

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

**Struktur und 3D-Organisation der Kapillarwand-assoziierten Zellen
im murinen Myokard**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Peter Michelbach
aus Langenau

Würzburg, März 2023

Referent: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Korreferent: Prof. Dr. med. Brenda Gerull

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

Diese Arbeit ist meiner geliebten Ehefrau und Mutter unserer Zwillinge
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Herz-Kreislauf-erkrankungen.....	1
1.2	Perizyten.....	2
1.2.1	Entdeckung und Namensgebung.....	2
1.2.2	Kardiale Perizyten.....	4
1.2.2.1	Embryologie.....	4
1.2.2.2	Charakterisierung und Anatomie.....	4
1.2.2.3	Marker.....	6
1.2.2.4	Funktionen.....	8
1.2.2.4.1	Angiogenese.....	8
1.2.2.4.2	Kontraktile Funktion.....	9
1.2.2.5	Rolle der Perizyten in der Pathophysiologie des Herzens.....	9
1.2.2.5.1	Herzfibrose.....	9
1.2.2.5.2	Myokardinfarkt.....	11
1.2.3	Therapeutisches Potential.....	11
1.3	Kapillarwand-assoziierte Zellen im Myokard.....	13
1.4	Fragestellung und Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Versuchstiere.....	16
2.1.2	Materialien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	16
2.1.3	Immunfärbung.....	18
2.1.4	Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM).....	21
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	TEM.....	24
2.2.1.1	Koventionelles Fixierungs- und Kontrastierungsfahren.....	24
2.2.1.2	Schnittherstellung.....	25

2.2.1.3	Kontrastierung.....	26
2.2.2	DAB – Färbung	27
2.2.3	Serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie	29
2.2.3.1	Perfusion	29
2.2.3.2	Fixierung und Kontrastierung	30
2.2.4	Elektronenmikroskopie	32
2.2.4.1	TEM	32
2.2.4.2	SBF-SEM	32
2.2.5	Bildverarbeitung.....	33
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Etablierung eines Protokolls zur optimalen Darstellung der Zellen der kardialen Mikrogefäße	35
3.1.1	Konventionelle Fixierung und Kontrastierung	36
3.1.2	Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für die serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie	38
3.1.3	Direkter Vergleich der beiden Protokolle	40
3.2	Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze mittels serieller Block-face Rasterelektronenmikroskopie und 3D- Rekonstruktion ausgewählter Abschnitte des Mikrogefäßsystems	42
3.2.1	Analyse und Rekonstruktion von ROI 03.....	43
3.2.2	Analyse und Rekonstruktion von ROI 04.....	49
3.2.3	Analyse und Rekonstruktion von ROI 06.....	54
3.2.4	Analyse und Rekonstruktion von ROI 02.....	61
3.2.5	Analyse und Rekonstruktion von ROI 01	66
3.2.6	Analyse und Rekonstruktion von ROI 00.....	76
3.3	Immunelektronenmikroskopischer Nachweis der Kapillarwand- assoziierten Zellen	84

3.3.1	Expression von CD34 in Kapillarwand-assoziierten Zellen.....	85
3.3.2	Expression von CD44 in Kapillarwand-assoziierten Zellen.....	86
3.3.3	Expression von Flk-1 in Kapillarwand-assoziierten Zellen.....	87
3.3.4	Negativkontrollen für CD34, CD44, Flk-1	88
4	Diskussion.....	89
4.1	Vergleich der konventionellen Fixierung und Kontrastierung mit der für die SBF-SEM optimierten Fixierung und Kontrastierung	91
4.1.1	Konventionelle Fixierung und Kontrastierung.....	91
4.1.2	Optimierte Fixierung und Kontrastierung für die SBF-SEM.....	92
4.2	Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze der kardialen Mikrovaskulatur mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM)	94
4.2.1	Rekonstruktion der Basallamina	96
4.2.2	Rekonstruktion der kardialen Perizyten	96
4.2.3	Rekonstruktion der kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen	97
4.2.4	Charakterisierung der kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen.....	98
4.3	Einordnung und Ausblick.....	100
5	Zusammenfassung	101
	Literaturverzeichnis	103
I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis	IV
III.	Tabellenverzeichnis	VII
IV.	Danksagung	IX

1 Einleitung

1.1 Herzkreislauferkrankungen

Im Jahr 2018 starben in Deutschland 345.274 Menschen an den Folgen von Herzkreislauferkrankungen (HKE). Das entspricht 36,2% aller Sterbefälle [3].

Damit stellen HKE die häufigste Todesursache, noch vor Krebserkrankungen in Deutschland, aber auch weltweit dar. Der Begriff HKE ist nicht eindeutig definiert, umfasst jedoch Erkrankungen des Herzens und der Vaskulatur wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Thrombose, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz. Für die einzelnen Krankheiten werden das Zusammenwirken endogener und exogener Einflüsse verantwortlich gemacht. Obwohl HKE sich durch eine Reihe von Symptomen wie Schwindelanfälle, Herzrhythmusstörungen, Schmerzen im Brustkorb, allgemeines Schwächegefühl, Atemnot und Wassereinlagerung bemerkbar machen, bleibt eine Erkrankung häufig lange unbemerkt und führt in vielen Fällen zum Tode. Die Therapie stützt sich v.a. auf Medikamente wie Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer), Betablocker, Diuretika und Antikoagulantien. HKE-bedingte Gesundheitskosten bezifferten sich im Jahr 2015 auf 46,4 Milliarden Euro. Dieser mit 13,7% größte Anteil an den gesamten Gesundheitskosten stellt somit auch eine gesellschaftliche Herausforderung dar [4].

Aus diesem Grund wurden und werden weitere Anstrengungen unternommen, die Pathomechanismen der verschiedenen HKE weiter aufzuklären. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Hinweise auf eine Beteiligung eines speziellen vaskulären Zelltyps, den Perizyten, gefunden. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher auf diesen Zelltyp eingegangen werden.

1.2 Perizyten

1.2.1 Entdeckung und Namensgebung

Im Jahre 1873 entdeckte der französische Wissenschaftler Charles Benjamin Rouget eine bisher noch unbekannt Population von Zellen, die mit kleinen Blutgefäßen assoziiert war [5]. Diese kontraktile Zellen wurden zunächst nach ihrem Entdecker als „Rouget-Zellen“ bezeichnet. Rougets Entdeckung wurde jedoch erst im frühen 20. Jahrhundert bestätigt. Der deutsche Wissenschaftler Karl Wilhelm Zimmermann benannte die Zellen aufgrund ihrer anatomischen Position in peri-endothelialer Lage als Perizyten [6]. Das Wort leitet sich vom lateinischen „peri“ für um und „cyte“ von dem altgriechischen Wort „kytos“ für Zelle ab.

Perizyten umgeben kleine Blutgefäße wie präkapilläre Arteriolen, Kapillaren (Abbildung 1) und postkapilläre Venolen. Zusammen bilden diese Blutgefäße die Mikrozirkulation und sind für einen Großteil des Stoffaustausches zwischen Blut und Geweben verantwortlich.

Zuerst wurden den Perizyten nur eine Stützfunktion zur Stabilisierung der Gefäßstruktur zugeschrieben. Durch den Einsatz neuer molekularbiologischer Methoden sowie mikroskopischer Verfahren konnten aber in den letzten Jahren neue Erkenntnisse zur Beteiligung von Perizyten an der Regulierung des Blutflusses, der Angiogenese sowie der Entstehung von Fibrosierung gewonnen werden.

Kapillare, kontinuierlicher Typ

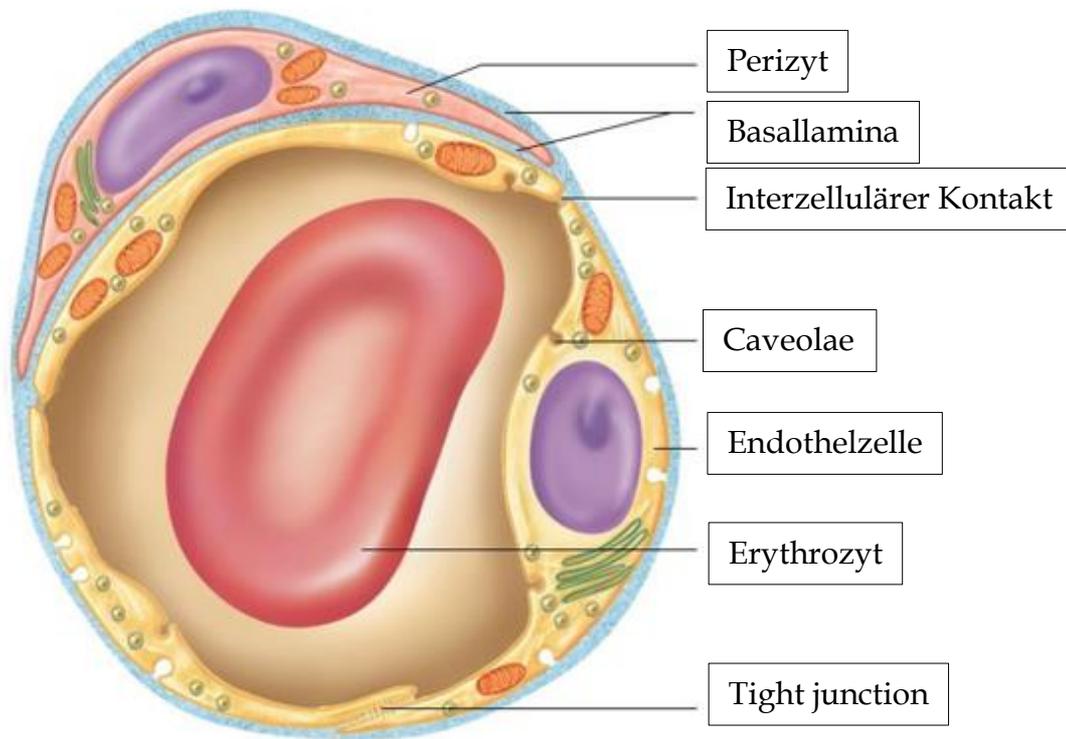


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Kapillare. Kontinuierlicher Typ
Modifiziert nach [1].

1.2.2 Kardiale Perizyten

1.2.2.1 Embryologie

Die genaue Identität der Vorläufer kardialer Perizyten bzw. der Mechanismus ihrer Rekrutierung ist derzeit noch unbekannt. Es gibt Anhaltspunkte, die darauf hinweisen, dass unterschiedliche Quellen während der Entwicklung eine Rolle spielen. Generell unterscheiden sich die Perizyten in ihrer Embryologie nicht nur zwischen verschiedenen Geweben, sondern auch innerhalb eines Organs. Es können also verschiedene Subpopulationen von Perizyten vorliegen, die sich in Morphologie, Verteilung und Funktion unterscheiden. Es wird angenommen, dass kardiale Perizyten aus dem Epikard stammen, welches eine einzelne Schicht abgeflachter Epithelzellen darstellt [7]. Epikardiale Zellen können sich während der Herzentwicklung zu mesenchymalen Zellen umwandeln (Epithelial-Mesenchymal-Transition: EMT), die in das sich entwickelnde Myokard einwandern und dort die Entstehung von kardialen Fibroblasten und Perizyten sowie Blutgefäßen begünstigen [8, 9]. Andere Studien deuten darauf hin, dass kardiale Perizyten von mesenchymalen Angioblasten abstammen und damit mesothelialen Ursprungs sind [10, 11].

1.2.2.2 Charakterisierung und Anatomie

Im Gehirn beträgt das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen 1:1 und ist damit als hoch einzustufen. In der Skelettmuskulatur beträgt dieses Verhältnis hingegen nur etwa 1:100 [12, 13]. Im Herzen sind die Perizyten die am zweithäufigsten vorkommenden Zellen nach den Endothelzellen. Das Verhältnis liegt bei 1:2 oder 1:3 [14].

Perizyten können lichtmikroskopisch mit vaskulären glatten Muskelzellen verwechselt werden, die in Arteriolen vorkommen. Beide Zelltypen besitzen intermediäre Filamente wie Vimentin und kontraktile Filamente wie glattmuskuläres alpha-Aktin und können so den Blutfluss durch Vasodilatation

und Vasokonstriktion beeinflussen. Eine genaue Unterscheidung von Perizyten und glatten Muskelzellen wird durch elektronenmikroskopische Analysen möglich. Perizyten sind deutlich flacher als glatte Muskelzellen und besitzen einen spindelförmigen Zelleib. Sie haben einen runden Zellkörper und ausgedehnte fingerförmige Ausläufer, die die abluminale Oberfläche mehrerer Endothelzellen in Längsrichtung unvollständig (lückenhaft) bedecken. Die Zellkörper glatter Muskelzellen hingegen sind typischerweise eher abgeflacht und länglich. Schichten glatter Muskulatur wirken deutlich homogener und dichter. Sie sind in Blutgefäßen zu finden, die einer hohen hämodynamischen Belastung ausgesetzt sind. Sie sind in der Regel quer zur Längsachse des Gefäßes orientiert und umhüllen je nach Gefäßgröße als Tunica media in mehreren Schichten das Endothel. Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung von Perizyten und anderen, mit dem Endothel assoziierten Zellen ist die Tatsache, dass Endothelzellen und Perizyten der Mikrogefäße von einer gemeinsamen, sich aufspaltenden Basallamina umhüllt werden (Abbildung 1).

Die besondere Lage der Perizyten ermöglicht ihnen sowohl die Verbindung mit dem darunter liegenden Kapillarendothel, als auch mit benachbarten Kapillaren [13]. Diese Verbindungen werden als „Peg-and-Socket“ Strukturen beschrieben. An Schnittstellen mit fehlender bzw. unterbrochener Basallamina bildet der Perizyt feine Ausläufer, welche in Invaginationen der Endothelmembran eingeführt werden. Diese Art von Kontakten weisen typischerweise die Moleküle Connexin 43 und N-Cadherin auf. Über diese besondere Form der Haft-/ Kommunikationskontakte ist der Austausch von Ionen und kleinen Molekülen, sowie die Übertragung von mechanischen Signalen der Perizyten auf die Endothelzellen möglich [15, 16].

Perizyten können ebenfalls eine Assoziation zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen vermitteln oder mit anderen Perizyten in Kontakt stehen. Es wird vermutet, dass bei dieser Interaktion die oben genannten Haft-/ Kommunikationskontakte ebenfalls eine wichtige Rolle spielen [17].

1.2.2.3 Marker

Die Identifizierung der Funktion der unterschiedlichen Populationen von Perizyten wird durch das Fehlen spezifischer Marker erschwert. Aktuell ist es nicht möglich, eine Einteilung der unterschiedlichen Populationen von Perizyten anhand von morphologischen und strukturellen Kriterien vorzunehmen. Generell können Perizyten aber durch die erhöhte Expression bestimmter Markerproteine von anderen Kapillarwand-assoziierten Zellen unterschieden werden. Die am häufigsten verwendeten Marker sind der von Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktorrezeptor Beta (PDGFR β), das Alpha-Aktin der glatten Muskulatur (α SMA) und das Neuronal Glial Antigen 2 (NG2). (Tabelle 1) [18]

Auch glatte Muskelzellen können diese Marker aufweisen, jedoch werden diese von Perizyten in ca. zehnfach höherer Konzentration exprimiert [19].

Tabelle 1: wichtigste Marker kardialer Perizyten. Modifiziert von [36]

Abkürzung	Name	Referenz
CD10	Neuronale Endopeptidase	[20]
CD13	Alaninaminopeptidase	[20]
CD29	Integrin Beta 1	
CD34		[21]
CD44	Rezeptor für Hyaluronsäure	[20, 22]
CD73	5'Nukleotidase	[20, 22]
CD90	Thy-1	[20, 22]
CD105	Endoglin	[20, 22]
CD108	Sema L	[20, 22]
CD109	Thrombozytenaktivierungsfaktor	[20]
CD140b	Von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor Beta (PDGFR β)	[20, 22]

CD140a	Von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor Alpha (PDGFR α)	[23]
CD146	Melanomzelladhäsionsmolekül	[20, 22]
CD164	Sialomucin-Kernprotein 24	[20]
CD166	ALCAM	[20]
CD318	„Cubdomain“ enthaltenes Protein 1	[20]
CD340	Huamer, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2	[20]
CD349	Frizzled -9	[20]
NG2	Neural/ Glial Antigen 2	[20, 22]
SM-MHC	Schwere Myosinketten der glatten Muskulatur	[22]
SSEA-4	Stadienspezifisches embryonales Antigen-4	[20]
STRO-1		[23]
HLA-CL	Humane Leukozyten-Antigen-Klasse	[20]
α -SMA		[20, 22]

Tabelle 2: Marker von Perizyten der Mikrozirkulation

Subtyp	NG2	α SMA	Quellen
Arteriöläre Perizyten	+	- + (Grund: schnelle Depolymerisation von F-Aktin)	[24] [25]
Mikrovaskuläre Perizyten	+	-	[24]
Venuläre Perizyten	-	+	[24]

Die Expression dieser Marker unterscheidet sich in isolierten Perizyten derselben Population, was eine Charakterisierung einzelner Subtypen zusätzlich erschwert. Die Expression dieser Faktoren und Marker muss deshalb vielmehr als ein dynamischer Prozess verstanden werden, der jedoch Hinweise auf die Reife und den Aktivierungszustand von Perizyten innerhalb desselben Gewebes liefern kann. [26, 27]

1.2.2.4 Funktionen

1.2.2.4.1 Angiogenese

Die Neubildung von Gefäßen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal ist dabei die Herkunft der beteiligten vaskulären Zellen. Durch den Prozess der Vaskulogenese werden die neuen Gefäßstrukturen durch Zellen aufgebaut, die sich von embryonalen kardiovaskulären Vorläufer- und Stammzellen ableiten. Einen Spezialfall stellt die postnatale Vaskulogenese dar. Hier dienen adulte Vorläufer- und Stammzellen als Ausgangspunkt der Gefäßneubildung.

Dem gegenüber steht die Angiogenese, die als Gefäßneubildung aus bereits vorhandenen Gefäßen definiert ist.

Perizyten sind an der Angiogenese beteiligt [28]. Sie produzieren und geben Wachstumsfaktoren, wie Angiopoietin -1 und -2 ab, die die Bildung neuer Gefäße anregen. Angiopoietin -1 und -2 sind Liganden für den Tie-2 Rezeptor, der sowohl auf Perizyten als auch auf Endothelzellen exprimiert wird. Dadurch können Perizyten sich selbst autokrin und das angiogenetische Verhalten der Endothelzellen parakrin maßgeblich beeinflussen [29]. Sowohl Endothelzellen als auch Perizyten sekretieren schließlich die Enzyme der Matrixmetalloproteasenfamilie (MMPs), um die Extrazellulärmatrix einschließlich der Basallamina der Kapillarwand zu verändern und eine Perizytenmigration zu ermöglichen [30, 31].

Außerdem bindet der von den Perizyten sekretierte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A) an den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR2) des Endothels. Dies führt zur Proliferation von Perizyten und Endothelzellen und damit zur Bildung neuer Gefäße [29, 32]. Die nachfolgende Sekretion des transformierenden Wachstumsfaktors Beta (TGF β) hemmt dagegen die Endothelzellproliferation [33, 34]. Neugebildete Blutgefäße sind sehr instabil und weisen nur eine begrenzte Integrität der Endothelbarriere auf. Um eine Reifung und Stabilisierung des Gefäßes zu ermöglichen, setzen Endothelzellen

Chemokine, wie PDGF β (und Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor – HB-EGF) frei. Dies führt zur Rekrutierung von Perizyten. Rezeptoren für diese Liganden (PDGFR β) finden sich auf der Perizytenoberfläche [28, 35]. N-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül und wird für die Stabilisierung des Gefäßes benötigt.

1.2.2.4.2 Kontraktile Funktion

Perizyten regulieren durch ihre Kontraktilität den Blutfluss im Mikrogefäßsystem. Am Übergang von Arteriolen zu Kapillaren weisen Perizyten einen besonders ausgeprägten kontraktilen Apparat auf. Möglicherweise wirken Perizyten in diesem Fall als präkapilläre Sphinktere [36]. Sie können jedoch auch zu einer erhöhten Steifheit der Gefäßwand beitragen, um etwa einem erhöhten Blutdruck entgegenzuwirken. Dieser Prozess wird durch die Proteine Calpain und Talin gesteuert [37]. Vasoaktive Faktoren wie Histamin, Serotonin, Angiotensin-2 und Endothelin-1 bewirken eine Vasokonstriktion durch Aktivierung der entsprechenden Oberflächenrezeptoren auf Perizyten [38].

1.2.2.5 Rolle der Perizyten in der Pathophysiologie des Herzens

Das Interesse an der Rolle der Perizyten im Rahmen pathophysiologischer Veränderungen des Herzens wächst. Dysfunktionale Perizyten werden mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ihren assoziierten Pathologien wie Fibrose, Myokardinfarkt und Atherosklerose in Verbindung gebracht.

1.2.2.5.1 Herzfibrose

Unter einer Fibrose versteht man eine krankhafte Vermehrung vom kollagenen Bindegewebe. Eine Herzfibrose kann im Rahmen diverser Herzerkrankungen auftreten. Im Vergleich zur Skelettmuskulatur ist die Regenerationsfähigkeit des Herzens stark eingeschränkt. Nach einer Verletzung in Folge eines Myokardinfarkts differenzieren sich Myofibroblasten, die vermehrt extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen produzieren und ablagern.

Durch diese fibrotischen Veränderungen werden die abgestorbenen Kardiomyozyten ersetzt und das Gewebe vernarbt. [39]

Dadurch wird das Myokardgewebe aber gleichzeitig steifer. Im Ergebnis nimmt die Pumpleistung des Herzens ab und die Gefahr für Herzrhythmusstörungen steigt.

Zur Entwicklung neuer, zielgerichteter, antifibrotischer Therapien ist es essenziell, die Vorläuferzellen der Myofibroblasten zu identifizieren und zu analysieren. Verschiedene Zelltypen können sich im Rahmen pathophysiologischer Regenerationsprozesse in Myofibroblasten differenzieren, einschließlich Fibroblasten und weiterer gewebe-residenter Zelltypen. Ein entscheidender Beitrag dieser Zelltypen zur Fibrosierung wird jedoch durch die Entdeckung, dass Perizyten vermutlich die wichtigsten Vorläufer von Myofibroblasten bei der Fibrosierung diverser Organe darstellen, in Frage gestellt. [40]

Es ist bekannt, dass Perizyten, die den von Blutblättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGFR β) exprimieren, zu fibrotischen Veränderungen in abdominalen Organen wie Leber und Niere beitragen können [41, 42]. Birbrair et al. konnten nachweisen, dass die Anzahl kardialer Perizyten innerhalb von 14 Tagen nach einem Myokardinfarkt im geschädigten Bereich zunimmt [43, 44].

Darüber hinaus wurden Perizyten in Zusammenhang mit der Entstehung einer Aortenklappenfibrose nach Myofibroblastentransformation sowie der Verkalkung der Aorta gebracht. Perizyten wurden dort vermehrt in neovaskulären Strukturen der Klappen bemerkt [45].

Weitere Studien kommen ebenso zu dem Ergebnis, dass sich dysfunktionale kardiale Perizyten zu Myofibroblasten differenzieren [40, 42].

1.2.2.5.2 Myokardinfarkt

Perizyten spielen eine wichtige Rolle im Rahmen des koronaren „no reflow“-Phänomens, welches nach einem Myokardinfarkt auftritt. Selbst wenn durch geeignete Intervention der Fluss in der proximalen Arterie wiederhergestellt werden kann, tritt häufig eine Verminderung der koronaren mikrovaskulären Perfusion auf. O'Farrel und Kollegen konnten zeigen, dass eine durch Perizyten vermittelte Vasokonstriktion nach Ischämie zu einer Reduktion der koronaren mikrovaskulären Perfusion führt [46]. Dies ist als nachteiliger Effekt der Perizytenaktivierung anzusehen.

Dem gegenüber steht der Befund, dass in genetischen Mausmodellen (Notch3- bzw. Sirtuin3-Knockout) eine deutlich verminderte Perizytenabdeckung der Gefäße mit einem erhöhten Infarktrisiko assoziiert ist. Zusätzlich waren die Herzfunktionen bzw. deren Erholung nach Myokardinfarkt deutlich reduziert [47, 48]. Dies spricht wiederum für einen positiven Einfluss von Perizyten auch bei der Regeneration des Herzens nach Myokardinfarkt (siehe Kapitel 1.2.3).

1.2.3 Therapeutisches Potential

Wie schon oben erwähnt, können Perizyten zu Myofibroblasten differenzieren, um die Herzstruktur z.B. nach einem Myokardinfarkt durch Fibrose zu stabilisieren [49-52]. Die Blutgefäße im Bereich der Verletzung bzw. Vernarbung sind nicht in der Lage, eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aufrechtzuerhalten. Es folgt die Revaskularisation durch Angiogenese. Auch dabei spielen Perizyten eine wichtige Rolle, denn sie sezernieren Wachstumsfaktoren wie Angiopoietin -1 und -2, die die Bildung neuer Gefäße anregen (vgl. Kapitel 1.2.2.4.1) [28].

Darüber hinaus existieren bereits erste vielversprechende Ergebnisse zu Transplantationen von Perizyten im Tiermodell [53, 54]. So konnte die Gruppe um Katare et al. im Mausmodell nachweisen, dass transplantierte humane CD34-positive Perizyten aus der Vena saphena magna einen positiven Einfluss auf Herzfunktion und Neovaskularisation nach einem Infarkt zeigten [55]. Ähnliche

Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit Perizytenpopulationen humaner Skelettmuskulatur erzielt werden [53]. Alvino et al. veröffentlichten eine Studie, bei der sowohl menschliche als auch allogene Perizyten postakut im Infarktmodell des Schweines injiziert wurden. Dabei führte zumindest die Transplantation allogener Perizyten zu einer Abnahme der Fibrosierung und einer gesteigerten Angiogenese [56].

Eine mögliche Ursache für diese günstigen Effekte transplanteder Perizyten könnte sein, dass sich Perizyten aufgrund ihrer Herkunft einige Eigenschaften mit mesenchymalen Stammzellen teilen. Es gibt sogar Autoren, die postulieren, dass alle Perizyten mesenchymale Stammzellen sind [54]. Diese Frage ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Sicher ist, dass Perizyten ein den Stammzellen ähnliches Sekretom aufweisen und trophische und proangiogene Faktoren, sowie weitere Enzyme, die zum Umbau und zur Stabilisierung der Gefäße beitragen, freisetzen. Zudem können sich die von der Kapillarwand abgelösten Perizyten in mesenchymale Zellen umwandeln. Mit den genannten Eigenschaften könnten Perizyten für die Etablierung neuer Strategien zur Therapie verschiedener kardialer Erkrankungen interessant sein [22, 57-59].

1.3 Kapillarwand-assoziierte Zellen im Myokard

Neben den klassischen Perizyten kommen im Herzen weitere, Kapillarwand-assoziierte Zellen vor.

Vor wenigen Jahren konnte eine Zellpopulation, Telozyten genannt, im Herzstroma nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um kleine Zellen (6-10µm) mit einem runden Kern, zahlreichen Ribosomen, vergleichsweise wenigen Mitochondrien und einem großen Nucleus [60]. Darüber hinaus verfügen sie über dünne, extrem lange Arme, die als Telopodien bezeichnet werden.

Neueste Studien belegen komplexe räumliche Beziehungen der Telozyten zu Kardiomyozyten und kardialen Stromazellen. Dies deutet auf eine Rolle bei der Organisation des Herzgewebes hin. Durch parakrine Mechanismen sind sie in der Lage, die Funktion der kardialen Stromazellen zu modulieren [61].

Mit Hilfe von extrazellulären Vesikeln können Telozyten darüber hinaus möglicherweise Angiogenese und Antifibrose regulieren [62].

Die Entdeckung der Telozyten gibt Grund zur Annahme, dass es auch noch andere wichtige Population kardialer Kapillarwand-assoziiierter Zellen gibt, die bisher unbeachtet geblieben sind. Eine morphologische Analyse und Charakterisierung kardialer Kapillarwand-assoziiierter Zellen ist deshalb Teil dieser Studie.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Das Interesse an der Rolle der Perizyten im Rahmen pathophysiologischer Veränderungen des Herzens wächst stetig und die Anzahl der Veröffentlichungen in diesem Forschungsbereich hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen. Dennoch gibt es bisher nur sehr wenige Studien, die sich mit der Morphologie bzw. der Ultrastruktur von Perizyten im Herzen beschäftigen. Im ZNS gibt es bereits erste Modelle von Perizytensubpopulationen, die im Mikrogefäßsystem unterschiedliche morphologische Charakteristika aufweisen [63]. Ob diese Art der Einteilung auf die kardialen Perizyten übertragbar ist, ist derzeit nicht bekannt.

Darüber hinaus hat die Entdeckung der Telozyten im Herzen gezeigt, dass die Analyse neuer kardialer Kapillarwand-assoziiierter Zelltypen vielleicht ein bedeutendes therapeutisches Potential haben könnte. Allerdings ist bisher nur sehr wenig über ihre Morphologie, Expression spezifischer Oberflächenmarker und Funktionen bekannt.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollen daher folgende Fragen beantwortet werden:

- Werden kardiale Perizyten durchgehend von einer Basallamina bedeckt?
- Wie stellt sich die Anordnung der kardialen Perizyten und ihre Assoziation mit Endothelzellen im dreidimensionalen Raum dar?
Welche besonderen morphologischen Merkmale fallen auf?
- Gibt es zusätzlich zu den Perizyten weitere Kapillarwand-assoziierte Zellen?
- Wie verhalten sich diese Kapillarwand-assoziierten Zellen im dreidimensionalen Raum? Lassen sie sich anhand von einzelnen morphologischen Merkmalen identifizieren bzw. charakterisieren?
- Ist eine Identifizierung der Kapillarwand-assoziierten Zellen anhand von Markerproteinen mittels immunelektronenmikroskopischer Verfahren möglich?

- Lassen sich eindeutige Kontaktstellen bzw. Wechselwirkungen der Zellen des Mikrogefäßes darstellen und charakterisieren?

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, mussten zuvor folgende methodische Voraussetzungen erfüllt werden:

- Etablierung eines Protokolls zur optimalen Kontrastierung der biologischen Membranen und bestmöglichem Erhalt der Ultrastruktur mit dem Fokus auf die Endothelzellen, Perizyten, Kapillarwand-assoziierten Zellen und Visualisierung der Basallamina.
- Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM) und 3D-Rekonstruktion zur Erzeugung dreidimensionaler Modelle ausgewählter Abschnitte des Mikrogefäßsystems mit dem Fokus auf die Darstellung endothelialer Zellen, kardialer Perizyten und Kapillarwand-assoziiierter Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Für die Analysen wurden drei Monate alte Mäuse (Wildtype C57BL) beider Geschlechter verwendet.

Die Tiere wurden in Käfigen unter pathogenfreien Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von 20°C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von 45-60% gehalten. Es wurde ausnahmslos ein Hell-Dunkel-Zyklus mit einer jeweiligen Periodendauer von zwölf Stunden eingehalten.

Alle Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von den lokalen Behörden genehmigt (55.2-2531.01-68/13; Regierung von Unterfranken, Würzburg, Deutschland).

2.1.2 Materialien für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Tabelle 3: Puffer für die TEM

Verbindung	Synthese
<i>0,01M Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4</i>	8,0g Natriumchlorid (NaCl) 0,2g Kaliumchlorid (KCl) 1,7g Dinatriumhydrogencarbonat (Na ₂ HPO ₄) 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Salzsäure (HCl) um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen
<i>0,15M Cacodylatpuffer (CaCo) pH 7,4</i>	3,2g Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat Mit ddH ₂ O auf ein Volumen von 100ml aufgefüllt

Tabelle 4: Fixierungs- und Kontrastmittel für die TEM

Verbindung	Synthese
2,5% <i>Glutaraldehyd (GA)</i> – <i>Fixierungslösung pH 7,2</i>	2.5% GA 50mM Cacodylatpuffer 50mM Kaliumchlorid (KCl) 2.5mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂) Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)
1% <i>Osmiumtetroxid</i> (OsO ₄)	4% OsO ₄ 0,2M Cacodylatpuffer ddH ₂ O
4% <i>Uranylacetat-</i> <i>Ersatzlösung (UAR-EMS)</i> <i>in ddH₂O</i>	
0,2% <i>Bleizitratlösung pH-</i> <i>Wert 12 [64]</i>	1,33g Bleinitrat (Pb(NO ₃) ₂) + 1,76g Natriumzitat x 2 H ₂ O gelöst in 30ml ddH ₂ O 6ml 1N Natriumhydroxid (NaOH) Volumen mit ddH ₂ O auf 50ml aufgefüllt
<i>Trägerfolien</i>	0,7% Formvar in Chloroform (getrocknet über Kupfersulfat)
<i>Färbelösung</i>	1g Methylenblau 1g Azur 1g Borax 100ml ddH ₂ O

Tabelle 5: Dehydratisierungsmittel für die TEM

Verbindung	Synthese
<i>Ethanol (EtOH)</i>	30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%

Tabelle 6: Komponenten des Einbettungsverfahrens für die TEM

Verbindung	Synthese
<i>Propylenoxid (PO)</i>	
<i>Epon-Komponente A</i>	24,3g Epon 812 (Glycidylether) 32,7g Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA)
<i>Epon-Komponente B</i>	22,5g Epon 812 20.3g Methylnadicanhydrid (MNA)
<i>EPON-Härter</i>	3 Teile Epon-Komponente A 7 Teile Epon-Komponente B 1,5 Vol% 2,4,6 - Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30)

2.1.3 Immunfärbung

Tabelle 7: Puffer für die DAB-Reaktion

Verbindung	Synthese
<i>0,1M PB-Puffer pH 7,4</i>	10,9g Na ₂ HPO ₄ 3,2g Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)
<i>0,1M Tris-Saline-Puffer (TBS) pH 7,6</i>	0,01M Trizma® - Basis (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃) 0,1M NaCl ddH ₂ O
<i>0,01M PBS pH 7,4</i>	wie unter 2.1.2 beschrieben

Tabelle 8: Fixierungs- und Kontrastmittel für die DAB-Reaktion

Verbindung	Synthese
<i>4% Paraformaldehyd (PFA) Fixationslösung in 0,01M PBS</i>	
<i>2% OsO₄</i>	500µl 4% OsO ₄ 250µl 2M Cacodylatpuffer 250µl ddH ₂ O
<i>4% UAR-EMS</i>	
<i>0,2% Bleizitratlösung</i>	wie unter 2.1.2 beschrieben

Tabelle 9: Verbindungen zur Blockierung der Reagenzien bei der DAB-Reaktion

Verbindung	Synthese
<i>0,5% Rinderserumalbumin (BSA) in 0,1M TBS</i>	0,5% BSA in 100ml 0,1 M TBS
<i>0,1% BSA in 0,1 M TBS</i>	0,1% BSA in 100ml 0,1 M TBS

Tabelle 10: Primärantikörper, welche bei der DAB-Reaktion verwendet wurden

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
CD44	BioLegend Inc., San Diegei, CA, USA)	1:400; 1:250
CD34	Abcam, Cambridge, UK	1:400; 1:250
Flk-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:200; 1:100; 1:50

Tabelle 11: Sekundärantikörper, welche bei der DAB-Reaktion verwendet wurden

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Biotinillierter Goat anti-Rat IgG	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA Best.-Nr.: BA-9400	1:400
Biotinillierter Goat anti-Rat IgG	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA Best.-Nr.: BA-9400	1:400
Biotinillierter Goat anti-Mouse IgG	VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA Best.-Nr.: BA-9200	1:400

Tabelle 12: Detektionsystem der DAB-Reaktion

Verbindung	Synthese
Avidin-Biotin (AB) Komplex	VECTASTAIN® ABC Kit: 1 Tropfen A + 1 Tropfen B in 5ml 0,1M TSB Der AB-Komplex wurde 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt und lichtundurchlässig abgedeckt.

