesh grids* als Trägermaterial für Ultradünnschnitte ermöglichte in meiner Arbeit eine qualitativ hochwertige Fotodokumentation am TEM. Voraussetzungen hierfür waren ein hochwertiges Diamantmesser, faltenfrei aufgezoogene Ultradünnschnitte und eine saubere Kontrastierung. Der letzte Punkt war dabei am schwersten zu realisieren. Nach dem Kontrastiervorgang konnten im TEM Präzipitate und weitere Verunreinigungen in unterschiedlichem Ausmaß und ohne vorhergehende offensichtliche Fehler während des Kontrastierens beobachtet werden. Durch Modifikation des Kontrastiervorgangs konnte jedoch äußerst zuverlässig das Ausmaß an Verunreinigungen reduziert werden. Hierfür inkubierte ich die Präparate auf Grundlage einer früheren Arbeit vor der Kontrastierung in 1% wässriger EDTA-Lösung (53). In dieser Arbeit wurde eine mögliche Blockade von Bindungen im Ultradünnschnitt durch EDTA sowie HCL vermutet, welche als eine Art Kristallisationskern während des Kontrastiervorgangs eine Präzipitatbildung induzieren können. Weil hier weiterhin ein Ausbleichen der Ultradünnschnitte als Folge der Inkubation in HCL beschrieben wurde, verwendete ich in meiner Arbeit EDTA. Ich nutzte weiterhin NaOH-Plätzchen zur Reduktion des CO₂-Gehalts innerhalb der geschlossenen Petrischale mit Bleizitrat, um eine Reaktion beider Stoffe zu unlöslichem Bleikarbonat zu vermeiden. Dieser Ansatz wurde in früheren Arbeiten empfohlen (118, 119). Die Umsetzung dieser beiden Modifikationen des Kontrastiervorgangs ermöglichte in meiner Arbeit die Herstellung nahezu Falten- und Präzipitat-freier Ultradünnschnittpräparate bei Verwendung von 300 *Mesh grids*. Publierte Empfehlungen bezüglich der Blockgeometrie und der Umgebungsbedingungen während der Ultramikrotomie wurden im Rahmen meiner Arbeit recherchiert und erfolgreich umgesetzt (51). Aufgrund der nur ca. 40 µm großen Maschen der hexagonalen 300 *Mesh grids* war die auswertbare Fläche der Ultradünnschnittpräparate jedoch deutlich eingeschränkt. *Mesh grids* mit größeren Maschen führten aber zu verstärkter Faltenbildung der aufgezoogenen Ultradünnschnitte, wodurch bei der Kontrastierung vermehrt Präzipitate entstanden. Die Verwendung von befilmten Schlitz-*Grids* führte zu Beginn meiner Arbeit zu starker, unkontrollierbarer Faltenbildung während der

Schnittaufnahme und der Kontrastierung. Weiterhin war die allgemeine Qualität der Präparate hier aufgrund von Film-Artefakten reduziert. Während meiner Etablierungsarbeiten zur verbesserten Ultradünnschnittpräparation für TEM-Nanotomie konnte ich einige entscheidende Quellen von Artefakten identifizieren und hierdurch die Qualität der Präparate deutlich verbessern. Ich entschied mich für Pioloform, weil dieses im „Wormatlas“ als stabiler gegenüber Formvar empfohlen wurde und keine nachträgliche Kohlenstoffbedampfung als Stabilisierung benötigt (<http://www.wormatlas.org/EMmethods/Gridmaking.htm>).

Durch Vermeidung von Wasserkontaminationen der Befilmungslösung war eine deutliche Reduktion von weißen Punkten und Filmlöchern möglich. Hierfür wurde die im Kühlschrank gelagerte Lösung erst nach Erwärmen auf Raumtemperatur geöffnet. Weiterhin wurden in späteren Schritten nur vollständig getrocknete Objektträger in die Befilmungslösung getaucht. In einer früheren Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Wasserkontamination und Artefaktbildung bereits beschrieben (120). Die Beschichtung der verwendeten Objektträger mit Kernseife war eine weitere Quelle häufiger Artefakte; das gründliche und gleichmäßige Verreiben der Kernseife reduzierte drastisch Schlierenartefakte, wie sie vermutlich aufgrund einer unebenen Oberfläche entstehen. Neben den Schlierenartefakten konnten weiterhin helle Abdrücke von massiven „Krümeln“ gefunden werden, was ebenfalls als Ursache ein ungenügendes Verreiben der Kernseife vermuten lässt. In früheren Arbeiten wurden verschiedene Techniken zur Befilmung beschrieben. Hier wurde z.B. Kernseife nass verarbeitet (121) oder keine vergleichbare Beschichtung verwendet (122).

In meiner Arbeit konnte ich Faltenbildungen während der Schnittaufnahme durch Hydrophilisierung der Schlitz-Grids drastisch reduzieren, was bei der anschließenden Kontrastierung ebenfalls eine deutliche Reduzierung von Präzipitaten ermöglichte. Die Hydrophilisierung von befilmten Schlitz-Grids wurde bisher vor allem für Techniken wie *Negative staining* zur Darstellung von z.B. Viren beschrieben (122), jedoch ergeben sich heutzutage für großflächige Auswertungen von Ultradünnschnitten (speziell für Digitalisierungen von Ultradünnschnittarealen) neue, sehr vielversprechende Anwendungsgebiete. Weiterhin wurde zur Reduktion von Faltenbildung bei der REM-Array Tomographie eine Hydrophilisierung von Kapton-Band und Deckgläsern durch Glimmentladung empfohlen (92).

4.5. Mikroskopische Verfahren zur optimierten morphologischen Darstellung der Niere

In meiner Arbeit habe ich auf Grundlage der verbesserten Nierenfixierung und nachfolgenden Präparationen ausgewählte methodische Ansätze für verbesserte licht- und elektronenmikroskopische Auswertungsverfahren getestet, um morphologische Besonderheiten von Nierengewebe optimiert darstellen zu können. Zu diesen Besonderheiten der Niere zählte ich die Heterogenität von mikroanatomischen Zonen (15, 24, 26) sowie die mit über 26 verschiedenen Zelltypen (48) bedeutende zelluläre Heterogenität. Es sollte hierfür der

Zusammenhang von Mikroanatomie (Nierenzonen und Zellarchitektur) und Ultrastruktur per Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen (Nanotomie) erhalten bleiben (75, 123, 124) und per *Big data* Ansatz dezentral für telepathologische Auswertungen verfügbar gemacht werden (125, 126).

4.5.1. LM-Array Tomographie

Eine konventionelle lichtmikroskopische Untersuchung von Semidünnschnitten ermöglichte in meiner Arbeit eine Auswertung nur auf zweidimensionaler Ebene. Aufgrund der bekannten Nierenanatomie und Histologie reicht dieser Auswertungsansatz für die meisten Fragestellungen aus, es waren durch zufällige Anschnitte die meisten Strukturen gut auswertbar. Für die Auswertungen der Fixierungsprotokolle konnten geschrumpfte, normale sowie geschwollene Zellen eindeutig klassifiziert werden. Eine Limitation dieser zweidimensionalen lichtmikroskopischen Auswertung war jedoch die mangelhafte Beurteilbarkeit von mikroanatomisch komplex gebauten Strukturen wie Glomeruli. Speziell für von der Norm abweichende Morphologien wie neonatale oder pathologische Glomeruli sollte daher eine Methode zur exakten dreidimensionalen mikroanatomischen Auswertung von Glomeruli evaluiert werden. Für eine verbesserte und direkte Beurteilung von Volumeninformationen verwendete ich Semidünnschnittserien, welche optional durch REM-Array Tomographie auswertbar gemacht werden können. Eine Schnittdicke von 300 nm ermöglichte eine Abbildung von Strukturen mit annähernd isometrischen Voxeln; bei Verwendung eines 63x Planapochromats mit einer numerischen Apertur von 1,4 ergab sich mit der verwendeten CCD-Kamera eine Voxelgröße von 150x150x300 nm. Die Alignierung der fotografierten Schnittserien ermöglichte eine Rekonstruktion von virtuellen Anschnitten in jeder gewünschten Ebene. Hierdurch konnte eine exakte morphologische Beschreibung des komplexen mikroanatomischen Aufbaus der Glomeruli ermöglicht werden. Eine manuelle Segmentierung von z.B. Kapillarlumina erlaubte weiterhin durch Modellierung eine sehr präzise und aussagekräftige dreidimensionale Visualisierung von Strukturen. Dies erlaubte eine exakte Darstellung des räumlichen Zusammenhangs der modellierten Strukturen. Glomeruli wurden bereits in früheren Arbeiten anhand von Semidünnschnittserien untersucht (127-129); hier wurde jeweils eine Schnittdicke von 1 µm verwendet. Im Rahmen früherer Arbeiten wurden eine Kartierung der Glomeruluskapillarschlingen mit seinen Verzweigungen (127) sowie ein Modell der Oberflächentopographie (128) erstellt. Weiterhin wurden die einzelnen Komponenten durch Modellierung visualisiert und hierdurch ein verbessertes Verständnis des exakten mikroanatomischen Aufbaus des Glomerulus erreicht (129). Weitere technische Ansätze zur dreidimensionalen Darstellung von Glomeruli wurden beschrieben; darunter Ausgusspräparate für konventionelle REM-Ansätze (130) und Nano-Computertomographie (131) sowie Präparate für Multiphotonenmikroskopie (132). Ausgusspräparate zeigten lediglich die Lumina der

Glomeruluskapillarschlingen, sodass keine Informationen über die Gewebzusammensetzung erhalten werden konnten (130, 131), weiterhin waren die Ausgusspräparate im REM nur entsprechend ihrer Orientierung von außen einsehbar, detaillierte Informationen über zentrale Bereiche der Glomeruluskapillarschlingen sowie die dem REM-Detektor abgewandte Seite wurden nicht erhalten. Während durch Multiphotonenmikroskopie mit normalem Gewebe nur ein limitiertes Gewebvolumen von 30-40 μm visualisiert werden kann (128), ermöglicht eine spezielle Transparenzerhöhung (*Clearing*) eine Visualisierung von über 1 mm dicken Proben (132); Auflösung und Gewebsveränderungen in Folge des *Clearing* können hier jedoch limitierende Faktoren sein. Volumen-Datensätze, wie sie in meiner Arbeit von neonatalen, adulten und pathologischen adulten Glomeruli durch Semidünnschnittserien hergestellt wurden, erlauben generell vielfältige und hochauflösende Auswertungsmodalitäten, besonders auch durch neue Techniken wie REM-Array Tomographie, sind jedoch sehr aufwändig in der Herstellung und Datenverarbeitung. Eine Kombination und Korrelation von Techniken verschiedener Größenskalen anhand eines Präparats, wie z.B. Mikro-Computertomographie, Multiphotonenmikroskopie und licht- bzw. elektronenmikroskopische Auswertungen von Semidünnschnitten, würden die jeweiligen Vorteile der Techniken kombinieren, sodass großes Volumen (Mikro-Computertomographie und Multiphotonenmikroskopie) sowie hochauflösende Struktur (licht- und elektronenmikroskopische Auswertung von Semidünnschnitten) von einem großen Präparat ausgewertet werden können. Mit diesem Ansatz wurden in einer früheren Arbeit Zebrafische exakt morphologisch kartiert; hier wurde Mikro-Computertomographie mit nachfolgender Semidünnschnittpräparation für licht- und elektronenmikroskopische Auswertung (REM-Array Tomographie) kombiniert (133).

