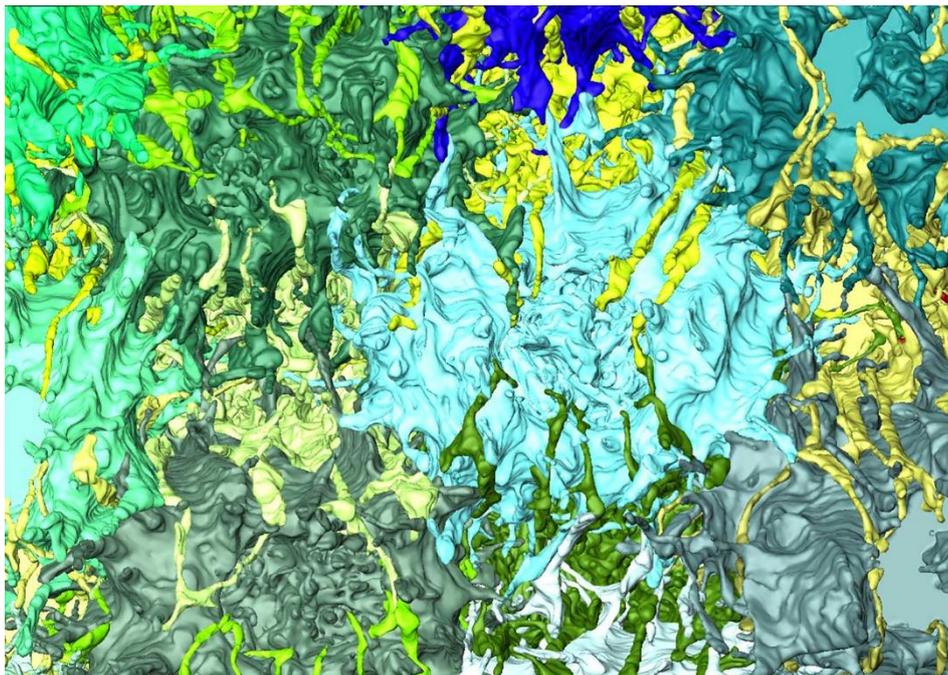


Connectomics der Sardellenretina

- Ein morphologischer und methodischer Beitrag -



Dissertation

an der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von
Maximilian Willy Scheungrab

München, Februar 2021

1. Gutachter: Prof Dr. Martin Heß
2. Gutachter: Prof Dr. Roland Melzer
Tag der Abgabe: 16.02.2021
Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2021

Inhalt

Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Warum <i>Engraulis encrasicolus</i> ?.....	8
1.2 Die Polarisation des Lichts.....	10
1.3 Auge und Retina.....	12
1.3.1 Das Auge.....	12
1.3.2 Die „äußere“ Retina.....	13
1.3.3 Die „innere“ Retina.....	14
1.3.4 Die Retina der Teleostei.....	16
1.3.5 Die Retina von <i>Engraulis encrasicolus</i>	17
1.4 Warum 3D-EM?.....	18
1.5 Elektronenmikroskopische Verfahren und Kombinationen.....	18
1.5.1 TEM – Transmissionselektronenmikroskopie.....	18
1.5.2 REM – Rasterelektronenmikroskopie.....	20
1.5.3 Automatisiertes Schneiden mit Diamantmesser – „Heidelberger Hobel“.....	21
1.5.4 Automatisiertes Schneiden mit Ionenstrahl – „FIB-FESEM“.....	21
1.5.5 Kombination von Methoden.....	22
1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	23
1.6.1 Biologische Fragestellungen.....	23
1.6.2 Methodische Fragestellungen.....	23
2. Material & Methoden.....	25
2.1 Akquise und Fixierung des Probenmaterials.....	26
2.2 Kontrastierung und Einbettung.....	26
2.2.1 Standardverfahren.....	26
2.2.2 OTO-Staining.....	27
2.3 3D-Elektronenmikroskopie.....	27
2.3.1 Mesa-Präparation.....	27
2.3.2 ssTEM.....	33
2.3.3 Heidelberger Hobel.....	36
2.3.4 FIB-FESEM.....	40
2.4 Digitales Imaging.....	42
2.4.1 Aufbereitung der Rohdaten für ssTEM.....	42
2.4.2 Aufbereitung der Rohdaten vom Heidelberger Hobel.....	54
2.4.3 3D-Rekonstruktion.....	56
2.4.4 Kombinationen der Bilderstapel.....	58

2.4.5	Muster der Zapfenterminalen.....	60
3.	Ergebnisse	61
3.1	Teil 1: 3D-Rekonstruktion der äußeren plexiformen Schicht.....	62
3.1.1	Äußere plexiforme Schicht insgesamt.....	62
3.1.2	Terminalen der Stäbchen	64
3.1.3	Terminalen der langen Zapfen	65
3.1.4	Terminalen der kurzen Zapfen	68
3.1.5	Synaptische Strukturen	69
3.1.6	Die (Telo-)Dendriten der Zapfenterminalen	70
3.1.7	Das interterminale Netzwerk	72
3.1.8	Kontakte zu Sekundärneuronen.....	74
3.2	Teil 2: 3D-Elektronenmikroskopie und Methodenkombinationen	78
3.2.1	ssTEM und FIB-FESEM	78
3.2.2	Heidelberger Hobel und FIB-FESEM	81
3.2.3	Vergleich der Methodenkombinationen.....	86
4	Diskussion.....	89
4.1	Teil 1: 3D-Rekonstruktion der äußeren plexiformen Schicht.....	91
4.1.1	Das Terminalen-Netzwerk.....	91
4.1.2	Die Sekundärneurone.....	93
4.1.3	Grenzen des Datensatzes	94
4.2	Teil 2: 3D-Elektronenmikroskopie und Methodenkombinationen	96
4.2.1	ssTEM	96
4.2.2	Heidelberger Hobel	100
4.2.3	FIB-FESEM.....	101
4.2.4	Methoden-Kombination.....	105
4.2.5	Methodenkritik.....	106
4.3	Ausblick	114
4.3.1	Segmentierung und Rekonstruktion	114
4.3.2	Datenerfassung	115
5.	Literatur.....	117
	Danksagung.....	137
	Erklärung	139
	Anhang	141
	Tabellen.....	142
	Erstellung von dreidimensionalen Papier-Modellen.....	150