Tabelle 13: Verbindungen der DAB-Färbung

Verbindung	Synthese
3,3' - <i>Diaminobenzidintetrahydr</i> <i>ochlorid (DAB) -</i> <i>Stammlösung</i>	0,075 % DAB in ddH ₂ O
<i>DAB Substrat-</i> <i>Arbeitslösung</i>	333µl 0,01 M PBS 667µl DAB-Stammlösung

	992µl Ammoniumchlorid (8mg/10ml Stammlösung) 8µl-Glukoseoxidase (1mg/ml in ddH ₂ O)
<i>Ammoniumnickel(II)sulfat Stammlösung (0,05M in H₂O); 20µm/ 1000µl</i>	
<i>α-D-Glucose (13,3% in H₂O) 20µl/1000µl</i>	

Tabelle 14: Deyhydratisierungsmittel für die DAB-Reaktion

Verbindung	Synthese
<i>EtOH</i>	30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%

2.1.4 Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM)

Tabelle 15: Puffer für die SBF-SEM

Verbindung	Synthese
<i>0,15M Caco pH 7,4</i>	wie unter 2.1.2 beschrieben

Tabelle 16: Fixierungs- und Kontrastmittel für die SBF-SEM

Verbindung	Synthese
<i>Vorspüllösung</i>	0,9% NaCl + 0,66ml Heparin/100ml in ddH ₂ O
<i>Perfusionsfixans/ Immersionfixation</i>	2,5% GA + 2% PFA + 2mM CaCl ₂ in 0,15M Cacodylatpuffer pH 7,4
<i>1,5% Kaliumferrocyanidlösung</i>	Stammlösung: 3,38% Kaliumferrocyanid * 3H ₂ O + 0,3M Cacodylatpuffer pH 7,4 + 4 mm CaCl ₂

	<p>Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung im Mischungsverhältnis 1:1 mit 4% OsO₄ vermengt</p> <p>Arbeitslösung: 1,5% Kaliumferrocyanid + 2% OsO₄ + 2mM CaCl₂ in 0,15M Cacodylatpuffer pH 7,4</p>
<p>1% Thiocarbohydrazid (NH₂NH)₂CS (TCH) - Lösung in CO₂ - freiem ddH₂O</p>	<p>10ml CO₂ - freies ddH₂O wurden zunächst auf 60°C erwärmt und unter ständigem Rühren wurde schließlich 0,1g TCH hinzugefügt. Alle 10 Minuten wurde die Lösung sanft aufgewirbelt, bis das TCH bei einer konstanten Temperatur von 60°C vollständig gelöst war. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend durch einen Filter (0,22µm) gedrückt</p>
<p>2% OsO₄ - Lösung</p>	<p>wie unter 2.1.3 beschrieben</p>
<p>4% UAR-EMS</p>	
<p>0,6% Bleiaspartatlösung [65]</p>	<p>0,03M Asparaginsäure - Stammlösung 0,02M Bleinitrat (Pb(NO₃)₂) 1N Kaliumhydroxid (KOH) ddH₂O</p> <p>Für die Lösungsherstellung wurden neue und v.a. saubere Gefäße verwendet.</p> <p>Zunächst wurden 30ml ddH₂O und 0,12g Asparaginsäure vermengt und weiterführend im Wasserbad bei 60°C erhitzt. Es folgte die Zugabe von einigen Tropfen 1N KOH, bis zur Einstellung eines pH- Wertes von 3,8.</p> <p>Alle Geräte wurden im Wasserbad bei 60°C vorgewärmt.</p>

	<p>0,066g Bleinitrat wurden ebenso wie die Asparaginsäure-Stammlösung für 10 Minuten bei 60°C im Wasserbad in einem 50ml Bluecup vorgewärmt.</p> <p>Ca. 10ml der Asparaginsäure-Stammlösung wurden dem vorbereiteten Bluecup mit Bleinitratlösung hinzugefügt. Unter ständigem Rühren mit Hilfe der vorgewärmten Pasteur-Pipette erfolgte die Zugabe von einigen Tropfen 1N KOH, bis zur Einstellung eines pH-Wertes von 5,5</p>
--	--

Tabelle 17: Dehydratisierungsmittel für die SBF-SEM

Verbindung	Synthese
<i>EtOH</i>	30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%
<i>Aceton</i>	

2.2 Methoden

Alle Experimente fanden unter Einhaltung der vorgeschriebenen Sicherheitsvorkehrungen statt. Aufgrund der Toxizität einiger Reagenzien erfolgte der Lösungsaustausch stets bei ausreichender Entlüftung und unter dem Abzug. Dies gilt auch für alle Verfahren, die der Fixierung und Kontrastierung zuzuordnen sind.

Vor jedem Experiment wurden die für die jeweiligen Arbeitsschritte benötigten Lösungen frisch angesetzt. Ebenso wurde destilliertes bzw. doppelt destilliertes Wasser vor Versuchsbeginn unter ständigem Rühren auf über 100°C erhitzt, damit noch enthaltenes CO₂ entweichen konnte. Anschließend wurde es auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.1 TEM

2.2.1.1 Koventionelles Fixierungs- und Kontrastierungsfahren

Nach erfolgreicher Perfusion (wie unter 2.2.3.1 beschrieben) wurde das Herz vorsichtig aus dem Thorax herauspräpariert und Teile des linken Ventrikels in kleinere Einzelstücke (ca. 1x1mm) zerteilt und über Nacht in glutaraldehydhaltiger Fixierungslösung bei 4°C fixiert.

Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebe für eine Stunde in 0,015M Cacodylatpuffer gewaschen, bevor es mit 1% OsO₄ (in Cacodylatpuffer) fixiert wurde. Die Probengläser wurden hierfür für 60 Minuten abgedeckt, da diese Reaktion im Dunkeln ablaufen muss. Dieser Arbeitsschritt diente der weiteren Fixierung und Färbung von Lipiden. Im weiteren Verlauf wurden die Gewebeproben erneut für 15 Minuten in Cacodylatpuffer gewaschen, bevor sie schließlich zweimal für jeweils 15 Minuten mit ddH₂O gespült wurden. Es erfolgte die Zugabe von 4% UAR-EMS für 60 Minuten. Dies führt zu einer erhöhten Kontrastierung von Proteinen und Lipiden. Um Niederschläge aufgrund der Lichtempfindlichkeit des UAR-EMS zu vermeiden, wurden die Probengläschen lichtundurchlässig abgedeckt. Es folgte eine zweimalige

Spülung mit ddH₂O für zehn Minuten. Zur Dehydrierung wurde im Folgenden für jeweils zehn Minuten mit Ethanollösungen aufsteigender Konzentration von 30%, 50%, 70%, 80%, 90% und 96% gespült, sowie zweimal mit reinem Ethanol. Dies für jeweils 15 Minuten. Zur vollständigen Dehydrierung wurde zweimal für jeweils 30 Minuten mit PO gespült.

Der Start des Einbettungsverfahrens wurde durch die Zugabe von einer Mischung aus Propylenoxid und Epon im Verhältnis 1:1 eingeleitet. In dieser Lösung wurden die Proben über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Glasbehälter wurden dabei nicht verschlossen, damit das Propylenoxid verdampfen konnte. Hat sich das Propylenoxid vollständig verflüchtigt, kann Epon in das Gewebe eindringen.

Am folgenden Tag wurde die Epon-PO-Mischung durch reines Epon ersetzt, in welchem die Gewebestücke zwei Stunden lang inkubiert wurden.

Die Gewebestücke wurden in BEEM® - Cups der Größe 00 eingebettet, welche mit unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestelltem Epon befüllt wurden. Es ist darauf zu achten, Blasen zu vermeiden und das Gewebe zentral an der dafür vorhergesehenen Stelle zu platzieren, um Schwierigkeiten bei der Schnittherstellung vorzubeugen.

Die Blöcke wurden für 48 Stunden bei einer Temperatur von 60°C im Ofen auspolymerisiert.

2.2.1.2 Schnittherstellung

Mit einer scharfen Klinge wurde überschüssiges Epon entfernt und der Block für das Schneiden mit dem Ultramikrotom präpariert. Zeitweise wurde für bessere Sicht- und Lichtverhältnisse ein Mikroskop verwendet.

Mit Hilfe des Ultramikrotoms wurden zunächst Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von ca. 0,5-1µm erzeugt, sogenannte Semidünnschnitte. Ausgewählte Gewebeschnitte wurden auf Objektträgern aufgebracht, mit einer Methylenblau-enthaltenden Färbelösung benetzt und schließlich für zehn Minuten auf eine Heizplatte mit 80°C gelegt. Im Anschluss wurde überschüssige

Färbelösung mit dH₂O abgespült und das Gewebe mit einem Eindeckmedium bestrichen, bevor schließlich ein Deckgläschen aufgelegt wurde. Es erfolgte eine erste Begutachtung unter dem Lichtmikroskop. Bei diesem Arbeitsschritt soll kontrolliert werden, ob bereits die gesamte Gewebeoberfläche angeschnitten und der angestrebte Schnittwinkel eingehalten wurde.

Anschließend wurden ultradünne Gewebeschnitte mit Hilfe des Ultramikrotom erzeugt, sogenannte Ultradünnschnitte. Diese Gewebeschnitte, welche eine Schichtdicke von ca. 60-90nm aufwiesen, wurden auf mit Trägerfolie beschichtete Netzchen aufgebracht.

2.2.1.3 Kontrastierung

Für die Kontrastierung wurden 4% UAR-EMS und 0,2% Bleizitrat verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden beide Reagenzien für fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Einzelne Tropfen des 4% UAR-EMS wurden auf einer mit Parafilm bedeckten Glasplatte aufgebracht.

Die Glasplatte sollte vor einem dunklen Hintergrund platziert werden. Die mit den ultradünnen Gewebeschnitten beladenen Netzchen wurden mit der gewebetragenden Seite voran auf oben beschriebene Tropfen gelegt und für 20 Minuten lichtundurchlässig abgedeckt. Anschließend erfolgte eine erste Waschung der Netzchen für jeweils fünf Minuten. Zunächst wurde zweimal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend dreimal mit ddH₂O.

Im weiteren Verlauf wurden die Netzchen für sieben Minuten mit einer 0,2% Bleizitratlösung inkubiert. Um die Bildung von Bikarbonatablagerungen zu vermeiden, welche sich als elektronendichte Partikel im Präparat ablagern würden, sollte eine Kontamination vermieden werden. Bleizitrat reagiert unter natürlichen Bedingungen mit CO₂. Aus diesem Grund wurden frisch angesetzte, mit NaOH getränkte Wattepellets in unmittelbarer Nähe der Netzchen platziert. Dadurch wird CO₂ absorbiert und die CO₂-Konzentration in der umgebenden Luft wird auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich empfiehlt sich ein

Mindestabstand von 1,5m der ausführenden Person, sowie eine ausreichende und weitestgehend luftundurchlässige Abdeckung.

Im weiteren Verlauf wurden die Netzchen erneut mehrere Male in ddH₂O gespült. Weiterhin erfolgte eine ausreichende Trocknung und anschließende sichere Verwahrung in der dafür vorgesehenen Gridbox.

2.2.2 DAB – Färbung

Mithilfe des präimmunelektronenmikroskopischen Verfahrens der Glucoseoxidase-Diaminobenzidin-Methode (GOD-DAB) können unter der Verwendung geeigneter Primär- und Sekundärantikörper einzelne Proteine in ihrem ultrastrukturellen Kontext dargestellt werden.

Aufgrund der limitierten Tiefe des Eindringens der Antikörper wurden aus dem linken Ventrikel gewonnene Vibratonschnitte zweier Mäuse (Nr. 1028; 6133) verwendet. Die Proben wurden 2018 fixiert und bei -20°C in Kryoprotectans gelagert. Die Schnittdicke der erzeugten Schnitte betrug 200µm.

Sofern nicht anders angegeben, fanden die einzelnen Versuchsschritte bei Raumtemperatur statt. Alle Reagenzien wurden vor Arbeitsbeginn frisch angesetzt.

Zunächst wurden die Proben auf verschließbare Glasbehältnisse verteilt und sechsmal für jeweils zehn Minuten mit 0,01M PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für 30 Minuten mit 0,5% BSA in 0,1M TSB-Puffer. Danach wurde zweimal mit 0,1M TSB-Puffer für jeweils fünf Minuten gespült.

Die Proben wurden mit den Primärantikörpern CD44, CD34 oder Flk-1, welche zum Zeitpunkt der Verwendung jeweils in 0,1% BSA gelöst vorlagen, über Nacht in der entsprechenden Konzentration in 0,1 BSA in 0,1M TSB-Puffer verdünnt inkubiert. Die jeweilige Negativkontrolle wurde nur mit 0,1% BSA in 0,1M TSB-Puffer inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden alle Proben zunächst dreimal für jeweils zehn Minuten mit 0,1M TSB-Puffer gespült. Es folgte die Zugabe der in 0,1% BSA in 0,1M TSB-Puffer verdünnten Sekundärantikörper für 1,5 Stunden.

Nach dreimaligem Waschen in 0,1M TSB-Puffer für jeweils zehn Minuten, wurden die Proben mit dem vorbereiteten AB-Komplex für 30 Minuten inkubiert. Die nächsten Arbeitsschritte umfassten eine einmalige Spülung für zehn Minuten mit 0,1M TSB-Puffer und eine zweimalige Spülung, ebenfalls für jeweils zehn Minuten, mit 0,01M PBS-Puffer. Die Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, welches mit Ammoniumnickelsulfat und der Substrat-Arbeitslösung gefüllt war und für fünf min in dieser Lösung inkubiert. Um die DAB-Reaktion zu starten, wurden 40µl D-Glucose (13,3 % in H₂O) zugefügt. Sobald die gewünschte Färbung eintrat, wurde die Reaktion durch Austausch der Substratlösung mit 0,01M PBS-Puffer gestoppt. Insgesamt wurde dreimal für zehn Minuten mit 0,01M PBS-Puffer gewaschen. Es schloss sich eine einstündige Fixierung mit 2% OsO₄ in 0,1M PBS-Puffer an. Hierzu wurden die Probengläschen lichtundurchlässig abgedeckt und auf den Schüttler gestellt.

Im weiteren Verlauf wurde erst zweimal mit 0,1M PBS-Puffer für jeweils zehn Minuten gespült und dann einmal mit ddH₂O.

Weiterhin wurden die Gewebeproben in einer Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen von 30%, 50%, 70%, 90% und 96% für jeweils fünf Minuten dehydriert und zusätzlich zweimal mit 100% EtOH für jeweils zehn Minuten gespült.

Es folgte die zweimalige Inkubation mit Propylenoxid für jeweils 10 Minuten, bevor die Probengefäße schließlich mit einer Mischung aus Epon und Propylenoxid im Verhältnis 1:1 über Nacht unverschlossen und bei Zimmertemperatur inkubiert wurden. Am darauffolgenden Tag wurde die Epon-PO-Mischung durch reines Epon ersetzt. Nach zwei Stunden konnte die Flacheinbettung des Gewebes zwischen zwei Aclarfolien mit einer Schichtdicke von ca. 2mm erfolgen. Es wurde darauf geachtet, dass die Aclarfolien schmutz- und staubfrei waren. Aus diesem Grund wurden diese vor Verwendung

gründlich mit 70% EtOH gereinigt. Darüber hinaus wurde die Entstehung von Luftblasen in unmittelbarer Nähe des Gewebes frühzeitig verhindert bzw. wurden diese gegebenenfalls behutsam entfernt. Mit Gewichten beschwert, wurden die Proben für 48 Stunden bei 60 °C in den Ofen gestellt. Nach der Polymerisierung wurde die Folie entfernt und das Gewebe mit Hilfe eines Superklebers auf einen Leerblock aufgetragen. Wie schon unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, erfolgte die Schnittherstellung und anschließende Kontrastierung.

2.2.3 Serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie

2.2.3.1 Perfusion

Zu Beginn des Experiments wurden die Mäuse durch eine Überdosis (ca. 500µl) des Narkotikums Isofluran getötet. Anschließend wurden sie auf einer Korkunterlage an den vier Pfoten fixiert. Der Thorax wurde eröffnet und das Mediastinum freigelegt. Mit Hilfe einer Perfusionspumpe folgte die ca. 60s andauernde Injektion der Vorspüllösung, die u.a. den Gerinnungshemmer Heparin enthält. Die Perfusionspumpe förderte ca. 4ml/min. Unmittelbar nach der Injektion wurde das rechte Herzohr eröffnet, um einen angemessenen Druckausgleich zu ermöglichen. Ein Marker für eine erfolgreiche Injektion der Vorspüllösung ist die langsame Aufhellung der Leber. Anschließend erfolgte die Perfusionsfixation durch die etwa zehnminütige Injektion des Perfusionsfixans, ebenfalls unter Zuhilfenahme der Perfusionspumpe. Die Geräteeinstellungen blieben unverändert. Durch die Verwendung eines Schlauchsystems mit mehreren Zuläufen war ein Austausch oder erneutes Einführen der Nadelspitze in die linke Herzkammer nicht notwendig. Es wurde stets darauf geachtet, dass zu keinem Zeitpunkt Blasen im Schlauchsystem enthalten waren. Im weiteren Verlauf wurde die Nadelspitze aus der linken Herzkammer entfernt und für die Dauer von ca. einer Minute unter gleichbleibenden Bedingungen retrograd in die Aorta eingeführt. Dieser Schritt sollte die Perfusionsfixation und gleichzeitige

Durchspülung der Blutgefäße, welche das Herz mit Sauerstoff versorgen, zusätzlich verbessern.

Im unmittelbaren Anschluss an die Perfusion wurde das Herz entnommen. Es wurden Anteile des ventralen Myokards aus dem linken und rechten Ventrikel gelöst. Die Gewebestücke wurden zunächst unter Zuhilfenahme eines Mikroskops in eine für die spätere Einbettung übliche Größe von ca. 1x1 mm zerlegt. Die Zerkleinerung erfolgte hierbei in einer mit Perfusionslösung gefüllten Petrischale, um eine Austrocknung zu vermeiden. Anschließend wurden die Präparate auf verschließbare, ebenfalls mit Perfusionsfixans befüllte Glasbehältnisse verteilt.

2.2.3.2 Fixierung und Kontrastierung

Das hier angewendete Verfahren ist eine Kombination und Modifikation zweier publizierter Protokolle [66, 67].

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Gewebe wurde nun in Perfusionsfixans auf Eis postfixiert. Es erfolgte ein mehrmaliges Waschen der Proben unter stetiger Verwendung des Perfusionsfixans. Anschließend wurden die weiterhin auf Eis inkubierten Proben dreimal nach jeweils fünf Minuten mit 0,15M Cacodylatpuffer gespült. Der darauffolgende Arbeitsschritt umfasste die Inkubation in Kaliumferrocyanidlösung für eine Stunde. Im weiteren Verlauf wurden die Gefäße auf Raumtemperatur überführt und fünfmal für jeweils fünf Minuten mit ddH₂O gewaschen.

Im Anschluss an eine Inkubation mit 1% Thiocarbohydrazide (TCH) für 25 Minuten wurden die Proben für jeweils fünf Minuten mit ddH₂O gespült.

Als nächstes wurden die Gewebestücke für 30 Minuten in 2% Osmiumtetroxid inkubiert und anschließend fünfmal für jeweils fünf Minuten mit ddH₂O gespült.

Es folgte eine Inkubation mit 4% UAR-EMS über Nacht bei einer Temperatur von 4°C.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben dreimal für jeweils drei Minuten mit ddH₂O bei Raumtemperatur und danach zweimal für jeweils drei Minuten mit ddH₂O bei 60°C gespült. Das Gewebe wurde auf diese Weise für die Inkubation mit der Blei-Aspartat-Färbelösung nach Walton vorbereitet, die im Anschluss für 30 Minuten bei 60°C durchgeführt wurde. Die Proben wurden fünf Minuten auf Raumtemperatur heruntergekühlt, bevor sie jeweils fünfmal für fünf Minuten mit ddH₂O gespült wurden. Es folgten Spülungen für jeweils zehn Minuten mit eisgekühlten Ethanollösungen. Verwendet wurden Konzentrationen von 30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100%. Weiterhin wurden die auf Eis befindlichen Proben zweimal für zehn Minuten in 100% Aceton getaucht, bevor sie für 10 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt wurden.

Der Einbettungsprozess begann mit dem Austausch des 100% Acetons durch ein Gemisch aus 75% Aceton und 25% Epon über zwei Stunden. Die nächsten Arbeitsschritte umfassten zunächst die Zugabe von einem Gemisch aus 50% Aceton und 50% Epon und schließlich aus 25% Aceton und 75% Epon. Beide Schritte benötigten jeweils zwei Stunden. Über Nacht wurden die Proben in reinem Epon belassen. Am nächsten Tag erfolgte ein Austausch des reinen Epons für zwei Stunden.

Die in Epon getränkten Gewebestücke wurden auf Aluminiumstiften, sogenannten Pins, befestigt. Diese wurden wiederum in einen eigens dafür angefertigten Block eingelegt bzw. eingeführt. Noch vorhandene Hohlräume und Freiflächen wurden Epon gefüllt. Anschließend wurde diese Konstruktion für 48 Stunden bei 60°C in den Ofen gestellt, damit das Epon auspolymerisieren konnte. Die Pins wurden zunächst aus dem Block entnommen und anschließend wurden die Proben getrimmt. Die Schnittherstellung erfolgte analog zu der unter Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode. Mit Hilfe der angefertigten Semidünnschnitte wurde der Bereich von Interesse für die Analyse am Rasterelektronenmikroskop vorbereitet bzw. getrimmt. Hierzu wurde nur der

entsprechende Teil des Gewebes belassen und umliegendes Gewebe, sowie überschüssiges Epon entfernt. Der Pin wurde erneut ins Ultramikrotom eingespannt. Von den Präparaten wurden zunächst Ultradünnschnitte hergestellt und diese am Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Sofern sich ein Präparat bzw. dessen Ausrichtung auf dem Pin für die weitere Analyse am Rasterelektronenmikroskop eignete, wurden alle Bereiche des Pins einschließlich der Schnittfläche des angeschnittenen Gewebes mit Silberfarbe überzogen, um eine elektrische Aufladung des Präparates im Rahmen der Analyse durch SBF-SEM zu reduzieren.

2.2.4 Elektronenmikroskopie

2.2.4.1 TEM

Die Proben wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop „LEO 912 AB OMEGA“ (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) und der verknüpften Digitalkamera (Tröndle Systems, Deutschland) analysiert. Für die Steuerung bzw. Datenakquirierung wurde die Software Image SP, Version 1.2.3.46 (x64) für Windows (SYSPROG&TRS, Moorenweis, Deutschland) verwendet.

2.2.4.2 SBF-SEM

Die Proben wurden mit dem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (Sigma 300VP, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Das Gerät ist mit einem automatisiertem Ultramikrotom (3View2XP System; Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) ausgestattet. Die Generierung der Bilddaten basiert auf der Bestrahlung der Probenoberfläche mittels eines fein gebündelten Elektronenstrahls und der Auswertung der dadurch generierten Rückstreuelektronen (Abbildung 2).

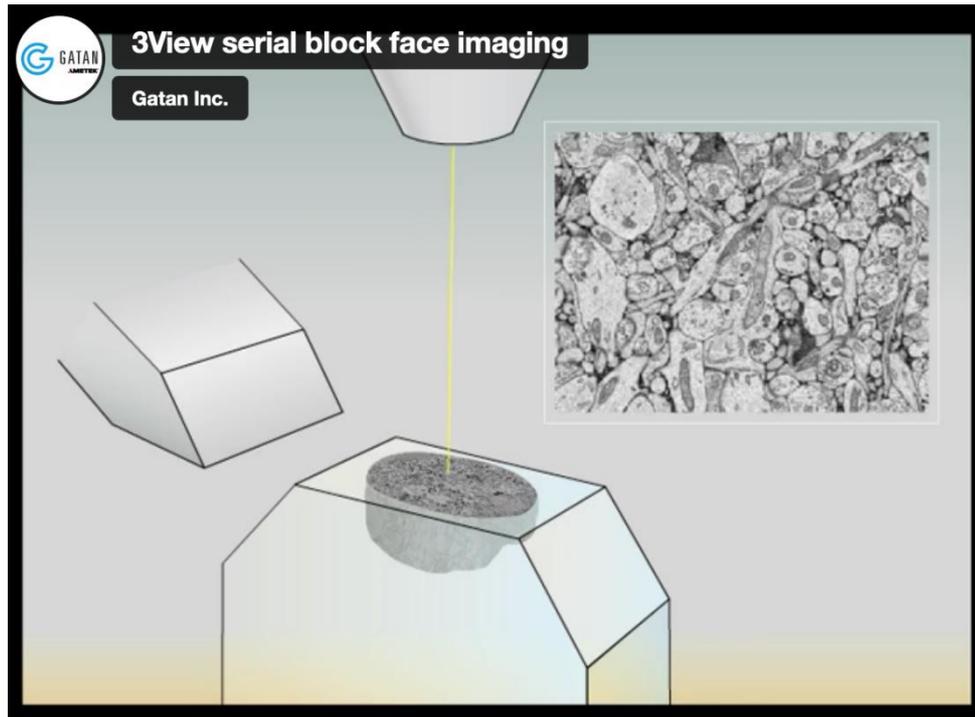


Abbildung 2: Prinzip der SBF-SEM.
Schematische Darstellung, Modifiziert nach [2].

Diese Signale werden in Grauwertinformation umgewandelt und schließlich auf einem Bildschirm dargestellt. Zur Steuerung des 3View2XP Systems wurde die DigitalMicrograph-Software Gatan Microscopy Suite® (GMS), Version 3.22.1461.0 (Gatan Inc.) verwendet.

2.2.5 Bildverarbeitung

Die erste Bearbeitung (u.a. das Alignment) der mit dem 3View2XP Systems erzeugten Daten erfolgte mit Hilfe des unter SBF-SEM beschriebenen Programms DigitalMicrograph® Scripting der Software Gatan Microscopy Suite® (GMS), Version 3.22.1461.0 (Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA). Die unter dem Reiter „Scan“ verfügbare „Capture“ - Funktion ermöglicht ein Alignment einzelner Aufnahmen derselben Interessensregion, unabhängig von der verwendeten Rahmengröße. Das Programm „Rename Us Pro“ Version 4.2.3 wurde für die Sortierung, Zusammenführung, Umbenennung und anschließende Speicherung der Bilddaten verwendet.

Die weitere Verarbeitung der Bilddaten erfolgte mit der Open-Source-Software Fiji [68]. Dieses Programm basiert auf ImageJ bzw. ImageJ2. Die Segmentierung erfolgte mit dem TrakEM2-Plug-in.

Die anschließende Erzeugung dreidimensionaler Modelle und Visualisierung der Bilddaten wurde mit der Open-Source-Softwareplattform Tomviz, Version 1.8.0., durchgeführt.

Die Screenshots und Videos wurden mit Captura, Version 8.00, aufgenommen. Für die Anpassung von Kontrast, Helligkeit und evtl. Fehlerkorrektur wurde die Software Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Tokyo, Japan) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Protokolls zur optimalen Darstellung der Zellen der kardialen Mikrogefäße

Um die Zellen der kardialen Mikrogefäße in optimaler Weise darstellen und analysieren zu können, musste zunächst ein Protokoll etabliert werden, das zum einen eine optimale Kontrastierung der biologischen Membranen mit bestmöglichem Erhalt der Ultrastruktur gewährleistet und zum anderen die Möglichkeit bietet, die Probe im zweiten Schritt mittels SBF-SEM zu analysieren. Der Fokus lag auf der optimalen Darstellung der Endothelzellen, Perizyten mit der Visualisierung der gemeinsamen Basallamina beider Zelltypen und potentieller weiterer Kapillarwand-assoziierten Zellen.

Das murine kardiale Gewebe wurde hierfür unter Verwendung von zwei verschiedenen Protokollen fixiert, kontrastiert und eingebettet:

- konventionelle Fixierung und Kontrastierung (unter 2.2.1.1 beschrieben)
- Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für die serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie (unter 2.2.3.2 beschrieben)

Von den eingebetteten Proben wurden Ultradünnschnitte angefertigt und am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert und verglichen. Besondere Aufmerksamkeit galt der Visualisierung der Endothelzellen, der Perizyten und der Basallamina sowie der Kapillarwand-assoziierten Zellen. Weiterhin wurde die Darstellung der interzellulären Kontakte beurteilt, um einzelne Endothelzellen und deren mögliche Kontakte zu Kapillarwand-assoziierten Zellen untersuchen zu können.

Für den detaillierten Vergleich beider Methoden wurden v.a. Präparate bzw. Aufnahmebereiche herangezogen, welche die Gefäße des kardialen Gewebes im Querschnitt präsentierten. Das hohe Auflösungsvermögen der Transmissionselektronenmikroskopie (1-2nm) ermöglicht die Darstellung

sowohl zellulärer als auch subzellulärer Komponenten auf ultrastruktureller Ebene. Darüber hinaus können Prozesse auf zellulärer Ebene wie interzelluläre Kontakte oder die Abgabe von Mikrovesikeln visualisiert werden.

3.1.1 Konventionelle Fixierung und Kontrastierung

Die Kapillaren zeigen eine sehr gute ultrastrukturelle Erhaltung (Abbildung 3). Die Wand der Kapillaren wird von Endothelzellen und Perizyten, die die Kapillarwand von außen unvollständig ummanteln, gebildet und beide Zelltypen sind von einer gemeinsamen Basallamina umgeben (Abbildung 3). Die in der gemeinsamen Basallamina eingeschlossenen Fortsätze der Perizyten sind eng mit den Endothelzellen assoziiert (Abbildung 3B, B'; C, C'). Allerdings sind die Membranen der Zellen und die Basallamina nicht immer gut voneinander abgrenzbar. Die Abgrenzung der Endothelzellen von den Fortsätzen der Perizyten (Abbildung 3B, B'; C, C') und die Unterscheidung zwischen Perizyten und Kapillarwand-assoziierten Zellen (Abbildung 3A, A) ist dadurch erschwert. Darüber hinaus lassen sich einzelne Endothelzellen nur schwer voneinander abgrenzen, da sich Zellkontakte nicht eindeutig identifizieren lassen. Charakteristika der Endothelzellen wie Caveolae sind nicht oder nur verschwommen zu erkennen.

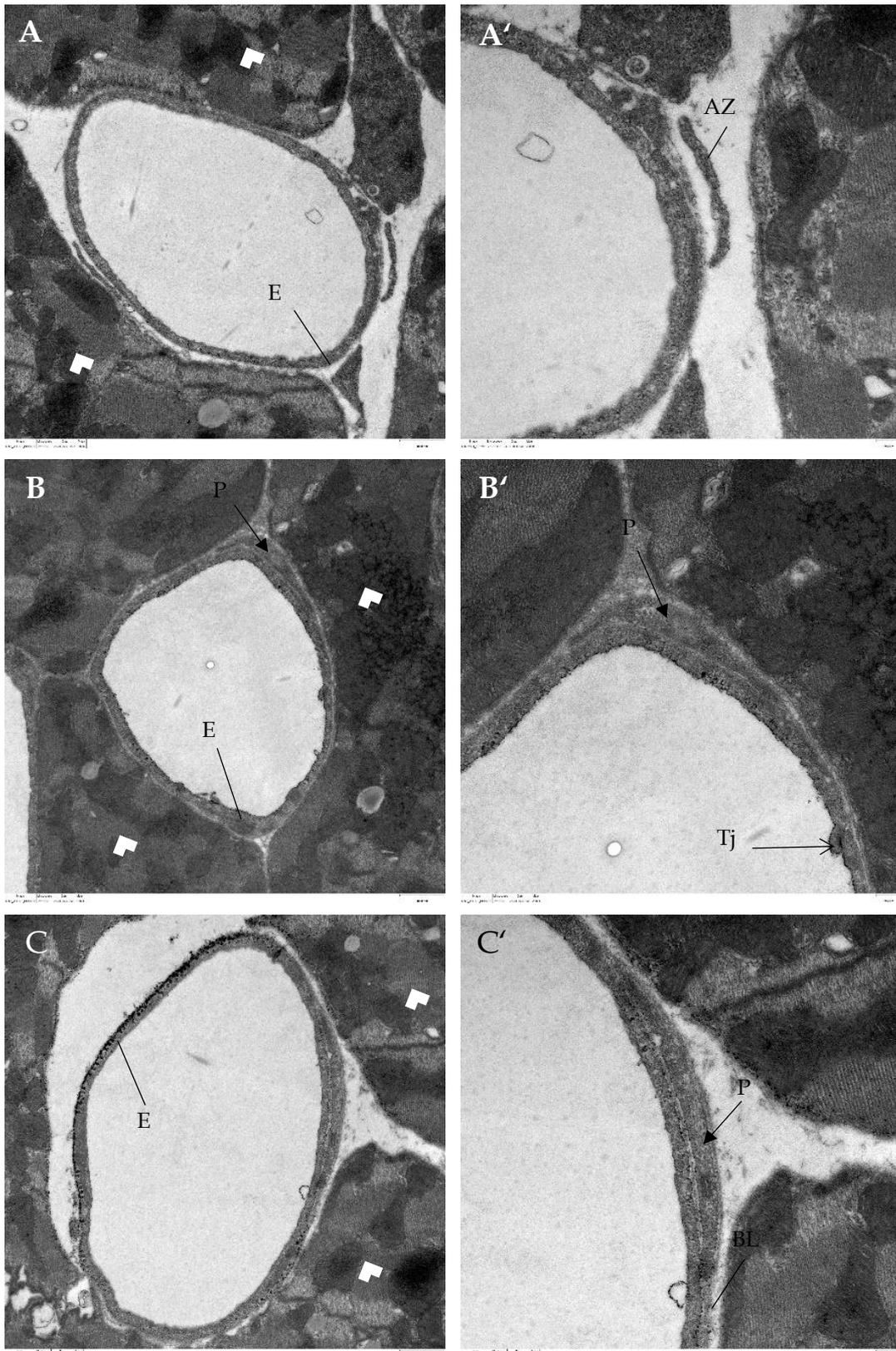


Abbildung 3: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard.
(Konventionelle Fixierung und Kontrastierung)

E, Endothelzelle. P, Perizytenfortsatz. Tj, Tight junctions. BL, Basallamina, AZ, Kapillarwand-assozierte Zelle. Kardiomyozyten (Pfeilspitzen) Vergrößerung: 10000 fach (A,B,C); 20000 fach (A', B', C').

3.1.2 Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für die serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie

Die Kapillaren zeigen eine exzellente ultrastrukturelle Erhaltung (Abbildung 4). Die Verwendung dieser Methode erlaubt eine optimale Darstellung der biologischen Membranen, wodurch eine eindeutige Abgrenzung der Zellen bzw. zellulären Fortsätze der verschiedenen Zelltypen der Kapillaren und der mit ihnen assoziierten Zellen möglich ist. Die Basallamina ist deutlich zu erkennen, sie erscheint als kontinuierliche Struktur und umhüllt die Endothelzellen sowie die Fortsätze der Perizyten, wodurch eine eindeutige Identifizierung dieser Zelltypen und eine Abgrenzung zu Kapillarwand-assoziierten Zellen möglich ist (Abbildung 4). Die verschiedenen ultrastrukturellen Charakteristika endothelialer Zellen lassen sich durch die Verwendung dieser Methode besonders gut visualisieren: In kontinuierlichen Kapillaren bilden die Endothelzellen eine geschlossene Schicht, die weder von intrazellulären Poren, noch von interzellulären Lücken durchbrochen werden. Endothelzellen sind v.a. durch Tight junctions und Adherens junctions miteinander verbunden. Der Sauerstofftransport erfolgt deshalb transendothelial, z.B. über Caveolae oder durch Endozytose. Durch die optimierte Kontrastierung der Membranen sind die individuellen Caveolae der Endothelzellen deutlich zu erkennen (Abbildung 4A'). Die durch Tight junctions gebildeten Kontaktstellen sind sichtbar und ermöglichen so eine eindeutige Unterscheidung einzelner Endothelzellen (Abbildung 4A). Die Kapillarwand-assoziierten Zellen können deutlich von den Perizyten abgegrenzt werden, da sie nicht in von einer Basallamina umgeben werden (Abbildung 4B, B'; C, C'). Die Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung des modifizierten Protokolls für die serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht somit eine eindeutige Identifikation der verschiedenen Zellen des Mikrogefäßsystems und bietet die Voraussetzung für die Akquirierung dreidimensionaler Datensätze.