4.5.2. Elektronentomographie

In meiner Arbeit konnte durch Elektronentomographie gER im proximalen Tubulus hochaufgelöst dargestellt werden. Im Gegensatz zur konventionellen hochauflösenden Darstellung am TEM war hierdurch, neben einer hohen Auflösung in X/Y, eine ebenfalls hohe digitale Schnittauflösung (Z) von ca. 1-2 nm möglich. Hierdurch konnten die Membranstrukturen des gER, die konventionell nur als Projektion darstellbar sind, exakt morphologisch beschrieben werden. Es zeigte sich eine maschenartige Struktur des gER mit einer Porengröße von ca. 50 nm, welches entlang der lateralen Zellgrenzen verlief und auch Organellen wie Mitochondrien und Peroxisomen umgab. In einer früheren Arbeit wurde das gER im proximalen Tubulus durch Osmiumimprägnation dargestellt. Hierbei wurden durch Inkubation von Nierengewebe in einer Osmiumtetroxid-Lösung Membranzisternen des gER selektiv kontrastiert. Es wurden Kunstharzschnitte mit einer Dicke zwischen 300-1000 nm verwendet, sodass Projektionen der Membranzisternen am TEM dargestellt werden konnten. Hier zeigte sich eine maschenartige Struktur, die vergleichbar mit den elektronentomographischen Aufnahmen meiner Arbeit sind. Durch diese konnten in meiner

Arbeit die Membranzisternen exakt im Volumen des ca. 250 nm dicken Kunstharzschnitts verfolgt werden. Die Anfertigung von elektronentomographischen Aufnahmen erforderte jedoch einen großen Zeitaufwand, während hierbei nur geringste Volumina bzw. Ultradünnschnittareale ausgewertet werden konnten. Über die technische Etablierung dieser Technik ergaben sich keine wichtigen Einsatzbereiche dieser Technik, da sich hier diverse Limitationen ergaben. Aufgrund der in meiner Arbeit routinemäßig durchgeführten chemischen Perfusionsfixierung ist im hochaufgelösten ultrastrukturellen Detail mit starken morphologischen Veränderungen während der Fixierung zu rechnen. Daher hatte die repräsentative Auswertung großer Flächen hier für mich Priorität. In früheren Arbeiten wurden elektronentomographische Aufnahmen jedoch auch von Material durchgeführt, welches durch *High-pressure freezing* und Gefriersubstitution verarbeitet wurde (134). Sofern durch *High-pressure freezing* die Möglichkeit einer lebensnahen morphologischen Darstellung per hochauflösender Elektronentomographie besteht, nimmt ihre Aussagekraft auch bei nur kleinen Probenvolumina bzw. Flächen drastisch zu. Dieser Ansatz konnte jedoch für Nierengewebe nicht verfolgt werden, da eine mechanische Manipulation von Nierengewebe, wie sie im Rahmen der Präparation für das *High-pressure freezing* notwendig wäre, zu starken morphologisch fassbaren Veränderungen mit Zellschwellungen und Tubuluskollaps geführt hätte (9, 101). Eine Anwendung dieses Ansatzes wäre daher primär für Zellkultur und kleinste Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* als Goldstandard zu betrachten, welche ein Einfrieren ohne vorherige mechanische Manipulation erlauben (135). In früheren Arbeiten wurden, trotz der offensichtlichen Limitationen, jedoch auch in morphologischen Studien mit Nierengewebe Darstellungen durch Elektronentomographie durchgeführt. Cheng et al. zeigten hochaufgelöste Datensätze der glomerulären Filtrationsbarriere, durch virtuelle Schnitte und Modellierungen wurden Nachbarschaftsbeziehungen von subzellulären Details beschrieben (136). Hier wurde jedoch ausschließlich mit chemischen Fixierungen gearbeitet, appliziert wurden diese konventionell (nicht per Injektion oder unterstützt durch Mikrowellenstrahlung) per Immersion oder Perfusion. In einer anderen Arbeit zeigten Arkill et al. ultrastrukturelle Studien des dreidimensionalen Aufbaus der glomerulären endothelialen Glykokalix mit einem *Serial block face* REM (SBF-REM), *Focused ion beam milling* REM (FIB-REM) und Elektronentomographie (44). Auch in dieser Arbeit wurde mit chemisch fixiertem Material gearbeitet. Die Substruktur der Glykokalix wurde beschrieben, jedoch wurde auf den hier unbekanntem Grad an Artefaktbildung als Limitation hingewiesen, weitere Arbeiten, unter anderem durchgeführt mit Gefriertechniken, seien hier als verbesserte Aufklärung notwendig. Eine Kombination von Techniken der Volumenelektronenmikroskopie mit der von Ohno et al. beschriebenen *Cryo in vivo* Fixierung (78) könnte dies ermöglichen, jedoch wurde dieser Ansatz bisher nicht publiziert.

4.5.3. Nanotomie und REM-Array Tomographie zur 3D-Rekonstruktion

Eine konventionelle ultrastrukturelle Auswertung am TEM ermöglichte in meiner Arbeit eine punktuelle Auswertung von Ultradünnschnitten. Eine vorangegangene lichtmikroskopische Untersuchung des zum Gewebeblock gehörigen Semidünnschnitts erlaubte hier eine Orientierung innerhalb des Präparats. Aufgrund der Heterogenität von Nierengewebe wäre eine repräsentative Auswertung mit Erfassung sämtlicher Zonen und Zelltypen auf ultrastruktureller Ebene äußerst zeitaufwändig gewesen. Ich fokussierte mich daher auf kortikale Zellen und hier besonders auf Podozyten und proximale Tubuli. Besprechungen der Ultrastruktur meiner Präparate waren generell nur anhand der angefertigten Fotos möglich, während Semidünnschnitte direkt live an einem Diskussionsmikroskop gemeinsam betrachtet werden konnten. Im direkten Vergleich von licht- und elektronenmikroskopischer Auswertung war daher die Informationsdichte sowie die Nutzbarkeit von Expertenwissen bei ultrastrukturellen Auswertungen allgemein deutlich eingeschränkt. Grund hierfür war das Fehlen einer schnellen Auswertungsmöglichkeit von Präparaten an einem TEM durch ein schnelles und qualitativ hochwertiges Livebild sowie die geringe Verfügbarkeit und zeitaufwändige Bedienung von Elektronenmikroskopen. Um technische Ansätze für eine verbesserte ultrastrukturelle Auswertung von Nierengewebe zu etablieren, wurde im zweiten Teil meiner Arbeit ein Schwerpunkt auf die Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen (Nanotomie) gelegt. Hierfür testete ich verschiedene TEM- und REM-Ansätze. Dieses Vorgehen wurde bereits in früheren Arbeiten als sehr effektive Möglichkeit beschrieben, um eine ultrastrukturelle Analyse vom zellulären sowie subzellulären Detail bei erhaltenem Kontext zur Mikroanatomie durchzuführen (75, 137). Hierfür wurden vor der Zeit von CCD-Kameras mit Planfilmen sehr aufwändige Montagen anhand von Positiv-Abzügen erstellt (138). Das große Potential dieses Ansatzes ist heutzutage auf verbesserte CCD-Kameras, neue REM-Techniken, innovative und offen zugängliche Software sowie leistungsfähige Computer und schnelle Internetverbindung zurückzuführen.

4.5.3.1. TEM-Nanotomie

In meiner Arbeit wurden Ultradünnschnittareale mit einer Größe von bis zu 350x350 µm und einer Pixelgröße von 1,6 nm digitalisiert. Als Grundlage hierfür wurden Ultradünnschnittpräparate durch Anpassung der Präparation in hoher Qualität angefertigt, wodurch Falten und Präzipitate deutlich reduziert werden konnten. Die Verwendung von Schlitz-Grids ermöglichte eine effiziente Auswahl von geeigneten Motiven sowie eine barrierefreie Digitalisierung dieser Bereiche.

Ein optimierter Ansatz zur Alignierung¹ der Einzelbilder (bis zu 4300 Bilder mit je 4084x4084 Pixel) ermöglichte das Zusammensetzen zu einem homogenen Datensatz, nahezu frei von

¹ Mit „Alignierung“ wird das Zusammenfügen von Einzelbildern durch automatisierte Anpassung (Verschieben, Rotation, Größenänderung, Strecken) zu einem 2D- oder 3D-Datensatz beschrieben.

Überblendungsartefakten. Die Datensätze konnten per interner Festplatte, externer Festplatte oder Charité-Laufwerk (dezentral) eingesehen werden. Durch die zusammenhängenden Datensätze konnten komplexe mikroanatomische Strukturen wie Glomeruli sehr präzise ausgewertet werden. Weiterhin konnte eine gemeinsame Diskussion der Datensätze zusammen mit Experten, unabhängig von einem Elektronenmikroskop, erfolgen. Hier war eine ähnlich effiziente Auswertung wie bei lichtmikroskopischen Präparaten möglich. Der Ansatz der TEM-Nanotomie war primär durch das zeitaufwändige Anfertigen der Datensätze limitiert. Die Anfertigung von 500 Einzelbildern dauerte ca. 2,5 Std., das Zusammenfügen benötigte weitere ca. 2 Std. Anhand der fertigen Datensätze konnte jedoch die Ultrastruktur der Präparate deutlich besser ausgewertet werden, als es durch eine konventionelle (punktuelle) Auswertung möglich war. Unabhängig vom Ansatz der TEM-Nanotomie konnte die hierfür etablierte verbesserte Ultradünnschnittpräparation auch für konventionelle Auswertungen genutzt werden.