Connectomics

is the production and study of connectomes: comprehensive maps of connections within an organism's nervous system

ist die Wissenschaft der Erstellung und Untersuchung von Konnektomen: umfangreiche Karten der Verbindungen innerhalb des Nervensystems eines Organismus.

(Hagmann et al. 2005)

Zusammenfassung

Die Sardellen (Engraulididae) sind eine der wenigen Vertebraten-Gruppen, die sowohl in der Lage sind, die Polarisierung des Lichtes wahrzunehmen und gleichzeitig eine morphologisch klar dieser Fähigkeit zuordenbare Struktur aufweisen: die Vielfachzapfen mit ihren orthogonal zueinander ausgerichteten Lamellen. Während die **äußere Retina** mit den photorezeptiven Teilen der Rezeptoren morphologisch auf lichtmikroskopischem und elektronenmikroskopischem Niveau gut untersucht und die Morphologie und Anordnung der Strukturen gut dokumentiert sind, so sind die Erkenntnisse über die **innere Retina** entweder elektrophysiologischer Natur oder bilden nur einen Zelltyp ab.

Mit der vorliegenden Arbeit wird mit einem 3D-morphologischen Ansatz die innere Retina von *Engraulis encrasicolus* dokumentiert und untersucht. Der Fokus liegt dabei auf dem enggestrickten **Netzwerk der äußeren plexiformen Schicht** – die Verbindungsschicht zwischen den Terminalen der Photorezeptoren und den, die Retina durchspannenden, Sekundärneuronen. Hierfür wurde die Retina mit dem **3D-EM-Verfahren FIB-FESEM** erfasst und anschließend raumerfüllend zu **3D-Modellen rekonstruiert**. So können alle Zelltypen und ihre Interaktionen innerhalb einer einzigen Probe erfasst werden. Die 3D-Modelle offenbaren neben den zahlreichen feinen (Durchmesser 10 nm) synaptischen Kontakten der Sekundärneurone zu den Endterminalen der Photorezeptoren, wobei jedes Sekundärneuron mehrere Photorezeptoren kontaktiert, ein überraschend **komplexes telodendritisches Netzwerk** zwischen den Photorezeptorterminalen selbst. Dieses verbindet die Zellen der Vielfachzapfenreihen intra- und interreihig und ist sehr konservativ für die beteiligten Zapfentypen. Dieser neue Aspekt der Fisch-Retina macht eine Modulation der Signale auf dieser Ebene sehr wahrscheinlich.

Die Verfolgung der Sekundärneurone und die Frage, ob die hohe Ordnung der Retina auf Höhe der Photorezeptoren in den nachfolgenden Schichten erhalten bleibt führte zur zweiten Fragestellung dieser Arbeit: Wie erhält man die nötige Auflösung (unter 10nm x 10nm x 10nm pro Voxel) um die feinen Dendriten der äußeren plexiformen Schicht rekonstruieren und gleichzeitig die nötigen Aufnahmeflächen um Zellen über die gesamte Retina (150 µm) hinweg darstellen zu können. Das **FIB-FESEM** (Focused Ion Beam – Field Emission SEM) bietet die nötige Auflösung mit isometrischen Voxeln aber mit begrenzter Aufnahmefläche. Der **Heidelberger Hobel**, eine weiteres SBFS-Verfahren, bietet hingegen große Abbildungsflächen mit größeren Voxeln. **Serial sectioning TEM (ssTEM)** bietet Pixelgrößen auf TEM-Niveau aber vergleichsweise hohe Schnittdicken (etwa 70nm). Um das Beste aus allen Methodiken erreichen zu können, wurden die Methoden ssTEM und Heidelberger Hobel jeweils mit FIB-FESEM kombiniert.

Beide Verfahren ergaben Datensätzen, die sowohl mit ihren FIB-FESEM-Datensätzen des jeweils gleichen Präparats kombiniert werden konnten als auch eine Rekonstruktion von Neuronen durch die gesamte Retina hindurch ermöglichen. In beiden Fällen ist die Auflösung ausreichend um Synapsen zu anderen Zellen (Amakrin- und Ganglienzellen) zu identifizieren. Bei der Quantifikation dieser Kontakte kommt der ssTEM-Ansatz jedoch an seine Grenzen, da in der Schnittdicke von 70 nm viel Information verloren geht und die Serienlänge methodisch begrenzt ist. Zudem hat sich der Nachbearbeitungsaufwand um die im ssTEM-Verfahren gewonnen Datensätze für eine Rekonstruktion verwenden zu können als sehr zeit- und arbeitsaufwendig herausgestellt. Mit einer deutlich besseren Auflösung und großen Abbildungsflächen, einer theoretisch unbegrenzten möglichen Schnittanzahl und einem signifikant geringeren Zeitaufwand hat sich die Kombination von Heidelberger Hobel und FIB-FESEM als die überlegene Methoden-Kombination herausgestellt.