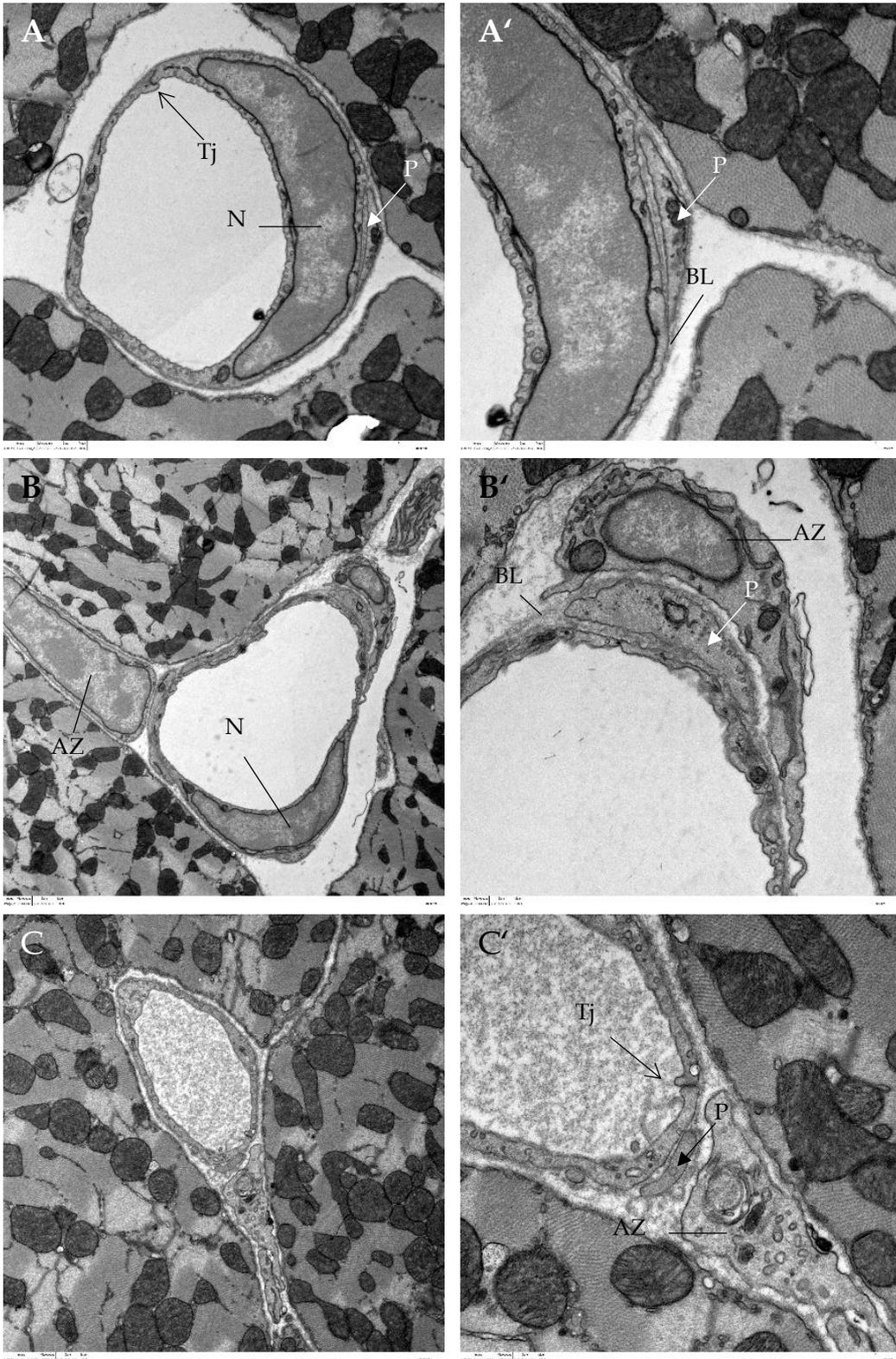


Abbildung 4: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. (Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung des modifizierten Protokolls für die serielle Blockface Rasterelektronenmikroskopie)
 N, Endothelzellkern. P, Perizytenfortsatz. Tj, Tight junctions. BL, Basallamina, AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Vergrößerung: 5000 fach (B); 8000 fach (C); 10000 fach (A); 16000 fach (B'); 20000 fach (A', C').

Auch die verschiedenen Zelltypen von größeren Gefäßen, wie Arteriolen, die den Kapillaren vorgeschaltet sind und fließend in diese übergehen, lassen sich mit dem verwendeten Protokoll in optimaler Weise darstellen und identifizieren und somit von den Kapillaren abgrenzen (Abbildung 5). Die Tunica media der Arteriolen enthält nur eine Schicht glatter Muskelzellen, es ist keine Membrana elastica interna ausgebildet (Abbildung 5).

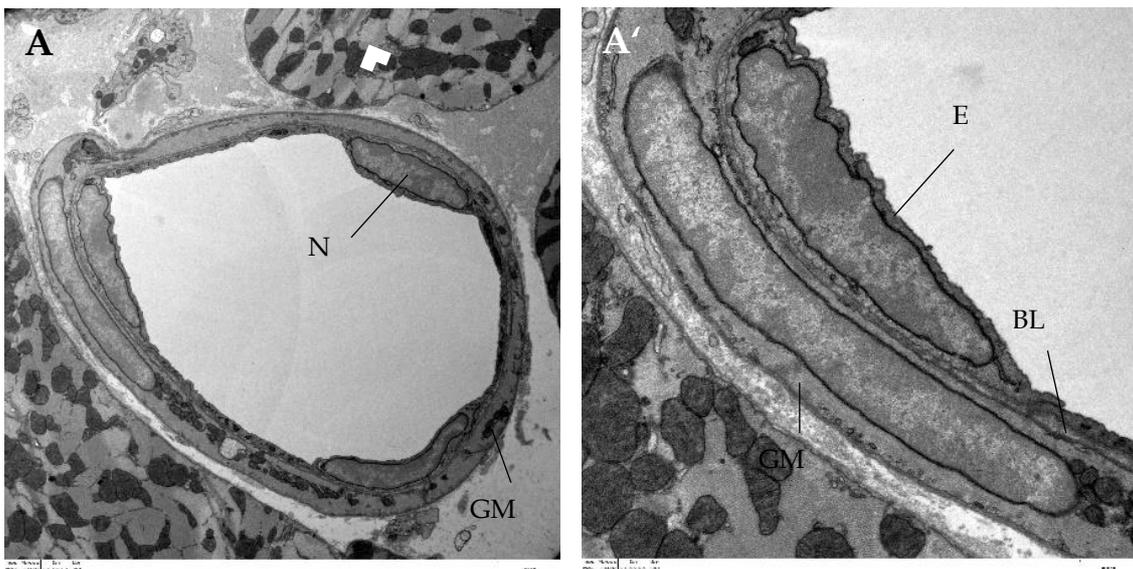


Abbildung 5: TEM-Aufnahme einer Arteriole im murinen Arbeitsmyokard. (Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung des modifizierten Protokolls für die serielle Rasterelektronenmikroskopie)
 N, Endothelzellkern. BL, Basallamina. E, Endothelzelle. GM, Glatte Muskelzelle. Kardiomyozyt (Pfeilspitze). Vergrößerung: 4000 fach (A); 10000 fach (A').

3.1.3 Direkter Vergleich der beiden Protokolle

Auch im direkten Vergleich (Abbildung 6) offenbaren sich die Stärken der Fixierung und Kontrastierung mit dem modifizierten Protokoll für die serielle Block-face Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung 6B, D) gegenüber der konventionellen Fixierung und Kontrastierung (Abbildung 6A, C). Die verschiedenen Zellen des Mikrogefäßsystems und die Basallamina sind klar abzugrenzen und die Membranen in idealer Weise kontrastiert. Eine eindeutige Identifikation der verschiedenen Zelltypen, die Voraussetzung für die Analyse

des Gewebes mittels serieller Block-face Rasterelektronenmikroskopie, wird dadurch möglich.

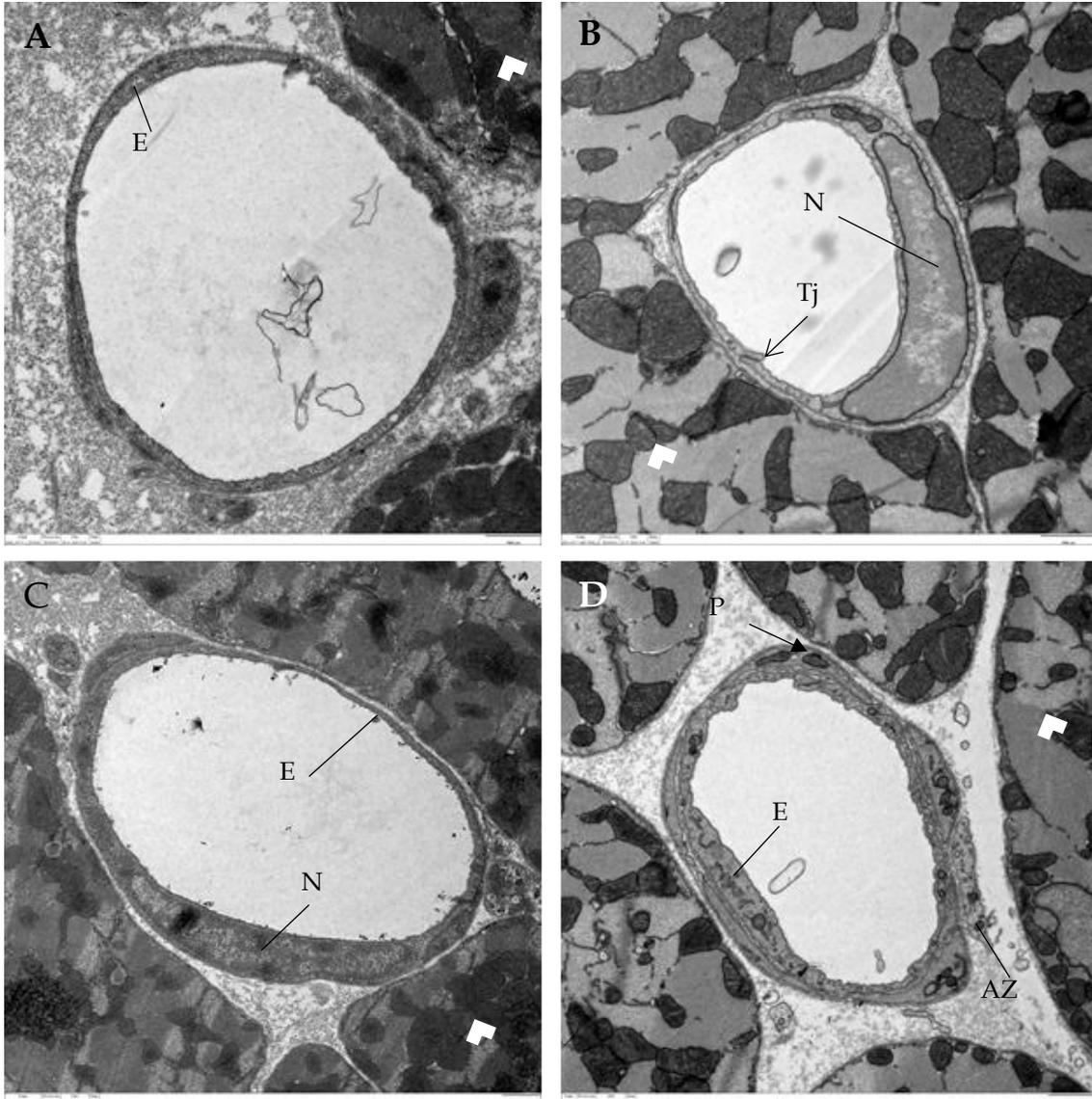


Abbildung 6: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Direkter Vergleich der konventionellen Fixierung und Kontrastierung (A,C) mit der Fixierung und Kontrastierung unter Verwendung des modifizierten Protokolls für die serielle Blockface Rasterelektronenmikroskopie (B,D)

E, Endothelzelle. P, Perizytenfortsatz. Tj, Tight junctions. N, Endothelzellkern. AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Kardiomyozyt (Pfeilspitze). Vergrößerung: 6300 fach (C); 8000 fach (D); 10000 fach (A,B).

3.2 Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze mittels serieller Block-face Rasterelektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion ausgewählter Abschnitte des Mikrogefäßsystems

Nach der Etablierung des optimierten Protokolls wurden mehrere ausgewählte Abschnitte des Mikrogefäßsystems im murinen Arbeitsmyokard mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie analysiert und rekonstruiert.

Mit Hilfe der implementierten Software DigitalMicrograph® wurden zunächst in einer Übersichtsaufnahme verschiedene Regions of Interest (ROIs) bestimmt. Die Größe des Ausschnitts und die Anzahl der ROIs lassen sich hierbei beliebig einstellen. Bei der Auswahl der ROIs ist zu beachten, dass sich die Probe in Bereichen, die sehr viel freien Interzellularraum und damit nichtleitendes Epon enthalten, bei zunehmender Datenakquirierung aufladen kann, wodurch die Bildqualität stark beeinträchtigt wird. Ebenfalls muss darauf geachtet werden, dass die Kapillaren bzw. die angrenzenden Myofilamente der Kardiomyozyten vorwiegend im Querschnitt vorliegen. Die verschiedenen Zelltypen und die Basallamina lassen sich auf diese Weise besser abgrenzen und die Gefäße dadurch besser verfolgen. Darüber hinaus besteht die Notwendigkeit einer erneuten Einstellung einer ROI, sofern das Gefäß während der Datenerhebung die markierte Region verlässt. Dies kann durch seine Lage im dreidimensionalen Raum oder eine Verzweigung bedingt sein. ROIs, die nur Anteile desselben Gefäßes zeigen, müssen nach der Datenakquirierung aufwändig zusammengefügt werden.

Die Proben wurden ausschließlich im Hochvakuum gescannt. Der Kammerdruck lag bei ca. 15PA und es wurde eine Spannung von 2,2kV angelegt.

Um nach der Datenakquirierung ein dreidimensionales Modell der aufgenommenen Gefäße zu erstellen, müssen die Aufnahmen zunächst mit Hilfe der Software DigitalMicrograph® und Fiji aligniert werden, um den

auf ladungsbedingten leichten Drift zu korrigieren. Danach erfolgt die Segmentierung der verschiedenen Strukturen unter Verwendung des Trakem-2-Plugin in Fiji und die Erstellung eines dreidimensionalen Modells unter Verwendung des open-source Programm tomviz.

Insgesamt wurden sechs ROIs zur Auswertung herangezogen. Die Anzahl der verwendeten Einzelaufnahmen kann aufgrund der Vereinigung zweier Gefäße oder enormer Größenzunahme und damit einhergehendem Aufnahmeende dieser ROIs leicht variieren.

Bei der Segmentierung standen die Endothelzellen, die Perizyten, die Basallamina, die Kapillarwand-assoziierten Zellen und teilweise auch die Kardiomyozyten im Fokus der Rekonstruktion.

Vereinzelte unscharfe oder identische Aufnahmen wurden aus dem Datensatz entfernt. Identische Aufnahmen können aufgrund minimaler Veränderungen der Probe im Hochvakuum bei Aufnahmestopp für mehrere Stunden oder Tage entstehen.

Bei den Regionen „ROI 00“ und „ROI 02“ wurden alle verwertbaren Schnitte für die Segmentierung verwendet, bei den vier übrigen Regionen wurde nur jeder dritte Schnitt für die Segmentierung verwendet.

3.2.1 Analyse und Rekonstruktion von ROI 03

Insgesamt wurden 720 Einzelaufnahmen dieser Kapillare erzeugt. Für die Segmentierung und Rekonstruktion wurde jede dritte Aufnahme verwendet. Insgesamt wurden 237 Einzelaufnahmen für die Rekonstruktion verwendet.

Die ROI 03 zeigt eine Kapillare (Abbildung 7), die zunächst ausschließlich von einer Endothelzelle und im weiteren Verlauf von zwei unterschiedlichen Endothelzellen gebildet wird. Zwischen den Kardiomyozyten und in unmittelbarer Nähe zu den Endothelzellen sind zwei Kapillarwand-assoziierte Zellen lokalisiert. Der Fortsatz eines Perizyten ist sehr eng mit der abluminalen

Seite der Endothelzellen assoziiert. Die Basallamina ist durchgehend und umhüllt sowohl die Endothelzellen als auch den Fortsatz des Perizyten.

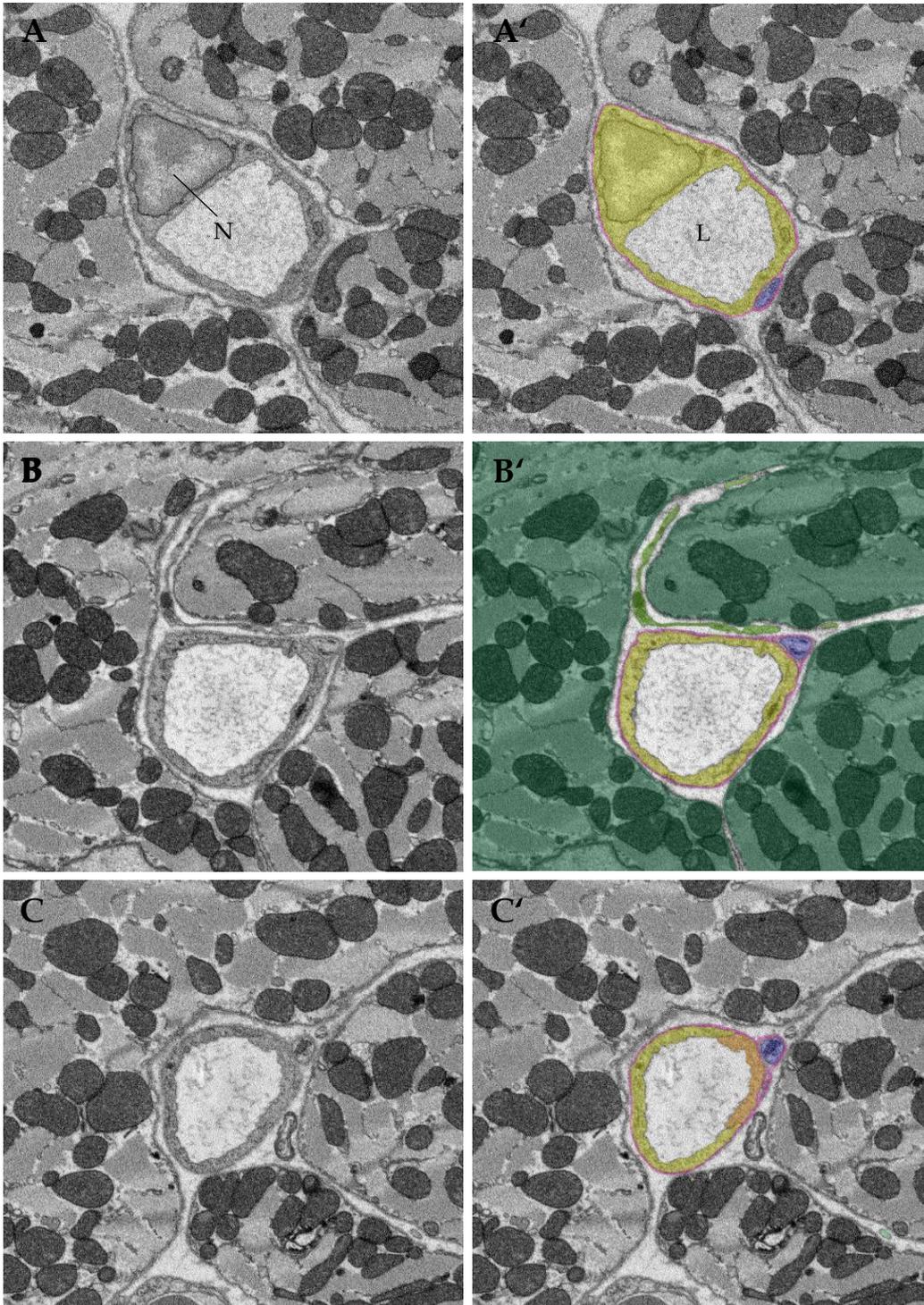


Abbildung 7: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03.
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grün**, Kardiomyozyt. **N**, Endothelzellkern. **L**, Kapillarlumen. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 1/237. B, B' Schnitt 103/237. C,C' Schnitt 237/ 237.

Das dreidimensionale Modell (Abbildung 8) zeigt den Ausschnitt eines Bereiches der Mikrovaskulatur von 36 μ m Länge. Der Gefäßabschnitt wird durch zwei Endothelzellen und einen parallel dazu verlaufenden Fortsatz eines Perizyten gebildet. Die Kapillare wird durch mehrere Fortsätze zweier Kapillarwand-assoziiierter Zellen in ihrem Verlauf begleitet, die im Interzellularraum verlaufend an die Kapillare herantreten.

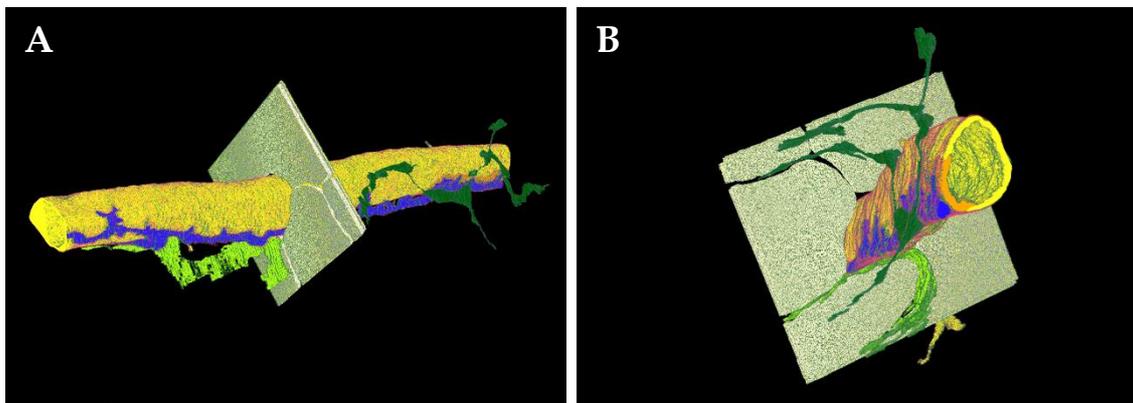


Abbildung 8: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03. Darstellung aller segmentierter Zellen. **Gelb**, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. **Graugrün**, Kardiomyozyten. - schematische Darstellung im mittleren Abschnitt. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36 μ m.

Die genauere Betrachtung der Kapillarwand-assoziierten Zelle 1 zeigt in einigen Regionen die Annäherung eines ihrer Fortsätze an die Endothelzellen bzw. die umgebende Basallamina (Abbildung 9).

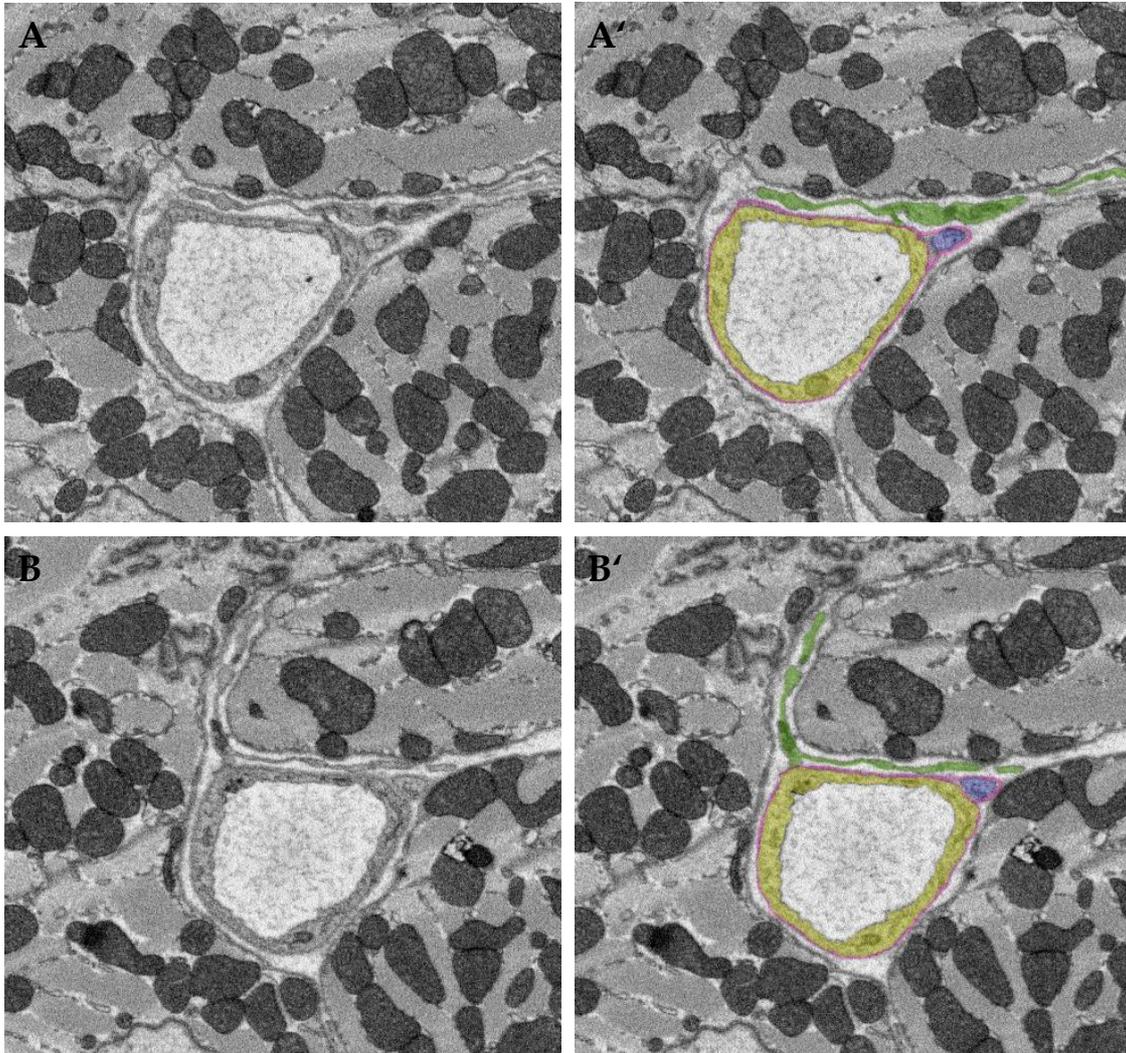


Abbildung 9: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03.
Gelb, Endothelzelle 1. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A,B) und segmentierte Aufnahmen (A', B'). A,A' Schnitt 93/237. B, B' Schnitt 101/237.

Der Verlauf der Kapillarwand-assoziierten Zellen anhand des dreidimensionalen Modells (Abbildung 10) zeigt, dass die Fortsätze dieser Zellen zwischen den Kardiomyozyten im Interzellularraum lokalisiert sind. Diese Fortsätze treten an verschiedenen Stellen an die Kapillare heran. Ob Zell-Zell-Kontakte zwischen Kapillarwand-assoziierten Zellen und Endothelzellen

bestehen, ist diesem Modell nicht zu entnehmen. Der Perizytenfortsatz ist nicht mit dem Fortsatz der Kapillarwand-assoziierten Zellen assoziiert (Abbildung 10).

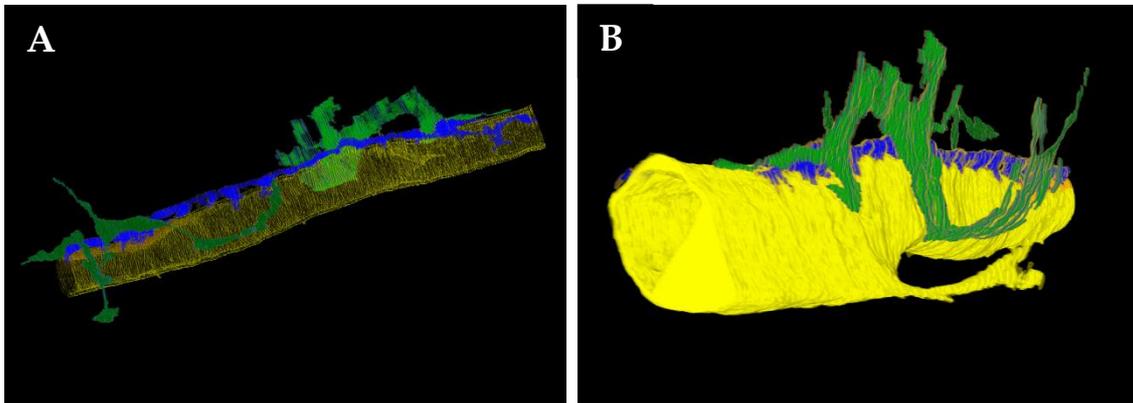


Abbildung 10: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03. Darstellung ohne Basallamina und Kardiomyozyten. **Gelb**, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. In Bild A wurde die Endothelzelle 1 durchscheinend dargestellt. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36µm.

Die Aufnahmen in Abbildung 11 zeigen eine Kapillarwand-assoziierte Zelle, die sich zwischen den Fortsatz des Perizyten und die Endothelzelle schiebt.

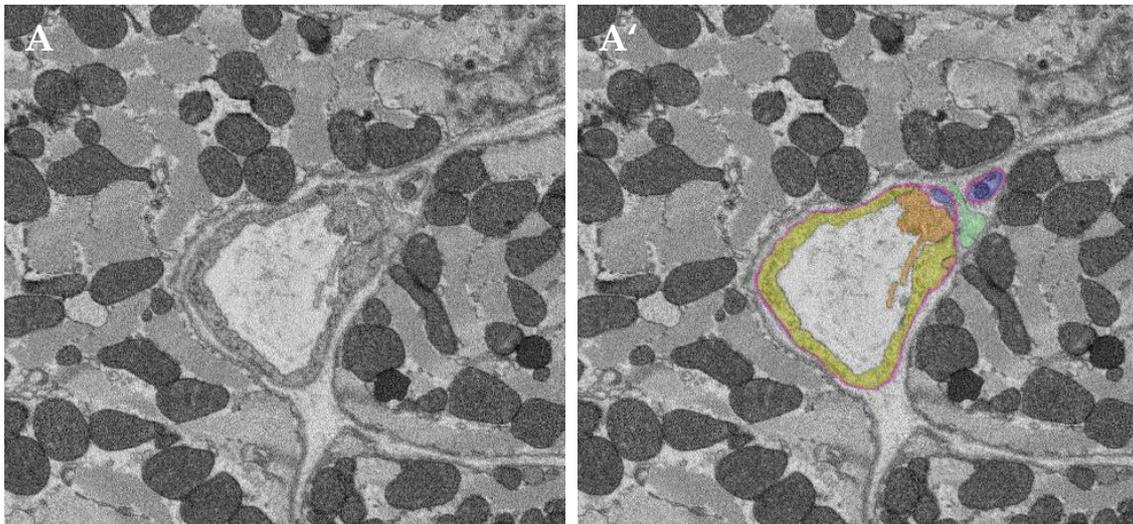


Abbildung 11: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03. **Gelb**, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Türkisgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahme (A) und segmentierte Aufnahme (A'). A,A' Schnitt 186/237.

Der Perizyt bzw. dessen Fortsätze bedecken das Endothel dieses rekonstruierten Gefäßabschnittes nur in einem kleinen Bereich. Der Perizyt verläuft nahezu geradlinig entlang der Gefäßachse und gibt nur kleinere Äste ab, die senkrecht zur Kapillare hin verlaufen (Abbildung 12). Darüber hinaus zeigt dieses Modell den Verlauf der Endothelzellen, einzelne zelluläre Fortsätze und ihre Überlappung bzw. Verzahnung.

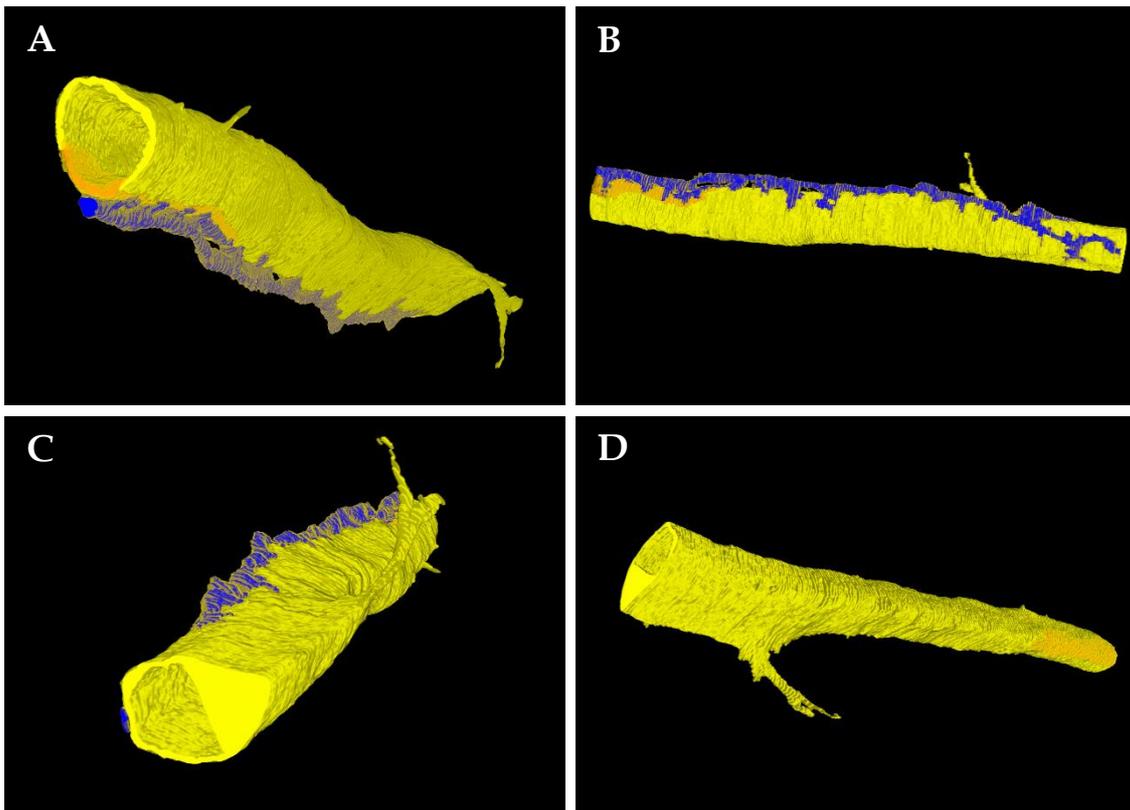


Abbildung 12: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03.

Darstellung der Endothelzellen und des Perizyten (A-C) bzw. nur Endothelzellen (D).

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyt. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36 μ m.

3.2.2 Analyse und Rekonstruktion von ROI 04

Insgesamt wurden 596 Einzelaufnahmen dieser Kapillare erzeugt. Für die Segmentierung und Rekonstruktion wurde jede dritte Aufnahme verwendet.

Insgesamt wurden 204 Einzelaufnahmen für die Rekonstruktion verwendet.

ROI 04 zeigt eine Kapillare, die aus insgesamt zwei Endothelzellen und umgebender Basallamina sowie einem Perizytenfortsatz gebildet wird, (Abbildung 13). Kapillarwand-assoziierte Zellen sind nicht vorhanden.