Eine verbesserte ultrastrukturelle Auswertung von peripheren Nerven durch Verwendung von TEM-Nanotomie wurde bereits 2003 beschrieben (139). Hier wurden einige 100 Einzelbilder angefertigt und digital zu einem großen Datensatz zusammengefügt, insgesamt dauerte dies zwischen 2-8 Std. Weiterhin konnte hierdurch eine Software-gestützte Bildanalyse durchgeführt und die Auswertung dezentral durchgeführt werden; analoge Montagen hätten hier bereits eine unhandliche Größe von vielen Quadratmetern erreicht. In einer Arbeit von Lee wurde 2011 ein kompletter Workflow zur Digitalisierung von Glomeruli pathologischer Präparate zu diagnostischen Zwecken (Telepathologie) beschrieben (137); innerhalb von ca. 1,5 Std. konnte ein Areal von 200x200 µm mit einer Pixelgröße von ca. 4 nm digitalisiert und zusammengefügt werden. Dieser Ansatz war schon soweit optimiert, dass die konventionelle Auswertung am TEM anhand von Einzelbildern durch die Digitalisierung im Rahmen der pathologischen Diagnostik von Nierenbiopsien ersetzt werden konnte. In der Arbeit von Lee war aufgrund der verwendeten Photomontage-Software jedoch die Anzahl der Einzelbilder auf 500 beschränkt, sodass größere Areale nur mit sehr geringer Auflösung aufgenommen werden konnten. Weiterhin wurde in dieser Arbeit mit *Mesh grids* gearbeitet, die einen großen Teil der Glomeruli verdeckt haben. In meiner Arbeit war hingegen durch Anpassung der Software (persönliche Kommunikation mit FEI; Max Otten) das Anfertigen von bis zu 20000 Einzelbildern möglich, wodurch ein *Field of view* von bis zu 375 µm hochauflösend digitalisiert werden konnte. Weiterhin erlaubte die Verwendung von hochwertigen Ultradünnschnittpräparaten auf Schlitz-*Grids* eine barrierefreie Digitalisierung von Glomeruli, wodurch auch kleine bzw. segmentale Veränderungen besser ausgeschlossen werden konnten. In der Arbeit von Lee wurde die Alignierung der Einzelbilder ohne elastische Anpassung durchgeführt, weiterhin zeigten sich noch deutlich erkennbare Helligkeitsunterschiede zwischen den Einzelbildern. Durch Verwendung von sehr leistungsfähigen Alignierungen in Fiji/ *TrakEM2* konnte ich in meiner Arbeit sehr viel homogenere Datensätze erstellen, allerdings können durch aufwändige Alignments auch geometrische

Verzerrungen induziert werden. Da in diesen Datensätzen jedoch auch eine Verlinkung mit den originalen Bildern in Fiji/ *TrakEM2* gegeben ist, konnte ich bei einem Verdacht auf solche Verzerrungen die Originalbilder einsehen.

Ein weiterer Vorteil der Digitalisierung von Ultradünnschnittarealen ist die Nutzung dieser Datensätze online in einem Viewer¹. Dieser Ansatz wurde im Rahmen meiner Arbeit bereits in einem ersten Stadium etabliert. Auch Datensätze aus früheren Arbeiten wurden online per Viewer zugänglich gemacht, wodurch dezentrale Auswertungen im Rahmen von Forschungsarbeiten und verbessertes Lehrmaterial verfügbar wurden. In einer früheren Arbeit wurden komplette Glomeruli mit einer Pixelgröße von ca. 1,4 nm digitalisiert, um eine verbesserte Auswertung des glomerulären Kapillarendothels zu ermöglichen (140). Eine Auswahl dieser Datensätze ist online verfügbar. In einer anderen Arbeit wurde ein Zebrafisch mit ca. 25000 Einzelphotos über 4,5 Tage mit einer Pixelgröße von 1,6 nm digitalisiert, auch dieser Datensatz ist online verfügbar (123).

Durch Digitalisierung mit TEM-Nanotomie können allgemein qualitativ hochwertige Datensätze für dezentrale und effektive Auswertungen erstellt werden. Limitationen der TEM-Nanotomie sind jedoch eine anspruchsvolle Ultradünnschnittpräparation und zeitaufwändige Schritte bei der Digitalisierung, Alignierung, Datenverarbeitung und Datenspeicherung.

4.5.3.2. REM-Nanotomie und REM-Array Tomographie zur 3D-Rekonstruktion

In meiner Arbeit konnten auf der Grundlage der qualitativ hochwertigen Aufnahmetechnik moderner REM-Ansätze bereits durch Einzelbilder nahezu perfekte Bilder in normaler Auflösung in Übersichtsvergrößerung sowie höchster Vergrößerung erstellt werden. Speziell bei Übersichtsvergrößerungen konnte durch die REM-Array Tomographie eine Qualität erreicht werden, die für mich mit TEM-Ansätzen nicht erreichbar war. Aufnahmen mit hoher Vergrößerung waren jedoch aufgrund einer relativ langen Aufnahmezeit von ca. 2-3 min. durch Vibration-induzierte Aufnahmeartefakte limitiert. Dass allgemein durch Aufnahme eines Ultradünnschnitts mit einem REM ein mit dem TEM-Ansatz vergleichbares Bildäquivalent entsteht, konnte bereits 1985 gezeigt werden (141). Hier war jedoch die Qualität der Bilder deutlich schlechter als bei damaligen TEM-Ansätzen. Verbesserte Detektorsysteme und Präparationsprotokolle ermöglichten ab 2004 eine Nutzung der REM-Ansätze in deutlich verbesserter Qualität (107, 142, 143). Heutzutage wird hierdurch eine bisher unerreichte Effizienz von dreidimensionalen Rekonstruktionen ermöglicht (6).

In meiner Arbeit konnten Ultradünnschnittareale auch hochauflösend durch REM-Nanotomie digitalisiert werden. Hierfür wurde ein spezieller Scan-Generator mit dem Zeiss ATLAS-System verwendet, wodurch große Einzelbilder mit bis zu 16384x16384 Pixel aufgenommen werden konnten. Hierdurch konnten komplette Glomeruli mit nur 4-6 Einzelbildern bei einer Pixelgröße

¹ Software, die für online-Betrachtung großer Bilder optimiert ist. In der Regel wird nur der jeweils aktuell betrachtete Bildausschnitt des gesamten Datensatzes geladen, wodurch selbst Datensätze in der Größe mehrerer Gigapixel schnell einsehbar sind.

von 3 nm digitalisiert werden. Dies reduzierte Bildüberlappungen im Vergleich zur TEM-Nanotomie deutlich, wodurch eine Induktion von Artefakten während der anschließenden Alignierung weniger wahrscheinlich wurde. Weiterhin war die Präparation der REM-Nanotomie deutlich einfacher und hochwertiger im Vergleich zur TEM-Nanotomie. Die höhere Präparationsstabilität der Ultradünnschnitte vermied außerdem eine Elektronenstrahl-induzierte Verformung, wie sie bei TEM-Präparaten auftritt. Aufgrund der größeren Einzelbilder und der höheren Präparationsstabilität konnten Ultradünnschnittareale mit der REM-Nanotomie im Vergleich zur TEM-Nanotomie zuverlässiger und mit verringerter Induktion von Verformungen während der Aufnahme und während des anschließenden Alignments erstellt werden. Im Rahmen meiner Arbeit ergab sich jedoch eine entscheidende Limitation, welche die Verwendung der REM-Nanotomie einschränkte. Die Aufnahmen der REM-Einzelbilder benötigten eine im Vergleich zum TEM-Ansatz bis zu 10-fach längere Aufnahmezeit, stark abhängig vom verwendeten Detektor. Durch eine angepasste Präparation zur Reduktion von oberflächennahen Artefakten und Verwendung eines BSE-Detektors konnten jedoch Aufnahmezeiten erreicht werden, die mit dem TEM-Ansatz vergleichbar waren. Der Zeitfaktor als limitierender Punkt wurde für die REM-Ansätze bereits beschrieben (144); die Digitalisierung von 1 mm² würde mit einer Pixelgröße von 3 nm bei einer *Dwell time* von 6 µs ca. 1 Woche benötigen. Eine Verwendung der REM-Array Tomographie zur dreidimensionalen Rekonstruktion muss daher generell sehr kritisch betrachtet werden, da aufgrund der langen Aufnahmezeiten und des Aufwands der Alignierung und Segmentierung viele weitere Limitationen hinzukommen und ein Erkenntnisgewinn im Vergleich zu zweidimensionalen Auswertungen mitunter nur gering ist (6). In meiner Arbeit zeigte die ultrastrukturelle 3D-Darstellung einer Zelle eines aufsteigenden Schleifenschenkels hochaufgelöst subzelluläre Details wie Mitochondrien und Membranzisternen, auch interstitielle Strukturen wie Zellfortsätze von Fibroblasten konnten exakt nachverfolgt werden. Es zeigte sich außerdem ein räumlicher Zusammenhang zwischen Autophagosomen und Membranzisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Aufgrund der hier gewählten Technik der Array Tomographie, welche im Gegensatz zu SBF-REM und FIB-REM im Allgemeinen nicht invasiv¹ ist, kann weiterhin eine mehrstufige Aufnahme durchgeführt werden. Die in meiner Arbeit gewählte Pixelgröße betrug 5 nm. Nach Lokalisation einer *Region of interest* in einem großen *Field of view* kann hier in einem weiteren Schritt z.B. ein Autophagosom mit einer Pixelgröße von 1-2 nm gescannt werden. Auf diese Weise ist generell eine hohe Flexibilität der REM-Array Tomographie gegeben, wodurch Anpassungen in X/Y (Pixelgröße) und Z (Anpassung der Schnittdicke, Auslassen mehrerer Ultradünnschnitte) die zeitlichen Limitationen zumindest teilweise auflösen lassen. Ein vergleichbares Vorgehen ist mit invasiven Techniken wie SBF-REM

¹ Die Ultradünnschnitte werden hier für nachfolgende Aufnahmen angefertigt und können als stabile und lang haltbare Präparate auch mehrfach aufgenommen werden, bei SBF-REM und FIB-REM wird die Blockoberfläche aufgenommen. Die Ultradünnschnitte werden verworfen, sodass eine nachfolgende Aufnahme nicht möglich ist.

und FIB-REM nicht möglich, jedoch kann durch diese Techniken durch sehr dünn abtragbare Schichten eine annähernd isometrische Voxelgröße von ca. 4 nm erreicht werden (FIB-REM), bei weiterhin deutlich erleichterten Alignments, da hier nicht deformierte Ultradünnschnitte sondern die Blockoberfläche aufgenommen werden (6). Es ergibt sich bei SBF-REM und FIB-REM jedoch eine weitere Limitation, die Aufnahmen in sehr hoher X/Y-Auflösung einschränkt. Während das Abtragen von 4 nm Schichtdicke mit dem FIB-REM gut möglich ist, hängt das Aufnahmevervolumen allgemein von der verwendeten Beschleunigungsspannung ab; eine hohe Beschleunigungsspannung für hohe X/Y-Auflösung geht daher mit einer verringerten Z-Auflösung aufgrund erhöhter Eindringtiefe des Primärelektronenstrahls einher. In der Folge ist das aufgenommene Volumen einer Schicht größer als das vorher abgetragene Volumen durch den Ionenstrahl. Dass auch mit der REM-Array Tomographie höchste Auflösungen erreichbar sind, wurde in einer früheren Arbeit gezeigt; es wurden die Membranzisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums mit hier erkennbaren helikalen Subdomänen beschrieben (145). Einige Schnittartefakte können hier weiterhin durch einen Ultraschalldiamanten¹ reduziert werden, wodurch eine Schnittdicke von ca. 20 nm sowie reduzierte Kompressionen ermöglicht werden (146).

Hochauflösende 3D-Rekonstruktionen von glomerulären Strukturen wurden u.a. von Ichimura et al. durchgeführt (147, 148). Hier wurden mit SBF-REM und FIB-REM die Interdigitationen von Podozytenfortsätzen ultrastrukturell verfeinert beschrieben und Stadien der podozytären Entwicklung demonstriert. Die Vor- und Nachteile der aktuellen 3D-Ansätze für neue REM-Verfahren (Array Tomographie, SBF-REM, FIB-REM) müssen generell gut gegeneinander abgewogen werden, um eine passende Auswahl treffen zu können. Allgemein eignen sich SBF-REM und FIB-REM für hochaufgelöste 3D-Rekonstruktionen mit geringsten Verformungen, jedoch benötigen sie spezielle Anpassungen der Kontrastierung, Einbettung und sind anfällig für Aufnahmefehler (keine erneute Aufnahme bei z.B. fehlerhaftem Autofokus möglich) (6). Weiterhin wird hier idR. das *Field of view* Aufnahme-bedingt durch die Größe der Einzelbilder limitiert.