Die generellen und spezifischen Problematiken der Methodiken und deren Lösungen werden dokumentiert und diskutiert. Ebenso wurden im Rahmen dieser Arbeit die Arbeitsabläufe für beide Methoden-Kombinationen optimiert und für zukünftige Projekte dokumentiert.

EINLEITUNG 1

MATERIAL
UND
METHODEN 2

ERGEBNISSE 3

DISKUSSION 4

LITERATUR 5

Sehen - **die Wahrnehmung von Licht** – ist für den Menschen der wichtigste Sinneseindruck überhaupt. Dabei wandeln die Photorezeptoren der Retina Lichtinformationen in elektrische Signale um, die dann über den Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet werden. Doch bereits in der Retina werden die elektrischen Signale mit diversen Nervenzellen durch vielfältige synaptische Verbindungen moduliert. Große Teile der Morphologie dieses synaptischen Netzwerkes der Retina sind noch unbekannt. Sicher ist, dass dieses Netzwerk in mehrere distinkte Verschaltungshorizonte gegliedert ist. Den Beginn der Signalkaskade bildet dabei der Horizont der äußeren plexiformen Schicht. Hier werden erstmals die Informationen des Lichtes als elektrisches Signal von den Photorezeptoren zu anderen Neuronen weitergegeben. Bereits an dieser Stelle werden die elektrischen Signale moduliert. Dies geschieht zum einen über spezialisierte Nervenzellen, die Horizontalzellen, die verschiedene Photorezeptoren miteinander verbinden. Doch bereits zwischen den Photorezeptoren selbst gibt es Verbindungen: das interterminale Netzwerk der Telodendriten. Die bis jetzt unbekannte Ausprägung dieses Geflechts könnte erste Hinweise zu Eigenschaften und Funktion dieser Zell-Zell-Verbindungen geben. Zudem sind die Photorezeptoren bei Organismen mit guter Sehschärfe oft hochgradig geordnet. Um eine hohe Informationsqualität zu gewinnen, muss diese Ordnung theoretisch in nachfolgenden Verschaltungshorizonten erhalten bleiben. Bisherige Untersuchungen der retinalen Netzwerke haben sich größtenteils auf die physiologischen Eigenschaften der Zellen und des retinalen Netzwerkes (Kaneko 1970), sowie auf die Morphologie einzelner Zelltypen begrenzt (Kolb et al. 1992).

Um ein klares Bild der Morphologie und Konnektivität der Zellen innerhalb des Netzwerkes zu erhalten, ist eine 3D-Rekonstruktion das Mittel der Wahl, um anhand der resultierenden Modelle die Morphologie und Interaktion aller Zellen des Netzwerkes erfassen zu können, sowie Informationen aus der Kombination aller drei Raumachsen zu nutzen, um die physiologischen Ergebnisse einzuordnen (Denk et al. 2012). Für die dafür nötigen Datensätze der Retina von *Engraulis encrasicolus* (der europäischen Sardelle) mit ihren ausgedehnten Schichten und großen Neuronen müssen große Flächen abgebildet werden, um ein vollständiges Bild der beteiligten Zellen zu erhalten. Gleichzeitig wird eine hohe Auflösung benötigt, um feine Dendriten und Axone verfolgen und um alle synaptischen Kontakte erfassen zu können. Kein kommerzielles Abbildungsverfahren kann derzeit alle Aspekte erfüllen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deswegen Kombinationsverfahren mehrerer Methodiken getestet und miteinander verglichen. Dabei wurden *serial sectioning Transmission Electron Microscopy (ssTEM)* und die *Serial Block Face Scanning Electron Microscopy (SBFSEM)* Methodik des **Heidelberger Hobel** jeweils mit der *Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-FESEM)* kombiniert und verglichen.

1.1 Warum *Engraulis encrasicolus*?

Engraulis encrasicolus (Linnaeus, 1758) – die europäische Sardelle – ist im gesamten Ostatlantik, der Nordsee, dem Mittelmeer und dem Schwarzen Meer zu finden. Die etwa 16 Zentimeter langen,

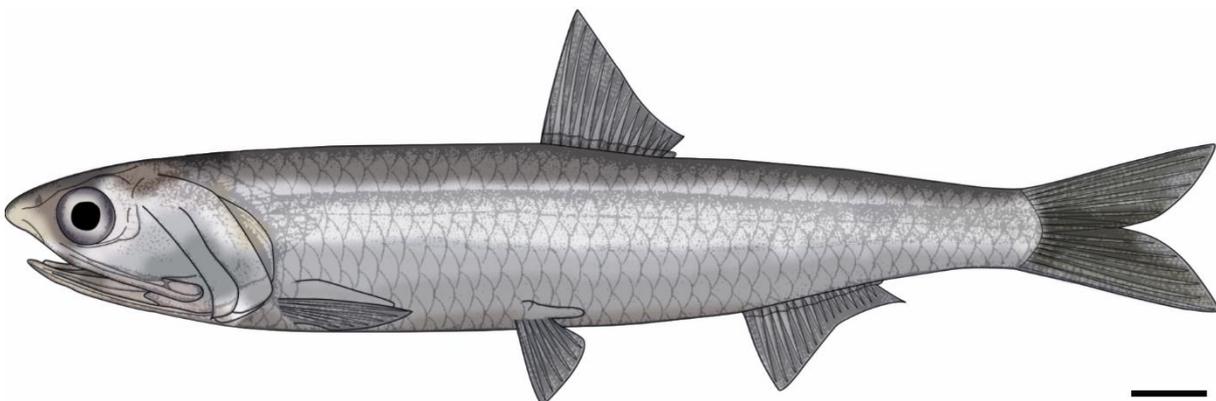


Abbildung 1: *Engraulis encrasicolus* nach Whitehead et al. 1988. Maßstabsbalken: 1 cm.