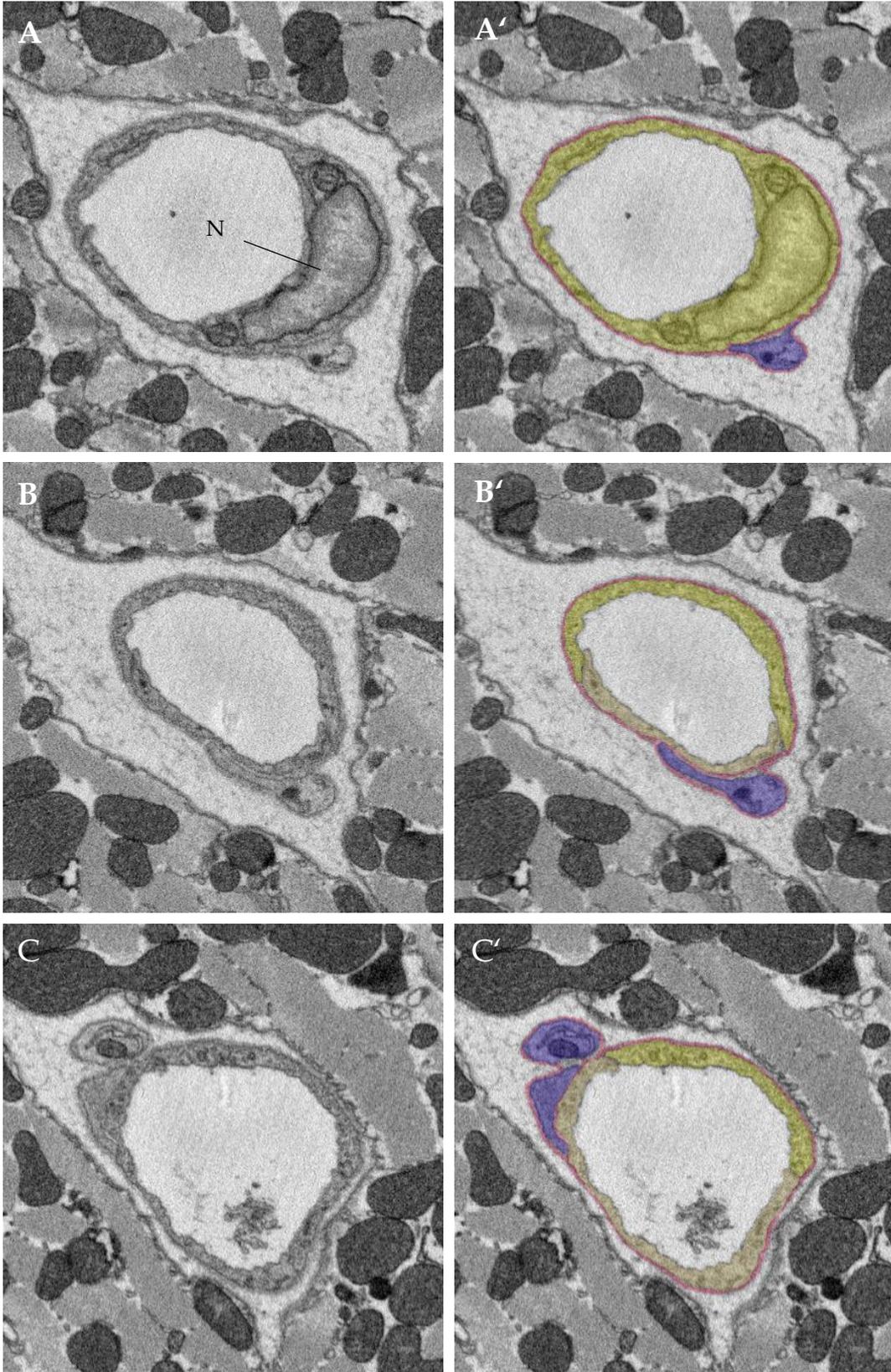


Abbildung 13: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 04.
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange,** Endothelzelle 2. **Pink,** Basallamina. **Blau,** Perizyt. **N,** Endothelzellkern. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 1/203. B,B' Schnitt 106/203. C,C' Schnitt 203/ 203.

Der Ausschnitt der Kapillare weist eine Länge von 29,8 μm auf. Sowohl Endothelzellen als auch der Perizyt werden von derselben Basallamina umgeben.

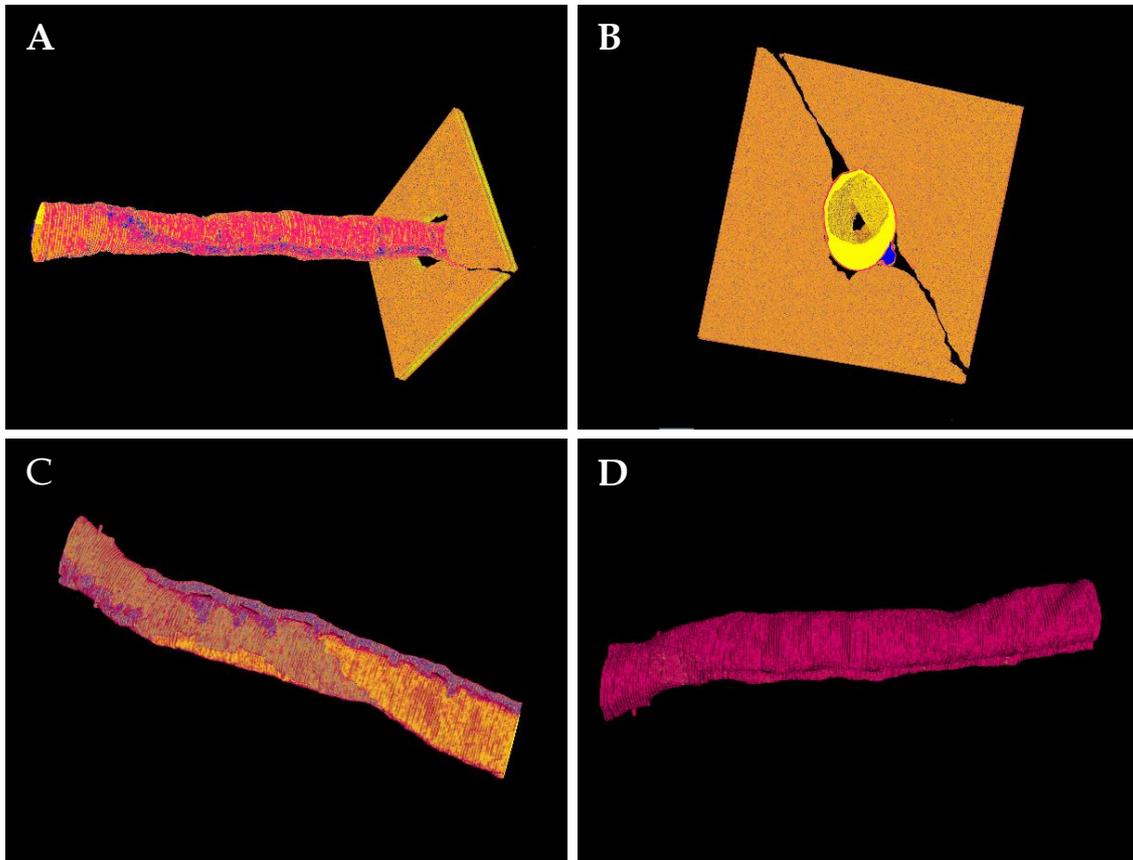


Abbildung 14: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 04. Darstellung der segmentierter Zellen mit (A,B) bzw. ohne Kardiomyozyten in einer Ebene (C,D)
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grauorange**, Kardiomyozyten - schematische Darstellung. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 29,8 μm .

Der Perizytenfortsatz befindet sich in dieser ROI vorwiegend an einer Seite der Kapillare (Abbildung 15), bevor er sich teilt und weiter entlang der Längsachse des Gefäßes verläuft.

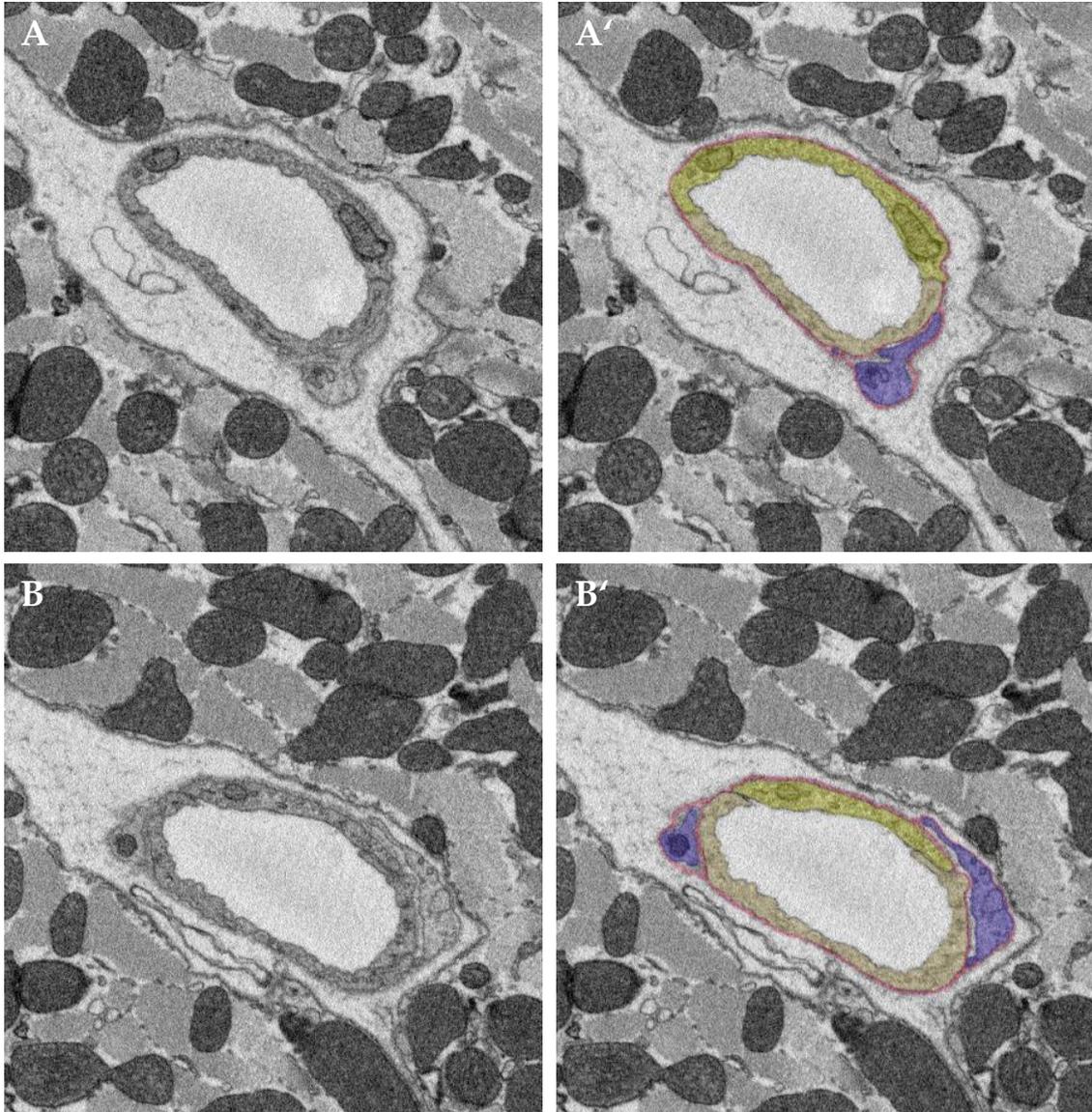


Abbildung 15: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 04. Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Pink, Basallamina. Blau, Perizyt. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A, B) und segmentierte Aufnahmen (A', B'). A, A' Schnitt 130/203. B, B' Schnitt 172/203.

Das 3D-Modell zeigt, dass auch in dieser ROI der Perizyot vorwiegend geradlinig entlang der Längsachse der Kapillare verläuft, bevor er sich aufteilt und mit zwei Fortsätzen anteilig die beiden Endothelzellen bedeckt (Abbildung 16). Die Endothelzellen selbst bilden keine Fortsätze, sind aber stark miteinander verzahnt.

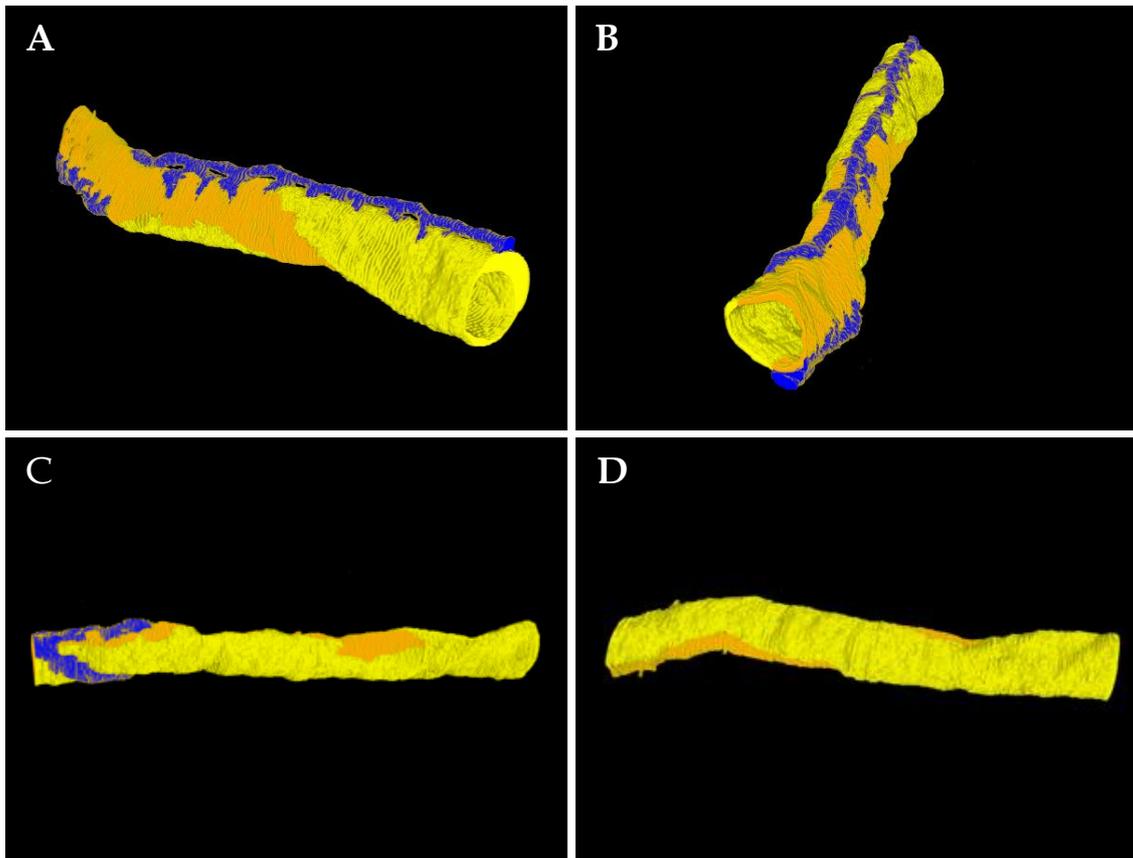


Abbildung 16: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 04.
Darstellung der Endothelzellen und des Perizyten (A-C) bzw. nur der Endothelzellen (D). **Gelb**, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyot. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 29,8 μ m.

3.2.3 Analyse und Rekonstruktion von ROI 06

Insgesamt wurden 732 Einzelaufnahmen dieser Kapillare erzeugt. Für die Segmentierung und Rekonstruktion wurde jede dritte Aufnahme benutzt. Insgesamt wurden 245 Einzelaufnahmen für die Rekonstruktion segmentiert und verwendet.

ROI 06 zeigt einen Gefäßabschnitt, der aus insgesamt zwei Endothelzellen, der Basallamina und einem Perizyt sowie vier Kapillarwand-assoziierte Zellen besteht (Abbildung 17). Die Kapillare teilt sich in zwei kleinere Äste auf. In unmittelbarer Nähe der Endothelzellen befindet sich der Zellkörper des Perizyten.

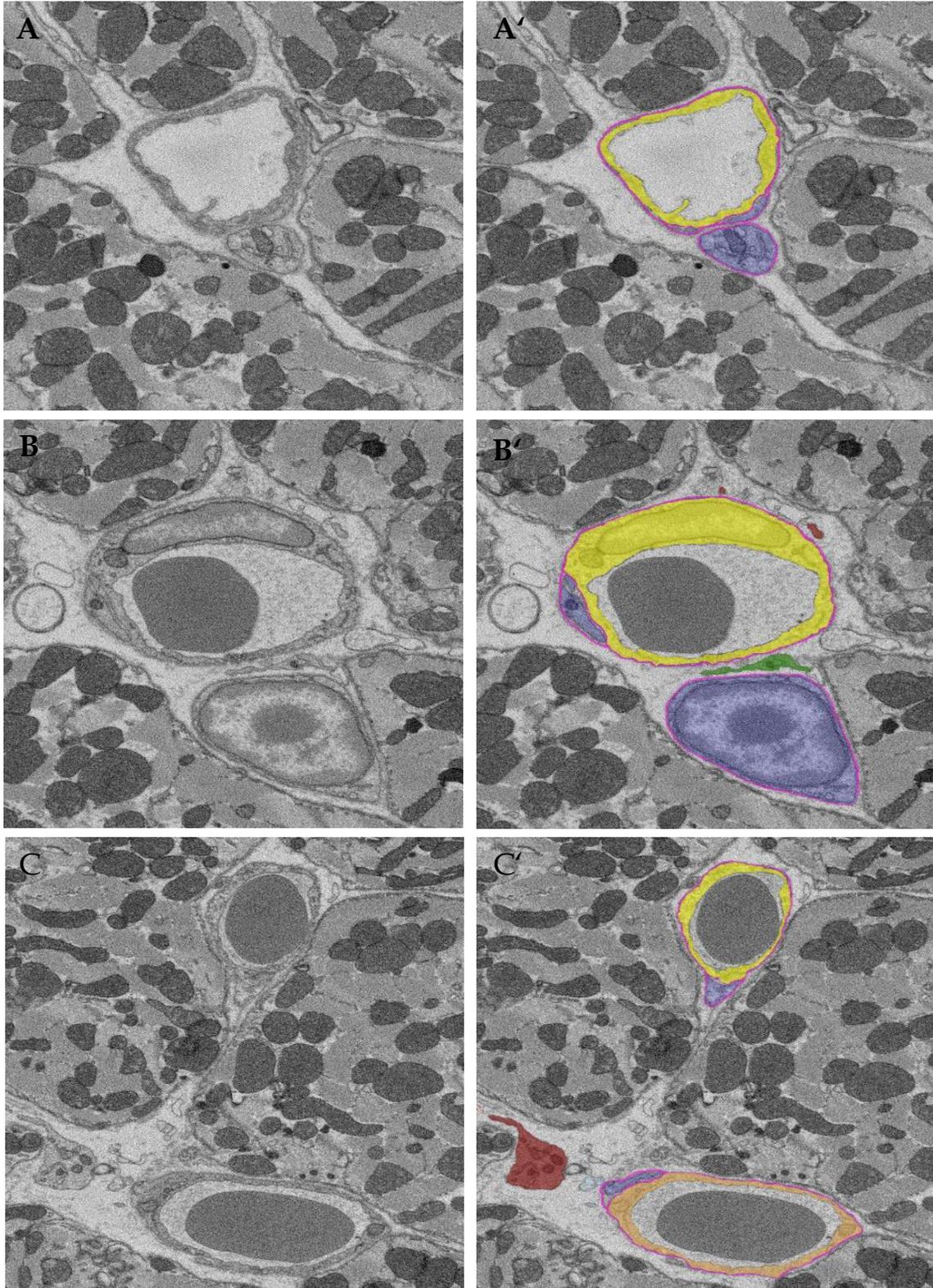


Abbildung 17: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 06.

Übersicht.

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Rot**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. **Hellblau** Kapillarwand-assoziierte Zelle 4. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 1/245. B,B' Schnitt 135/245. C,C' Schnitt 245/ 245.

Die Kapillare weist eine Länge von 36,6µm auf. Der Zellkörper des Perizyten verläuft parallel der Gefäßlängsachse (Abbildung 18). Er ist kontinuierlich von einer Basallamina umgeben.

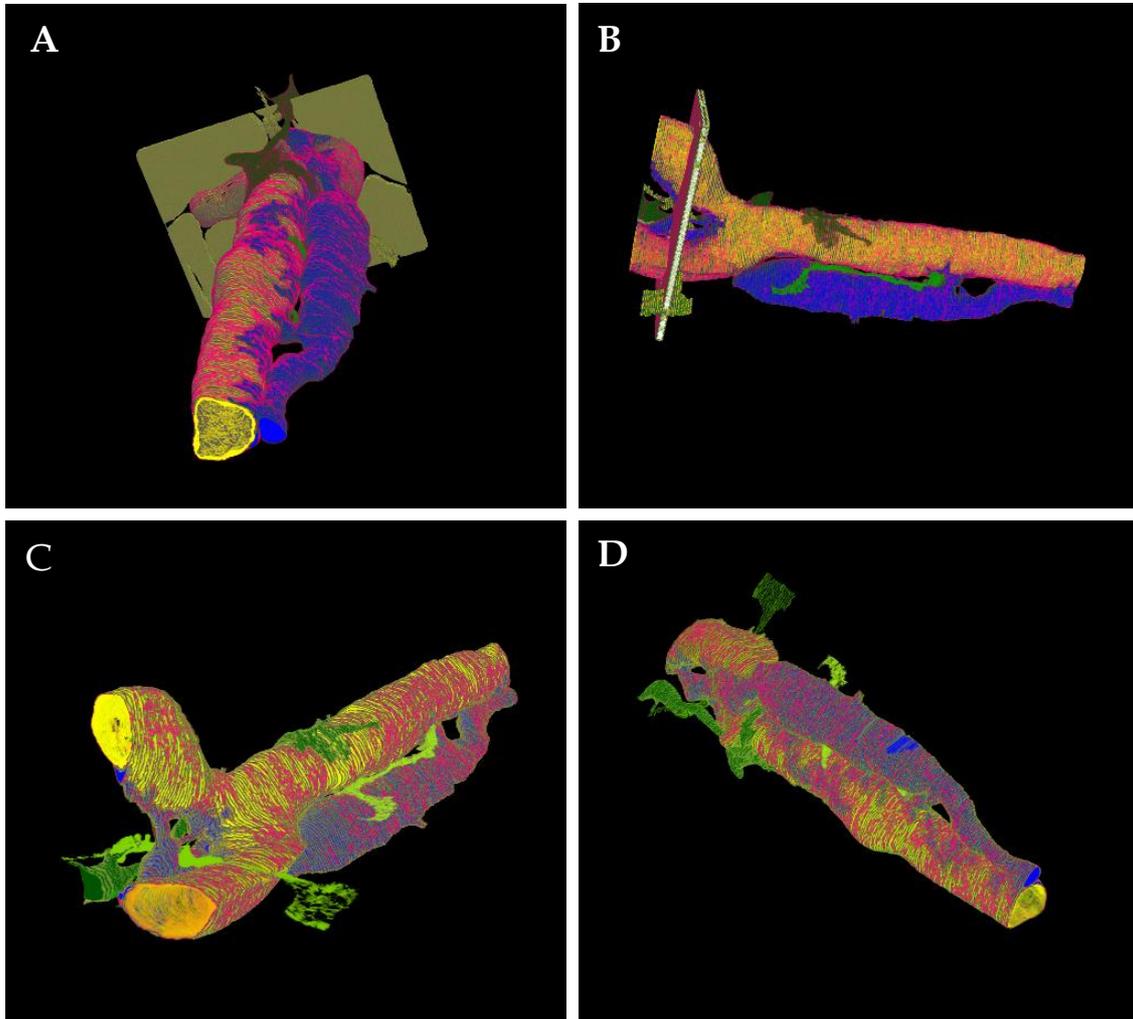


Abbildung 18: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06. Darstellung aller segmentierter Zellen mit (A,B) bzw. ohne Kardiomyozyten (C,D)

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zellen 1 und 3. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zellen 2 und 4. **Graubraun**, Kardiomyozyten - schematische Darstellung. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

In Abbildung 19 ist die räumliche Lokalisation der Kapillare, des Perizyten und eines Fortsatzes der Kapillarwand-assoziierten Zelle zu erkennen. Es lassen sich keine Regionen identifizieren, in der Perizyt und Kapillarwand-assoziierte Zelle in enger Assoziation vorliegen.

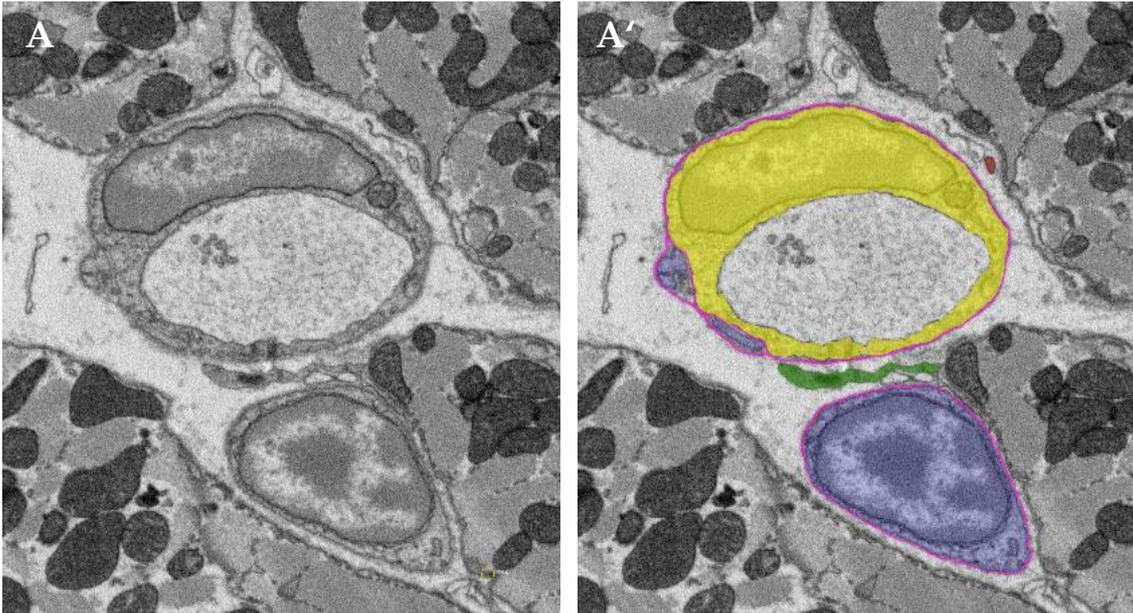


Abbildung 19: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 06.
Gelb, Endothelzelle 1. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahme (A) und segmentierte Aufnahme (A'). A, A' Schnitte 129/245c.

Auch das dreidimensionale Modell (Abbildung 20) lässt keine Rückschlüsse auf Kontaktstellen zwischen Perizyten und Kapillarwand-assoziierten Zellen zu. Interessanterweise sind die Kapillarwand-assoziierten Zellen weit größer als angenommen und ihre Fortsätze liegen weit verzweigt zwischen den Kardiomyozyten. Eine komplette Rekonstruktion dieser Zellen war aufgrund der gewählten Größe der ROIs nicht möglich.

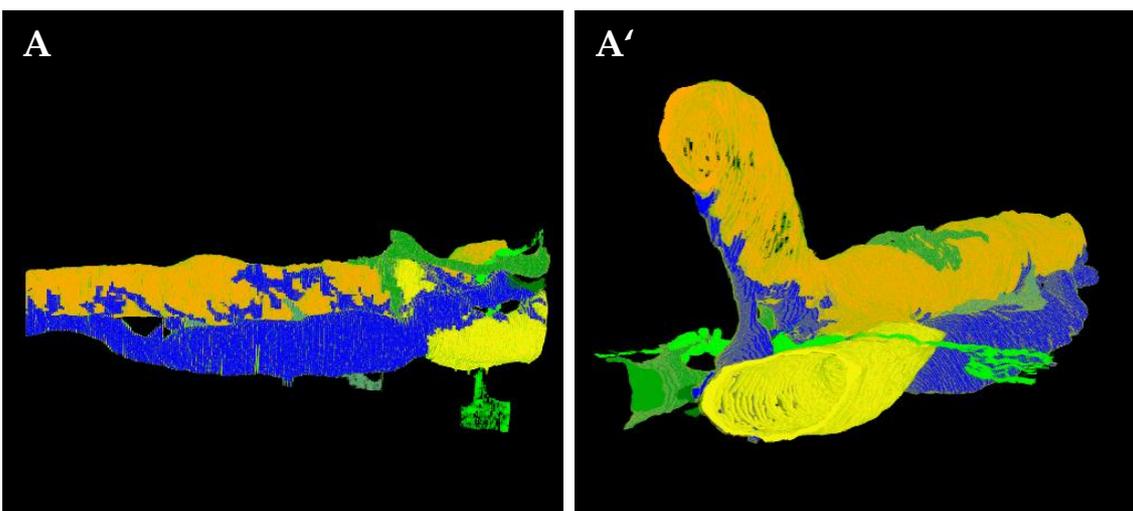


Abbildung 20: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06. Darstellung ohne Basallamina und Kardiomyozyt. **Gelb**, Endothel. **Orange**, Endothel 2. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1/3. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2/4. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

Der Zellkörper des in Abbildung 21 dargestellten Perizyten ist groß und verläuft entlang der Gefäßlängsachse. Er ist von der Basallamina umgeben und gibt kleinere Fortsätze ab, die mit der Endothelzelle der Kapillare assoziiert sind.

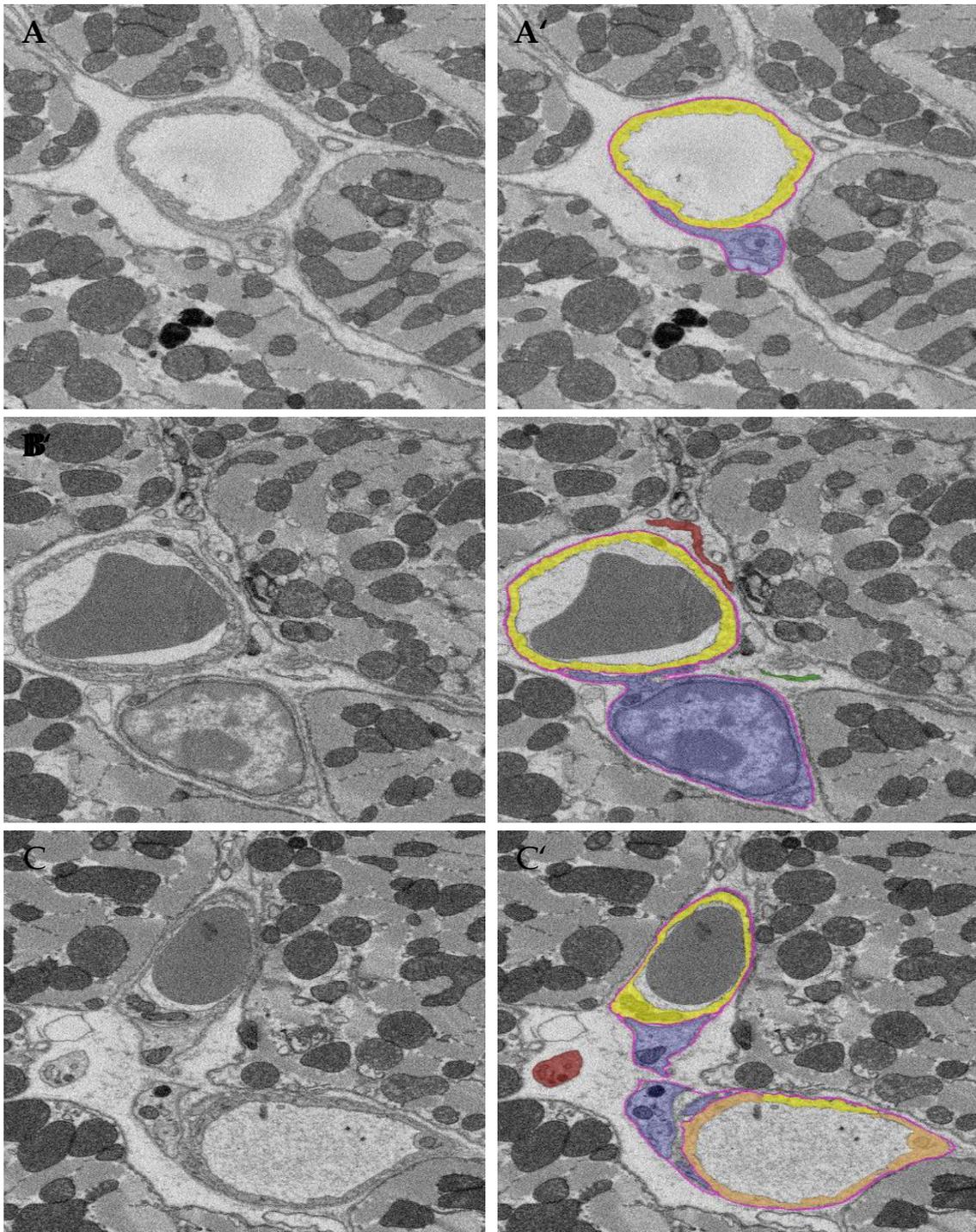


Abbildung 21: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-Sem Datensatzes der ROI 06. Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Pink, Basallamina. Blau, Perizyt. Grün, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1 Rot, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 13/245. B, B' Schnitt 153/245. C,C' Schnitt 209/245.

Nach der Verzweigung der Kapillare ist der Zellkörper des Perizyten zwischen den beiden Verzweigungen der Kapillare lokalisiert. Die Fortsätze des Perizyten sind jetzt mit beiden Verzweigungen der Kapillare assoziiert (Abbildung 21, Abbildung 22). Der Perizyt bedeckt die Kapillare nur zu einem kleinen Anteil. Der Zellkörper des Perizyten folgt weitestgehend linienförmig der Längsachse der Kapillare (Abbildung 22).

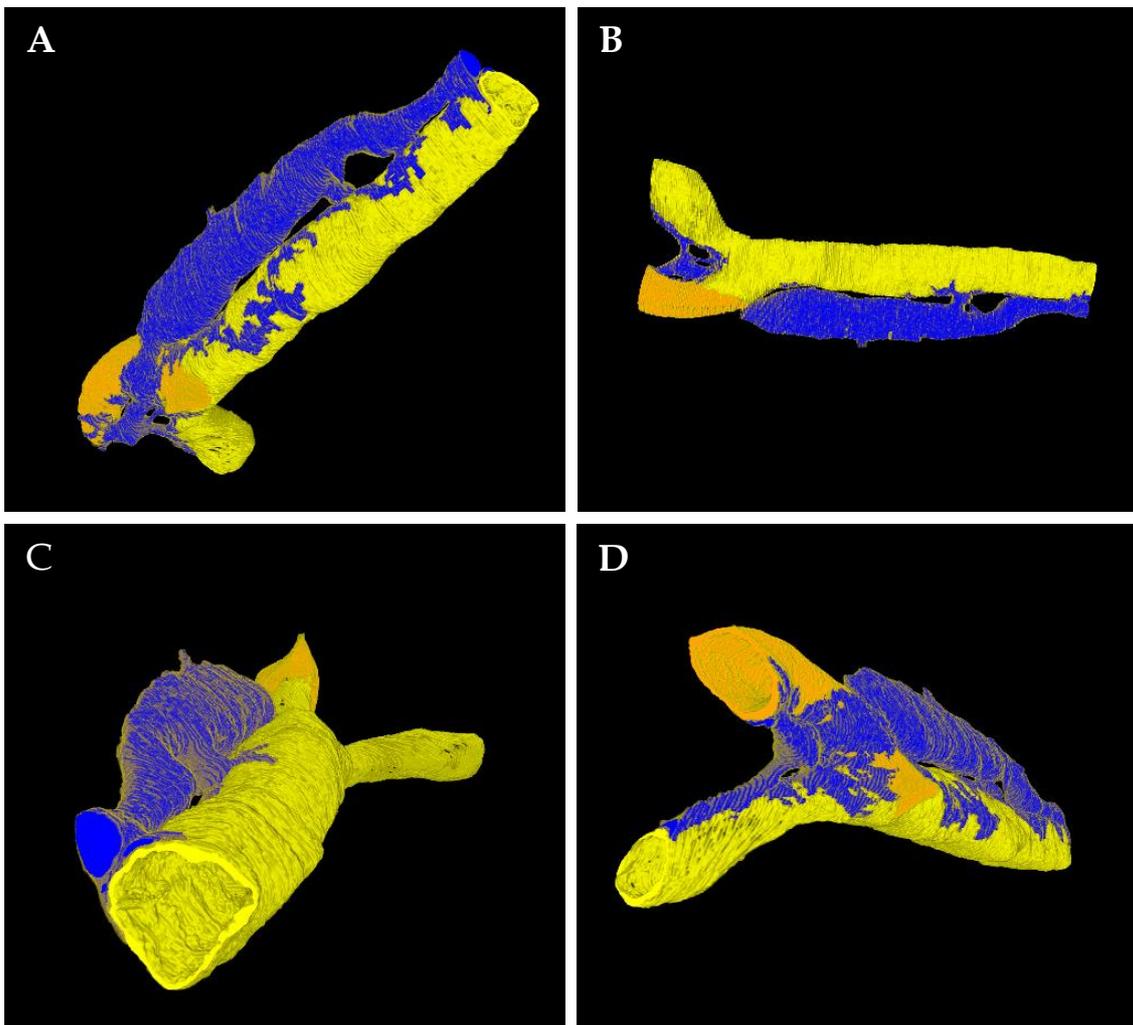


Abbildung 22: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06.
Darstellung der Endothelzellen und des Perizyten (A-C) bzw. nur der Endothelzellen (D).
Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Blau, Perizyt. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

Abbildung 23 zeigt die sich verzweigende Kapillare, die in der analysierten Region zum größten Teil von der ersten Endothelzelle gebildet wird. Diese verzahnt sich vor der Verzweigung mit der zweiten Endothelzelle.