Auf Grundlage der REM-Technik können zeitliche Limitationen von Bildaufnahmen weitestgehend aufgehoben werden, hier bietet das Zeiss MultiSEM 505 eine Aufnahmetechnik mit 61 parallel arbeitenden Elektronenstrahlen, bei einer festen Pixelgröße von 4 nm (144, 149). Aufgrund der 61 Elektronenstrahlen, einem speziellen Sekundärelektronendetektorsystem sowie weiterer Ansätze zur Beschleunigung der Aufnahme kann hier 1 mm² Ultradünnschnittareal innerhalb von ca. 6,5 min. digitalisiert werden. Eine Anpassung der Gewebepräparation sowie des gesamten Workflows der Datenverarbeitung und Speicherung ist hier jedoch üblicherweise notwendig; mit einem MultiSEM 505 können bis zu 100 TB Primärdaten pro Tag generiert werden,

¹ Verwendbar an einem konventionellen Ultramikrotom. Durch horizontal oszillierende Schwingungen des Diamantmessers wird eine „schneidende“ Bewegung durchgeführt, dies reduziert Kompressionen und damit verbundene Verformungen der Ultradünnschnitte deutlich, weiterhin kann hierdurch dünner (ca. 15 nm) geschnitten werden.

mit dem MultiSEM 506 (91 Elektronenstrahlen bei 8 nm Pixelgröße) bis zu 160 TB. In meiner Arbeit konnte durch eine Standardpräparation auf Siliziumwafern ein Ultradünnschnittareal mit einem *Field of view* von ca. 250 µm innerhalb von nur einer Minute mit dem Zeiss MultiSEM 505 digitalisiert werden, ein vergleichbares Areal hätte mit einem TEM bzw. einem einfachen REM bei hierfür jeweils typischen Parametern mehrere Stunden Digitalisierungszeit benötigt. Es konnte durch diesen Ansatz bereits mit meiner Standardpräparation der REM-Array Tomographie ein hochwertiger Datensatz mit Auflösbarkeit von subzellulären Details und geringer Artefaktbildung erreicht werden. In früheren Arbeiten wurden bereits erste Datensätze, die mit dem Zeiss MultiSEM 505 bzw. 506 erstellt wurden, publiziert (149). Weiterhin wurden spezielle Präparationstechniken wie verstärkte Kontrastierungen und Ansätze für leitfähige Kunstharze entwickelt, mit denen die Aufnahme von Proben für REM-Array Tomographie weiter verbessert und beschleunigt werden konnten (6, 92, 150).

4.5.4. Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie

Durch Optimierung von Fixierung und weiterer Präparation konnte in meiner Arbeit hochwertiges Ausgangsmaterial für kombinierte morphologische sowie immunzytochemische Methoden von nur einem Versuchstier generiert werden. Immunzytochemische Ansätze anhand von Goldmarkierungen (Kunstharzmaterial oder Tokuyasu-Technik) zeigten jedoch generell eine unbefriedigende Strukturhaltung und benötigten eine zeitaufwändige Dokumentation am TEM. Weiterhin waren Mehrfachmarkierungen mit diesem Ansatz nur schwer zu realisieren.

Ein neuartiger methodischer Ansatz ermöglicht durch Kombination verschiedenartiger bildgebender Techniken in vielen Fällen eine Auflösung dieser klassischen Limitationen. Hierbei werden mit den verschiedenen Techniken dieselben Zell- oder Gewebestrukturen dargestellt und miteinander korreliert; daher wird dieser Ansatz als korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie bezeichnet (*correlative light- and electron microscopy*; CLEM) (108). Die Vorteile der jeweiligen Techniken können somit verbunden werden, z.B. die sensitive Detektion von transgen induziertem GFP-Signal durch Konfokalmikroskopie mit nachfolgender Kunstharzeinbettung und hochwertiger ultrastruktureller Darstellung derselben Strukturen mit einem TEM.

Durch das breite Spektrum an bildgebenden Techniken, darunter auch Computertomographie von Kunstharzblöcken, kann hier eine entsprechend der Fragestellung individualisierte Kombination der Techniken vorgenommen werden. Cheng et al. führten an Zebrafischen eine korrelative Darstellung durch Mikro-Computertomographie, lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Array Tomographie durch (133), wodurch Methoden mit sehr unterschiedlichen Größenordnungen kombiniert werden konnten.

Ein vielversprechender CLEM-Ansatz zur optimierten Darstellung von Nierengewebe wird in Zukunft vermutlich die Array Tomographie nach Collman et al. sein (7). Auf Grundlage einer optimierten Gefriersubstitution könnte Nierengewebe hierdurch sehr zuverlässig verbessert

ausgewertet werden. In ersten Vorarbeiten (nicht Teil der vorherigen Kapitel) konnte ich nach dem Protokoll von Micheva et al. (107) Semidünnschnitte von hydrophilem Kunstharz mit pNKCC2 und DAPI-Kernfärbung markieren und mit einem konventionellen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop aufnehmen, anschließend war nach Färbung (Richardson) eine Korrelation mit dem lichtmikroskopischen Semidünnschnitt-Signal per *TrakEM2* möglich (7). Die stabile Präparation der *Array Tomographie* eröffnet hier auf einfache Weise durch Schnittserien 3D-Rekonstruktionen und durch mehrfache Zyklen von Immunmarkierungen ein präzises molekulares *Mapping* von Proteinepitopen anhand der selben Ultradünnschnitte. Weiterhin eröffnet das lichtmikroskopische Signal im Vergleich zu klassischen immunzytochemischen Ansätzen mit dem TEM ein sehr viel größeres *Field of view*.

4.5.5. Ausblick: Mehrstrahl-REM ermöglicht Hochdurchsatzverfahren

Mein Zugang zu Präparation und Auswertung elektronenmikroskopischer Proben war aufgrund der freien Nutzbarkeit der Core Facility Elektronenmikroskopie der Charité sehr gut. Die Planung von Fixierexperimenten wurde auf Grundlage der vorangegangenen Experimente durchgeführt, in einem Takt von 4-8 Wochen konnten so die notwendigen Fixierungen, Einbettungen, Schnittpräparationen und Auswertungen durchgeführt werden. Eine zeitnahe Auswertung von Fixierungen und modifizierter Schnittpräparation erlaubte eine effiziente Anpassung der Präparationen und damit eine Annäherung an höchste Qualitätsstandards. Allgemein ist jedoch der Zugang zu diesen Techniken aufgrund langer Wartezeiten in Core Facilities und limitierten Möglichkeiten von Anpassungen der Präparation und Auswertung sehr beschränkt. Weiterhin sind in den meisten Arbeitsgruppen EM-Präparationen aufgrund der hohen Spezialisierung der Techniken nicht eigenständig durchführbar. In vielen Forschungsprojekten könnte eine ultrastrukturelle Auswertung von Proben jedoch Vorteile bringen, Wartezeiten von einigen Monaten, je nach Abteilung, schrecken aber viele potentielle Nutzer dieser Techniken ab (151, 152).

Die Kunstharzeinbettungen und Schnittpräparationen wurden in meiner Arbeit noch ausschließlich manuell durchgeführt. Elektronenmikroskopische Techniken auf TEM-Basis wurden in den letzten Jahren mehrfach durch Ansätze zur Hochdurchsatzpräparation verbessert (115, 153); Kunstharzeinbettungen sind inklusive der Fixierung innerhalb von nur 3,5 Std. möglich, sodass durch nachfolgende Schnittpräparation und Auswertung z.B. eine ultrapathologische Diagnostik am selben Tag ermöglicht wird. Dieser Fortschritt wurde vor allem durch kommerzielle Mikrowelleneinbettungssysteme (z.B. Leica *Automatic microwave tissue processor*) ermöglicht. Weiterhin wurden kommerzielle Kontrastierautomaten zur Kontrastierung von TEM-Grids (z.B. Leica *Automatic contrasting instrument*) konstruiert. Heutzutage werden Techniken zur beschleunigten Präparation in einigen pathologischen Instituten für eine zeitnahe EM-Diagnostik verwendet (119, 153), jedoch bleibt bei diesem Ansatz weiterhin mit der TEM-

Auswertung ein stark limitierender Faktor bestehen. Während einige pathologische Fragestellungen theoretisch durch eine gezielte Bilddokumentation in kurzer Zeit aufgeklärt werden könnten, wird dennoch das Anfertigen von repräsentativen Fotos auch in diesen Fällen empfohlen (49), um die *Open view* (154) der EM-Technik voll ausschöpfen zu können. Hierdurch ist auch die Detektion von unerwarteten pathologischen Veränderungen möglich, die bei oberflächlicher Analyse eher übersehen werden kann. Speziell in der biomedizinischen Forschung erfordert die Anwendung von EM-Techniken repräsentative Auswertungen, da das Ausmaß von pathologischen Veränderungen bei z.B. Tiermodellen oder Zellkulturen nicht vorausgesagt werden kann. Eine ultrastrukturelle Auswertung von mehreren Organsystemen, wie sie zur Charakterisierung von pathologischen Tiermodellen notwendig werden kann, erfordert daher eine solche repräsentative Auswertung, was pro Präparat viele 100 Bilder benötigen kann. Benutzungszeiten am TEM können so für große Projekte unerschwinglich werden, selbst bei nicht kostendeckender interner Leistungsverrechnung. Im Gegensatz zu Auswertungen mit konventionellen Lichtmikroskopen, die in der Regel in jedem Labor mehrfach vorhanden sind, ist eine nachträgliche bzw. erneute Auswertung am TEM mit einem großen Aufwand verbunden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von TEM-Ansätzen in Forschung und Diagnostik (152) muss die Nutzung dieser Technik in den meisten Fällen daher als mangelhaft angesehen werden. Die Verfügbarkeit ist dabei jedoch ein kritischer Punkt, der eine sinnvolle Nutzung der Elektronenmikroskopie erst ermöglicht.

Eine verbesserte bzw. ideale Nutzbarkeit kann nun, erstmals seit Erfindung des Elektronenmikroskops, durch Beschleunigung des gesamten Arbeitsablaufs für REM-Array Tomographie inklusive Digitalisierung und dezentraler Auswertung, z.B. zum Ziel der Telepathologie (125), ermöglicht werden (Abb. 41A-L). Das Mehrstrahl-REM ist hier das letzte Bindeglied, um mit einer zentralisierten EM-Abteilung innerhalb von nur 24 Std. 100-200 Präparate fixieren, einbetten, schneiden, kontrastieren und digitalisieren zu können. Eine beschleunigte Schnittpräparation, wie in dieser Arbeit vorgeschlagen (Abb. 41E-J) und in ersten Ansätzen getestet, könnte dabei mit neuartigen Kontrastierautomaten eine weitere Beschleunigung bzw. Automatisierung ermöglichen. Hierbei ist auch aufgrund der neuen Möglichkeiten zur korrelativen Nutzung des licht- und elektronenmikroskopischen Signals mit einer steigenden Nachfrage für EM-Ansätze zu rechnen. Weiterhin werden diese Techniken vermutlich aufgrund neuer Anwendungen von Nanotechnologie in Diagnostik (155, 156) und Therapie (157) und ihrer möglichen gesundheitlichen Gefahren (158) einen neuen Stellenwert in der Toxikologie erreichen. Aufgrund der verbesserten Verfügbarkeit von experimentellen Tiermodellen durch z.B. CRISPR/Cas bieten sich besonders hier neue Anwendungsmöglichkeiten für eine verbesserte routinemäßige ultrastrukturelle Charakterisierung von Organsystemen. Insgesamt ergibt sich, wie im Rahmen meiner Arbeit

gezeigt werden konnte, die Möglichkeit einer vielversprechenden Neubewertung von elektronenmikroskopischen Techniken für biomedizinische Anwendungen.