spindelförmigen und für Clupeidae relativ schlanken planktonfressenden Reusenzäger bilden große, küstennah lebende Schwärme (Whitehead et al. 1988). Wie die meisten Arten der Heringe (Clupeidae), so ist auch die europäische Sardelle ein wichtiger Speisefisch mit großer wirtschaftlicher Bedeutung (Binohlan 2020).

Stamm:	Chordata	Kohorte:	Otomorpha
Unterstamm:	Vertebrata	Ordnung:	Clupeiformes – Heringsartige
Klasse:	Actinopterygii – Strahlenflosser	Unterordnung:	Clupeoidea - Heringe
Unterklasse:	Neopterygii – Neuflosser	Familie:	Engraulidae – Sardellen
Teilkategorie:	Teleostei – Echte Knochenfische	Gattung:	<i>Engraulis</i>
Überkohorte:	Clupecephala - Heringsköpfige	Art:	<i>encrasicolus</i>

Eine Übersicht über den Stand der Forschung an der clupeiformen Retina findet sich in der Tabelle „Historie der Forschung an der clupeiformen Retina“ (Seite 142).

Eine Retina mit einem hochgeordneten Photorezeptor-Muster

Die europäische Sardelle bietet mit den in Kapitel 1.3.5 beschriebenen Vielfachzapfen eine hohe strukturelle Ordnung am Anfang der Signalleitungskette des Sehens. Sollte grundsätzlich jegliche Ordnung, die auf Höhe der Außenglieder der Photorezeptoren besteht auch durch die Schichten der Retina fortgesetzt werden, so sollte sie bei diesem Tiermodell deutlich zu erkennen sein. Die Sardelle weist mit ihren Vielfachzapfenreihen zudem eine sehr hohe Zapfendichte im ventrotemporalen Quadranten der Retina (Koch & Heß 2011) auf. Dieser klar definierte Bereich ist damit ideal geeignet zur gezielten Erfassung vollständiger retinaler Schaltkreise in einem möglichst kleinen Probenvolumen (siehe Kapitel 1.3.5 „Die Retina von *Engraulis encrasicolus*“).

Das Polarisationssehen

Die Fähigkeit von *E. encrasicolus*, die Polarisierung des Sonnenlichtes wahrzunehmen (siehe Kapitel 1.2), wurde physiologisch schon früh nachgewiesen und später morphologisch mit den Vielfachzapfen-Strukturen der äußeren Retina in Verbindung gebracht (Novalés-Flamarique & Hawryshyn 1998, Heß 2009). Dies stellt eine für Wirbeltiere untypische und vermutlich einzigartige Modalität des Sehvermögens dar. Die systematische Gruppe der Engraulidinae (Unterfamilie), zu denen *E. encrasicolus* gehört, bildet eines der wenigen sicher dokumentierten Beispiele für die Wahrnehmung von polarisiertem Licht innerhalb der Vertebraten (Hawryshyn 1992). Die morphologische Untersuchung der weiteren Verschaltung in der Retina wird Einsichten in diese Spezialfähigkeit der Sardelle ermöglichen, sowie generelle Aussagen über Verschaltungswege in der Retina der Vertebraten zulassen.

Ein guter Kompromiss bei der Probengröße

Da für ultrastrukturelle Untersuchungen nur sehr kleine Probensegmente benötigt werden, beziehungsweise nur kleine Volumina mit vertretbarem Aufwand untersucht werden können, sind möglichst kleine Augen aus dem Sichtpunkt des Materialaufwandes zu bevorzugen. Die Präparation sehr kleiner Augen, wie zum Beispiel bei *Danio rerio* machen die Verwendung eines Binokulars und feinste Instrumente unabdingbar. Zudem muss der Präparator viel Erfahrung mitbringen, um Verlust und Beschädigungen gering zu halten. Selbst unter den besten Umständen kommt es zu einem umso größeren Ausschuss, je kleiner die Augen sind. Größere Augen, wie zum Beispiel die der *Elasmobranchii*, *Selachii* oder von *Homo sapiens*, sind leichter zu präparieren und bieten potenziell mehr Probenausbeute. Allerdings ist die Beschaffung aufgrund einer geringen Verfügbarkeit und deutlich höherer gesetzlicher Hürden kompliziert. Unter diesen Aspekten bilden die Augen von *E.*

encrasicolus mit einer Größe von etwa 10 mm und relativ einfacher Verfügbarkeit einen guten Kompromiss.

Die Verfügbarkeit

Für die für die Untersuchungen verwendeten Retinasegmente müssen möglichst frische, das heißt frisch tote, Organismen verwendet werden. Jegliche Degradation des Gewebes ist für Untersuchungen auf ultrastrukturellem Niveau mit Qualitätseinbußen verbunden. Feine Strukturen wie die Terminaldendriten von Photorezeptoren sind von Abbauprozessen besonders betroffen. Einige Stunden zwischen der Tötung des Organismus und der ersten Fixierung des Retinagewebes sind hierfür schon ausreichend (Heß et al. 2006).