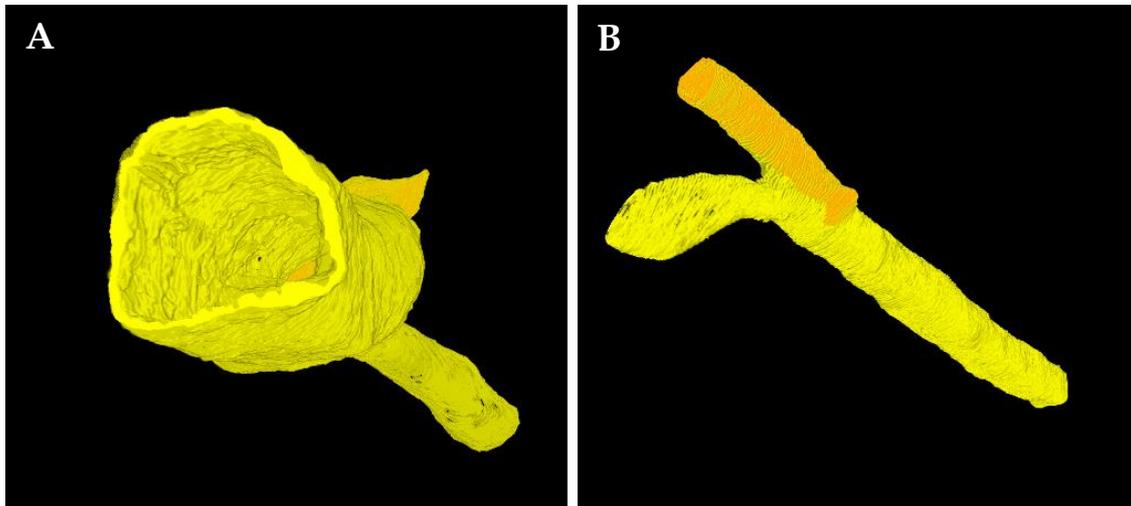


Abbildung 23: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06. Darstellung der Endothelzellen. Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

3.2.4 Analyse und Rekonstruktion von ROI 02

Insgesamt wurden 696 Einzelaufnahmen dieser Kapillare erzeugt. Für die Segmentierung und Rekonstruktion wurde jede Aufnahme verwendet.

Diese Kapillare weist eine Länge von 35 μ m auf. ROI 02 zeigt einen Gefäßabschnitt der aus zwei Endothelzellen, zwei Perizyten und zwei Kapillarwand-assoziierten Zellen gebildet wird (Abbildung 24).

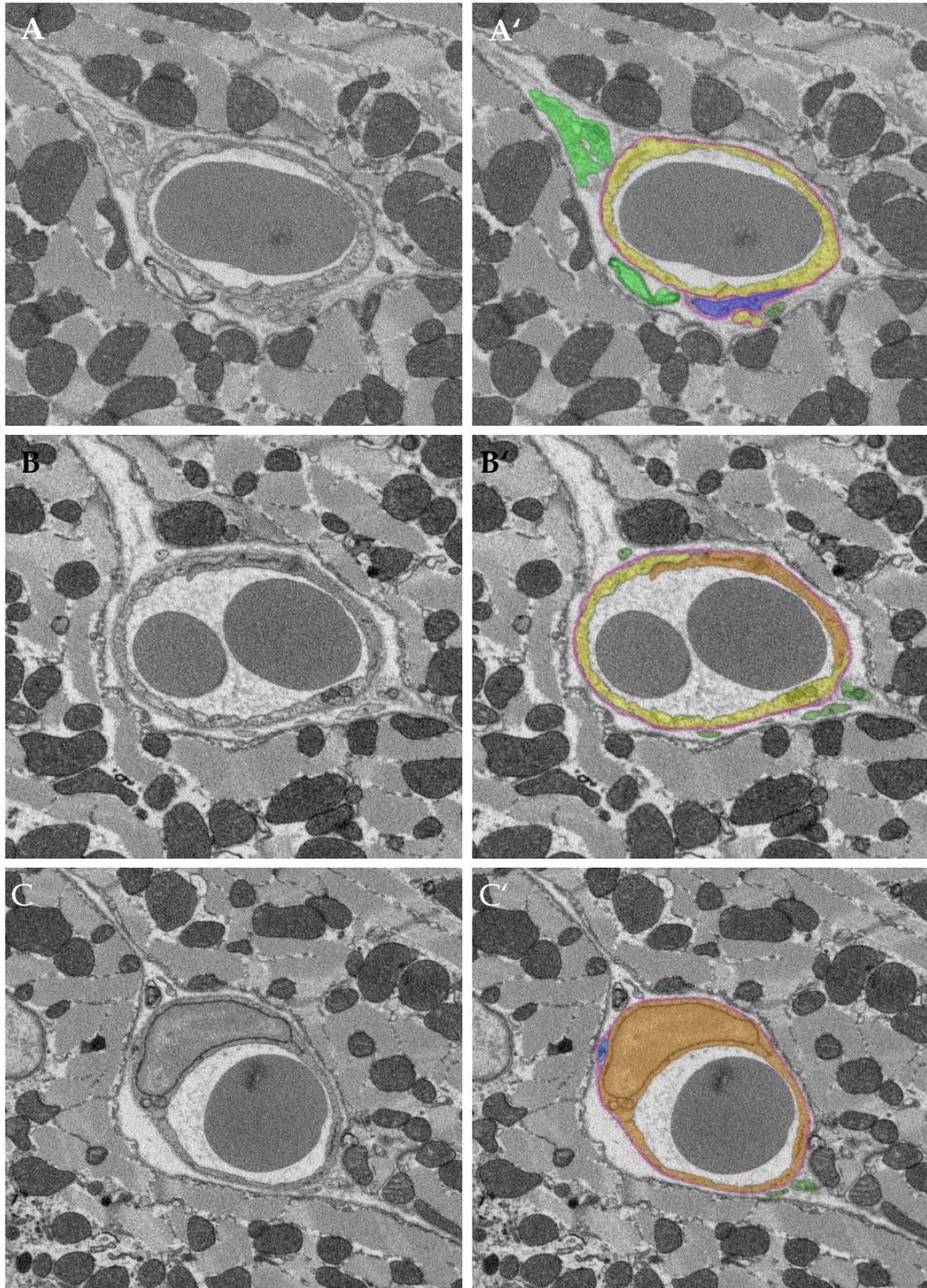


Abbildung 24: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes von ROI 02. Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Pink, Basallamina. Blau, Perizyt. Hellgrün, Gefäß-ssozierte Zelle 1. Dunkelgrün, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 1/664. B, B' Schnitt 357/664. C,C' Schnitt 663/664.

Die Betrachtung des dreidimensionalen Modells der ROI 02 zeigt eindrücklich, dass die Übergänge zwischen den segmentierten Einzelbildern im Vergleich zu Modellen, bei denen nur jede dritte Aufnahme segmentiert wurde, weicher sind und die Darstellung insgesamt schärfer und detaillierter wirkt (Abbildung 25). Dieser Teil der Kapillare ist nur an vereinzelten Stellen durch die beiden Perizytenfortsätze bedeckt. Beide Fortsätze sind von einer Basallamina umgeben (Abbildung 25).

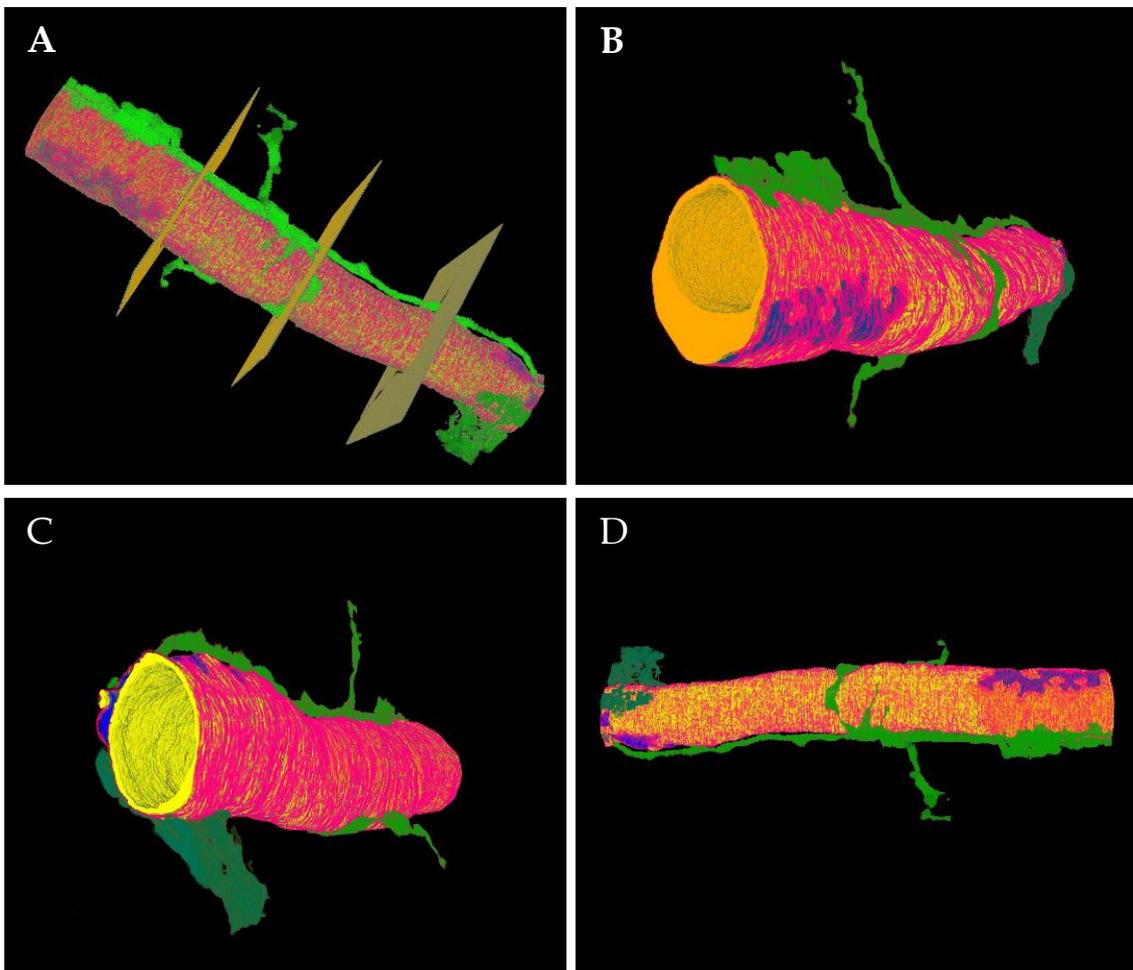


Abbildung 25: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.

Darstellung aller segmentierter Zellen mit (A) bzw. ohne Kardiomyozten (B-D)

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyten. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle.1 **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. **Graubraun**, Kardiomyozyt – schematische Darstellung. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35µm.

In Abbildung 26 steht die hellgrün dargestellte Kapillarwand-assoziierte Zelle 1 im Fokus. Sie folgt der Kapillare entlang deren Längsachse und gibt einzelne Fortsätze ab, die zum einen im Interzellularraum zwischen Kardiomyozyten lokalisiert sind, zum andern in sehr enger Assoziation mit der Kapillare stehen (Abbildung 26A, A'). Obwohl sich die Kapillarwand-assoziierte Zelle 2 teilweise angrenzend zur Basallamina bzw. den Endothelzellen befindet, ist keine direkte Kontaktstelle zu identifizieren, in der die Basallamina durchbrochen ist (Abbildung 26B, B').

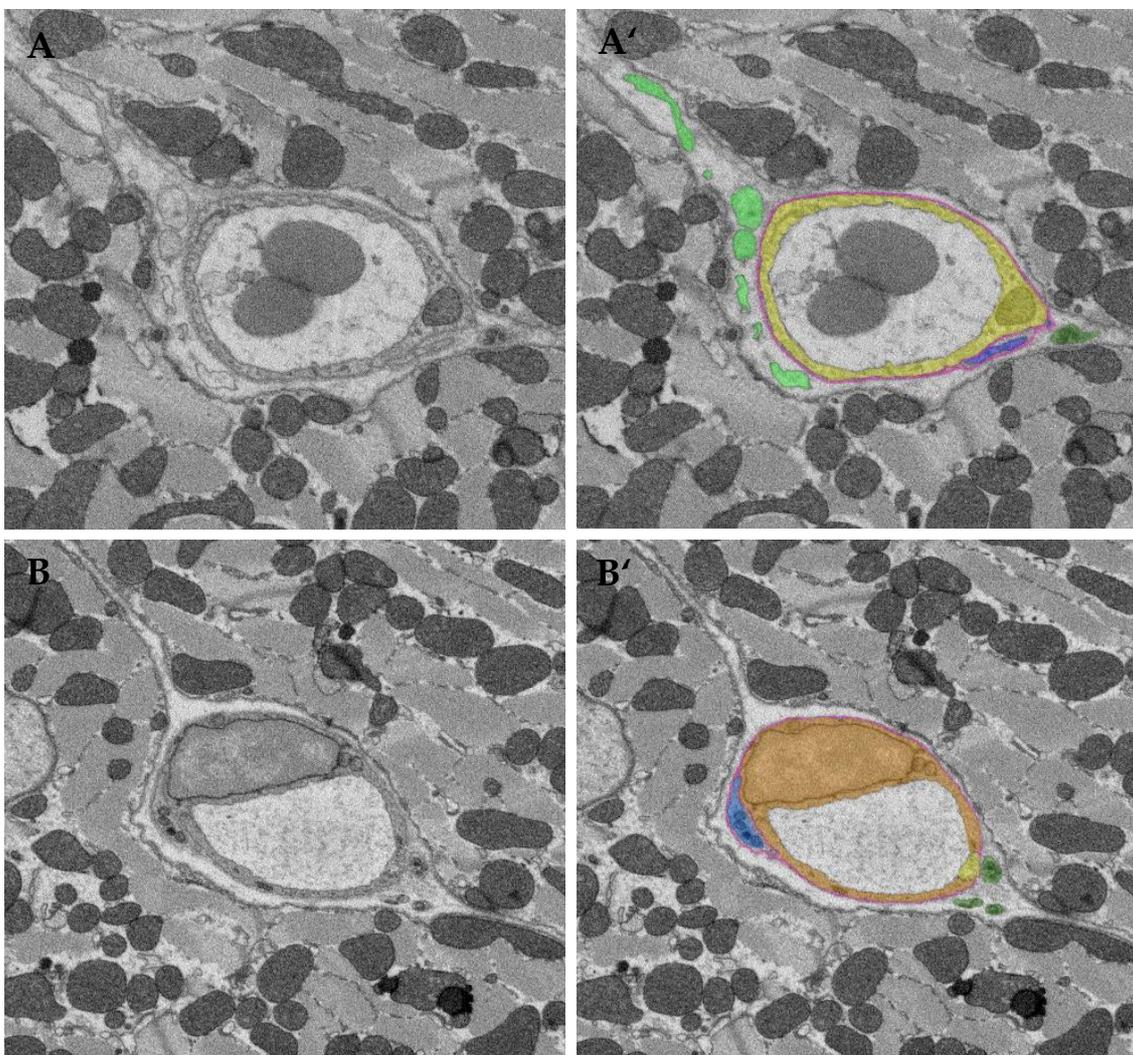


Abbildung 26: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 02.

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-B) und segmentierte Aufnahmen (A'-B'). A, A' Schnitt 51/664. B, B' Schnitt 523/664.

Das dreidimensionale Modell (Abbildung 27) zeigt einen nahezu geradlinigen Verlauf der Kapillarwand-assoziierten Zelle Nummer 1. Sie folgt der Kapillare in Längsrichtung und gibt im mittleren Bereich des vorliegenden Ausschnitts Ausläufer ab, die zum einen im Interzellularraum zwischen den Kardiomyozyten (hier nicht dargestellt) lokalisiert sind, zum anderen die Kapillare zumindest teilweise umfassen.

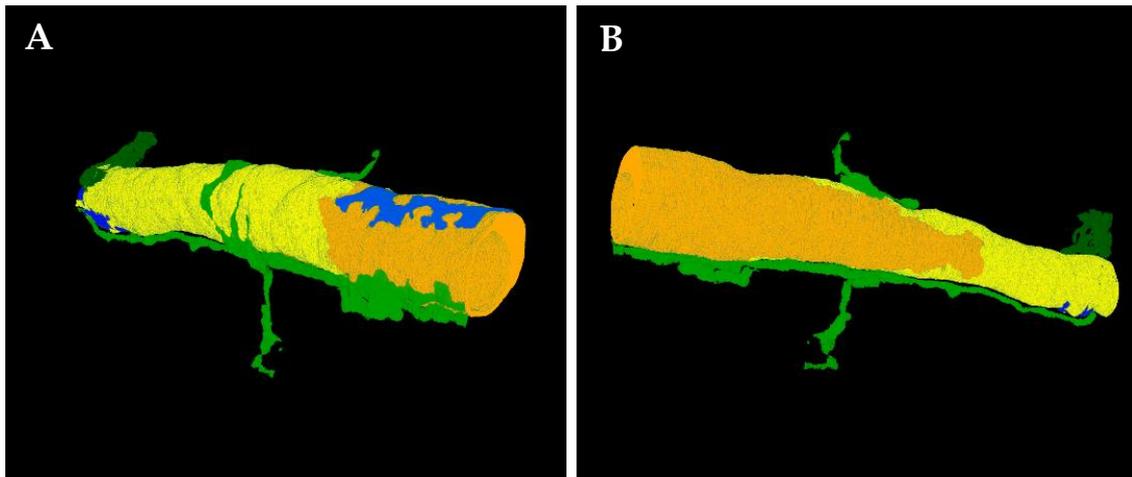


Abbildung 27: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyt. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1.
Dunkelgrün, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35µm.

Die Kapillare ist nur an vereinzelten Stellen durch Perizyten-Fortsätze bedeckt. Diese Fortsätze folgen der Längsachse der Kapillaren. Der größte Anteil der Kapillare weist keine Bedeckung von Perizyten auf (Abbildung 28).

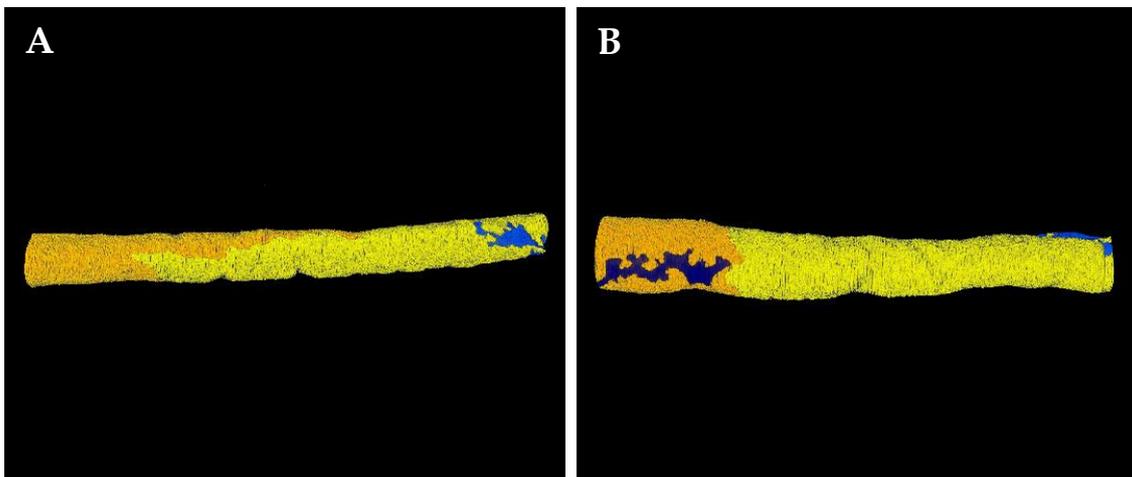


Abbildung 28: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.
 Darstellung der Endothelzellen und des Perizyten (A-B) **Gelb**, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2.
Blau, Perizyt. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35µm.

3.2.5 Analyse und Rekonstruktion von ROI 01

Diese ROI besteht aus einem Zusammenschluss zweier ROIs und anschließender Vergrößerung des Bildausschnitts. Die ersten Aufnahmen wurden zunächst mit Hilfe des unter 2.2.5 erwähnten Trak-EM2 Plug-ins zusammengefügt und aligniert. Insgesamt umfasst ROI 01 717 Aufnahmen. Für die Rekonstruktion des dreidimensionalen Modells wurden 240 Einzelaufnahmen segmentiert (Abbildung 29).

Der Abschnitt dieser Kapillare weist eine Länge von 35,8µm auf. ROI 01 zeigt einen Gefäßabschnitt der aus vier Endothelzellen, zwei Perizyten und zwei Kapillarwand-assoziierten Zellen gebildet wird (Abbildung 29).

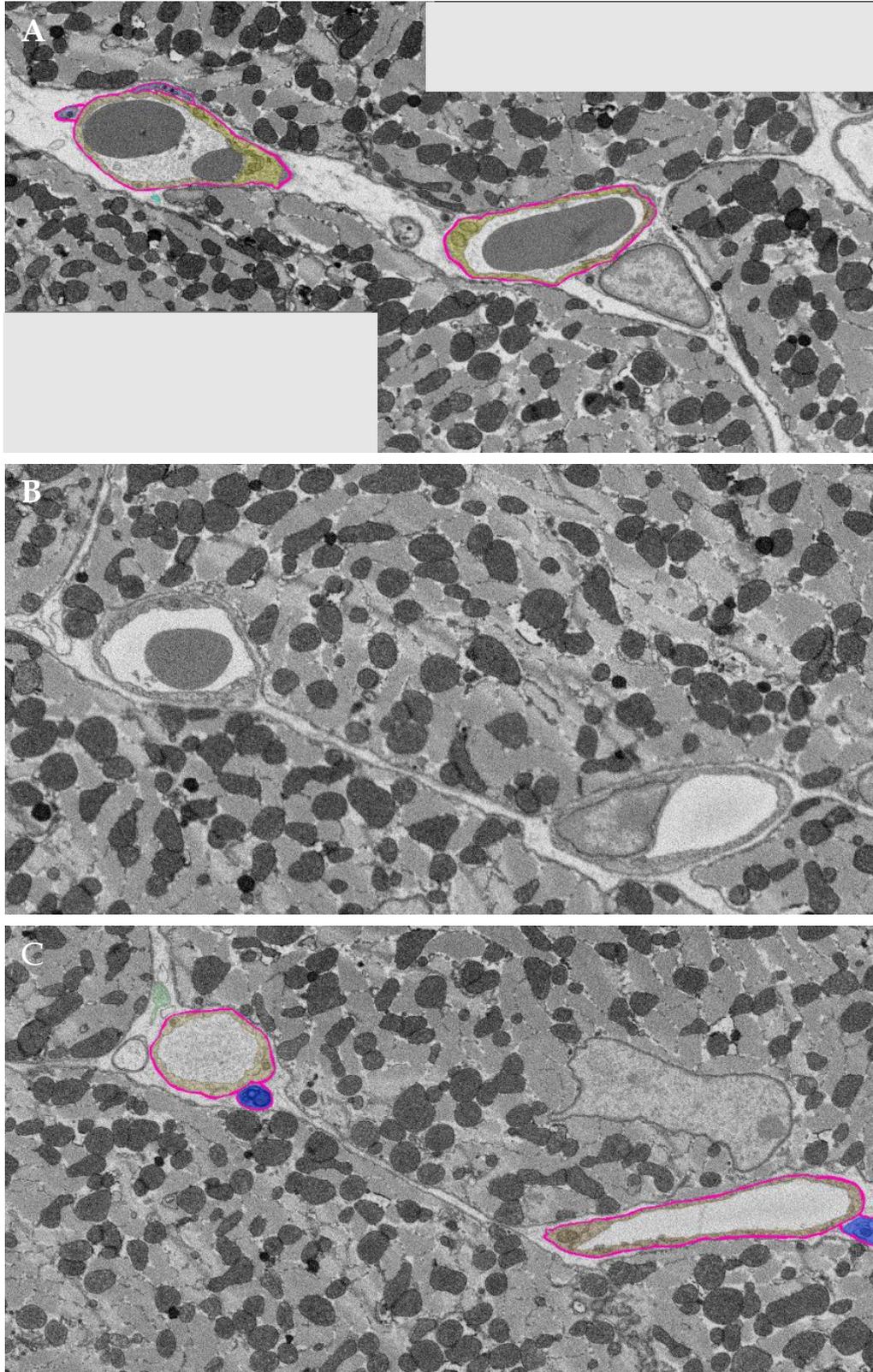


Abbildung 29: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 01.
 Übersicht. **Gelb**, Endothelzelle 1. **Gelborange**, Endothelzelle 2. **Orange**, Endothelzelle 3, **Lachsfarben**, Endothelzelle 4. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyten. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahme (B) und segmentierte Aufnahmen (A,C). A Schnitt 1/240. B, Schnitt 120/240. C, Schnitt 240/ 240.

Beide die Kapillare bedeckende Perizyten sind von einer Basallamina umgeben. Die Kapillare setzt sich zunächst aus zwei kleinen Verzweigungen zusammen, vereinigt sich und bildet ein gemeinsames Lumen und spaltet sich im weiteren Verlauf wiederum in zwei kleinere Verzweigungen auf (Abbildung 30). Einer der beiden Perizyten bedeckt sowohl Teile der vereinigten Kapillare als auch Anteile der verzweigten Kapillaren. Er folgt ihnen dabei in Längsrichtung und kontaktiert beide Kapillaren. Die Kapillarwand-assoziierten Zellen befinden sich v.a. in der direkten Umgebung der vereinigten Kapillare.

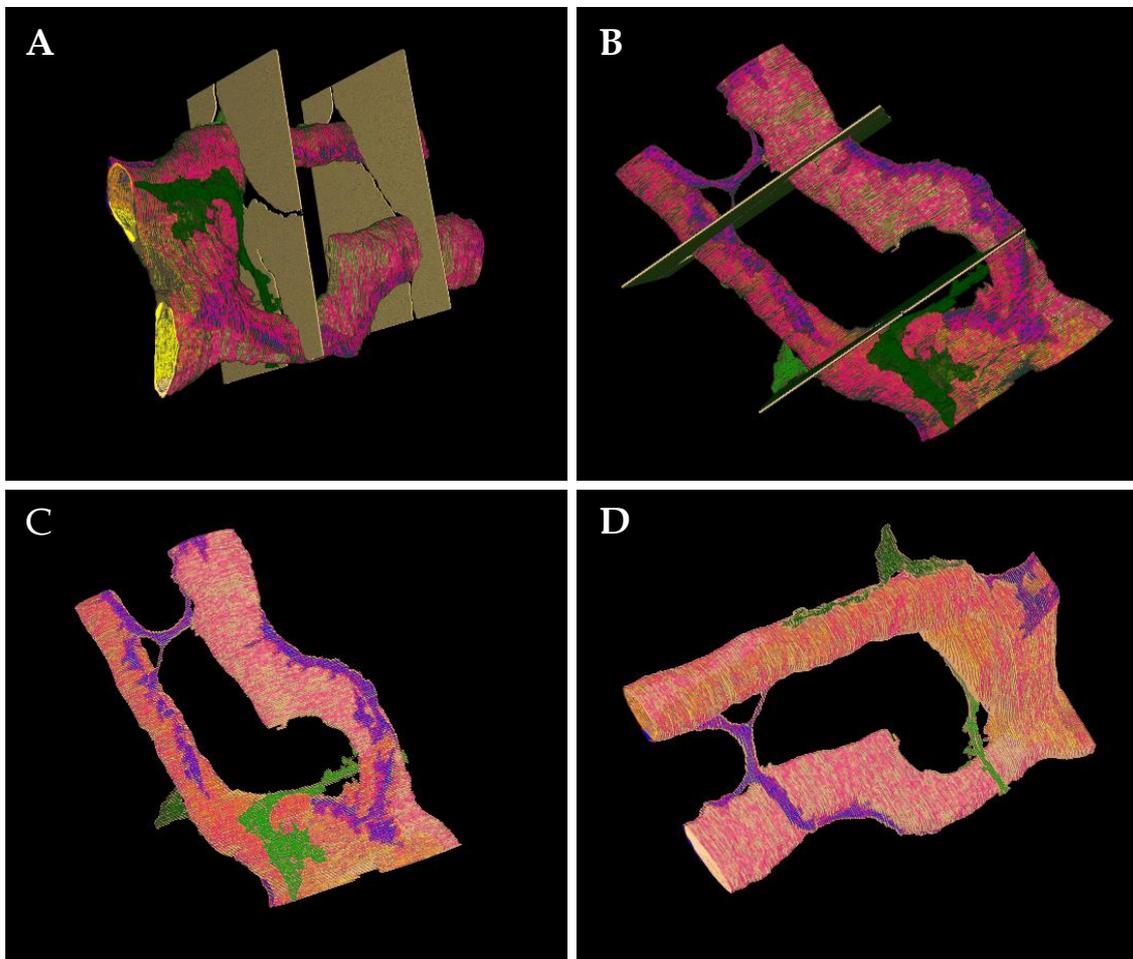


Abbildung 30: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.

Darstellung aller segmentierter Zellen mit (A,B) bzw. ohne Kardiomyozten (C,D)

Gelb, Endothelzelle 1. **Gelborange**, Endothelzelle 2. **Orange**, Endothelzelle 3, **Lachsrot**, Endothelzelle 4. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyten. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35,8µm.

Die Endothelzelle Nummer drei (Abbildung 31, Bildausschnitte: B, B') bildet Ausläufer, die in Kontakt mit der Kapillarwand-assoziierten Zelle zu stehen scheinen. Um welche Art der Interaktion es sich dabei handelt, ist in dieser Auflösung nicht abschließend zu klären. Die Endothelzelle zeigt eine Ausstülpung, die Basallamina ist an dieser Stelle unterbrochen und der schmale Bereich zwischen Endothelzelle und Kapillarwand-assoziierte Zelle ist elektronendicht (Abbildung 33 B, Inset). Auch in einem zweiten Bildausschnitt (Abbildung 31, Bildausschnitte C, C') befindet sich die Kapillarwand-assoziierte Zelle in unmittelbarer Nähe zum Endothel. An dieser Stelle ist jedoch noch eine Basallamina zwischen den Zellen erkennbar.

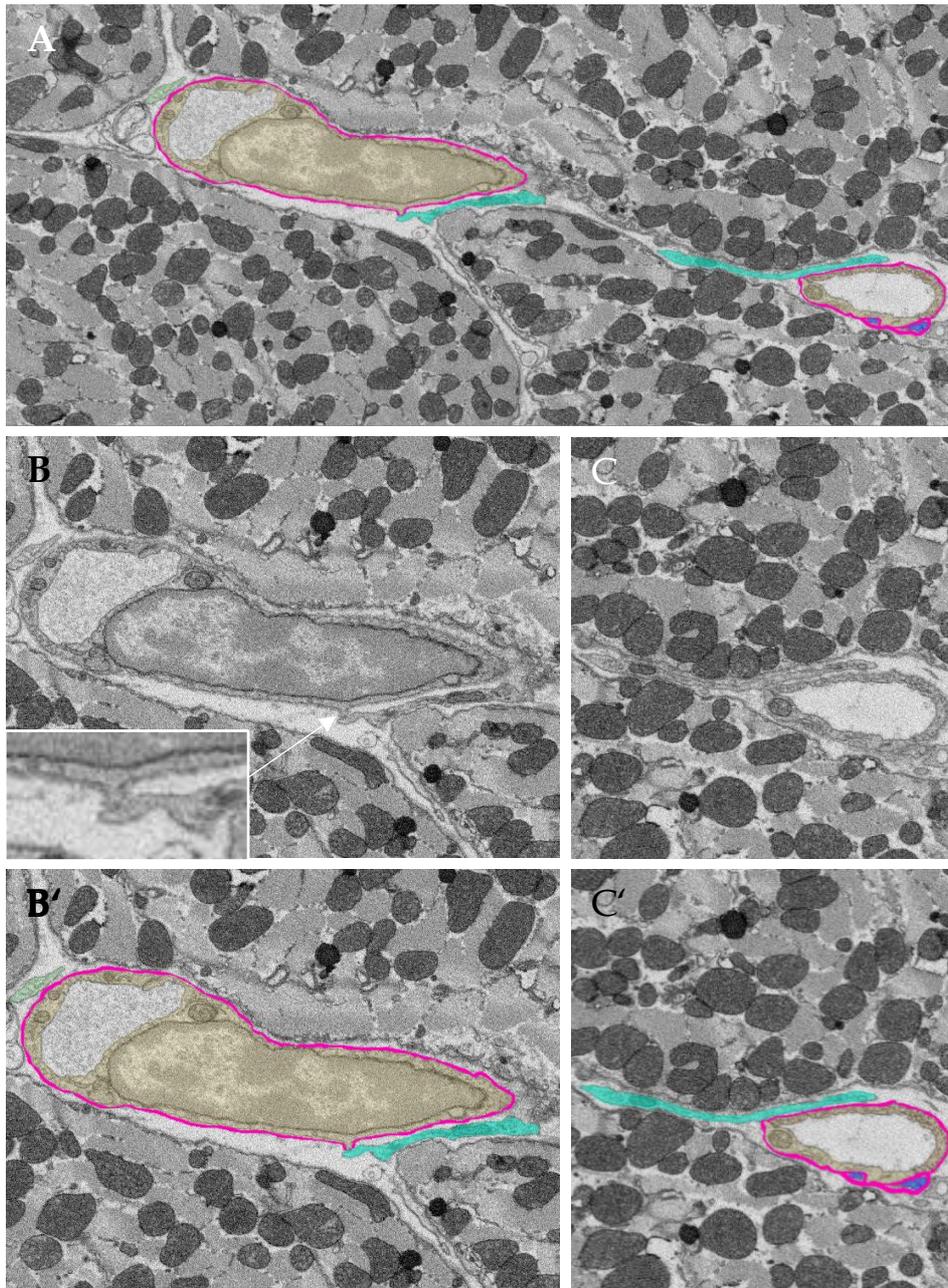


Abbildung 31: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 01.
Gelborange, Endothelzelle 2. **Orange**, Endothelzelle 3 **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt.
Grün, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1 **Türkis**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2.
 Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (B, C) und segmentierte Aufnahmen (A,B',C'). A Schnitt 71/240. B,B' Schnitt 71/240 linker Bildausschnitt. C,C' Schnitt 71/ 240 rechter Bildausschnitt.

Der Bildausschnitt (Abbildung 32 A, A') sowie das Inset (Abbildung 32 A) zeigt ebenfalls eine Protrusion der Endothelzelle in Richtung einer Kapillarwand-assoziierten Zelle. Im selben Bereich einer potenziellen Kontaktstelle zeigt auch die Kapillarwand-assoziierte Zelle eine entsprechende Protrusion in Richtung der Endothelzelle (Abbildung 32 B, B', B Inset). In dieser Region fehlt eine Basallamina und die Kontaktstelle erscheint elektronendicht.