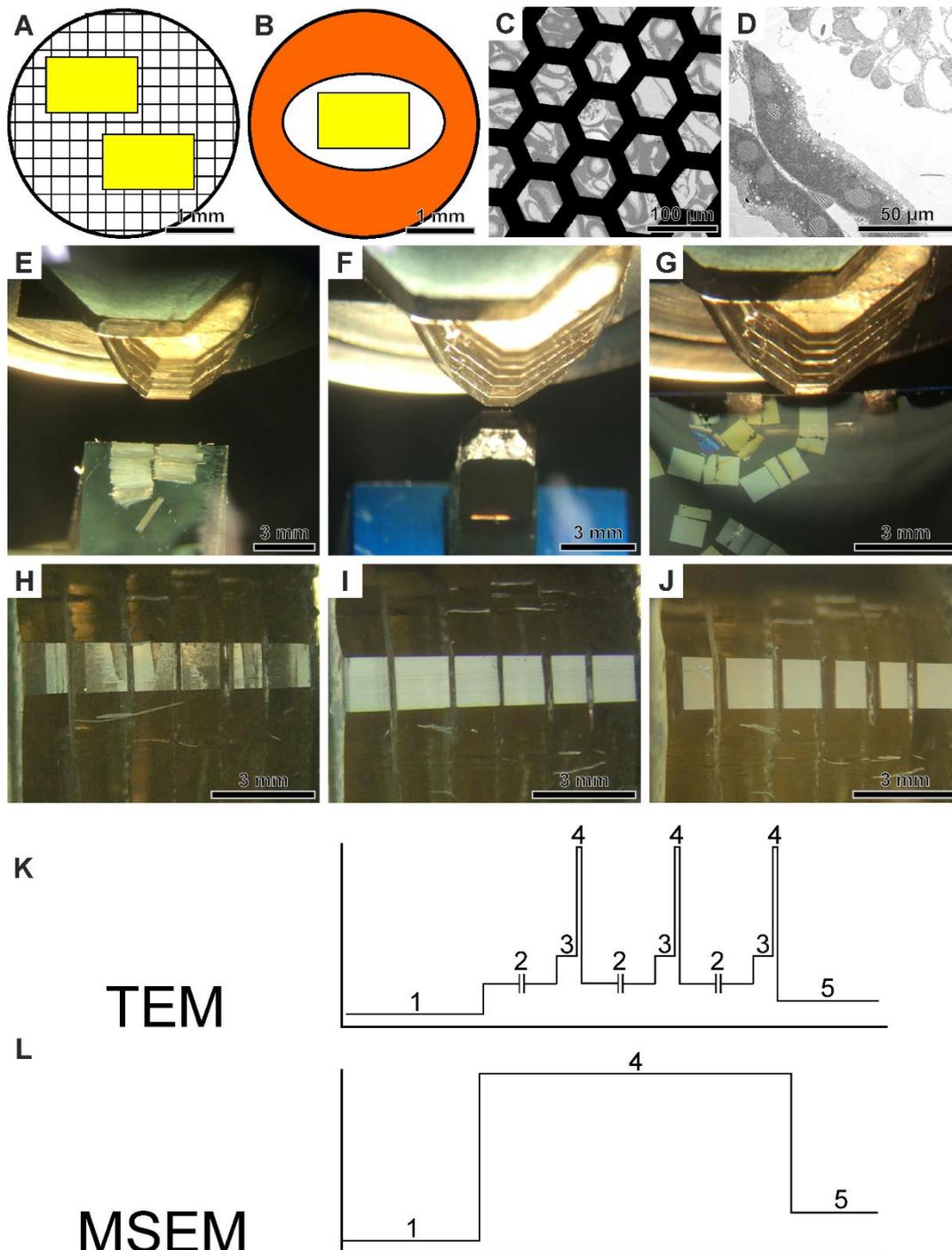


Abbildung 41. Mögliche Hochdurchsatzverfahren für Präparate der REM-Array Tomographie.

Limitationen von TEM-Grids (A-D); *Mesh grid* (A; 2 Ultradünnschnitte) und *Schlitz-Grid* (B; 1 Ultradünnschnitt). *Mesh grids* verdecken einen großen Teil der Schnittfläche; große, zusammenhängende Bereiche können nicht ausgewertet werden (C). *Schlitz-Grids* sind anfällig für Falten und tragen Filmartefakte (D). Serielles Trimmen (E,F,H,I) bzw. Schneiden (G,J) von mehreren Blöcken (Epon pur) für beschleunigte Schnittpräparation. Vereinfachte schematische Darstellung eines Workflows zur Dokumentation an einem TEM (K) und einem Zeiss MultiSEM 505 (L); einschließen einer Probe und Kalibrierung des Elektronenstrahls (1), Suche nach einer *Region of interest* (2), Einstellungen (3), Foto (4) und Speicherung/Bearbeitung (5). Durch das MultiSEM 505 ist eine beschleunigte und vereinfachte Dokumentation per Digitalisierung möglich, nachfolgende Auswertungen können anhand eines zusammenhängenden Datensatzes auch unabhängig von einem Elektronenmikroskop erfolgen.

5. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. Harnorgane. Taschenlehrbuch Histologie. 2 ed. Stuttgart: Thieme; 2003. p. 437-60.
2. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. The kidney. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 587-654.
3. Doorschodt BM, Teubner A, Kobayashi E, Tolba RH. Promising future for the transgenic rat in transplantation research. *Transplant Rev (Orlando)*. 2014;28(4):155-62.
4. Sontheimer EJ, Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *Hum Gene Ther*. 2015;26(7):413-24.
5. Galbraith CG, Galbraith JA. Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 10):1607-11.
6. Peddie CJ, Collinson LM. Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age. *Micron*. 2014;61:9-19.
7. Collman F, Buchanan J, Phend KD, Micheva KD, Weinberg RJ, Smith SJ. Mapping synapses by conjugate light-electron array tomography. *J Neurosci*. 2015;35(14):5792-807.
8. Markert SM, Britz S, Proppert S, Lang M, Witvliet D, Mulcahy B, Sauer M, Zhen M, Bessereau JL, Stigloher C. Filling the gap: Adding super-resolution to array tomography for correlated ultrastructural and molecular identification of electrical synapses at the *C. elegans* connectome. *Neurophotonics*. 2016;3(4):041802.
9. Griffith LD, Bulger RE, Trump BF. The ultrastructure of the functioning kidney. *Laboratory investigation*. 1967;16(2).
10. Peti-Peterdi J, Kidokoro K, Riquier-Brison A. Novel in vivo techniques to visualize kidney anatomy and function. *Kidney Int*. 2015;88(1):44-51.
11. Weigert R, Porat-Shliom N, Amornphimoltham P. Imaging cell biology in live animals: Ready for prime time. *J Cell Biol*. 2013;201(7):969-79.
12. Petersen P. Glutaraldehyde fixation for electron microscopy of needle biopsies from human livers. *Acta path microbio scand Sect A*. 1977;85:373-93.
13. Maunsbach AB, Madden SC, Latta H. Variations in fine structure of renal tubular epithelium under different conditions of fixation. *J ultrastructure research*. 1962;6:511-30.
14. Palay S, McGee-Russell SM, Gordon S, Grillo MA. Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide. *The journal of cell biology*. 1962;12:385-410.
15. Maunsbach AB. The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells: II. Effects of varying osmolality, ionic strength, buffer system and fixative concentration of glutaraldehyde solutions. *Journal of ultrastructure research*. 1966;15:283-309.
16. Maunsbach AB, Afzelius BA. Fixatives. *Biomedical electron microscopy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 32-59.
17. Maunsbach AB, Afzelius BA. Fixative vehicle. *Biomedical electron microscopy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 60-79.
18. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *The journal of histochemistry & cytochemistry*. 1985;33(8):845-53.
19. Hayat MA. Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. *Micron and microscopica acta*. 1986;17(2):115-35.
20. Hopwood D. Cell and tissue fixation, 1972-1982. *Histochemical journal*. 1985;17(4):389-442.
21. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The journal of cell biology*. 1965;27(2):137-8.
22. Palade G. A study of fixation for electron microscopy. *J exp med*. 1952;95(3):285-98.
23. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *The journal of cell biology*. 1963;17(1):19-58.
24. Maunsbach AB. The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixatives. *Journal of ultrastructure research*. 1966;15:242-82.
25. Andrews PM, Coffey AK. A technique to reduce fixation artifacts to kidney proximal tubules. *Kidney International*. 1984;25(6):964-8.
26. Bohman S. The ultrastructure of the rat renal medulla as observed after improved fixation methods. *Journal of ultrastructure research*. 1974;47:329-60.
27. Bohman S, Maunsbach AB. Effects on tissue fine structure of variations in colloid osmotic pressure of glutaraldehyde fixatives. *Journal of ultrastructure research*. 1970;30(1):195-208.

28. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(5):852-62.
29. Maunsbach AB, Boulpaep EL. Hydrostatic pressure changes related to paracellular shunt ultrastructure in proximal tubule. *Kidney International*. 1980;17(6):732-48.
30. Welsch U. Harnorgane. *Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier; 2005. p. 449-72.
31. Lang F, Kurtz A. Niere. In: Schmidt RF, Lang F, editors. *Physiologie des Menschen*. 30 ed. Heidelberg: Springer; 2007. p. 683-719.
32. Kriz W. Nieren. In: Drenckhahn D, editor. *Anatomie Band 1*. 17 ed. München: Elsevier; 2008. p. 758-90.
33. Schick MA, Baar W, Bruno RR, Wollborn J, Held C, Schneider R, Flemming S, Schlegel N, Roewer N, Neuhaus W, Wunder C. Balanced hydroxyethylstarch (HES 130/0.4) impairs kidney function in-vivo without inflammation. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137247.
34. Ryan GB, Karnovsky MJ. Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: Role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney International*. 1976;9(1):36-45.
35. Lindström KE, Rönnestedt L, Jaremko G, Haraldsson B. Physiological and morphological effects of perfusing isolated rat kidneys with hyperosmolar mannitol solutions. *Acta physiol scand*. 1999;166(3):231-8.
36. Andrews PM, Cooper M, Verbese J, Ghasemian S, Rogalsky D, Moody P, Chen A, Alexandrov P, Wang HW, Chen Y. Mannitol infusion within 15 min of cross-clamp improves living donor kidney preservation. *Transplantation*. 2014;98(8):893-7.
37. Glaumann B. Effect of mannitol, dextran (macrodex), allopurinol, and methylprednisolone on the morphology of the proximal tubule of the rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows Arch B Cell Path*. 1977;23(4):297-323.
38. Maunsbach AB, Madden SC, Latta H. Light and electron microscopic changes in proximal tubules of rats after administration of glucose, mannitol, sucrose, or dextran. *Laboratory investigation*. 1962;11(6):421-32.
39. Nomani AZ, Nabi Z, Rashid H, Janjua J, Nomani H, Majeed A, Chaudry SR, Mazhar AS. Osmotic nephrosis with mannitol: Review article. *Ren Fail*. 2014;36(7):1169-76.
40. Andrews PM, inventor Patent US5306711 - Organ preservative solution 1994.
41. Ownby CL. Foreword. In: Crang RFE, Klomparens KL, editors. *Artifacts in biological electron microscopy*. New York: Plenum Press; 1988. p. VII-IX.
42. Mollenhauer HH. Artifacts caused by dehydration and epoxy embedding in transmission electron microscopy. *Microscopy research and technique*. 1993;26(26):496-512.
43. Glauert AM, Lewis PR. Dehydration methods. London: Portland Press; 1988. p. 129-46.
44. Arkill KP, Qvortrup K, Starborg T, Mantell JM, Knupp C, Michel CC, Harper SJ, Salmon AHJ, Squire JM, Bates DO, Neal CR. Resolution of the three dimensional structure of components of the glomerular filtration barrier. *BMC Nephrology*. 2014;15(24):1-13.
45. Amann K, Haas CS. What you should know about the work-up of a renal biopsy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(5):1157-61.
46. Amann K, Benz K. [Work-up of a renal biopsy: what is established? What will follow?]. *Pathologe*. 2009;30(2):94-100.
47. Brealey J. Transplant renal biopsies. In: Stirling JW, Curry A, Eyden B, editors. *Diagnostic electron microscopy*. Chichester: Wiley; 2013. p. 55-88.
48. Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney International*. 2002;61(2):387-95.
49. Stirling JW, Curry A. Quality standards for diagnostic electron microscopy. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31(5):365-67.
50. Klomparens KL. Artifacts in ultrathin sectioning. In: Crang RFE, Klomparens KL, editors. *Artifacts in biological electron microscopy*. New York: Plenum Press; 1988. p. 65-79.
51. Reid N. In: Glauert AM, editor. *Ultramicrotomy*. Amsterdam: North-Holland; 1975. p. 1-353.
52. Mollenhauer HH, Bradfute OE. Comparison of surface roughness of sections cut by diamond, sapphire, and glass knives. *Journal of electron microscopy technique*. 1987;6:81-5.
53. Mollenhauer HH. Contamination of thin sections: Some observations on the cause and elimination of "embedding pepper". *Journal of electron microscopy technique*. 1987;5:59-63.
54. Kuo J, Husca GL, Lucas LND. Forming and removing stain precipitates on ultrathin sections. *Stain technology*. 1981;56(3):199-204.
55. Fahrenbach WH. Continuous serial thin sectioning for electron microscopy. *Journal of electron microscopy technique*. 1984;1:387-98.
56. Galey FR, Nilsson SEG. A new method for transferring sections from the liquid surface of the trough through staining solutions to the supporting film of a grid. *Journal of ultrastructure research*. 1966;14:405-10.

57. von Ruhland CJ, Hobot JA. LR White sections as slot grid support films for transmission electron microscopy. *J Microsc.* 2010;240(2):130-4.
58. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120-32.
59. Herrnberger L, Seitz R, Kuespert S, Bosl MR, Fuchshofer R, Tamm ER. Lack of endothelial diaphragms in fenestrae and caveolae of mutant Pivap-deficient mice. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(5):709-24.
60. Blumer MJF, Gahleitner P, Narzt T, Handl C, Ruthensteiner B. Ribbons of semithin sections: An advanced method with a new type of diamond knife. *Journal of Neuroscience Methods.* 2002;2002(1):11-6.
61. Peachey L. Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *The Journal of biophysical and biochemical cytology.* 1958;4(3):233-42.
62. Dykstra MJ, Reus LE. Staining methods for semithins and ultrathins. *Biological electron microscopy: Theory, techniques and troubleshooting.* 2 ed. New York: Kluwer Academic; 2003. p. 175-96.
63. Saalfeld S, Fetter R, Cardona A, Tomancak P. Elastic volume reconstruction from series of ultra-thin microscopy sections. *Nat Methods.* 2012;9(7):717-20.
64. Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh RJ. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology.* 1996;116(13):71-6.
65. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
66. Cardona A, Saalfeld S, Schindelin J, Arganda-Carreras I, Preibisch S, Longair M, Tomancak P, Hartenstein V, Douglas RJ. TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One.* 2012;7(6):e38011.
67. Saalfeld S, Cardona A, Hartenstein V, Tomancak P. As-rigid-as-possible mosaicking and serial section registration of large ssTEM datasets. *Bioinformatics.* 2010;26(12):i57-63.
68. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The journal of cell biology.* 1963;17(1):208-12.
69. Riedelshheimer B, Büchl-Zimmermann S. Färbemethoden. In: Mulisch M, Welsch U, editors. *Romeis Mikroskopische Technik.* 19 ed. Berlin: Springer Spektrum; 2015. p. 171-282.
70. Schnepf E, Hausmann K, Herth W. The osmium tetroxide-potassium ferrocyanide (OsFeCN) staining technique for electron microscopy: A critical evaluation using ciliates, algae, mosses, and higher plants. *Histochemistry.* 1982;76:261-71.
71. Langford LA, Coggeshall RE. The use of potassium ferricyanide in neural fixation. *Anat Rec.* 1980;197(3):297-303.
72. Möbius W, Cooper B, Kaufmann WA, Imig C, Ruhwedel T, Snaidero N, Saab AS, Varoquaux F. Electron microscopy of the mouse central nervous system. *Methods in cell biology.* 962010. p. 475-512.
73. Bergeron M, Gaffiero P, Thiéry G. Segmental variations in the organization of the endoplasmic reticulum of the rat nephron. *Cell Tissue Res.* 1987;247(1):215-25.
74. Lucic V, Rigort A, Baumeister W. Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ. *J Cell Biol.* 2013;202(3):407-19.
75. Sokol E, Kramer D, Diercks GFH, Kuipers J, Jonkman MF, Pas HH, Giepmans BNG. Large-scale electron microscopy maps of patient skin and mucosa provide insight into pathogenesis of blistering diseases. *J Invest Dermatol.* 2015;135(7):1763-70.
76. Wacker I, Chockley P, Bartels C, Spomer W, Hofmann A, Gengenbach U, Singh S, Thaler M, Grabher C, Schroder RR. Array tomography: Characterizing FAC-sorted populations of zebrafish immune cells by their 3D ultrastructure. *J Microsc.* 2015;259(2):105-13.
77. Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *The American journal of physiology.* 1997;273(1):F170-F7.
78. Ohno S, Terada N, Fujii Y, Ueda H, Takayama I. Dynamic structure of glomerular capillary loop as revealed by an in vivo cryotechnique. *Virchows Archiv.* 1996;427(5):519-27.
79. Yu Y, Leng CG, Terada N, Ohno S. Scanning electron microscopic study of the renal glomerulus by an in vivo cryotechnique combined with freeze-substitution. *Journal of Anatomy.* 1998;192(4):595-603.
80. Maunsbach AB, Afzelius BA. Micrograph interpretation. *Biomedical electron microscopy.* San Diego: Academic Press; 1999. p. 1-30.
81. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney International.* 1978;14(1):31-49.

82. Shanley PF, Rosen MD, Brezis M, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. *American Journal Of Pathology*. 1985;122(3):462-8.
83. Zierold K. Cryoultramicrotomy. In: Steinbrecht R, Zierold K, editors. *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Berlin: Springer; 1987. p. 132-48.
84. Shi SR, Shi Y, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(1):13-32.
85. Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS, Isacke CM. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*. 2008;9(13).
86. Ripper D, Schwarz H, Stierhof YD. Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. *Biol Cell*. 2008;100(2):109-23.
87. Doughty MJ, Bergmanson JP, Blocker Y. Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde. *Tissue & cell*. 1997;29(5):533-47.
88. Doughty MJ, Bergmanson JPG, Blocker Y. Impact of glutaraldehyde versus glutaraldehyde-formaldehyde fixative on cell organization in fish corneal epithelium. *Tissue & Cell*. 1995;27(6):701-12.
89. Wisse E. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(23):2851-66.
90. Weibel ER, Limacher W, Bachofen H. Electron microscopy of rapidly frozen lungs: Evaluation on the basis of standard criteria. *Journal of applied physiology*. 1982;53(2):516-27.
91. Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D, Weibel ER. Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis: Credits and limitations. *Journal of applied physiology Respir Environ Exerc Physiol*. 1982;53(2):528-33.
92. Tapia JC, Kasthuri N, Hayworth KJ, Schalek R, Lichtman JW, Smith SJ, Buchanan J. High-contrast en bloc staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy. *Nat Protoc*. 2012;7(2):193-206.
93. Mollenhauer HH. Artifacts caused by dehydration and epoxy embedding in transmission electron microscopy. *Artifacts in biological electron microscopy*. Crang, R. F. E. Klomparens, K. L. ed. New York 1988. p. 43-64.
94. O'Hare KH, Braunschweig RJ. The effects of various fixative-buffer combinations on lung fine structure. *Anat Rec*. 1975;181(3):545-59.
95. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Aneman A, Madsen KR, Moller MH, Elkjaer JM, Poulsen LM, Bendtsen A, Winding R, Steensen M, Berezowicz P, Soe-Jensen P, Bestle M, Strand K, Wiis J, White JO, Thornberg KJ, Quist L, Nielsen J, Andersen LH, Holst LB, Thormar K, Kjaeldgaard AL, Fabritius ML, Mondrup F, Pott FC, Moller TP, Winkel P, Wetterslev J. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med*. 2012;367(2):124-34.
96. Christensen EI, Maunsbach AB. Effects of dextran on lysosomal ultrastructure and protein digestion in renal proximal tubule. *Kidney International*. 1979;16(3):301-11.
97. McDonald KL. Out with the old and in with the new: Rapid specimen preparation procedures for electron microscopy of sectioned biological material. *Protoplasma*. 2014;251(2):429-48.
98. Ries E, Gersch M. Gibt das fixierte Präparat ein Äquivalentbild der lebenden Zelle? *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1936;25(1):14-33.
99. McDonald KL, Morphey M, Verkade P, Müller-Reichert T. Recent advances in high-pressure freezing: Equipment- and specimen-loading methods. *Methods Mol Biol*. 2007;369(8):143-73.
100. Gilkey JC, Staehelin LA. Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *Journal of electron microscopy technique*. 1986;3(2):177-210.
101. Vanhecke D, Graber W, Studer D. Rapidly excised and cryofixed rat tissue. *Methods in cell biology*. 2010;96(10):513-27.
102. Studer D, Humbel BM, Chiquet M. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(5):877-89.
103. Tokuyasu KT. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *Journal of cell biology*. 1973;57(2):551-65.
104. Elder HY. Cryoprotection. In: Bullock GR, Petrusz P, editors. *Techniques in immunocytochemistry Volume 4*. London: Academic Press; 1989. p. 14-5.
105. Keller GA, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. An improved procedure for immunoelectron microscopy: Ultrathin plastic embedding of immunolabeled ultrathin frozen sections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(18):5744-7.
106. Takizawa T, Anderson CL, Robinson JM. A new method to enhance contrast of ultrathin cryosections for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(1):31-9.
107. Micheva KD, Smith SJ. Array tomography. *Neuron*. 2007;5(55):25-36.