Beim kommerziellen Fischfang erhaltene Exemplare sind in der Regel mehrere Stunden bis Tage auf den Fischereischiffen unterwegs, bevor sie das Festland erreichen. Die dabei verwendete Kühlung auf Eis ist zur Bewahrung ultrastruktureller Details letztlich ungenügend. Eine Fixierung durch das Fischereipersonal ist nicht erfolgsversprechend, da diese – aufgrund der Faktoren Zeit und Erfahrung – nur mit ganzen Fischen durchgeführt werden kann. Das Eindringverhalten des zu verwendenden Fixativs ist jedoch nicht ausreichend, um in diesem Ansatz die Retina zu erreichen. Eine zuverlässige Durchdringung der gesamten Retina ist damit unmöglich. Eine Präparation und Präfixierung der frisch gefangenen Fische durch wissenschaftliches Personal direkt auf dem Schiff ist theoretisch machbar. Dies ist jedoch mit einem großen Organisationsaufwand verbunden, um öffentlichen Bestimmungen und Versicherungsansprüchen gerecht zu werden. Zudem ist ein Schiff aufgrund des Seegangs nicht optimal als Ort für feinmotorischen Präparationen geeignet. Denkbar und durchführbar ist die Bearbeitung der Fische direkt nach dem Anliefern an Land. Dafür werden jedoch zwei essenzielle Dinge vorausgesetzt: Die Fische sind in den letzten Stunden vor dem Anlegen gefangen worden – was nicht immer garantiert werden kann – und es muss ein Labor mit angemessener Belüftung (Dunstabzugshaube) vorhanden sein, um die Fixierung mit den zum Teil giftigen Fixationsmitteln (Glutaraldehyd, Osmiumtetroxid) durchführen zu können. Beides war bei den Fischereiunternehmen, die grundsätzlich bereit waren, wissenschaftliche Proben zu sammeln, nicht gegeben.

Das „Aquarium-Palace del Mar“ in San Sebastian (Baskenland) bietet im Vergleich dazu perfekte Bedingungen: (1) Den in Europa einzigen Schwarm von *Engraulis encrasicolus* in Aquariumshaltung mit einer angeschlossener Nachzucht, (2) ein Labor für Gastwissenschaftler mit allen benötigten Einrichtungen, (3) eine gute Infrastruktur und Erreichbarkeit, sowie (4) eine bereits langjährige Kooperation mit dem angestellten wissenschaftlichen Personal (Dr. Amalia Martinez de Murguia).

1.2 Die Polarisation des Lichts

Auch wenn das für Tiere sichtbare Licht meist als Partikel – als Photonen – beschrieben wird, hat es auch Charakteristika einer Welle. Dies zeigt sich unter anderem dann, wenn man Lichtquellen mit linearen Polarisationsfiltern betrachtet. Ein linearer Polarisationsfilter besteht aus parallelen „Linien“ mit einem sehr geringen Abstand zueinander. Durch diesen Filter kann nur Licht ungehindert hindurchtreten, dessen Schwingungsebene parallel zu den Linien des Filters orientiert ist. Schwingungsebenen, deren Winkel nicht übereinstimmen, werden, je nachdem um wieviel Grad sie abweichen, teilweise abgeblockt. Licht, das orthogonal zur Filterausrichtung schwingt, kann den Filter nicht passieren (Johnson 2012).

Für das Verständnis der Polarisierung des Lichtes sind zwei Aspekte zu bedenken: (1) Sämtliche optische Wahrnehmung von Objekten, die nicht selbst Licht emittieren, finden durch von diesen Objekten reflektiertes oder gestreutes Licht statt. (2) Das grundlegende Prinzip für die Wahrnehmungen von Formen und Bewegung ist Kontrast. Dabei handelt es sich um Unterschiede in der

Strahlungsqualität, die von zwei benachbarten Bildpunkten ausgeht. Für das Sehen im Tierreich sind drei Kontraste relevant: Helligkeitsunterschiede (Menge an Photonen), spektrale Unterschiede (Wellenlänge des sichtbaren Lichtes = Farbe) und Polarisationsunterschiede. Zusätzlich gibt es sekundäre Kontraste, die von spezifischen physikalischen Eigenschaften des Detektionssystems abhängen, wie dem Qualitätskontrast (Unterschied der Farbtintensitäten = Sättigung) oder dem Komplementärkontrast (abhängig vom Anteil des Spektrums, das der Detektor wahrnehmen kann). Während für die Wahrnehmung des Helligkeitskontrastes ein Sensor ausreicht, werden für die Wahrnehmung von Farb- und Polaritätskontrast mindestens zwei Sensoren benötigt, und zusätzlich ein Vergleichsmechanismus für den Informations-Output der beiden Sensoren. Für das Farbsehen müssen unterschiedliche Wellenlängen detektiert werden, für die Polarisation werden detektionsseitig senkrecht zueinander stehenden e-Vektoren benötigt.