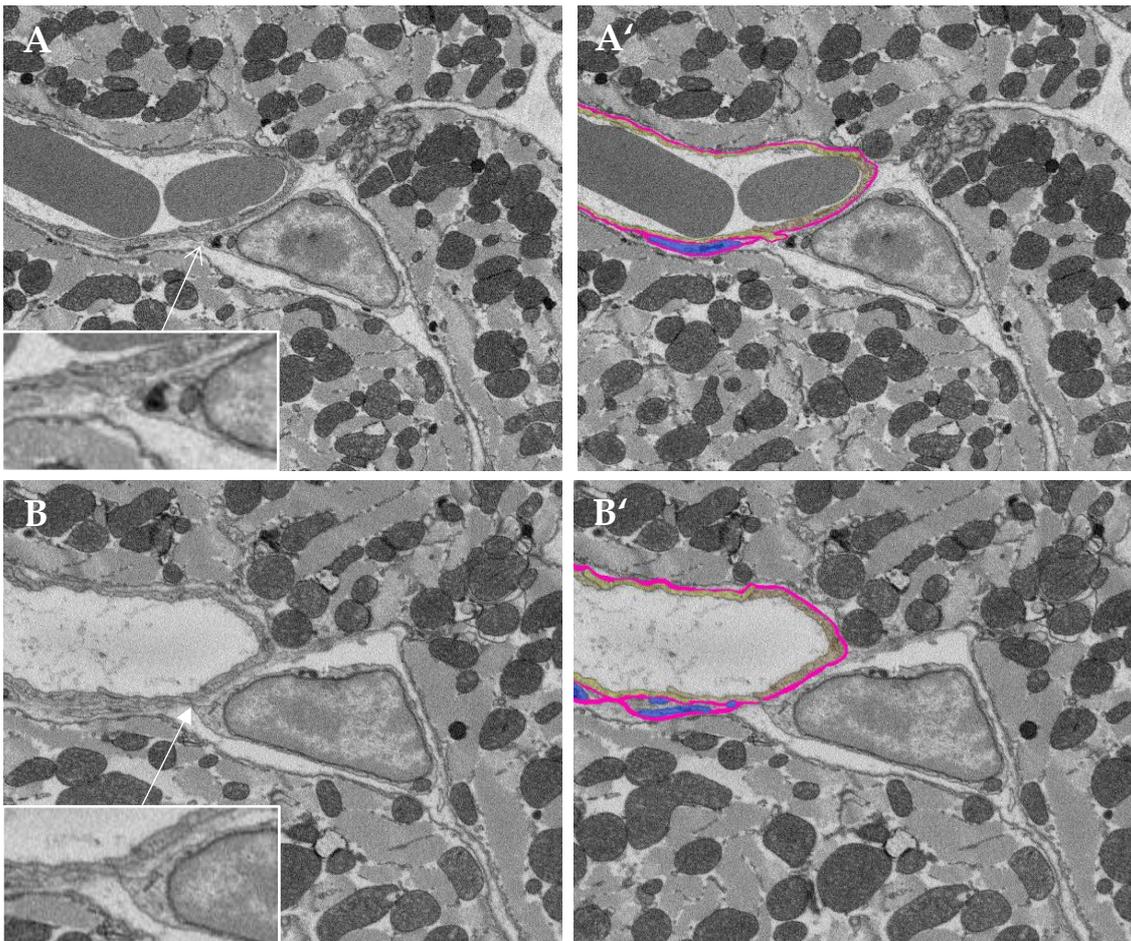


Abbildung 32: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 01.
Gelborange, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. Kontaktstellen (Pfeilspitzen) Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A, B) und segmentierte Aufnahmen (A',B'). A, A' Schnitt 23/240. B,B' Schnitt 40/240 rechter Bildausschnitt.

Auch im folgenden Verlauf bildet die Endothelzelle eine Protrusion, die in Richtung der Kapillarwand-assozierten Zelle gerichtet ist (Abbildung 33 A, B, Insets). Die Basallamina fehlt und die potenzielle Kontaktstelle ist elektronendicht.

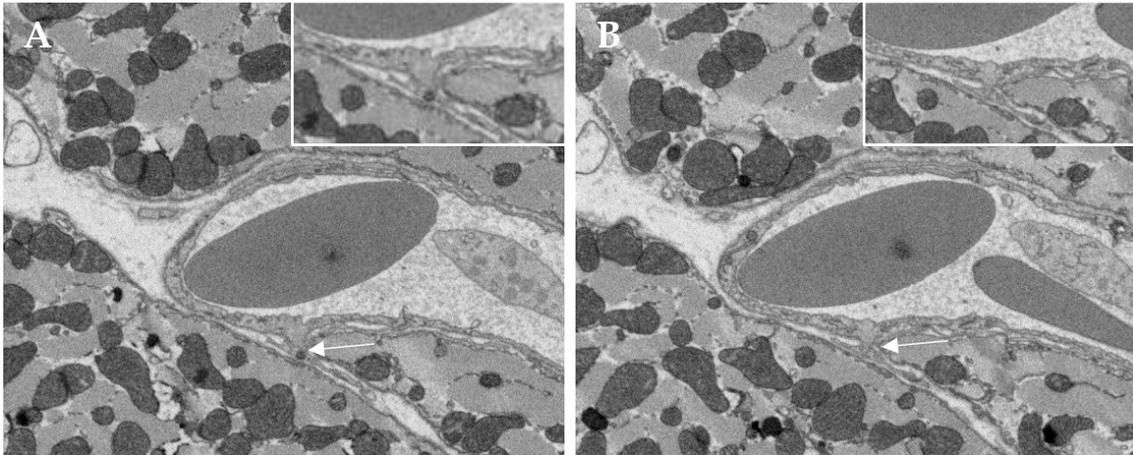


Abbildung 33: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 01.
Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen des Originaldatensatzes. Bereiche der Insets (Pfeilspitzen) (A, B). A, Schnitt 66/717 linker Bildausschnitt. B, Schnitt 72/717 linker Bildausschnitt.

Die erste Kapillarwand-assoziierte Zelle folgt der Kapillare in Längsrichtung. Einige ihrer Fortsätze sind im interzellulären Raum lokalisiert (Abbildung 34). Die zweite Kapillarwand-assoziierte Zelle verläuft in der Region des vereinigten Bereiches der Kapillare. Einer ihrer Fortsätze nähert sich nach der Aufzweigung der Wand beider benachbarter Kapillaren an und umschlingt diese (Abbildung 36). In diesem Modell ist die räumliche Anordnung der Perizyten in Bezug auf die Endothelzellen zu erkennen. Der zweite Perizyt bedeckt zunächst Teile des Bereiches der vereinigten Kapillare und ist dann in Längsrichtung mit einer der kleineren Verzweigungen assoziiert. Er gibt einen Fortsatz ab, der durch den Interzellularraum verläuft und nähert sich dann der zweiten Verzweigung der Kapillare an und ist mit dieser assoziiert (Abbildung 34).

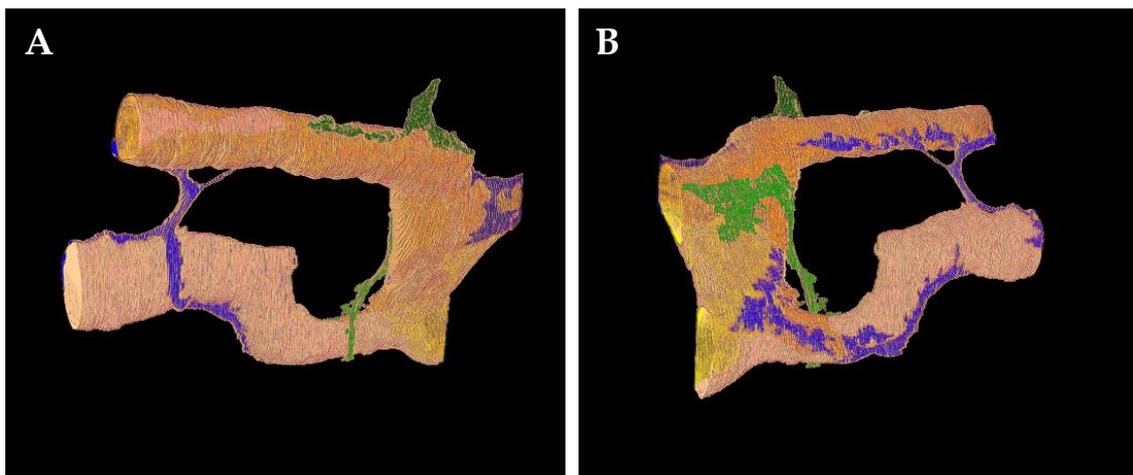


Abbildung 34: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.

Darstellung segmentierter Zellen ohne Kardiomyozyten und Basallamina.

Gelb, Endothelzelle 1. **Gelborange**, Endothelzelle 2. **Orange**, Endothelzelle 3, **Lachsfarben**, Endothelzelle 4. **Dunkelblau**, Perizyt 1. **Blau**, Perizyt 2 **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35,8µm.

Diese ultrastrukturellen Aufnahmen (Abbildung 35) zeigen Teile des Perizyten im Interzellularraum zwischen den Kapillaren bzw. Kardiomyozyten. Die Fortsätze des Perizyten sind in der gesamten Länge von einer Basallamina umgeben.

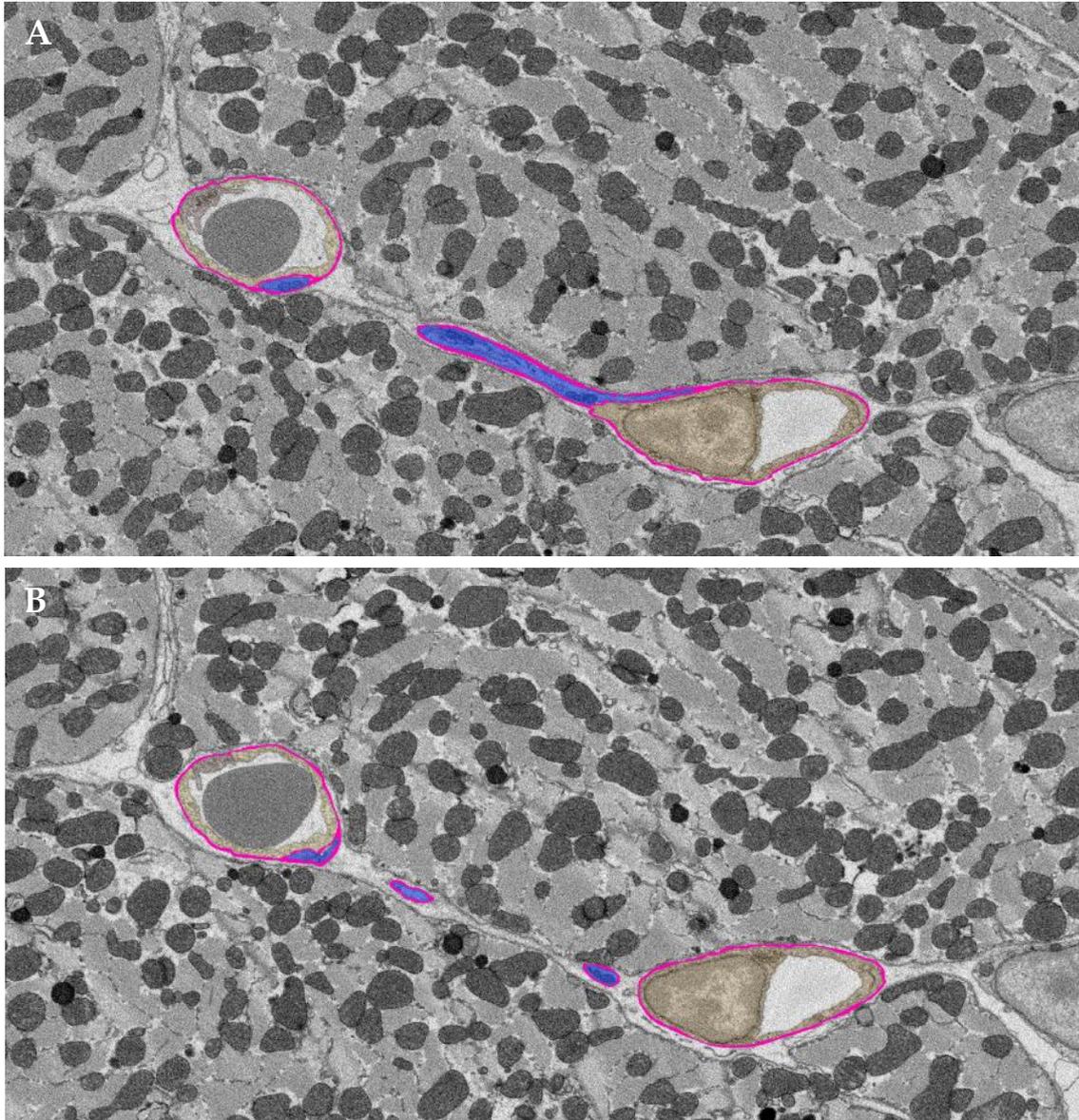


Abbildung 35: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 01. Gelb, Endothelzelle 1. Gelborange, Endothelzelle 2. Orange, Endothelzelle 3, Lachsfarben, Endothelzelle 4. Pink, Basallamina. Blau, Perizyt. Dargestellt sind segmentierte Aufnahmen (A,B). A, Schnitt 195/240. B, Schnitt 201/240.

In dem 3D-Modell wird die Assoziation der beiden Perizyten mit dem Endothel (Abbildung 36A, B) sowie die Verzahnung der drei Endothelzellen deutlich (Abbildung 36 C, D).

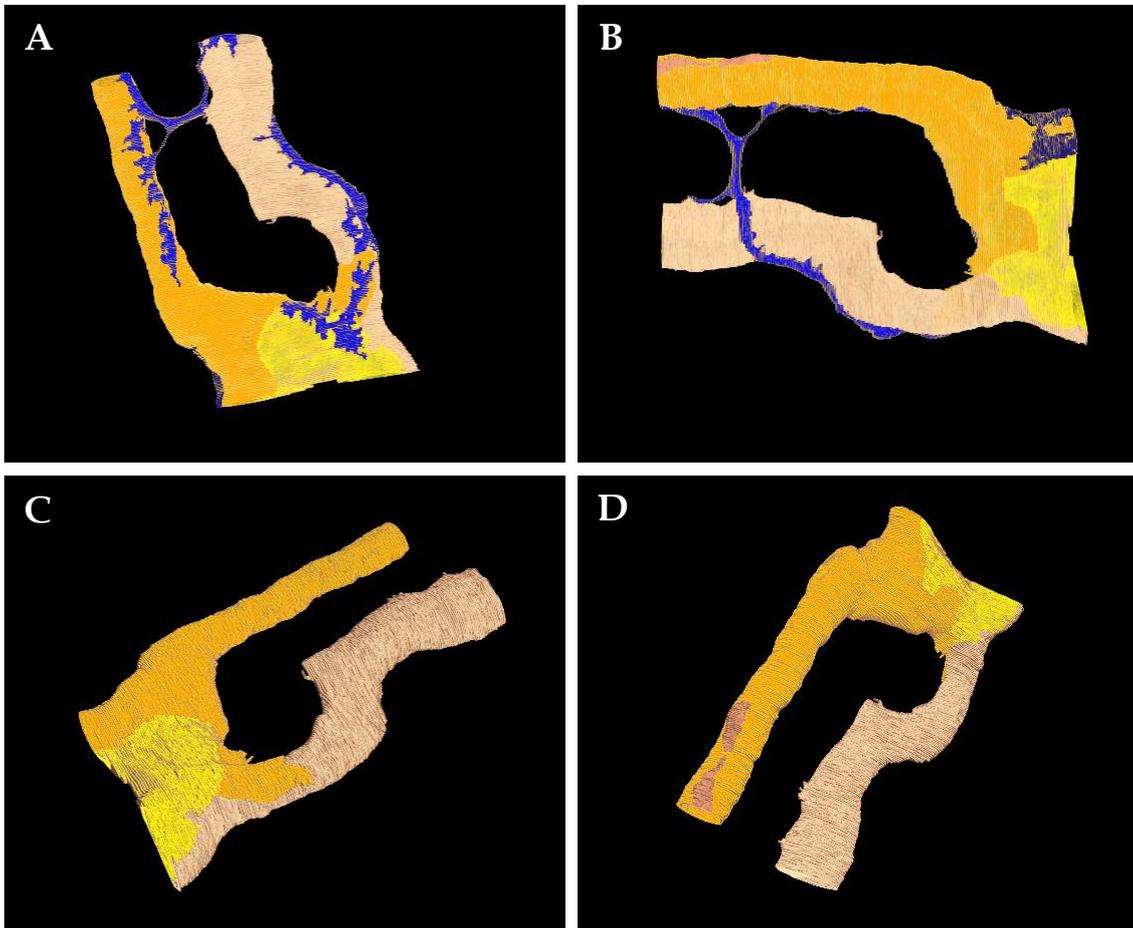


Abbildung 36: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.

Darstellung nur Endothelen und Perizyten (A,B) bzw. nur Endothelen (C,D).

Gelb, Endothelzelle 1. **Gelborange**, Endothelzelle 2. **Orange**, Endothelzelle 3, **Lachsfarben**, Endothelzelle 4. **Pink**, Basallamina. **Dunkelblau**, Perizyt 1. **Blau**, Perizyt 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 35,8 μ m.

3.2.6 Analyse und Rekonstruktion von ROI 00

Insgesamt wurden 696 Einzelaufnahmen dieser Kapillare erzeugt. Für die Segmentierung und Rekonstruktion wurde jede Aufnahme verwendet. Dieser Datensatz zählt somit zu den beiden vollständig segmentierten Datensätzen.

Diese Kapillare weist eine Länge von 36,6 μm auf. ROI 00 zeigt einen Gefäßabschnitt der aus zwei Endothelzellen, einem Perizyten und zwei Kapillarwand-assoziierten Zellen gebildet wird (Abbildung 37).

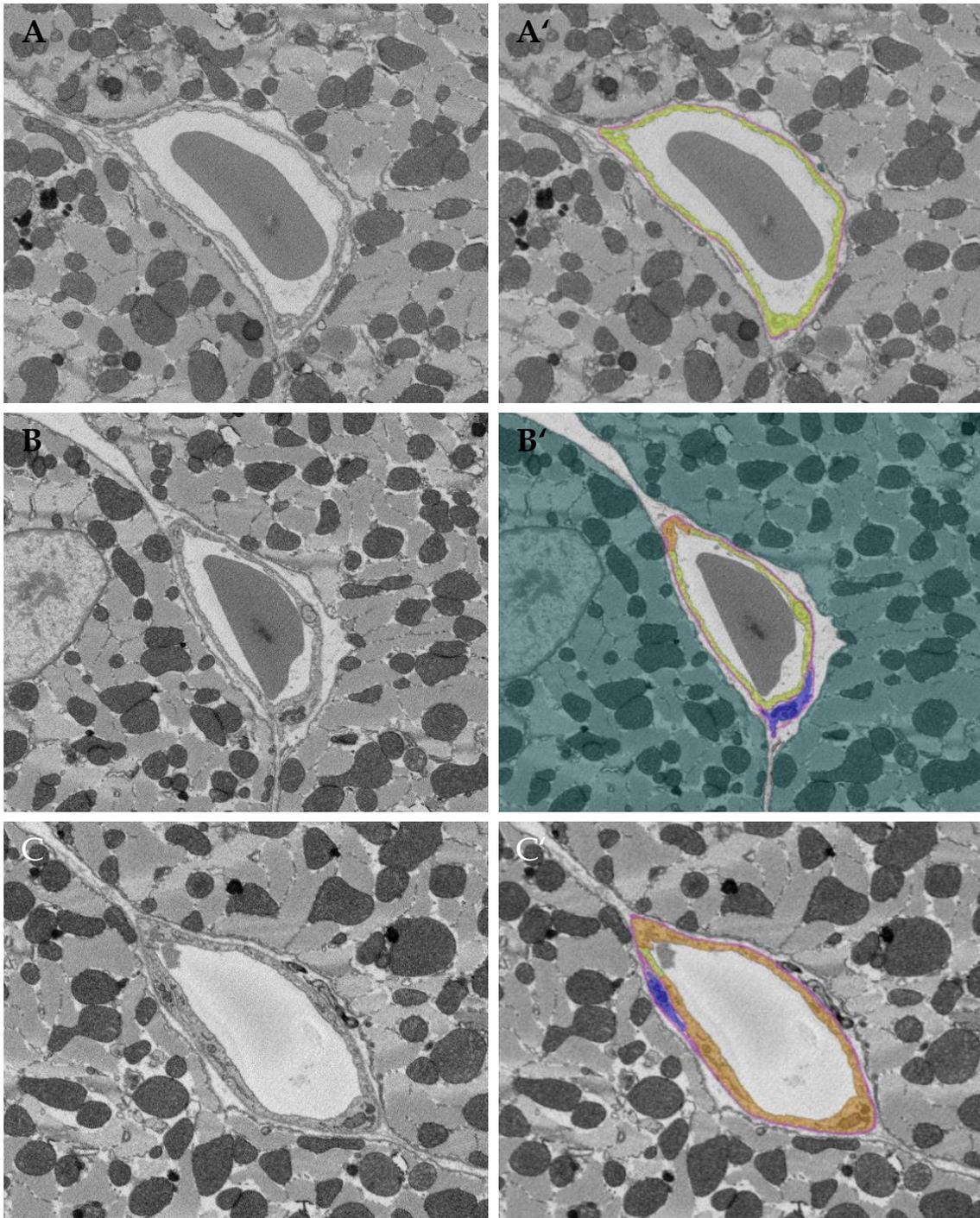


Abbildung 37: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 00.
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyt. **Grün**, Kardiomyozyten.
 Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A-C) und segmentierte Aufnahmen (A'-C'). A,A' Schnitt 1/696. B, B' Schnitt 328/696. C,C' Schnitt 695/696.

Die 3D-Rekonstruktion zeigt einen vorwiegend geraden Verlauf des Gefäßabschnittes (Abbildung 38). Perizyten und Endothelzellen teilen sich eine Basallamina, von der sie kontinuierlich bedeckt werden. Die Kapillarwand-assoziierte Zelle Nummer eins ist in unmittelbarer Nähe des Gefäßes lokalisiert (Abbildung 38, hellgrüner Fortsatz). Die Fortsätze der Kapillarwand-assoziierten Zelle Nummer zwei treten aus dem Interzellularraum an die Kapillare heran und sind im weiteren Verlauf erneut im Interzellularraum zwischen den Kardiomyozyten lokalisiert (Abbildung 38, dunkelgrüner Fortsatz).

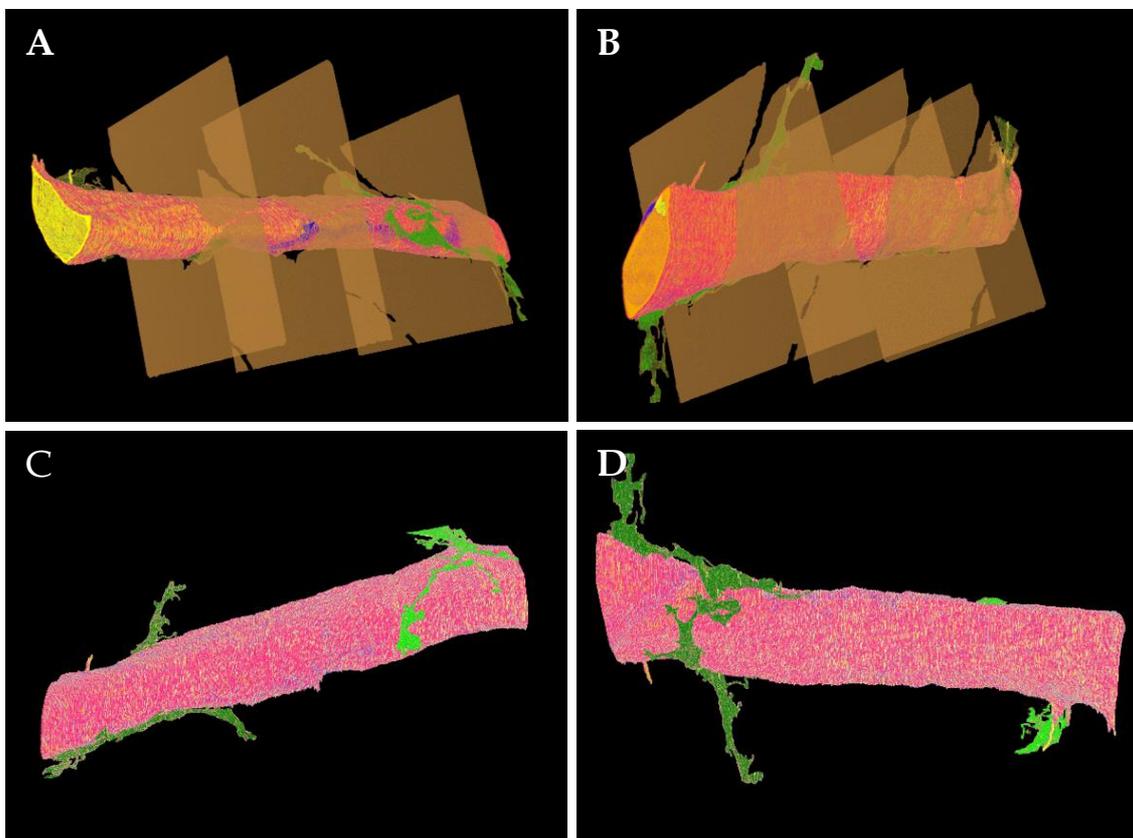


Abbildung 38: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00.

Darstellung aller segmentierter Zellen mit (A,B) bzw. ohne Kardiomyozyten (C,D).

Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Pink**, Basallamina. **Blau**, Perizyten. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. **Graubraun**, Kardiomyozyten - schematische Darstellung. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

Zwei aufeinanderfolgende Einzelaufnahmen (Abbildung 39 A, B; Insets: höhere Vergrößerung des Kontaktbereiches) zeigen einen Kontakt zwischen der Kapillarwand-assoziierten Zelle Nummer eins und einem Ausläufer der Endothelzelle. Der Kontaktbereich hebt sich elektronendicht hervor. Es ist eine deutliche Unterbrechung der Basallamina an dieser Stelle zu erkennen (Abbildung 39, Insets).

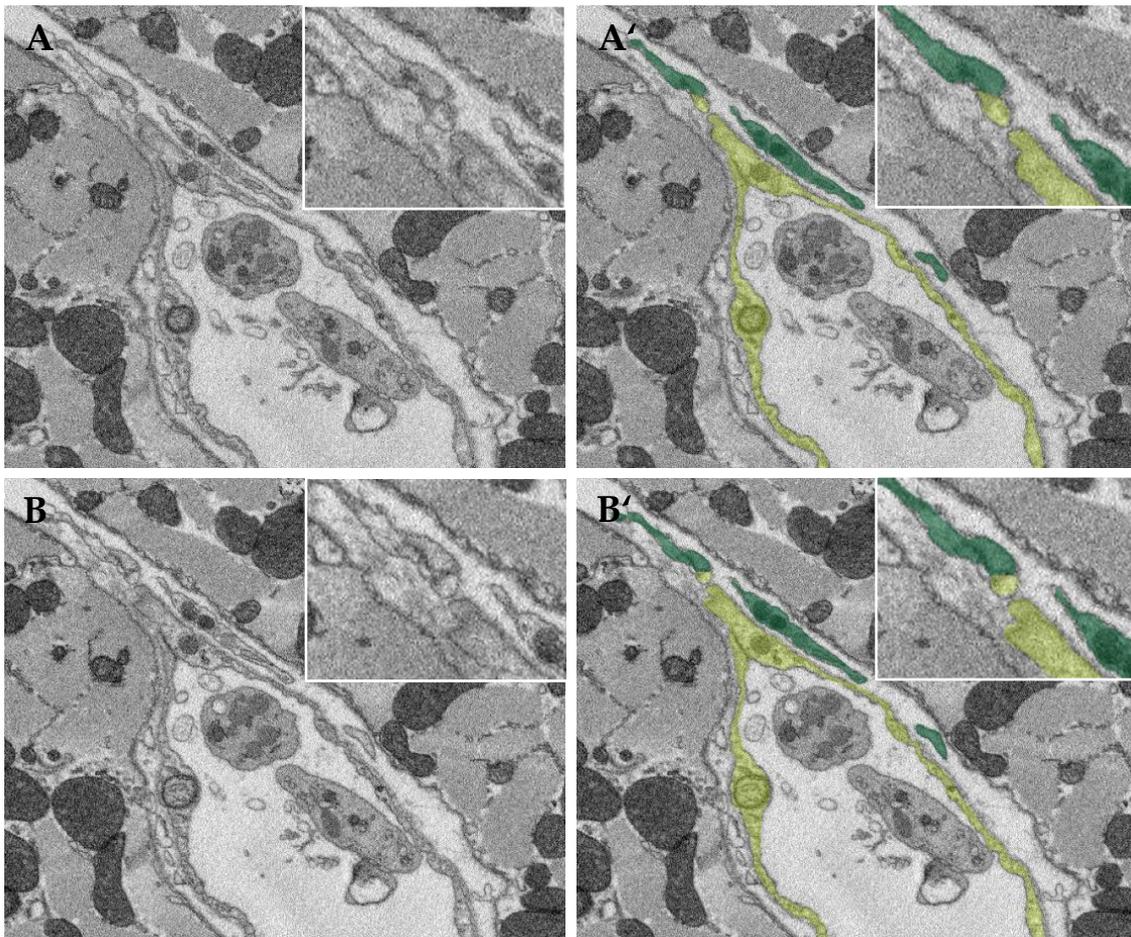


Abbildung 39: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 00.
Gelb, Endothelzelle 1. **Grün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A,B) und segmentierte Aufnahmen (A',B'). A,A' Schnitt 72/696 - oberer Bildbereich. B, B' Schnitt 73/696 oberer Bildbereich. Insets: Vergrößerungen der Kontaktstellen in A,A',B,B'.

Im weiteren Verlauf der Kapillare zeigt sich eine zweite Kontaktstelle zwischen den in Abbildung 39 beschriebenen Zellen. Abbildung 40 A zeigt zunächst eine Übersichtsaufnahme dieser Region. Zwei aufeinanderfolgende Einzelaufnahmen (Abbildung 40 A', B, B' Insets: höhere Vergrößerung des Kontaktbereiches) zeigen einen Kontakt zwischen der Kapillarwand-assoziierten Zelle Nummer eins und einem Ausläufer der Endothelzelle. Der Kontaktbereich hebt sich elektronendicht hervor. An zwei Stellen ist eine deutliche Unterbrechung der Basallamina an dieser Stelle zu erkennen (Abbildung 40 A', B, B' Insets).

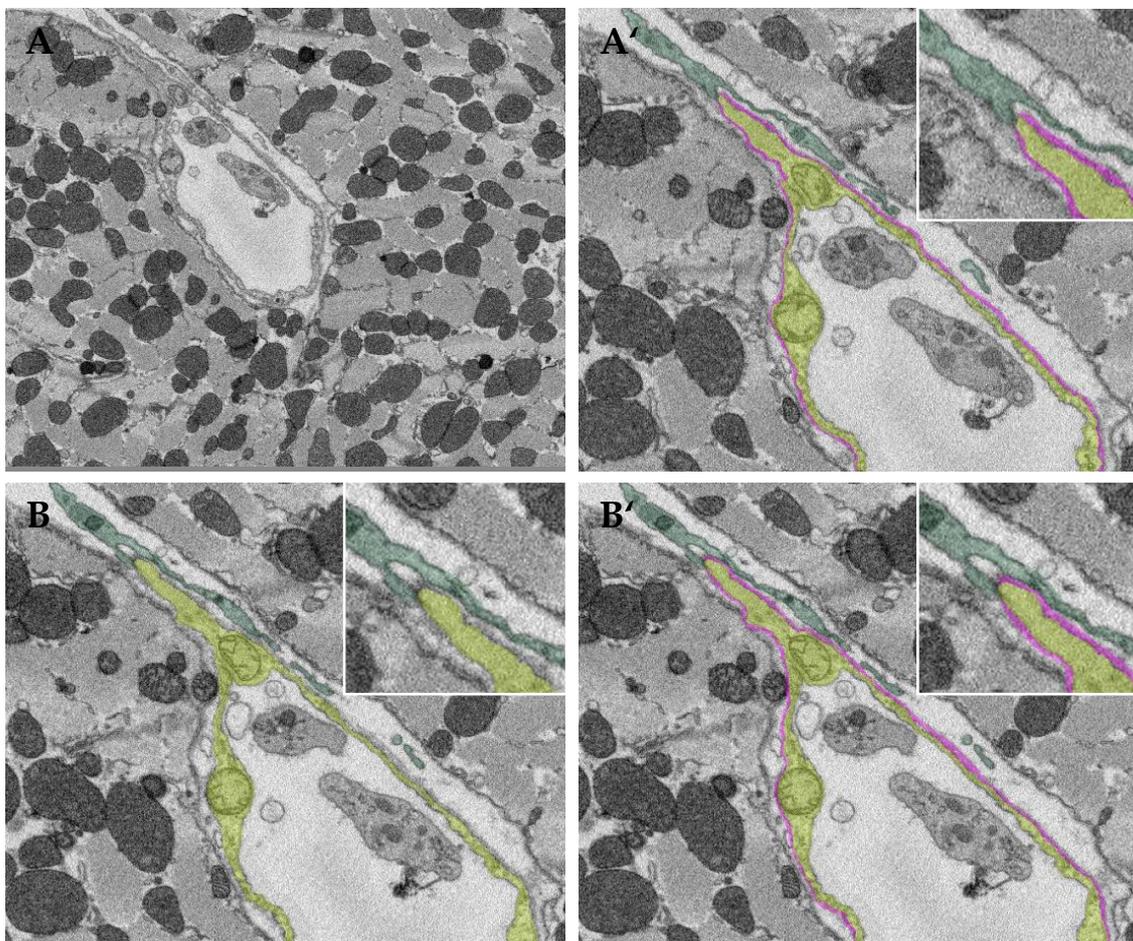


Abbildung 40: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 00.
Gelb, Endothelzelle 1. **Pink**, Basallamina. **Grün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahme (A) und segmentierte Aufnahmen (A'-B'). A,A' Schnitt 80/696 oberer Bildausschnitt. B, B' Schnitt 82/696 oberer Bildausschnitt.

Das dreidimensionale Modell (Abbildung 41) zeigt den Verlauf des mit dem Gefäß assoziierten Perizytenfortsatzes und den Verlauf der Kapillarwand-assoziierten Zellen. Die Kapillarwand-assoziierte Zelle Nummer eins weist Fortsätze auf, die senkrecht zur Kapillare in deren unmittelbarer Nähe verlaufen, und Fortsätze, die mit der Endothelzelle eins assoziiert sind (Abbildung 41, hellgrüne Fortsätze).

Die Kapillarwand-assoziierte Zelle Nummer zwei zeigt weitläufige Fortsätze, die von der Kapillare wegführen sowie Fortsätze, die senkrecht zur Kapillarlängsachse verlaufen oder der Kapillarlängsachse linienförmig folgen (Abbildung 41, dunkelgrüne Fortsätze).