108. Loussert Fonta C, Humbel BM. Correlative microscopy. *Arch Biochem Biophys*. 2015;581:98-110.
109. Vanhecke D, Graber W, Herrmann G, Al-Amoudi A, Egli P, Studer D. A rapid microbiopsy system to improve the preservation of biological samples prior to high-pressure freezing. *Journal of microscopy*. 2003;212:3-12.
110. Ohno N, Terada N, Saitoh S, Zhou H, Fujii Y, Ohno S. Recent development of in vivo cryotechnique to cryobiopsy for living animals. *Histology and Histopathology*. 2007;22(11):1281-90.
111. Shimo S, Saitoh S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S. Morphological and immunohistochemical analyses of soluble proteins in mucous membranes of living mouse intestines by cryotechniques. *Microscopy (Oxf)*. 2015;64(3):189-203.
112. Morin F, Crevier C, Bouvier G, Lacaille JC, Beaulieu C. A fixation procedure for ultrastructural investigation of synaptic connections in resected human cortex. *Brain Res Bull*. 1997;44(2):205-10.
113. Schultz RL, Karlsson U. Fixation of the central nervous system for electron microscopy by aldehyde perfusion. *Journal of ultrastructure research*. 1965;12:187-206.
114. Kalimo H. The role of the blood-brain barrier in perfusion fixation of the brain for electron microscopy. *The Histochemical journal*. 1976;8(1):1-12.
115. Giberson RT, Demaree RS, Nordhausen RW. Four-hour processing of clinical/diagnostic specimens for electron microscopy using microwave technique. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1997;9(1):61-7.
116. In: Giberson RT, Demaree RS, editors. *Microwave techniques and protocols*. Totowa: Humana Press; 2001.
117. Williams TH, Jew JY. An improved method for perfusion fixation of neural tissues for electron microscopy. *Tissue and Cell*. 1975;7(3):407-18.
118. Kuwajima M, Mendenhall JM, Harris KM. Large-volume reconstruction of brain tissue from high-resolution serial section images acquired by SEM-based scanning transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 2013;950:253-73.
119. Cavusoglu I, Kahveci Z, Sirmali SA. Rapid staining of ultrathin sections with the use of a microwave oven. *Journal of microscopy*. 1998;192(Pt 2):212-6.
120. Harris KM, Perry E, Bourne J, Feinberg M, Ostroff L, Hurlburt J. Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *J Neurosci*. 2006;26(47):12101-3.
121. Mulisch M. Präparation für die TEM. In: Mulisch M, Welsch U, editors. *Romeis Mikroskopische Technik*. 19 ed. Berlin: Springer Spektrum; 2015. p. 121-44.
122. Dykstra MJ, Reus LE. Support films. *Biological electron microscopy: Theory, techniques and troubleshooting*. 2 ed: Kluwer Academic; 2003. p. 241-58.
123. Faas FG, Avramut MC, van den Berg BM, Mommaas AM, Koster AJ, Ravelli RB. Virtual nanoscopy: generation of ultra-large high resolution electron microscopy maps. *J Cell Biol*. 2012;198(3):457-69.
124. Hayworth KJ, Morgan JL, Schalek R, Berger DR, Hildebrand DG, Lichtman JW. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: A multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front Neural Circuits*. 2014;8(68):1-18.
125. Meyer J, Pare G. Telepathology impacts and implementation challenges: A scoping review. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(12):1550-7.
126. Kerr WT, Lau EP. The future of medical diagnostics: Large digitized databases. *Yale journal of Biology and Medicine*. 2012;85:363-77.
127. Remuzzi A, Brenner BM, Pata V, Tebaldi G, Mariano R, Belloro A, Remuzzi G. Three-dimensional reconstructed glomerular capillary network: Blood flow distribution and local filtration. *The American journal of physiology*. 1992;263(3 Pt 2):F526-F72.
128. Antiga L, Ene-lordache B, Remuzzi G, Remuzzi A. Automatic generation of glomerular capillary topological organization. *Microvasc Res*. 2001;62(3):346-54.
129. Roth JA, Wilson TD, Sandig M. The development of a virtual 3D model of the renal corpuscle from serial histological sections for E-learning environments. *Anat Sci Educ*. 2015;8(6):574-83.
130. Manelli A, Sangiorgi S, Binaghi E, Raspanti M. 3D analysis of SEM images of corrosion casting using adaptive stereo matching. *Microsc Res Tech*. 2007;70(4):350-4.
131. Wagner R, Van Loo D, Hossler F, Czymmek K, Pauwels E, Van Hoorebeke L. High-resolution imaging of kidney vascular corrosion casts with Nano-CT. *Microsc Microanal*. 2011;17(2):215-9.
132. Torres R, Velazquez H, Chang JJ, Levene MJ, Moeckel G, Desir GV, Safirstein R. Three-dimensional morphology by multiphoton microscopy with clearing in a model of cisplatin-induced CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):1102-12.
133. Cheng D, Shami GJ, Morsch M, Chung RS, Braet F. Ultrastructural mapping of the zebrafish gastrointestinal system as a basis for experimental drug studies. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8758460.

134. Watanabe S, Rost BR, Camacho-Perez M, Davis MW, Sohl-Kielczynski B, Rosenmund C, Jorgensen EM. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*. 2013;504(7479):242-7.
135. Müller-Reichert T, Hohenberg H, O'Toole ET, McDonald KL. Cryoimmobilization and three-dimensional visualization of *C. elegans* ultrastructure. *Journal of microscopy*. 2003;212(1):71-80.
136. Cheng D, Shen S, Chen XM, Pollock C, Braet F. Application of transmission electron tomography for modeling the renal corpuscle. *Pathol Res Pract*. 2013;209(11):731-4.
137. Lee KC, Mak LS. Virtual electron microscopy: a simple implementation creating a new paradigm in ultrastructural examination. *Int J Surg Pathol*. 2011;19(5):570-5.
138. Maunsbach AB, Afzelius BA. Sampling and quantification. *Biomedical electron microscopy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 455-76.
139. Sullivan KA, Brown MS, Harmon L, Greene DA. Digital electron microscopic examination of human sural nerve biopsies. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2003;8(4):260-70.
140. Dane MJ, van den Berg BM, Avramut MC, Faas FG, van der Vlag J, Rops AL, Ravelli RB, Koster BJ, van Zonneveld AJ, Vink H, Rabelink TJ. Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1532-40.
141. Scala C, Pasquinelli G, Martegani F, Laschi R. Use of secondary electron detectors for compositional studies on embedded biological material. *Scanning electron microscopy*. 1985;4:1709-18.
142. Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*. 2004;2(11):1900-9.
143. Horstmann H, Korber C, Satzler K, Aydin D, Kuner T. Serial section scanning electron microscopy (S3EM) on silicon wafers for ultra-structural volume imaging of cells and tissues. *PLoS One*. 2012;7(4):e35172.
144. Eberle AL, Schalek R, Lichtman JW, Malloy M, Thiel B, Zeidler D. Multiple-beam scanning electron microscopy. *Microscopy today*. 2015;23(2):12-8.
145. Terasaki M, Shemesh T, Kasthuri N, Klemm RW, Schalek R, Hayworth KJ, Hand AR, Yankova M, Huber G, Lichtman JW, Rapoport TA, Kozlov MM. Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell*. 2013;154(2):285-96.
146. Nebesarova J, Hozak P, Frank L, Stepan P, Vancova M. The cutting of ultrathin sections with the thickness less than 20 nm from biological specimens embedded in resin blocks. *Microsc Res Tech*. 2016;79(6):512-7.
147. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K, Ohta K, Sakai T. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci Rep*. 2015;5:8993.
148. Ichimura K, Kakuta S, Kawasaki Y, Miyaki T, Nonami T, Miyazaki N, Nakao T, Enomoto S, Arai S, Koike M, Murata K, Sakai T. Morphological process of podocyte development revealed by block-face scanning electron microscopy. *J Cell Sci*. 2017;130(1):132-42.
149. Eberle AL, Mikula S, Schalek R, Lichtman J, Knothe Tate ML, Zeidler D. High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope. *J Microsc*. 2015;259(2):114-20.
150. Nguyen HB, Thai TQ, Saitoh S, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Fujitani H, Otobe H, Ohno N. Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging. *Sci Rep*. 2016;29(6):1-10.
151. Knott G, Genoud C. Is EM dead? *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 20):4545-52.
152. de Haro T, Furness P. Current and future delivery of diagnostic electron microscopy in the UK: results of a national survey. *J Clin Pathol*. 2012;65(4):357-61.
153. Giberson RT, Austin RL, Charlesworth J, Adamson G, Herrera GA. Microwave and digital imaging technology reduce turnaround times for diagnostic electron microscopy. *Ultrastructural Pathology*. 2009;27(3):187-96.
154. Pavlisko EN, Howell DN. The continued vital role of electron microscopy in the diagnosis of renal disease/dysfunction. *Ultrastruct Pathol*. 2013;37(1):1-8.
155. Nordmeyer D, Stumpf P, Groger D, Hofmann A, Enders S, Riese SB, Dervede J, Taupitz M, Rauch U, Haag R, Ruhl E, Graf C. Iron oxide nanoparticles stabilized with dendritic polyglycerols as selective MRI contrast agents. *Nanoscale*. 2014;6(16):9646-54.
156. Soenen SJ, De Cuyper M, De Smedt SC, Braeckmans K. Investigating the toxic effects of iron oxide nanoparticles. *Methods Enzymol*. 509. 2012/05/10 ed2012. p. 195-224.
157. Elnaggar YSR, Etman SrM, Abdelmonsif DA, Abdallah OY. Intranasal piperine-loaded chitosan nanoparticles as brain-targeted therapy in Alzheimer's disease: Optimization, biological efficacy, and potential toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(10):3544-56.
158. Fanizza C, Casciardi S, Incoronato F, Cavallo D, Ursini CL, Ciervo A, Maiello R, Fresegna AM, Marcelloni AM, Lega D, Alvino A, Baiguera S. Human epithelial cells exposed to functionalized multiwalled carbon nanotubes: interactions and cell surface modifications. *J Microsc*. 2015;259(3):173-84.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Apparaturen zur Perfusionsfixierung	13
Abbildung 2. Anfertigung von Semidünnschnittserien	21
Abbildung 3. Anfertigung von Ultradünnschnittpräparaten für TEM-Nanotomie	24
Abbildung 4. Anfertigung von Ultradünnschnittpräparaten für REM-Array Tomographie.....	25
Abbildung 5. Kriterien zur Beurteilung der Mikroanatomie von Nierengewebe.....	40
Abbildung 6. Kriterien zur Beurteilung der Ultrastruktur von Nierengewebe.	41
Abbildung 7. Optimierte Membrandarstellung durch reduzierte Osmierung.....	43
Abbildung 8. Protokoll 1; Semidünnschnitt-Morphologie.	45
Abbildung 9. Protokoll 1; TEM-Morphologie.	47
Abbildung 10. Protokoll 1; TEM- und REM-Morphologie.....	48
Abbildung 11. Protokoll 1 und Variation; Histochemie, Immunhistochemie und ISH.	49
Abbildung 12. Variationen von Protokoll 1; Immunzytochemie.....	50
Abbildung 13. Variation von Protokoll 1; Semidünnschnitt-Morphologie.....	52
Abbildung 14. Variationen von Protokoll 1; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.....	53
Abbildung 15. Protokoll 2; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.....	56
Abbildung 16. Protokoll 2; TEM-Morphologie.	57
Abbildung 17. Variation von Protokoll 2; Immunhistochemie und TEM-Morphologie.....	58
Abbildung 18. Variation von Protokoll 2; colorierte REM-Aufnahme eines Podozyten.	59
Abbildung 19. Variation von Protokoll 2; TEM-Morphologie.	60
Abbildung 20. Variation von Protokoll 2; TEM-Morphologie.	61
Abbildung 21. Variation von Protokoll 2; Semidünnschnitt-Morphologie.....	62
Abbildung 22. Protokoll 3; Semidünnschnitt-, TEM- und REM-Morphologie.	65
Abbildung 23. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.....	67
Abbildung 24. Variation von Protokoll 3; REM-Morphologie.....	68
Abbildung 25. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.....	69
Abbildung 26. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt-Morphologie.....	70
Abbildung 27. Variation von Protokoll 3; Semidünnschnitt-, TEM- und REM-Morphologie.....	71
Abbildung 28. Fixierung von Gehirngewebe, TEM-Morphologie.....	74
Abbildung 29. Fixierung von Dünndarm, Semidünnschnitt-Morphologie.....	77
Abbildung 30. Fixierung von Lebergewebe, Semidünnschnitt- und TEM-Morphologie.....	79
Abbildung 31. 3D-Rekonstruktionen anhand von Semidünnschnittserien.....	81
Abbildung 32. Elektronentomographie von Membranzisternen des gER.....	83
Abbildung 33. TEM-Nanotomie von Nieren- und Gehirngewebe.....	86
Abbildung 34. Funktionsweise der REM-Array Tomographie.....	89
Abbildung 35. REM-Array Tomographie, Einzelbild.....	91
Abbildung 36. Vergleich von konventionellem TEM-Ansatz mit REM-Array Tomographie.....	92
Abbildung 37. Vergleich von konventionellem TEM-Ansatz mit REM-Array Tomographie.....	93
Abbildung 38. REM-Array Tomographie, Nanotomie-Datensatz im Einzelstrahl-REM.....	94
Abbildung 39. REM-Array Tomographie, 3D-Datensatz.....	96
Abbildung 40. REM-Array Tomographie, Nanotomie-Datensatz im Mehrstrahl-REM.....	98
Abbildung 41. Mögliche Hochdurchsatzverfahren für Präparate der REM-Array Tomographie.....	135