Das Licht, das von der Sonne ausgeht, ist grundsätzlich nicht polarisiert (d.h. alle Schwingungsebenen sind gleich häufig vertreten) und die Lichtstrahlen sind für den Beobachter auf der Erde annähernd parallel zueinander ausgerichtet. Das Himmelslicht, das nicht in direkter Linie den Detektor trifft, erreicht diesen durch eine Ablenkung oder Reflexion oder Streuung an den Molekülen der Luft (O_2 , N_2 usw.). Diese für die Himmelsfarben verantwortliche Streuung ändert die Polarisierung dieser Lichtstrahlen richtungsabhängig (Rayleigh-Streuung, Abbildung 2). Das im 90 Grad zur ursprünglichen Lichtrichtung gestreute Licht wird dabei am stärksten polarisiert (Hawryshyn 1992). Durch diesen Effekt kann anhand der Polarisierung des Himmelslichtes von Arthropoden die Position der Sonne ermittelt werden. Für Detektoren mit Polarisationsfilter äußern sich diese Unterschiede des Polarisierungswinkels als Helligkeitskontrast (Horváth & Varjú 2004). Somit geht mit der Fähigkeit die Polarisierung von Licht wahrzunehmen einher, den Sonnenstand auch bei bedecktem Himmel ermitteln zu können. Damit ist eine weitgehend wetterunabhängige heliozentrische Orientierung möglich. Einige landlebende Tiere, wie auch die Honigbiene (Frisch 1949) mit ihren rhabdomeren Facettenaugen, machen sich dies zu Nutze. Es gibt aber nicht nur landlebende Organismen, die die Polarisierung des Lichtes wahrnehmen können. Auch im Wasser finden sich Beispiele innerhalb der Vertebrata (Hawryshyn & McFarland 1987). Hier jedoch nicht nur für eine Orientierung am Polarisationsmuster des Himmels (Horváth & Varjú 1995), sondern vorwiegend, um Polarisationskontraste bei der Objekterkennung auszunutzen (Waterman 1954, Novalés-Flamarique & Hawryshyn 1997). Im weitgehend homogenen visuellen Umfeld des Freiwassers gibt es mitunter wenig optische Kontraste. Dieser Umstand wird von vielen aquatischen Organismen genutzt, um sich optisch zu tarnen: seien es durchsichtiges Plankton und Quallen oder Cephalopoden mit der Fähigkeit zur Farbanpassung (Denton & Land 1971), sowie Fische mit reflektierenden Schuppen (Denton & Nicol 1965) oder auch einfach nur Farb-Tarnung: blau in blau.

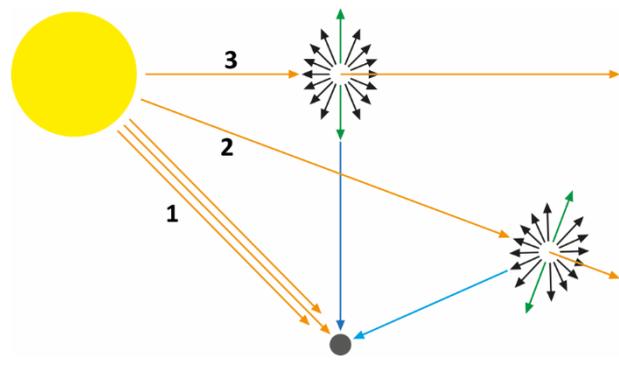


Abbildung 2: Rayleigh-Streuung. Das Sonnenlicht kann den Detektor (**grauer Kreis**) auf drei Wegen erreichen: **(1)** Direkt von der Sonne als parallele Lichtstrahlen, **(2)** gestreut von Luftmolekülen (**schwarze Pfeile**), kurzwelliger als das Sonnenlicht und **(3)** gestreut von Luftmolekülen im 90°-Winkel zum Sonnenlicht. Das abgelenkte Licht ist im letzten Fall am stärksten polarisiert (**grüne Pfeile**).

Für Detektoren mit Polarisationsfilter äußern sich diese Unterschiede des Polarisierungswinkels als Helligkeitskontrast (Horváth & Varjú 2004). Somit geht mit der Fähigkeit die Polarisierung von Licht wahrzunehmen einher, den Sonnenstand auch bei bedecktem Himmel ermitteln zu können. Damit ist eine weitgehend wetterunabhängige heliozentrische Orientierung möglich. Einige landlebende Tiere, wie auch die Honigbiene (Frisch 1949) mit ihren rhabdomeren Facettenaugen, machen sich dies zu Nutze. Es gibt aber nicht nur landlebende Organismen, die die Polarisierung des Lichtes wahrnehmen können. Auch im Wasser finden sich Beispiele innerhalb der Vertebrata (Hawryshyn & McFarland 1987). Hier jedoch nicht nur für eine Orientierung am Polarisationsmuster des Himmels (Horváth & Varjú 1995), sondern vorwiegend, um Polarisationskontraste bei der Objekterkennung auszunutzen (Waterman 1954, Novalés-Flamarique & Hawryshyn 1997). Im weitgehend homogenen visuellen Umfeld des Freiwassers gibt es mitunter wenig optische Kontraste. Dieser Umstand wird von vielen aquatischen Organismen genutzt, um sich optisch zu tarnen: seien es durchsichtiges Plankton und Quallen oder Cephalopoden mit der Fähigkeit zur Farbanpassung (Denton & Land 1971), sowie Fische mit reflektierenden Schuppen (Denton & Nicol 1965) oder auch einfach nur Farb-Tarnung: blau in blau.

Das Licht unter Wasser ist in den oberen Wasserschichten nach dem gleichen Mechanismus wie das Sonnenlicht parallel polarisiert. Objekte, die sich zwischen dem Beobachter und der Wasseroberfläche befinden, absorbieren Licht, erscheinen also dunkel vor hellem Hintergrund. Bei Objekten, die sich in anderen Raumrichtungen befinden, kann ebenfalls der Absorptionskontrast eine Rolle spielen, oder es gibt mindestens eine Reflektion von der Oberfläche des Objekts. In diesem Fall ist auch bei geringem Helligkeits- oder Farbkontrast die Polarisierung des reflektierten Lichtes anders als die des Hintergrunds

(Jerlov 1968). Diese Informationen bieten einen deutlichen Vorteil, unabhängig davon, ob sie zur Erkennung von Beute oder von Fressfeinden dient (Fineran & Nicol 1978).