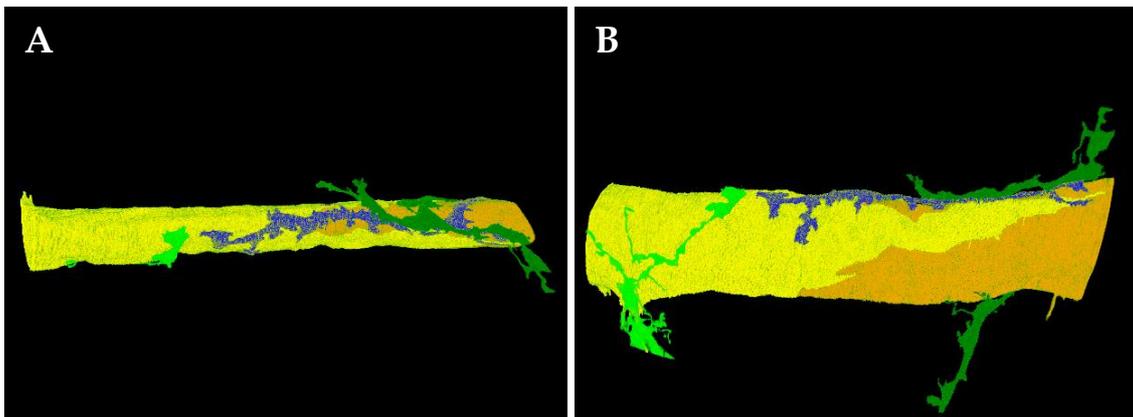


Abbildung 41: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00.
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyten. **Hellgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 1. **Dunkelgrün**, Kapillarwand-assoziierte Zelle 2. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

Der Perizyt ist nur mit einem kleinen Anteil der Kapillare assoziiert (Abbildung 42).

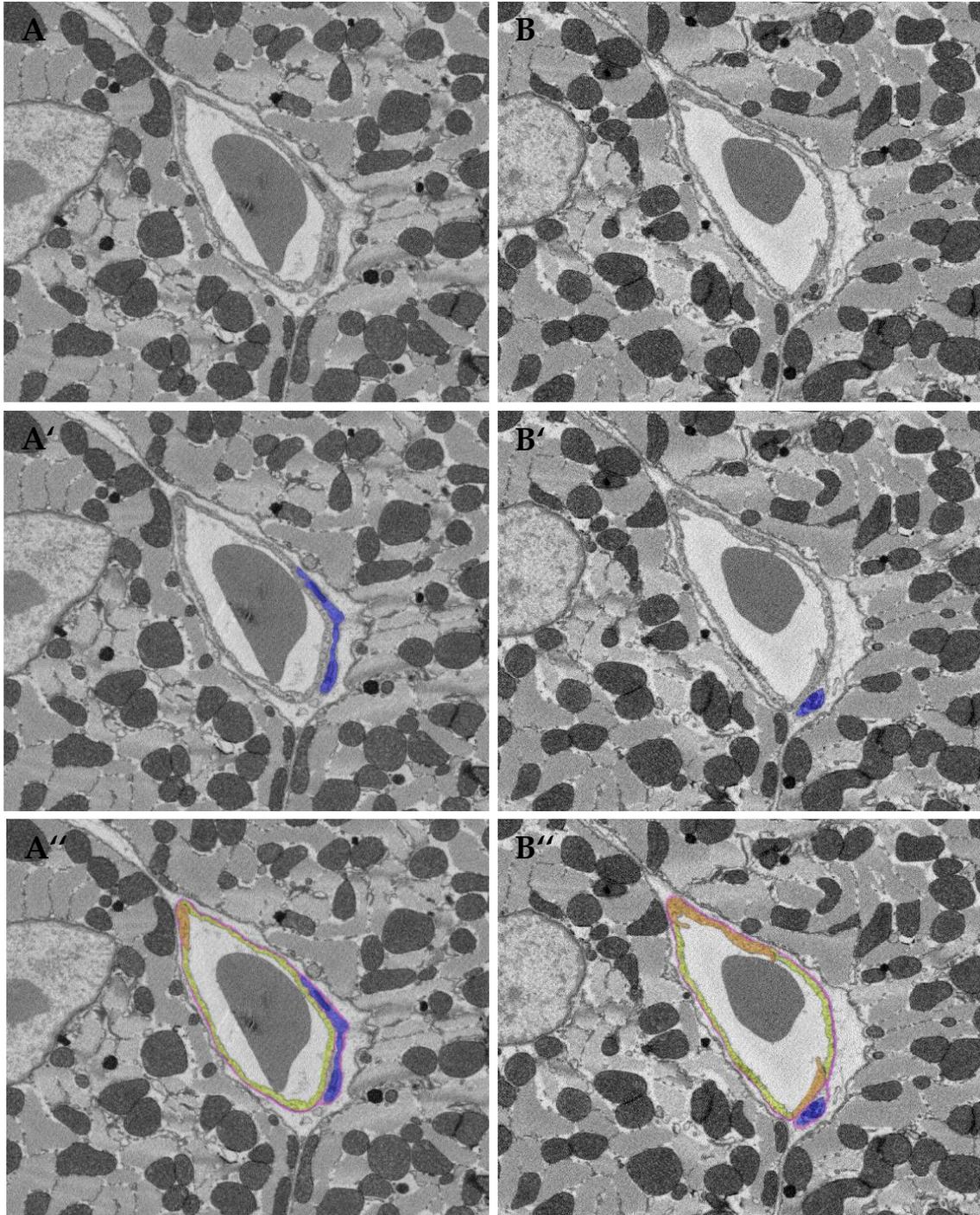


Abbildung 42: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 00.
Gelb, Endothelzelle 1. Orange, Endothelzelle 2. Pink, Basallamina. Blau, Perizyt. Dargestellt sind nicht segmentierte Aufnahmen (A,B) und segmentierte Aufnahmen (A'-B''). A,A',A'' Schnitt 306/696. B, B',B'' Schnitt 388/696. C,C' Schnitt 695/ 696.

Der erste Bereich der Kapillare ist nicht mit Perizytenfortsätzen assoziiert (Abbildung 43). Der darauffolgende Anteil der Kapillare wird von einem Perizytenfortsatz kontaktiert, der dem Gefäß in Längsrichtung folgt und wenige kleine und kurze Fortsätze zum Endothel hin abgibt. Zum Ende des rekonstruierten Bereiches hin teilt sich der Fortsatz auf und umschließt die Kapillare (Abbildung 43).

Die Endothelzellen dieser rekonstruierten Region bilden feine Protrusionen in den Interzellularraum (Abbildung 43 B, C, D).

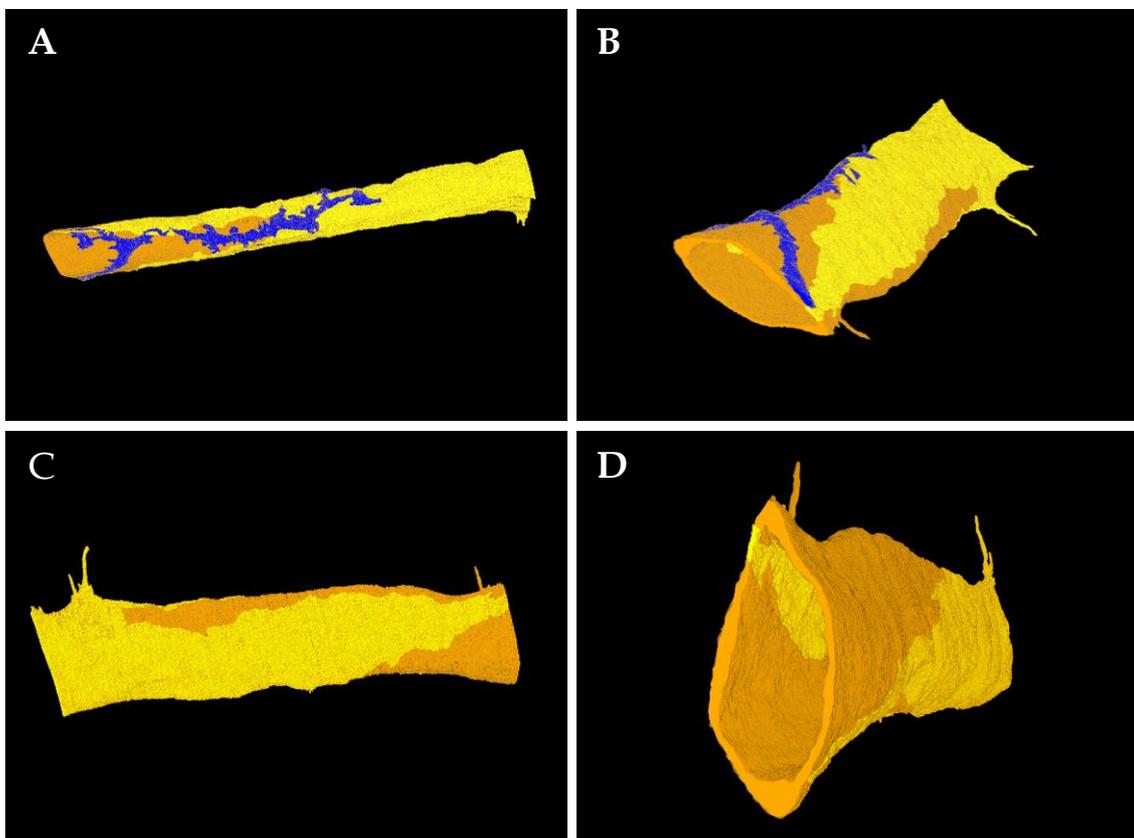


Abbildung 43: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00. Darstellung nur Endothelzellen und Perizyten (A,B) bzw. nur Endothelzellen (C,D)
Gelb, Endothelzelle 1. **Orange**, Endothelzelle 2. **Blau**, Perizyten. Gesamtlänge Gefäßabschnitt 36,6µm.

3.3 Immunelektronenmikroskopischer Nachweis der Kapillarwand-assoziierten Zellen

Die Kapillarwand-assoziierten Zellen, die stellenweise in Assoziation mit den Endothelzellen stehen, sind groß und weit verzweigt. Um diese Zellen besser zu charakterisieren, wurde untersucht, ob diese Zellen die drei Proteine CD34, CD44 und Flk-1 exprimieren. Im Rahmen der SBF-SEM Untersuchung und der damit verbundenen Fixierung und Kontrastierung der Proben ist ein Antigennachweis durch Immunfärbung dieser Proteine nicht möglich. Die Expression dieser drei Proteine in den Kapillarwand-assoziierten Zellen wurde durch das immunelektronenmikroskopische Preembedding-Verfahren analysiert.

3.3.1 Expression von CD34 in Kapillarwand-assoziierten Zellen

Die in Abbildung 44 dargestellten Aufnahmen zeigen CD34-DAB markierte Kapillarwand-assoziierte Zellen. Die in den einzelnen Ausschnitten präsentierten Kapillarwand-assoziierten Zellen zeigen eine Expression von CD34 und dessen Lokalisation an der Plasmamembran, erkennbar durch den elektronendichten DAB-Niederschlag.

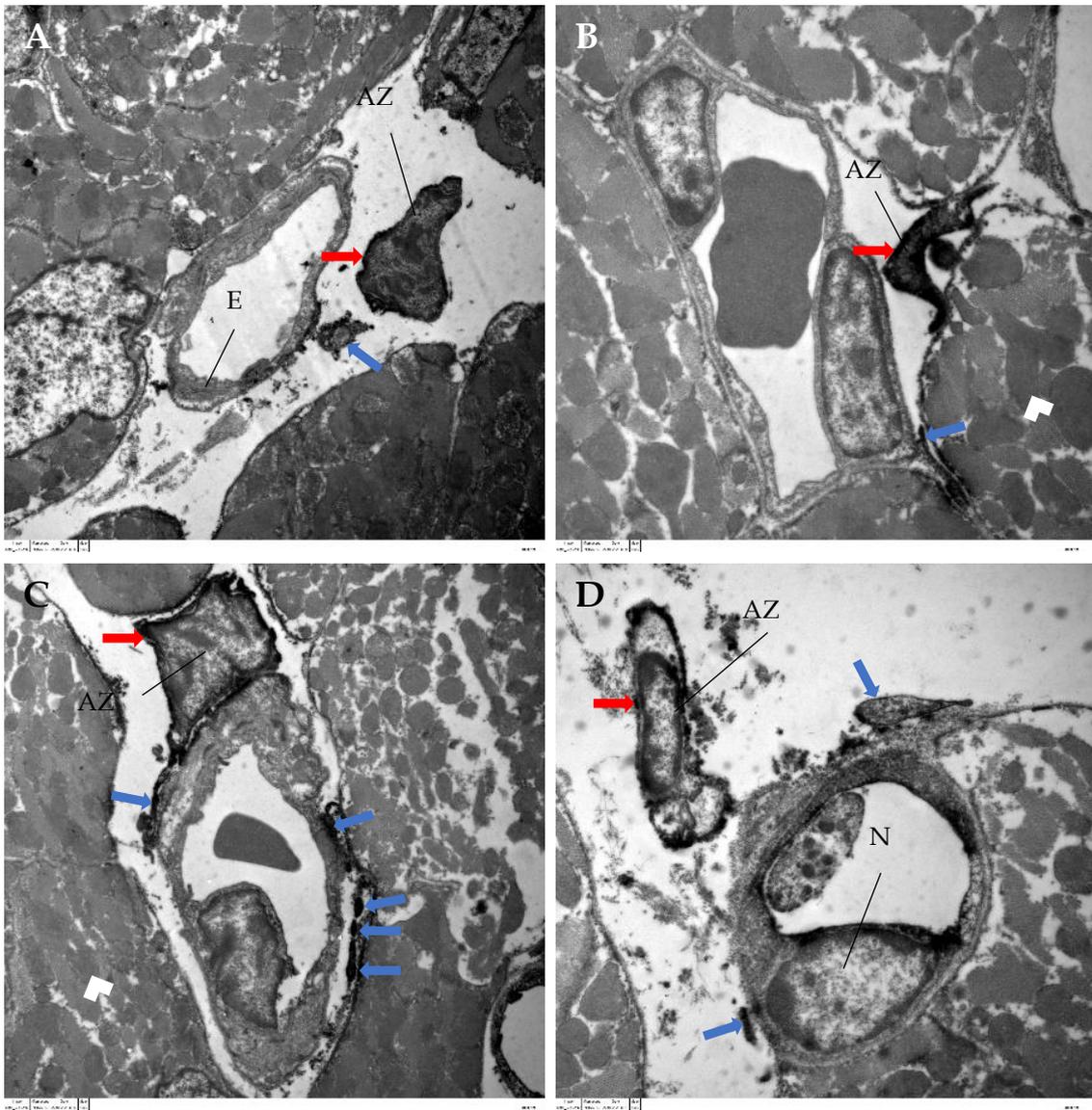


Abbildung 44: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Immunelektronenmikroskopischer Nachweis der Expression von CD34 durch eine DAB-Reaktion (schwarzes Präzipitat im Bereich der Zellmembran, rote Pfeile).

E, Endothelzelle. N, Endothelzellkern. AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Fortsätze der Kapillarwand-assoziierten Zellen (blaue Pfeile). Kardiomyozyten (Pfeilspitzen). Vergrößerung: 5000 fach (A,C); 8000 fach (B,D).

3.3.2 Expression von CD44 in Kapillarwand-assoziierten Zellen

Die in Abbildung 45 dargestellten Aufnahmen zeigen CD44-DAB markierte Kapillarwand-assoziierte Zellen. Die in den einzelnen Ausschnitten präsentierten Kapillarwand-assoziierten Zellen zeigen eine deutliche Expression von CD44, welches im Bereich der Plasmamembran lokalisiert ist.

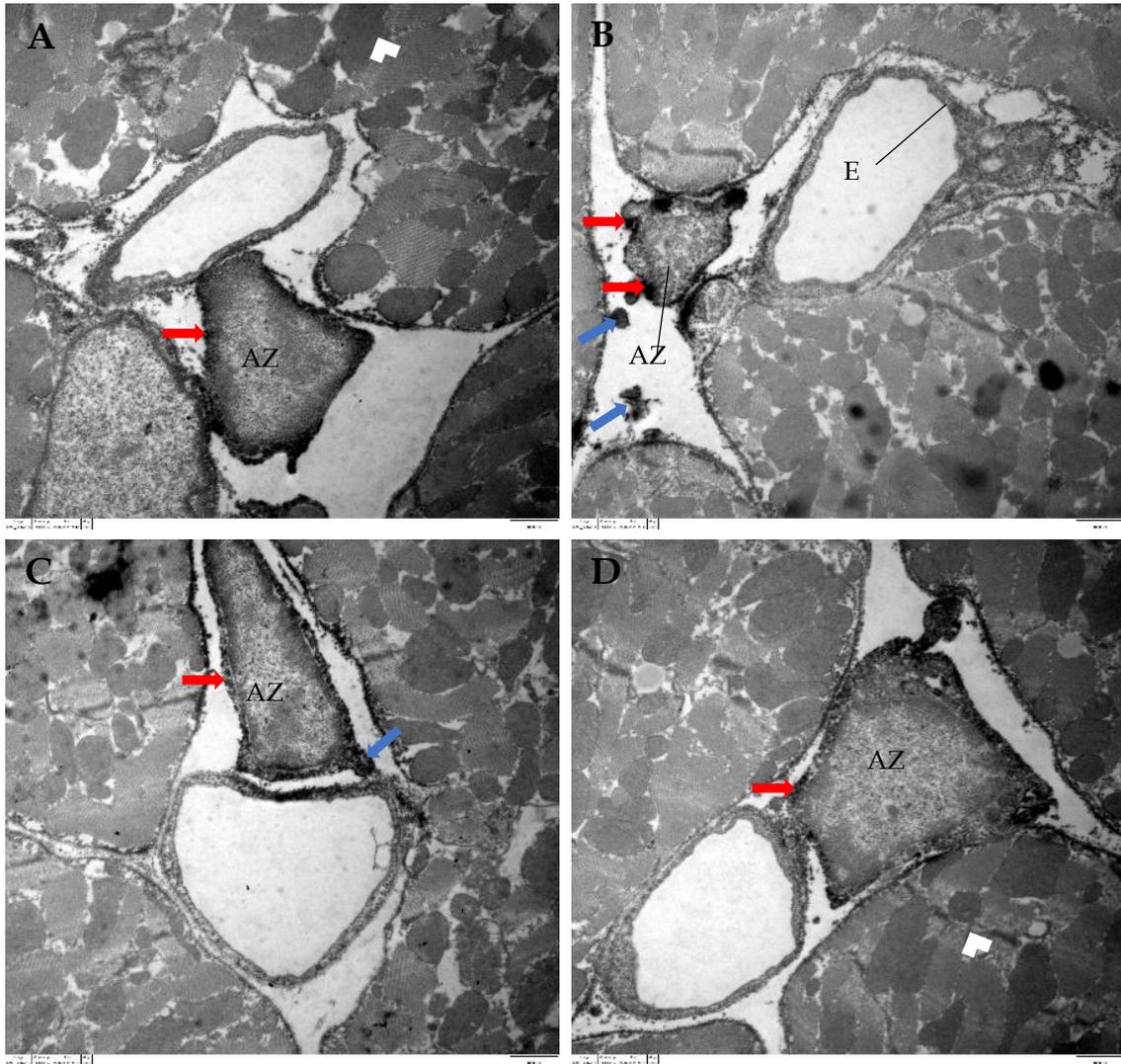


Abbildung 45: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Immunelektronenmikroskopischer Nachweis der Expression von CD44 durch eine DAB-Reaktion (schwarzes Präzipitat im Bereich der Zellmembran, rote Pfeile) Konzentration 1:250. E, Endothelzelle. AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Fortsätze der Kapillarwand-assoziierten Zellen (blaue Pfeile). Kardiomyozyten (Pfeilspitzen). Vergrößerung: 8000 fach (A-D).

3.3.3 Expression von Flk-1 in Kapillarwand-assoziierten Zellen

Die in Abbildung 46 gezeigten Aufnahmen zeigen den DAB-Niederschlag der als Nachweis für die Expression von Flk-1 dienen sollte. Da der DAB-Niederschlag nicht nur an der luminalen Membran des Endothels und an der Zellmembran der Kapillarwand-assoziierten Zellen nachzuweisen ist, sondern auch die Kardiomyozyten DAB-positiv sind, ist anzunehmen, dass die DAB-Reaktion unspezifisch ist.

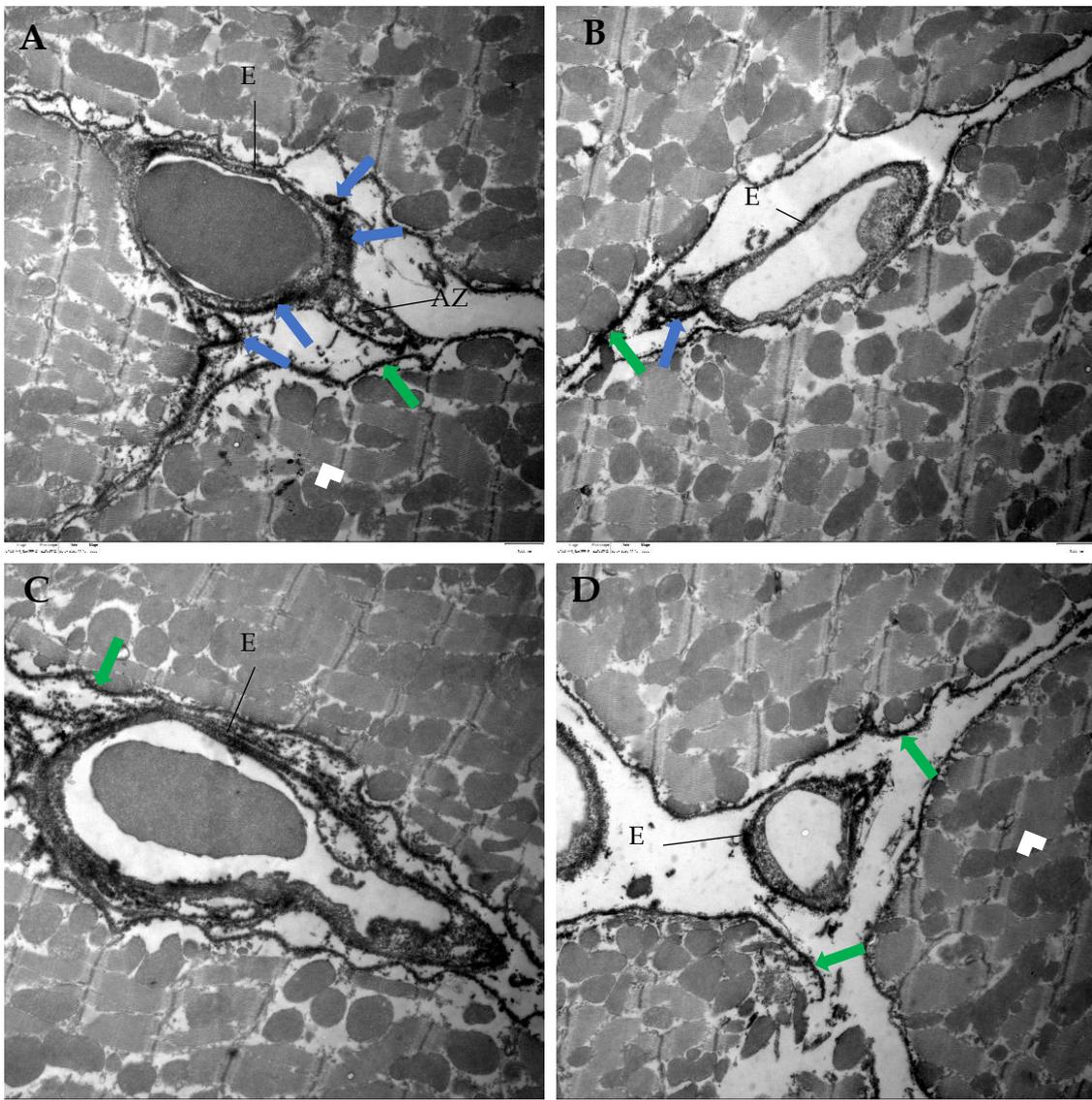


Abbildung 46: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Immunelektronenmikroskopischer Nachweis der Expression von Flk-1 durch eine DAB-Reaktion. E, Endothelzelle. AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Fortsätze der Kapillarwand-assoziierten Zellen (blaue Pfeile). Kardiomyozyten (Pfeilspitzen). Membran der Kardiomyozyten (grüne Pfeile). Vergrößerung: 6300 fach (A-D).

3.3.4 Negativkontrollen für CD34, CD44, Flk-1

Die Negativkontrollen für CD34, CD44 (Abbildung 47) und Flk-1 (Abbildung 48) zeigen keine DAB-Reaktion.

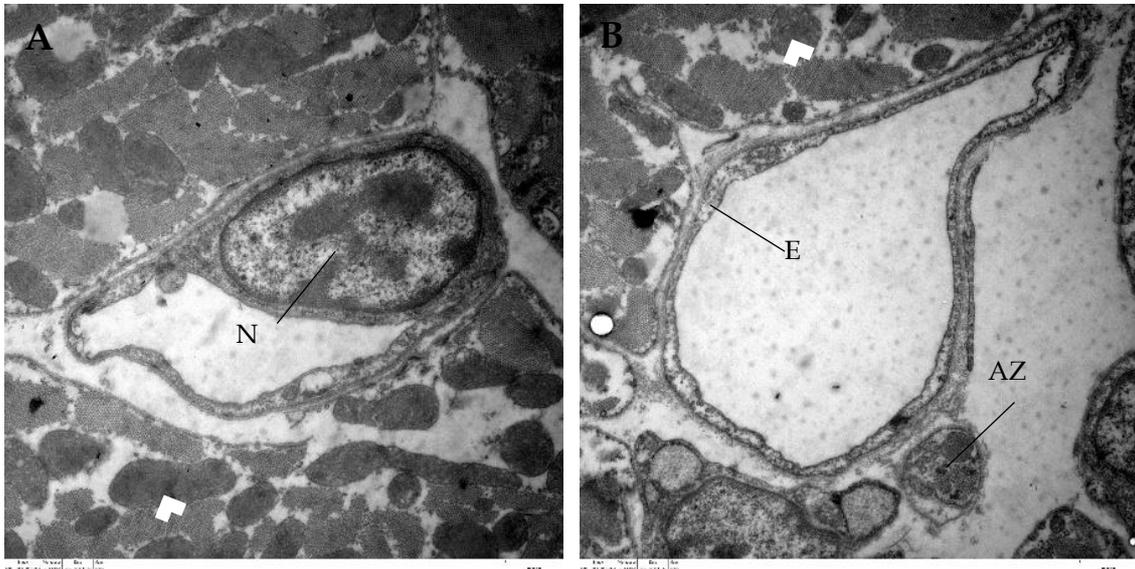


Abbildung 47: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Negativkontrolle: Goat anti-Rat. IgG
E, Endothelzelle. N, Endothelzellkern. AZ, Kapillarwand-assoziierte Zelle. Kardiomyozyten (Pfeilspitzen)
Vergrößerung: 10000 fach (A,B).



Abbildung 48: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard. Negativkontrolle Goat anti-Mouse. IgG
E, Endothelzelle. Kardiomyozyten (Pfeilspitzen) Vergrößerung: 6300 fach (A), 5000 fach (B).

4 Diskussion

Das Myokard besteht aus dicht gepackten Herzmuskelzellen, die in einem dreidimensionalen Zellverband organisiert sind. Im engen interstitiellen Raum zwischen den Herzmuskelzellen machen die Blutgefäße, insbesondere die Mikrovaskulatur des Myokards den Hauptanteil an myokardialem Stroma aus. Die besonders hohe Gefäßdichte des Myokards ist essenziell für die Versorgung des Herzens mit Blut und anderen wichtigen Faktoren für die Regulation der Herzfunktion. Eine anhaltende Mangelversorgung geht mit Ischämie und ggf. Herzinfarkt einher, bei dem Herzmuskelgewebe unwiderruflich abstirbt und in der Regel durch Narbengewebe ersetzt wird. Je nach Größe dieses Narbenareals kann so ein Verlust an Herzmuskelgewebe mit erheblichen funktionellen Einbußen verbunden sein oder gar zum Tode führen. Daher werden weltweit größte Anstrengungen an Forschungsarbeiten unternommen, um einen therapeutischen Ausweg dahingehend zu finden, dass es zu einer funktionierenden Regeneration bzw. Heilung des Herzmuskelgewebes kommt. Hierzu ist es notwendig, nicht nur die Herzmuskelzellen im Blick zu haben, sondern auch die Komponenten des Herzmuskelstromas, z.B. die myokardialen Gefäße, die nicht nur als passiver Zubringer des Blutes mit Sauerstoff und anderen Faktoren, wie Hormone wichtig sind, sondern auch als lokale Signalgeber parakrin aus der nächsten Nachbarschaft die Funktion der Herzmuskelzellen beeinflussen. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Kapillarwand im Myokard (aber vermutlich auch in einigen anderen Geweben) nicht nur aus Endothelzellen und Perizyten besteht, sondern stellenweise auch sehr eng noch von Fortsätzen von Zelltyp(en) ummantelt wird, die bisher nicht ausreichend charakterisiert worden sind. Diese Zellen tragen die Oberflächenmarker CD34 und CD44 sowie den VEGF-Rezeptor Flk-1. 3D-Rekonstruktionen basierend auf den elektronenmikroskopischen Analysen mittels serieller Block-Face-Technologie zeigen die Morphologie und den räumlichen Aufbau dieser Zellen, die mit ihren Fortsätzen einerseits stellenweise

an der Kapillarwand andocken, sich andererseits aber auch teilweise in die Zwischenräume zwischen den Kardiomyozyten erstrecken.

Für die ultrastrukturelle Untersuchung von Gewebeproben hat sich die Elektronenmikroskopie seit vielen Jahrzehnten etabliert. Derzeit kann mit Transelektronenmikroskopen eine Auflösung von etwa 0,1nm erreicht werden. Die Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops liegt vergleichsweise bei nur ca. 200nm. Durch die dadurch mögliche detaillierte Analyse von zellulären und subzellulären Komponenten können morphologische Charakteristika verschiedener Zellen des Mikrogefäßsystems untersucht werden.

Übergeordnetes Ziel dieser Promotionsarbeit war die detaillierte ultrastrukturelle Analyse kardialer Perizyten, endothelialer Zellen sowie Kapillarwand-assoziiertes Zellen und deren Kontakte im Arbeitsmyokard der Maus mittels verschiedener elektronenmikroskopischer Methoden.

Für die elektronenmikroskopische Analyse müssen Gewebeproben verschiedene Schritte der chemischen Fixierung, Kontrastierung und Dehydrierung durchlaufen. Dieses Verfahren muss für die jeweilige Probe und die jeweiligen spezifischen Fragestellungen zu Beginn jeder Arbeit optimiert werden.

Wie schon unter 1.4.1 beschrieben, ist es daher wichtig, eine geeignete und reproduzierbare Fixierungs- und Färbemethode für die Gewebeproben auszuwählen. Die erste Zielsetzung dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Etablierung eines Protokolls zur optimalen Kontrastierung der biologischen Membranen und bestmöglichem Erhalt der Ultrastruktur mit Fokus auf die Endothelzellen, Perizyten, Kapillarwand-assoziierten Zellen und Visualisierung der Basallamina.

Des Weiteren wurden die Protokolle bezüglich der möglichen Anwendbarkeit für die SBF-SEM, der Handhabung und der Beschaffenheit der Proben beurteilt.

4.1 Vergleich der konventionellen Fixierung und Kontrastierung mit der für die SBF-SEM optimierten Fixierung und Kontrastierung

4.1.1 Konventionelle Fixierung und Kontrastierung

Die Substitution von Schwermetallen wie Uranylacetat bzw. UAE und Bleizitrat stellen die Grundlage dieser in der Elektronenmikroskopie über viele Jahrzehnte etablierten Methodik zur Kontrastierung des Gewebes dar [69, 70]. Eine Erhöhung bzw. Verbesserung des Kontrasts stellt sich durch die hohe Affinität von Uranyl- bzw. Bleiionen für Proteine, Nukleinsäuren und Hydroxygruppen in Kohlenhydraten wie RNA ein [71]. Diese Methode der Kontrastierung hat den Nachteil, dass elektronendichte Präzipitate im Gewebe oder auf den Ultradünnschnitten entstehen können, die Risse in den Dünnschnitten induzieren können und somit das Präparat beschädigen.

Die Anwendung dieser klassischen Fixierung und Kontrastierung im kardialen Gewebe der Maus zeigt, dass die ultrastrukturelle Erhaltung der Zellen sehr gut ist. Die Zellmembranen der verschiedenen Zellen sind allerdings nicht ausreichend kontrastiert, um in allen Regionen die Zellen gegeneinander, und auch gegen die Basallamina abgrenzen zu können.

Die analysierten Aufnahmen zeigen, dass es oft sehr schwer ist, die Aufteilung der Basallamina zu erkennen und es dadurch erschwert wird, Rückschlüsse über die Assoziation der Perizyten mit den Endothelzellen zu ziehen. Durch eine unzureichende Kontrastierung der Zell-Zell-Kontakte lassen sich einzelne Endothelzellen nur schwer voneinander abgrenzen.

Ein Vorteil dieser Art der Probenvorbereitung verglichen mit der Probenvorbereitung für die SBF-SEM liegt im geringeren Arbeitsaufwand. Ebenfalls empfiehlt sich diese Art der Kontrastierung für Fragestellungen, in denen eine Differenzierung zwischen Hetero- und Euchromatin von Bedeutung ist. Besonders hervorzuheben ist, dass die mit dieser Methode erzeugten Proben

vergleichsweise weniger spröde sind und somit problemlos intakte Ultradünnschnitte der Proben angefertigt werden können.

4.1.2 Optimierte Fixierung und Kontrastierung für die SBF-SEM

Ziel dieser Art der Probenvorbereitung ist eine optimale Kontrastierung der Zellmembranen und der Komponenten des Zytoskeletts sowie der extrazellulären Matrix. Das von Seligman und Kanker im Jahre 1960 entwickelte OTO-Verfahren (Osmium - Thiocarbohydrazid (TCH) - Osmium) [72] findet auch heute noch Anwendung und ist wesentlicher Bestandteil dieser Färbung. Es verstärkt die durch Osmium induzierte Färbung von Lipiden, im Besonderen die der lipidhaltigen Zellmembran. Das TCH bindet Osmium, das in einem zusätzlichen Arbeitsschritt zugefügt wird, an bereits angelagertes Osmium. Die Probe wird dadurch stärker kontrastiert (und dadurch auch die für die SBF-SEM essenzielle Leitfähigkeit der Probe erhöht). [73, 74]

Weitere wichtige Bestandteile dieser Färbung stellen die Verwendung von Reduktionsmitteln mit reduziertem Osmium und die Zugabe von Kaliumferrocyanid dar. Die Verwendung der Reduktionsmittel führt zu einer Kontrasterhöhung und zu einer verstärkten Konservierung der Membranen [75, 76]. Durch die Reduktion von Osmium durch Kaliumferrocyanid wird die Reaktionsfähigkeit gesteigert. Dadurch verstärkt sich die Kontrastierung der Membran zusätzlich [77]. Eine weitere Kontrastierung der Ultradünnschnitte ist nach Anwendung dieses Protokolls dadurch nicht mehr nötig. Ein Nachteil der verstärkten Kontrastierung zeigte sich in der erhöhten Zerbrechlichkeit und Sprödigkeit der Proben. Darüber hinaus kann es vereinzelt in bestimmten Regionen zu einer unzureichenden Kontrastierung kommen, deren Ursachen noch unbekannt sind.

Aufgrund der optimalen Kontrastierung der Membranen sowie der Basallamina ist dieses Protokoll demjenigen der konventionellen Kontrastierung für die in dieser Forschungsarbeit gestellten Fragen überlegen. Die Endothelzellen sind eindeutig zu erkennen und die Möglichkeit der Abgrenzung untereinander ist

durch die Identifizierung der Zell-Zell-Kontakte gegeben. Auch Perizyten und Kapillarwand-assoziierte Zellen können eindeutig abgegrenzt und identifiziert werden. Die Probenvorbereitung unter Verwendung dieses optimierten Protokolls stellte dann auch die Grundlage für die Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM) und 3D-Rekonstruktion zur Erzeugung dreidimensionaler Modelle ausgewählter Abschnitte des Mikrogefäßsystems dar.

4.2 Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze der kardialen Mikrovaskulatur mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM)

Die bisherige Gewebeeinbettung sowie die anschließende Proben-Auswertung mit Hilfe der klassischen TEM auf der Basis serieller Ultradünnschnitte haben zwar Bilder mit hoher Auflösung und ausreichendem Kontrast geliefert, jedoch war die Sammlung großer Probenvolumen kaum umsetzbar. Groß angelegte 3D-Studien waren extrem zeitintensiv und wurden aufgrund des großen Arbeitsaufwandes, Fehler bei der Schnittherstellung, Verlust von Schnitten und Fehlern beim Alignieren der seriellen Schnitte nur selten durchgeführt.