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Carsten Dittmayer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Optimierte Verfahren zur morphologischen und histochemischen Auswertung der Niere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet (s.u.).

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Carsten Dittmayer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder RR, Bachmann S. Modern field emission scanning electron microscopy provides new perspectives for imaging kidney ultrastructure. *Kidney International*, akzeptiert am 17.05.2018.

Beitrag im Einzelnen: Optimierung von Fixierung, Einbettung und Schnittpräparation des Nierengewebes der verwendeten Versuchstiere als Ausgangsmaterial für die verwendeten mikroskopischen Techniken. Etablierung der präparatorischen Ansätze auch speziell für Array tomography (Schnittpräparation, Kontrastierung) und der Datenauswertung (u.a. Alignierung in Fiji/ TrakEM2, Segmentierung und Visualisierung in IMOD/3dmod). Schreib- und Korrekturarbeiten des Papers zu großen Anteilen inkl. Komposition (Bildbearbeitung, Zuschnitt, Maßstabbalken, Beschriftung) aller Bildtafeln per Corel Draw. Anteile an den Bildtafeln des Papers: Abbildung 1; Erstellung des Schemas, REM-Aufnahme (B), TEM-Aufnahmen (D,G,I). Abbildung 3; Alignment des Datensatzes (Photoshop CS4). Abbildung 4; Alignment des Datensatzes (Fiji/ TrakEM2). Abbildung S2; Schnittpräparation und Datenverarbeitung inkl. Segmentierung und Modellierung. Abbildung S3; Konvertierung der Modelldatei ist stl-Datei für 3D-Druck. Abbildung S5; Schnittpräparation und Datenverarbeitung inkl. Segmentierung und Modellierung. Graphical abstract; Konzept und Komposition per Corel Draw.

Publikation 2:

Deák VA, Skroblin P, Dittmayer C, Knobeloch KP, Bachmann S, Klussmann E. The A-kinase anchoring protein GSKIP regulates GSK3 β activity and controls palatal shelf fusion in mice. *J Biol Chem*. 2016; 291(2):681-90.

Beitrag im Einzelnen: Mehrfache manuelle Paraffineinbettungen von kompletten Maus-Embryonen mit Anfertigung von Paraffin-Schnittserien (Schneiden, Färben, Eindecken), mikroskopische Fotodokumentation durch Einzelbilder und großflächige manuelle Digitalisierung durch Panoramabilder mit histomorphologischer Auswertung. Weiterhin ultrastrukturelle Auswertung von Lungengewebe am TEM mit Fotodokumentation (TEM im Paper nicht enthalten).

Anteile an den Bildtafeln des Papers: Abbildung 3; Paraffinschnitte und Fotos (A). Abbildung 4; Paraffinschnitte und Fotos (A).

Publikation 3:

Willière Y, Borschewski A, Patzak A, Nikitina T, Dittmayer C, Daigeler AL, Schuelke M, Bachmann S, Mutig K. Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption. *Sci Rep*. 2018; 8(1):545.

Beitrag im Einzelnen: Optimierung von Fixierung und Schnittpräparation zur verbesserten ultrastrukturellen Auswertung des Nierengewebes der verwendeten Versuchstiere. Anteilig ultrastrukturelle Auswertung mit Fotodokumentation.

Anteile an den Bildtafeln des Papers: Abbildung 2; Optimierung der Gewebepräparation und Schnittpräparation, TEM-Aufnahmen (2e-h).

Publikation 4: Abstract (Erhalt des Feroze Ghadially Awards)

Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder R, Bachmann S. Scanning electron microscopy of thin sections: A technique to overcome limitations in kidney ultrastructural research. *Ultrastuct Pathol*. 2017;41(1):119-120.

Beitrag im Einzelnen: Schnittpräparation und TEM-Aufnahmen, Schreiben des Abstracts.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Publikation; Erstautorenschaft

Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder RR, Bachmann S. Modern field emission scanning electron microscopy provides new perspectives for imaging kidney ultrastructure. *Kidney International*, akzeptiert am 17.05.2018 (ID KI-01-18-0138.R1; siehe beiliegenden "Acceptance Letter"). (Impact Factor 2016; 8,395)

Publikationen; Koautorenschaften

Deák VA, Skroblin P, Dittmayer C, Knobeloch KP, Bachmann S, Klussmann E. The A-kinase anchoring protein GSKIP regulates GSK3 β activity and controls palatal shelf fusion in mice. *J Biol Chem*. 2016; 291(2):681-90. (Impact Factor 2016; 4,125)

Willière Y, Borschewski A, Patzak A, Nikitina T, Dittmayer C, Daigeler AL, Schuelke M, Bachmann S, Mutig K. Caveolin 1 Promotes Renal Water and Salt Reabsorption. *Sci Rep*. 2018; 8(1):545. (Impact Factor 2016; 4,259)

Abstracts (Posterpräsentationen als Erstautor, Koautorenschaften nicht aufgelistet)

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 2014:

A recipe for an „all purpose“ perfusion fixation of rodent kidneys for morphology and cytochemistry. Dittmayer C, Horn J, Riskowsky K, Schrade P, Mutig K, Bachmann S.

Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Salzburg 2014:

A recipe for an „all purpose“ perfusion fixation of rodent kidneys for morphology and cytochemistry. Dittmayer C, Bachmann S.

Podocyte conference, Freiburg 2014:

A Recipe for an „All Purpose“ Perfusion Fixation of Rodent Kidneys for Morphology and Cytochemistry. Dittmayer C, Bachmann S.

Podocyte conference, Israel 2016:

Scanning electron microscopy of thin sections: New perspectives for imaging podocyte ultrastructure. Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder R, Bachmann S.

Ultrapath XVIII, Lissabon 2016:

Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder R, Bachmann S. Scanning electron microscopy of thin sections: A technique to overcome limitations in kidney ultrastructural research. *Ultrastuct Pathol*. 2017;41(1):119-120.

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 2016:

Digitale Elektronenmikroskopie: Potential für nephrologische Forschung. Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder R, Labes R, Mildner M, Bachmann S.

Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft 2016, Göttingen 2016:

Big data in electron microscopy; improved examination of kidney tissue using large-scale two dimensional datasets. Dittmayer C, Völcker E, Wacker I, Schröder R, Mildner M, Bachmann S.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Sebastian Bachmann für die Betreuung meiner Dissertation. Mit großem Engagement und stets sehr kritischer Beurteilung meiner licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen erleichterte er mir die Umsetzung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt weiterhin den technischen Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Anatomie: Hier besonders Herrn John Horn für die Einarbeitung in EM-Techniken und Frau Kerstin Riskowsky für ihre große Unterstützung im Labor, speziell bei Planung und Vorbereitung von Perfusionsfixierungen. Weiterhin danke ich Frau Petra Schrade aus der Core Facility Elektronenmikroskopie für die zahlreichen EM-Präparationen.

Mein Dank gilt außerdem Eckhard Völcker (Penard labs) für die Hilfe bei Etablierungsarbeiten zur REM-Array Tomographie.

Ich bedanke mich bei Dr. Irene Wacker und Prof. Dr. Rasmus Schröder (Universität Heidelberg) für die Hilfe bei Digitalisierungen von Ultradünnschnitten mit neuen REM-Ansätzen.

Durch die großzügige Unterstützung von Herr Helmut Gnaegi von Diatome in Form von Diamantmessern wurden meine Schnittpräparationen für EM-Ansätze allgemein deutlich erleichtert; besonders der Zugang zu den neuen REM-Ansätzen wurde mir hierdurch entscheidend gebahnt.

Mein weiterer Dank insbesondere für Gerätenutzungen und wertvollen Austausch bezüglich der neuen EM-Techniken gilt den Mitarbeitern von Carl Zeiss Microscopy, insbesondere Dr. Anna Lena Eberle, Dr. Jörg Lindenau, Dr. Stephan Nickell, Herrn Tomasz Garbowsky und Dr. Geertje Bammert.

Meiner Familie gilt mein besonderer Dank, sie hat mich während der langen Zeit des Studiums und der Promotionsarbeit uneingeschränkt unterstützt und stand mir mit Ratschlägen zur Seite. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht realisieren können.