Physiologische Forschungen auf Basis dieser Annahme konnten bei einigen Teleostei-Gruppen (Kamerma & Hawryshyn 2011) Polarisationssehen nachweisen. Als Beispiele seien die Salmoniden (Hawryshyn et al. 1990) und die Cichliden (Davitz & McKaye 1978) genannt. Bei keiner der anderen Gruppen konnte jedoch ein so klarer Zusammenhang zwischen der Morphologie der Photorezeptoren und der Polarisationswahrnehmung hergestellt werden, wie bei den Engraulididae. Folgestudien konnten hochspezialisierte Zellverbände – die der Vielfachzapfenreihe – als Polarisationsdetektoren identifizieren (Fineran & Nicol 1976, Land 1991). Diese Zellgruppen bilden mit ihrem besonderen Aufbau und ihrer Anordnung einen Teil des sensitiven Gewebe des Auges: der Retina.

1.3 Auge und Retina

Das Laterallauge der Vertebrata (Abbildung 3) besteht zum Teil aus einer frühembryonalen Ausstülpung des Gehirns, welche die **Retina** und das **Pigmentepithel** bildet. Die restlichen Teile des Auges, wie **Linse** oder **Cornea**, werden durch eine Einstülpung des Ektoderms gebildet. Die Lederhaut des Auges, die **Sklera**, und die Augenmuskulatur sind mesodermalen Ursprungs.

1.3.1 Das Auge

Das Auge ist grundsätzlich ein Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Licht. Wahrgenommen wird dabei primär die Anzahl an Photonen, die die sensitiven Strukturen des Auges treffen – die Helligkeit des Lichtes. In den sensitiven Strukturen, den Photorezeptoren, wird die Anwesenheit eines Photons in einen elektrischen Reiz umgewandelt. Dies geschieht mit Hilfe von photosensitiven Proteinen, den Opsinen. Diese Opsine sind an ein Sehpigment, das Retinal, gekoppelt, das zusammen mit dem Opsin eine Empfindlichkeit für eine bestimmte Wellenlänge des Lichtes definiert. Durch die Energie, die ein Photon über das Sehpigment einbringt, ändert das Retinal seine Struktur. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, deren Ergebnis ein elektrischer Fluss an der Photorezeptorenmembran darstellt. Dieser nun elektrische Reiz wird dann über Signalstoffe an weitere Nervenzellen und letztendlich über den Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet. Dort werden dann komplexe Wahrnehmungsfähigkeiten wie Kontrast, Bewegung, Objekterkennung und Distanzen in den visuellen Zentren aus den kombinierten elektrischen Reizen mehrerer Photorezeptoren und Photorezeptoren-Gruppen errechnet.

Nicht Teil der Retina, aber dennoch essenziell, sind zum einen die **Sklera**, die stabilisierende und zähe Außenhaut des Auges und zum anderen die **Choroidea**, eine mit Blutgefäßen durchsetzte Gewebeschicht (Ali et al. 1968, Henkind et al. 1979), die unterhalb der Sklera liegt und für die Versorgung des Pigmentepithels mit Nährstoffen und Sauerstoff zuständig ist (Abbildung 3). Die Form des Auges wird durch den Glaskörper, den **Corpus vitreum**, aufrechterhalten. Dieses durchsichtige Gel füllt den Auginnenraum fast komplett aus (Remington 2012-a).

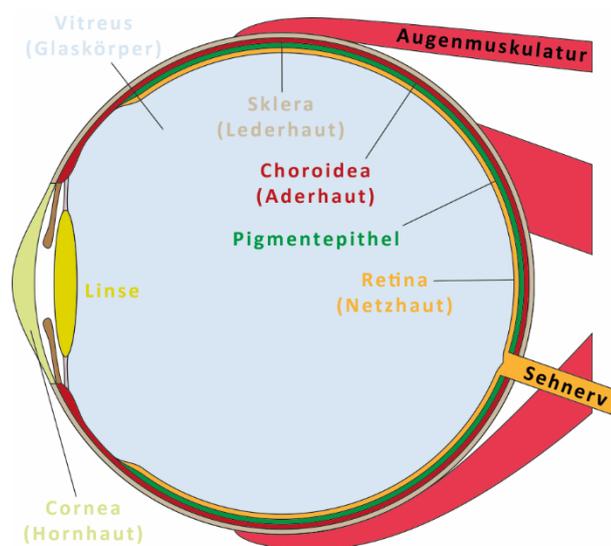


Abbildung 3: Grundsätzlicher Aufbau eines Auges am Beispiel eines landlebenden Vertebraten.

Die Sklera und der Glaskörper sind für die Orientierung innerhalb der Retina wichtige Referenzpunkte, so spricht man von **skleral** und **vitreal** (siehe auch Abbildung 5), um Raumrichtungen in der Retina zu beschreiben. Insofern nicht gesondert angegeben, ist skleral in dieser Arbeit bei allen Seitenansichten der Retina oder 3D-Darstellungen oben.