Die Methode der SBF-SEM wurde 2004 erstmals von Denk und Horstmann eingeführt und hat sich seither zu einem der wichtigsten Verfahren im Bereich der dreidimensionalen Elektronenmikroskopie weiterentwickelt [78]. Darüber hat dieses Verfahren Einzug in viele Bereiche der Forschung erhalten, wie der Zell- und Matrixbiologie oder der Erforschung von Konnektomen [79]. SBF-SEM füllt eine Lücke in der dreidimensionalen Bildgebung, die durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskope und hochauflösende elektronentomographische Verfahren ermöglicht wird [80]. Die Zahl der Veröffentlichungen in diesem Bereich hat seit der Einführung stark zugenommen.

Die SBF-SEM ermöglicht mit Hilfe von serieller Schnitttechnik bei gleichzeitig hochauflösender Bildgebung eine detaillierte Analyse der Ultrastruktur von Zellen und Geweben in der 3. Dimension.

Hunderte oder gar Tausende von seriellen elektronenmikroskopischen Aufnahmen eines fixierten Gewebeblöckchens können optimal ausgerichtet, automatisch geschnitten und ohne Falten, Verzerrung oder Strukturverlust erzeugt werden. Mit Hilfe der erhobenen Daten ist es möglich, ein dreidimensionales Modell der untersuchten Gewebeprobe zu erzeugen. Diese Modelle ermöglichen eine deutlich genauere Analyse und Zuordnung einzelner Zellen und deren Einordnung im subzellulären Kontext. Weiterhin ermöglicht die Rekonstruktion dieser Datensätze die Analyse von interzellulären Kontakten.

Als Nachteil dieses Verfahrens sind die anspruchsvolle Handhabung und die unwiederbringliche Zerstörung des Präparates bei der Generierung der Einzelbilder anzusehen.

Die für die Modellerzeugung notwendige Alignierung und anschließende Segmentierung der zahlreichen Aufnahmen stellt eine technisch anspruchsvolle und zeitaufwändige Arbeit dar. Zunächst müssen die Aufnahmen nachbearbeitet und sortiert werden, bevor anschließend einzelne Strukturen bzw. Zellen von Hand unter Zuhilfenahme eines Grafiktablets segmentiert werden können. In dieser Arbeit wurden Endothelzellen, Perizyten, Kapillarwand-assoziierte Zellen, die Basallamina und vereinzelt auch Kardiomyozyten analysiert und segmentiert.

Ein zuverlässiges Programm zur automatischen Segmentierung der Zellen existiert zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

Aus diesem Grund wurden nur zwei der insgesamt sechs Datensätze durchgängig segmentiert. Bei den vier anderen Datensätzen wurde nur jedes dritte Schnittbild zur Erzeugung eines dreidimensionalen Modells verwendet. Diejenigen Modelle, bei denen jede Aufnahme segmentiert wurde, (vgl. 3.2.4 und 3.2.6) präsentierten sich qualitativ hochwertiger. Die Übergänge zwischen den einzelnen Segmenten erscheinen weicher und die Darstellung detaillierter. Dennoch vermitteln die vier übrigen Modelle einen Überblick über die Lage der Endothelzellen, der Perizyten und der Kapillarwand-assoziierten Zellen sowie der Kontaktstellen im dreidimensionalen Raum.

Die Auswertung der dreidimensionalen Modelle erfolgte systematisch und unter den bereits in der Einleitung genannten Gesichtspunkten. Dabei war die Rekonstruktion der Endothelzellen und der Perizyten sowie deren gemeinsamen Basallamina ebenso wie deren mögliche Interaktion mit Kapillarwand-assoziierten Zellen im dreidimensionalen Raum von besonderem Interesse.

4.2.1 Rekonstruktion der Basallamina

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob die Perizyten durchgehend von einer Basallamina umschlossen werden bzw. diese mit den Endothelzellen teilen. Mit dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Perizyten der Kapillaren des Arbeitsmyokards der Maus kontinuierlich von einer Basallamina umhüllt werden. Befindet sich der Perizytenfortsatz in unmittelbarer Nähe zu den Endothelzellen oder bedeckt diese teilweise, so teilt sich die Basallamina auf und verläuft zwischen Perizytenfortsatz und Endothelzelle und umschließt so den sich anlagernden Perizytenfortsatz. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Perizytenfortsätze, die sich im Raum zwischen Kardiomyozyten und damit nicht in unmittelbarer Nähe zu den Endothelzellen befinden, ebenfalls von einer Basallamina umhüllt sind. Auch der Zellkörper der Perizyten, welcher kontinuierlich Fortsätze bzw. Ausläufer abgibt, ist von einer Basallamina umgeben. Zum Zeitpunkt der Abgabe eines Fortsatzes, der die Endothelzellen bedeckt, umschließt die Basallamina die Endothelzellen, den Fortsatz sowie auch den Zellkörper des Perizyten. Es entsteht eine Einheit.

4.2.2 Rekonstruktion der kardialen Perizyten

Die Zahl der Veröffentlichungen im Bereich der Erforschung der Funktion der Perizyten, wenn auch nicht mit Fokus auf deren Morphologie, hat stark zugenommen. In diversen Artikeln und Lehrbüchern existieren Schaubilder und Schemazeichnungen, die den Verlauf der Perizyten darstellen sollen. Die Abbildungen zeigen zumeist den rundlich dargestellten Zellkörper des Perizyten und zelluläre Ausläufer, die senkrecht zu der Gefäßachse verlaufen. Es ergibt sich ein netzartiges Gesamtgefüge [81, 82]. Darüber hinaus scheinen keine Verbindungen zwischen den einzelnen Perizyten zu bestehen. Lediglich in Studien, die zur Bildgebung auf fluoreszenzmikroskopische Verfahren zurückgegriffen haben, zeigte sich vereinzelt, dass auch ein Perizyt mit mehreren Kapillaren in Verbindung stehen kann [83]. Das begrenzte Auflösungsvermögen konventioneller Lichtmikroskope lässt jedoch eine detailliertere Beschreibung

der Perizyten nicht zu. Des Weiteren präsentieren Schemazeichnungen der Perizyten in vielen Lehrbüchern oft eine Kapillare im Querschnitt, die nahezu vollständig von Perizyten umschlossen wird [84].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen ermöglichten die Rekonstruktion von kardialen Kapillarausschnitten im dreidimensionalen Raum mit Fokus auf den genauen Verlauf der mit diesen assoziierten Perizyten. Die Ergebnisse der Rekonstruktion verschiedener Kapillaren im Rahmen dieser Arbeit lassen sich folgenderweise zusammenfassen:

Der Zellkörper der Perizyten verläuft parallel der Gefäßlängsachse. Der Perizyt gibt in seinem Verlauf vereinzelt Fortsätze ab, die mit dem Endothel assoziiert sind. Dadurch entsteht eine perizytäre-endotheliale Einheit, welche von derselben Basallamina umschlossen wird. Die Perizytenfortsätze folgen weitestgehend geradlinig der Längsachse der Kapillare. Vereinzelt entstehen Ausläufer, die nahezu senkrecht zur Kapillare verlaufen, diese jedoch nicht komplett umschließen. Die Endothelzellen der hier untersuchten Kapillaren werden an der abluminalen Seite in keinem Abschnitt vollständig von Perizyten bedeckt. Außerdem existieren Abschnitte der Kapillare, welche komplett frei von Perizyten bzw. dessen Fortsätzen sind.

4.2.3 Rekonstruktion der kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen

Existenz, Verlauf und mögliche Funktionen der kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen im Allgemeinen zogen in den vergangenen Jahren die Aufmerksamkeit vieler Forschungsgruppen auf sich. In kapillären Gefäßabschnitten werden diese Zellen im Gegensatz zu Perizyten nicht von der gleichen Basallamina wie die kapillären Endothelzellen umgeben und lassen sich durch dieses differentialdiagnostische Kriterium sehr gut von den Perizyten abgrenzen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Rekonstruktionen weisen darauf hin, dass diese Zellen sehr groß und weit verzweigt sind. Die Ausläufer der Kapillarwand-assoziierten Zellen verlaufen oftmals entlang der Gefäß-Längsachse und begleiten somit die Kapillaren. Anhand von mehreren

Aufnahmen und dreidimensionalen Modellen konnten potentielle Kontaktstellen identifiziert werden, die eine räumliche Assoziation dieser Zellen mit den Endothelzellen zeigen. Diese Kontaktstellen erstrecken sich über wenige Nanometer und weisen eine stärkere Elektronendichte auf. Im Bereich dieser potenziellen Kontaktstellen ist die sonst kontinuierliche Bedeckung der abluminalen Seite der Endothelzellen durch die Basallamina unterbrochen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Kapillarwand-assoziierten Zellen den Endothelzellen nähern und kleine Ausläufer bilden können, die Voraussetzung zur Bildung von potenziellen Zell-Zell-Kontakten. Interessanterweise zeigen die in dieser Arbeit generierten Aufnahmen, dass auch die Endothelzellen selbst zelluläre Fortsätze bilden, die durch die Basallamina nach außen protrudieren und dann in Kontakt mit den Kapillarwand-assoziierten Zellen stehen. Potenzielle Kontaktstellen zwischen Kapillarwand-assoziierten Zellen und Perizyten bzw. Regionen enger Assoziation der beiden Zelltypen konnten in dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Die weitere Rekonstruktion der Ausläufer der Kapillarwand-assoziierten Zellen zur Erfassung ihrer gesamten Größe und Verzweigung wurde durch die Größe der ROIs limitiert.

4.2.4 Charakterisierung der kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen

Um die kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen näher zu charakterisieren, wurde die Expression dreier Membranproteine mittels eines immunelektronenmikroskopischen Verfahrens analysiert. Die in diesem Rahmen eingesetzte Glucoseoxidase-Diaminobenzidin-Methode (GOD-DAB) eignet sich hervorragend zum Nachweis und zur Lokalisierung von Proteinen auf der Oberfläche von und in Zellen sowie in Geweben innerhalb ihres ultrastrukturellen Kontextes [85]. Die Methode wurde mit dem Ziel des Nachweises einzelner Markerproteine auf kardialen Kapillarwand-assoziierten Zellen angewandt. Durch die DAB-Reaktion vermittelt, bildet sich in dem

Bereich der Antikörpermarkierung ein elektronendichtes Präzipitat, das in der transmissions-elektronenmikroskopischen Analyse nachgewiesen werden kann. Auf dieser Weise wurde untersucht, ob die Kapillarwand-assoziierten Zellen die Oberflächenproteine CD34, CD44 sowie den Tyrosinkinaserzeptor Flk-1 exprimieren.

CD34, das zu den Cluster of Differentiation - Molekülen zählt, ist ein von hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen exprimiertes Membranprotein. Die genaue Funktion bzw. Funktionsweise von CD34 konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden, jedoch wird diesem Protein eine tragende Rolle bei der Steuerung der Hämatopoese zugeschrieben [86]. CD34 und CD44 spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und auch der Angiogenese und haben dadurch auch Einfluss auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum.

Das Adhäsionsmolekül CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, der zu der Entstehung von Zellkontakten bzw. Zell-Matrixkontakten beiträgt und damit die Zellmigration fördert. Darüber hinaus ist CD44 an der Zytokinese und der Hämatopoese beteiligt [87, 88].

Die fetale Leberkinase (Flk-1) gehört zur Gruppe der VEGF - Rezeptoren und ist daher auch unter dem Namen VEGFR-2 bekannt. Diese Rezeptoren sind essenziell bei der Steuerung der Vaskulogenese und Angiogenese. Sie beeinflussen somit Migration und Proliferation der Endothelzellen.

Mit dieser Studie konnte der Nachweis erbracht werden, dass die hier untersuchten Kapillarwand-assoziierten Zellen sowohl CD34 positiv als auch CD44 positiv sind, also beide Membranproteine exprimieren. Da neben Endothelzellen auch Kardiomyozyten, wie in der Literatur beschrieben [89-93], Immunreaktivität für Flk-1 zeigten, war ein zweifelsfreier Nachweis der Expression von Flk-1 in den dazwischen lokalisierten Kapillarwand-assoziierten Zellen nicht möglich.

4.3 Einordnung und Ausblick

Mit Hilfe dieser Studie konnten neue morphologische Merkmale der Perizyten im Kapillarbett des Herzens der Maus charakterisiert und die Wechselwirkungen von Kapillarwand-assoziierten Zellen mit dem Kapillarendothel analysiert werden. Weiterhin konnten die Markerproteine CD34 und CD44 auf der Oberfläche der Kapillarwand-assoziierten Zellen nachgewiesen werden.

Die auf die Verwendung der Block-face-Methode zurückzuführende, sehr gute Darstellung der Ultrastruktur lässt sich höchstwahrscheinlich auch auf die Untersuchung des Mikrogefäßsystems in anderen Bereichen des Körpers, wie der Skelettmuskulatur übertragen. Somit könnten Vergleichsdaten generiert und analysiert werden. Des Weiteren könnten Unterschiede der Perizyten bezüglich ihrer Lokalisation im Gefäßbett dargestellt werden. Ebenso wäre eine weiterführende Rekonstruktion der Kapillarwand-assoziierten Zellen und Endothelzellausläufer im dreidimensionalen Raum möglich. Anhand dieser Grundlagenforschung ließen sich in Zukunft wahrscheinlich die einzelnen Subpopulationen der Perizyten nicht nur mit Hilfe von Markern, sondern auch durch morphologische Merkmale einteilen. Diese zukünftige Einteilung stellt einen der wichtigsten Pfeiler in der Erforschung der Perizyten dar, nicht zuletzt, weil sie es ermöglichen könnte, das enorme therapeutische Potenzial, das diese Zellart bietet, auszuschöpfen.

Die SBF-SEM hat sich bei dreidimensionalen Rekonstruktionen etabliert und füllt eine Lücke zwischen der dreidimensionalen Bildgebung, welche durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskope und hochauflösende elektronentomographische Verfahren ermöglicht wird. Die Segmentierung und Erzeugung der dreidimensionalen Modelle stellen jedoch eine technisch anspruchsvolle und zeitaufwändige Arbeit dar.

5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weit verbreitet und nicht nur eine große Belastung für die Betroffenen, sondern auch für das Gesundheitssystem. Die Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z.B. Myokardinfarkt und koronare Herzkrankheit stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Prävention, frühzeitige Erkennung und konsequente Behandlung sind daher von großer Bedeutung.

Um das Verständnis für die Pathophysiologie zu fördern und ferner Therapieansätze ausfindig zu machen, ist es notwendig, nicht nur die Herzmuskelzellen im Blick zu haben, sondern auch die Komponenten des Herzmuskelstromas, die deren Funktion beeinflussen können.

Das Verständnis und die Rekonstruktion des kardialen Gewebes auf ultrastruktureller Ebene, sowie die Charakterisierung und Wechselwirkungen der verschiedenen Zellen des Herzens haben deshalb das Interesse vieler Forschergruppen geweckt.

Das Ziel dieser Arbeit war die detaillierte ultrastrukturelle Analyse kardialer Perizyten, Endothelzellen sowie Kapillarwand-assoziiierter Zellen und deren Kontakte im Arbeitsmyokard der Maus mittels verschiedener elektronenmikroskopischer Methoden.

Zu Beginn der Arbeit wurde die transmissionselektronenmikroskopische Probenaufbereitung optimiert und ein modifiziertes Protokoll zur hervorragenden Kontrastierung der biologischen Membranen und zum bestmöglichen Erhalt der Ultrastruktur etabliert. Die optimierte Probenaufbereitung bot dann die ideale Grundlage für die Generierung elektronenmikroskopischer Datensätze mittels serieller Block-Face Rasterelektronenmikroskopie (SBF-SEM) und anschließender Erzeugung dreidimensionaler Modelle der Mikrovaskulatur des Arbeitsmyokards der Maus.

Die detaillierte ultrastrukturelle Analyse in drei Dimensionen offenbart neue morphologische Merkmale der kardialen Mikrovaskulatur und zeigt, dass die

kardialen Perizyten vereinzelt Fortsätze abgeben, die mit den Endothelzellen assoziiert sind. Dadurch entsteht nicht nur eine perizytäre-endotheliale Einheit, die von derselben Basallamina umschlossen wird. Die Rekonstruktion zeigt ebenfalls, dass die Kapillarwand-assoziierten Zellen sehr groß und weit verzweigt sind und nicht von der die Perizyten und Endothelzellen umgebenden Basallamina umschlossen werden. Sie stehen an vereinzelter Stellen in direktem Kontakt mit den Endothelzellen.

Immunelektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass die Kapillarwand-assoziierten Zellen sowohl CD34-positiv als auch CD44-positiv sind.

Größer angelegte Studien zur weiteren dreidimensionalen Analyse z.B. in der Intima einer Arteriole könnten zur weiteren Charakterisierung der Perizyten und der Kapillarwand-assoziierten Zellen beitragen und sogar eine Einteilung möglich machen.

Eine Beteiligung von Perizyten im Rahmen des kardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt wurde bereits nachgewiesen. Außerdem spielen die Membranproteine CD34 und CD44 eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und auch der Angiogenese.

In Zukunft könnten sich auch daraus interessante neue Ansätze für gezielte Therapien nach einem Myokardinfarkt ergeben.

Literaturverzeichnis

1. *Continuous Capillary.* Available from: http://images.slideplayer.com/10/2776645/slides/slide_21.jpg. Abrufdatum 25.08.2020.
2. *Prinzip der SBF-SEM.* Available from: <https://www.gatan.com/resources/media-library/3view-serial-block-face-imaging>. Abrufdatum 13.03.2023.
3. Destatis, S.B. *Todesursachen.* 2018; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>. Abrufdatum 21.08.2020.
4. Destatis, S.B., *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten, Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017.* 2017.
5. Rouget, C., *Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques.* Arch. Physiol. Norm. Pathol., 1873. **5**: p. 603-663 .
6. Zimmermann, K.W., *Der feinere bau der blutcapillaren.* Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 1923. **68**(1): p. 29-109.
7. Mikawa, T. and R.G. Gourdie, *Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ.* Developmental biology, 1996. **174**(2): p. 221-232.
8. Wessels, A. and J. Pérez-Pomares, *The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells.* The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2004. **276**(1): p. 43-57.
9. Dettman, R.W., et al., *Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart.* Developmental biology, 1998. **193**(2): p. 169-181.
10. Kumar, A., et al., *Specification and diversification of pericytes and smooth muscle cells from mesenchymoangioblasts.* Cell Reports, 2017. **19**(9): p. 1902-1916.
11. Kovacic, J.C., et al., *Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease.* Circulation, 2012. **125**(14): p. 1795-1808.
12. Sims, D.E., *The pericyte – a review.* Tissue and Cell, 1986. **18**(2): p. 153-174.
13. Armulik, A., G. Genové, and C. Betsholtz, *Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.* Developmental cell, 2011. **21**(2): p. 193-215.
14. Nees, S., et al., *Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro.* American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2012. **302**(1): p. H69-H84.

15. Armulik, A., A. Abramsson, and C. Betsholtz, *Endothelial/pericyte interactions*. *Circ Res*, 2005. **97**(6): p. 512-23.
16. Díaz-Flores, L., et al., *Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche*. *Histology and histopathology*, 2009.
17. Nees, S., et al., *Wall structures of myocardial precapillary arterioles and postcapillary venules reexamined and reconstructed in vitro for studies on barrier functions*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2012. **302**(1): p. H51-H68.
18. Armulik, A., et al., *Pericytes regulate the blood–brain barrier*. *Nature*, 2010. **468**(7323): p. 557-561.
19. Nees, S., et al., *Abundant pericytes in the venous intima and the vasa venarum: evidence for their key role in venous thrombosis*. *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders*, 2013. **1**(1): p. 113.
20. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. *Cell stem cell*, 2008. **3**(3): p. 301-313.
21. Chen, C.W., et al., *Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 597439.
22. Chen, W.C., et al., *Human myocardial pericytes: multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity*. *Stem cells*, 2015. **33**(2): p. 557-573.
23. Psaltis, P.J., et al., *Resident vascular progenitor cells--diverse origins, phenotype, and function*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. **4**(2): p. 161-76.
24. Wanjare, M., S. Kusuma, and S. Gerecht, *Perivascular cells in blood vessel regeneration*. *Biotechnology journal*, 2013. **8**(4): p. 434-447.
25. Alarcon-Martinez, L., et al., *Capillary pericytes express a-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection*. *Elife*, 2018. **7**: p. e34861.
26. Prazeres, P.H.D.M., et al., *Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue*. *Developmental biology*, 2017. **427**(1): p. 6-11.
27. Van Dijk, C.G., et al., *The complex mural cell: pericyte function in health and disease*. *International journal of cardiology*, 2015. **190**: p. 75-89.
28. Gerhardt, H. and C. Betsholtz, *Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis*. *Cell and tissue research*, 2003. **314**(1): p. 15-23.
29. Benest, A.V., et al., *VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue*. *Microcirculation*, 2006. **13**(6): p. 423-437.
30. Stratman, A.N., et al., *Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010. **116**(22): p. 4720-4730.
31. Stratman, A.N. and G.E. Davis, *Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation and stabilization*. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 2012. **18**(1): p. 68.

32. Darland, D., et al., *Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival*. *Developmental biology*, 2003. **264**(1): p. 275-288.
33. Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic, *Central nervous system pericytes in health and disease*. *Nature neuroscience*, 2011. **14**(11): p. 1398.
34. Bergers, G. and S. Song, *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. *Neuro-oncology*, 2005. **7**(4): p. 452-464.
35. Hall, A.P., *Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy*. *Toxicologic pathology*, 2006. **34**(6): p. 763-775.
36. Allt, G. and J. Lawrenson, *Pericytes: cell biology and pathology*. *Cells tissues organs*, 2001. **169**(1): p. 1-11.
37. Kotecki, M., et al., *Calpain-and talin-dependent control of microvascular pericyte contractility and cellular stiffness*. *Microvascular research*, 2010. **80**(3): p. 339-348.
38. Rucker, H.K., H.J. Wynder, and W.E. Thomas, *Cellular mechanisms of CNS pericytes*. *Brain research bulletin*, 2000. **51**(5): p. 363-369.
39. Deb, A. and E. Ubil, *Cardiac fibroblast in development and wound healing*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014. **70**: p. 47-55.
40. Greenhalgh, S.N., J.P. Iredale, and N.C. Henderson, *Origins of fibrosis: pericytes take centre stage*. *F1000prime reports*, 2013. **5**.
41. Fabris, L. and M. Strazzabosco. *Epithelial–mesenchymal interactions in biliary diseases*. in *Seminars in liver disease*. 2011. NIH Public Access.
42. Schrimpf, C. and J.S. Duffield, *Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte*. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2011. **20**(3): p. 297-305.
43. Birbrair, A., et al., *Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner*. *Stem cell research & therapy*, 2014. **5**(6): p. 122.
44. Birbrair, A., et al., *Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2014. **307**(1): p. C25-C38.
45. Weiss, R.M., J.D. Miller, and D.D. Heistad, *Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models*. *Circulation research*, 2013. **113**(2): p. 209-222.
46. O'Farrell, F.M., et al., *Capillary pericytes mediate coronary no-reflow after myocardial ischaemia*. *Elife*, 2017. **6**: p. e29280.
47. Tao, Y.-K., et al., *Notch3 deficiency impairs coronary microvascular maturation and reduces cardiac recovery after myocardial ischemia*. *International journal of cardiology*, 2017. **236**: p. 413-422.
48. He, X., H. Zeng, and J.-X. Chen, *Ablation of SIRT3 causes coronary microvascular dysfunction and impairs cardiac recovery post myocardial ischemia*. *International journal of cardiology*, 2016. **215**: p. 349-357.
49. Crisan, M., et al., *Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: Myoendothelial cells and pericytes*. *Methods in cell biology*, 2008. **86**: p. 295-309.

50. Kramann, R., et al., *Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis*. *Cell stem cell*, 2015. **16**(1): p. 51-66.
51. Kramann, R., et al., *Gli1+ pericyte loss induces capillary rarefaction and proximal tubular injury*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017. **28**(3): p. 776-784.
52. Kim, J. and T. Braun, *Targeting the cellular origin of organ fibrosis*. *Cell stem cell*, 2015. **16**(1): p. 3-4.
53. Chen, C.W., et al., *Human pericytes for ischemic heart repair*. *Stem cells*, 2013. **31**(2): p. 305-316.
54. Dar, A., et al., *Multipotent vasculogenic pericytes from human pluripotent stem cells promote recovery of murine ischemic limb*. *Circulation*, 2012. **125**(1): p. 87-99.
55. Katare, R., et al., *Transplantation of human pericyte progenitor cells improves the repair of infarcted heart through activation of an angiogenic program involving micro-RNA-132*. *Circulation research*, 2011. **109**(8): p. 894-906.
56. Alvino, V.V., et al., *Transplantation of allogeneic pericytes improves myocardial vascularization and reduces interstitial fibrosis in a swine model of reperfused acute myocardial infarction*. *Journal of the American Heart Association*, 2018. **7**(2): p. e006727.
57. Ellison-Hughes, G.M. and P. Madeddu, *Exploring pericyte and cardiac stem cell secretome unveils new tactics for drug discovery*. *Pharmacology & therapeutics*, 2017. **171**: p. 1-12.
58. Tawonsawatruk, T., et al., *Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing-non-union*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 22779.
59. Chen, W.C., B. Péault, and J. Huard, *Regenerative translation of human blood-vessel-derived MSC precursors*. *Stem cells international*, 2015. **2015**.
60. Gherghiceanu, M. and L.M. Popescu, *Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(4): p. 871-7.
61. Bani, D., *Telocytes in Cardiac Tissue Architecture and Development*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **913**: p. 127-137.
62. Fu, S., et al., *Telocytes in Cardiac Protection*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016. **11**(5): p. 390-4.
63. Hartmann, D.A., et al., *Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice*. *Neurophotonics*, 2015. **2**(4): p. 041402.
64. Reynolds, E.S., *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 208-12.
65. Walton, J., *Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology*. *J Histochem Cytochem*, 1979. **27**(10): p. 1337-42.
66. Tapia, J.C., et al., *High-contrast en bloc staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy*. *Nat Protoc*, 2012. **7**(2): p. 193-206.
67. Deerinck, T.J.B., Eric & Thor, Andrea & Ellisman, Mark. (2010). NCMIR methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological

- specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Nat Center Microsc Imag Res.* 6-8. .
68. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
 69. Venable, J.H. and R. Coggeshall, *A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.* *The Journal of cell biology*, 1965. **25**(2): p. 407.
 70. Watson, M.L., *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.* *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1958. **4**(4): p. 475.
 71. Hayat, M.A., *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications.* 1981: Edward Arnold.
 72. Seligman, A.M., H.L. Wasserkrug, and J.S. Hanker, *A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH).* *The Journal of cell biology*, 1966. **30**(2): p. 424.
 73. Kelley, R.O., R.A. Dekker, and J.G. Bluemink, *Ligand-mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy.* *Journal of ultrastructure research*, 1973. **45**(3-4): p. 254-258.
 74. Shotton, D., et al., *Postsynaptic membrane folds of the frog neuromuscular junction visualized by scanning electron microscopy.* *Neuroscience*, 1979. **4**(3): p. 427-435.
 75. McDonald, K., *Osmium ferricyanide fixation improves microfilament preservation and membrane visualization in a variety of animal cell types.* *Journal of ultrastructure research*, 1984. **86**(2): p. 107-118.
 76. Willingham, M.C. and A.V. Rutherford, *The use of osmium-thiocarbohydrazide-osmium (OTO) and ferrocyanide-reduced osmium methods to enhance membrane contrast and preservation in cultured cells.* *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1984. **32**(4): p. 455-460.
 77. White, D., J. Mazurkiewicz, and R. Barnett, *A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures.* *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1979. **27**(7): p. 1084-1091.
 78. Denk, W. and H. Horstmann, *Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure.* *PLoS Biol*, 2004. **2**(11): p. e329.
 79. Smith, D. and T. Starborg, *Serial block face scanning electron microscopy in cell biology: Applications and technology.* *Tissue Cell*, 2019. **57**: p. 111-122.
 80. Hughes, L., et al., *Serial block face scanning electron microscopy--the future of cell ultrastructure imaging.* *Protoplasma*, 2014. **251**(2): p. 395-401.
 81. Attwell, D., et al., *What is a pericyte?* *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016. **36**(2): p. 451-5.
 82. Ferland-McCollough, D., et al., *Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology.* *Pharmacol Ther*, 2017. **171**: p. 30-42.
 83. Nees, S., D.R. Weiss, and G. Juchem, *Focus on cardiac pericytes.* *Pflugers Arch*, 2013. **465**(6): p. 779-87.

84. Kloc, M., et al., *Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection*. *Transplantation*, 2015. **99**(4): p. 658-67.
85. Ana, L.D.P., et al., *Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes*, in *Applications of Immunocytochemistry*, D. Hesam, Editor. 2012, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 4.
86. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery*. *Microcirculation*, 2009. **16**(6): p. 487-96.
87. Cuff, C.A., et al., *The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(7): p. 1031-40.
88. Chen, L., et al., *The role of CD44 in pathological angiogenesis*. *FASEB J*, 2020. **34**(10): p. 13125-13139.
89. Takahashi, N., et al., *Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes*. *Circ Res*, 1999. **84**(10): p. 1194-202.
90. Zentilin, L., et al., *Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction*. *FASEB J*, 2010. **24**(5): p. 1467-78.
91. Wang, T., et al., *Brief Communication: Copper suppression of vascular endothelial growth factor receptor-2 is involved in the regression of cardiomyocyte hypertrophy*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014. **239**(8): p. 948-953.
92. Klinnikova, M.G., et al., *Immunohistochemical Study of the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (KDR/Flk-1) during Myocardial Infarction*. *Bull Exp Biol Med*, 2017. **163**(4): p. 500-505.
93. Mzhelskaya, M.M., et al., *Expression of Flk-1 and Cyclin D2 mRNA in the Myocardium of Rats with Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy and after Treatment with Betulonic Acid Amide*. *Bull Exp Biol Med*, 2017. **163**(6): p. 809-813.

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
µm	Mikrometer
3D	3 Dimensional
AB	Avidin-Biotin
Abbildung	Abbildung
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
AZ	Kapillarwand-assoziierte Zelle
BL	Basallamina
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO	Cacodylatpuffer
CD	Cluster of Differentiation
Cx43	Connexin 43
DAB	3, 3'- Diaminobenzidintetrahydrochlorid
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DDSA	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
DMP-30	2, 4, 6- Tris(dimethylaminomethyl)phenol
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FLK-1	Fetale Leberkinase 1
GA	Glutaraldehyd
Gli 1	Transkriptionsfaktor des Sonic-Hedgehog-Pathway

GOD	Glucoseoxidase
GOD-DAB	Glucoseoxidase-Diaminobenzidin
HCl	Salzsäure
HKE	Herz-Kreislauf-Erkrankungen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MNA	Methylnadicanhydrid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogencarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NG2	neuronal glial antigen 2
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NVU	funktionelle neurovaskuläre Einheit
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGFRβ	von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PO	Propylenoxid
ROI	Region of Interest
SBF-SEM	Serial Block-face Scanning Electron Microscopy
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Saline-Puffer
TCH	Thiocarbohydrazid

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Gewebefaktor
UAR-EMS	Uranylacetat-Ersatzlösung
vgl.	Vergleichsweise
WT	Wildtyp
α SMA	Alpha-Aktin der glatten Muskulatur

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Kapillare.	3
Abbildung 2: Prinzip der SBF-SEM.	33
Abbildung 3: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard.	37
Abbildung 4: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard.	39
Abbildung 5: TEM-Aufnahme einer Arteriole im murinen Arbeitsmyokard.	40
Abbildung 6: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen Arbeitsmyokard.	41
Abbildung 7: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03.	44
Abbildung 8: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03.	45
Abbildung 9: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03.	46
Abbildung 10: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03.	47
Abbildung 11: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 03.	47
Abbildung 12: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 03.	48
Abbildung 13: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 04.	50
Abbildung 14: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 04.	51
Abbildung 15: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 04.	52
Abbildung 16: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 04.	53
Abbildung 17: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI 06.	55
Abbildung 18: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06.	56

Abbildung 19: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
06.	57
Abbildung 20: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06.	57
Abbildung 21: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-Sem Datensatzes der ROI	
06.	58
Abbildung 22: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06.	59
Abbildung 23: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 06.	60
Abbildung 24: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes von ROI	
02.	62
Abbildung 25: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.	63
Abbildung 26: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
02.	64
Abbildung 27: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.	65
Abbildung 28: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 02.	65
Abbildung 29: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
01.	67
Abbildung 30: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.	68
Abbildung 31: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
01.	70
Abbildung 32: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
01.	71
Abbildung 33: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
01.	72
Abbildung 34: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.	73
Abbildung 35: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
01.	74
Abbildung 36: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 01.	75
Abbildung 37: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
00.	77
Abbildung 38: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00.	78

Abbildung 39: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
00.	79
Abbildung 40: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
00.	80
Abbildung 41: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00.	81
Abbildung 42: Ausgewählte Aufnahmen des SBF-SEM Datensatzes der ROI	
00.	82
Abbildung 43: 3D-Modell des Datensatzes von ROI 00.	83
Abbildung 44: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen	
Arbeitsmyokard.	85
Abbildung 45: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen	
Arbeitsmyokard.	86
Abbildung 46: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen	
Arbeitsmyokard.	87
Abbildung 47: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen	
Arbeitsmyokard. Negativkontrolle: Goat anti-Rat. IgG.....	88
Abbildung 48: TEM-Aufnahmen verschiedener Kapillaren im murinen	
Arbeitsmyokard.	88

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: wichtigste Marker kardialer Perizyten	6
Tabelle 2: Marker von Perizyten der Mikrozirkulation	7
Tabelle 3: Puffer für die TEM	16
Tabelle 4: Fixierungs- und Kontrastmittel für die TEM	17
Tabelle 5: Dehydratisierungsmittel für die TEM	18
Tabelle 6: Komponenten des Einbettungsverfahrens für die TEM	18
Tabelle 7: Puffer für die DAB-Reaktion	18
Tabelle 8: Fixierungs- und Kontrastmittel für die DAB-Reaktion	19
Tabelle 9: Verbindungen zur Blockierung der Reagenzien bei der DAB- Reaktion	19
Tabelle 10: Primärantikörper, welche bei der DAB-Reaktion verwendet wurden	19
Tabelle 11: Sekundärantikörper, welche bei der DAB-Reaktion verwendet wurden	20
Tabelle 12: Detektionssystem der DAB-Reaktion	20
Tabelle 13: Verbindungen der DAB-Färbung	20
Tabelle 14: Deyhydratisierungsmittel für die DAB-Reaktion	21
Tabelle 15: Puffer für die SBF-SEM	21
Tabelle 16: Fixierungs- und Kontrastmittel für die SBF-SEM	21
Tabelle 17: Dehydratisierungsmittel für die SBF-SEM	23

IV. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, Direktor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Frau PD Dr. Nicole Wagner danke ich besonders für die inhaltliche Ausrichtung und thematische Eingrenzung, die hervorragende Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich positiv beeinflusst und ermutigt.

Auch danke ich Frau Prof. Dr. med. Brenda Gerull für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachterin.

Besonderen Dank auch an Herr PD Dr. Uwe Rückschloss für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und seine Tipps.

Danke an Sieglinde Schenk für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfe während der Durchführung der Versuchsreihen.

Meinen herzlichsten und außerordentlichen Dank gilt Frau Karin Reinfurt-Gehm, ohne deren mühevollen Geduld, liebevolles Verständnis und ihrer kreativen und konstruktiven Ideen ein solcher Arbeitsumfang nie hätte gelingen können.

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die liebevolle, vielseitige und finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch außerdem meinen Freunden, insbesondere Herrn Dr. Sebastian Haschke.

An letzter Stelle in dieser Aufzählung, aber in meinem Herzen dafür weit vorn, kommt meine eigene kleine Familie. Herzlichen Dank an meine Frau Kristin und an unsere Zwillinge.