1.3.2 Die „äußere“ Retina

Eine genaue Kenntnis der retinalen Schichten und Strukturen auf histologischem und feinstrukturellem Beschreibungsniveau sind essenziell, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verstehen zu können.

Die Retina beginnt proximal mit dem direkt an die Choroidea anschließenden retinalen **Pigmentepithel** (Abbildung 5: I) (siehe z.B. Fineran & Nicol 1977), dem hinteren Teil der ehemaligen Augenblase. Namensgebend sind hierbei die eingelagerten Pigmente wie Melanin oder auch hochbrechende Kristallite aus Guanin. Dadurch erhält das Pigmentepithel Abschirmeigenschaften sowie gegebenenfalls Reflexionseigenschaften (Nicol et al. 2011). Beides hilft, die Lichtausbeute der anliegenden Photorezeptoren zu optimieren, beziehungsweise den Strahlenweg bis zuletzt fokussiert zu halten.

Darauf folgen distalwärts, dem Licht zugewandt, die **Außenglieder der Photorezeptoren** (Abbildung 5: II), die photoaktiven Anteile der Sinneszellen (Anderson & Fisher 1976). Die Photorezeptoren sind meist in mehr oder weniger geordneten Mustern vorzufinden (Lyll 1957), welche bereits Rückschlüsse auf die Qualitäten des Sehens – wie Sehschärfe, Lichtempfindlichkeit oder Kontrast-Mechanismen – zulassen können. Es folgen die Mitochondrien-reichen Ellipsoide („Innenglieder“) als „Kraftwerke“ der Sehzellen. An der Basis der Myoide der Photorezeptoren, knapp unterhalb der sensitiven äußeren Segmente, umschließen Ausläufer von Müllerzellen die Photorezeptoren und bilden die **äußere Grenzmembran** (Abbildung 5: III, outer limiting membrane) (Behar-Cohen et al. 2010). Diese komplexe Verbindungsstelle (*junction complex*) versorgt, wie alle Müllerzellen der Retina, die aktiven Teile der Photorezeptoren mit Nährstoffen und isoliert diese zudem möglicherweise elektrisch von den Nachbarzellen und der darunter vorkommenden Signalweiterleitung (Newman 1988). Wie alle Gliazellen, dienen sie als Stützstrukturen der Retina (Kirschfeld 2019). Zudem unterteilt die äußere Grenzmembran die Retina in einen **äußeren Bereich** und einen **inneren Bereich**.

Damit bildet alles zwischen der Choroidea beziehungsweise der Basallamina des retinalen Pigmentepithels und der äußeren Grenzmembran die sogenannte „äußere Retina“. Sie ist zusammengesetzt aus dem Pigmentepithel, sowie den Außen- und Innengliedern der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren. Der Spaltraum zwischen diesen Geweben entspricht dem Ventrikel des ehemaligen Augenbläschens. Die äußere Retina und ihre Struktur sind bei vielen Wirbeltierarten lichtmikroskopisch und teils elektronenmikroskopisch bereits gut untersucht. Entsprechend gibt es fundierte Kenntnisse über die Anordnung und Muster der verschiedenen Photorezeptortypen (Ali & Anttil 1968), Stäbchen wie Zapfen (Wagner 1976), und des Pigmentepithels (Ali & Ryder 1977).

Bereits innerhalb einer taxonomischen Gruppe, wie zum Beispiel der Clupeiformes, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Anordnung der Photorezeptoren (Heß et al. 2006). Diese sind, für eine gleichmäßige Wahrnehmungsqualität, in Reihen und Spalten – sogenannten Photorezeptormustern – angeordnet (Engström & Ahlbert 1963). Auch innerhalb der Retina einer Art gibt es unterschiedliche Anordnungen, Verteilungen und Dichten verschiedener Photorezeptortypen (Heß 2009).

Bei Fischen ist diese heterogene Verteilung innerhalb der Retina stark ausgeprägt (Engström 1960). Das hat damit zu tun, dass Fischaugen seitlich am Fischkopf angeordnet sind und damit oft eine fast komplette Rundumsicht zulassen. Dabei ist die Überlappung der Sehfelder der beiden Augen gering. Dies führt zu äußerst unterschiedlichen Ansprüchen an das Sehen in den verschiedenen Blickrichtungen des Auges, insbesondere der dorsalen Retina oder der ventralen Retina (Abbildung 4).

Die dorsale Retina empfängt Lichtinformationen von der Umwelt der ventralen Seite des Fisches, also aus den lichtschwächeren tiefen Wasserschichten. Die ventrale Retina empfängt Lichtinformationen von der dorsalen Seite der Umwelt des Fisches, das heißt von der Wasseroberfläche. Von dort kommt wesentlich mehr Licht, sodass eventuell sogar Farbsehen möglich und sinnvoll ist. Damit müssen die verschiedenen Bereiche sehr unterschiedliche Licht- und Kontrastverhältnisse abbilden können. Ähnlich unterschiedlich sind die Aufgaben, die den anderen Sehrichtungen zufallen (Collin & Pettigrew 1988-a, 1988-b): Frontal die Beuteerkennung, dorsal und ventral die Fressfeinderkennung, beide womöglich in Farbe und Helligkeit getarnt. Lateral steht neben der Feinderkennung die intraspezifische Erkennung und Kommunikation im Vordergrund.

Diese verschiedenen Ansprüche an die Fischretina zeigen sich deutlich in den Dichteverteilungen der Photorezeptoren der Retina von *Engraulis encrasicolus* (Heß 2009, Koch et al. 2010). Die größte Dichte an Photorezeptoren, die „Area“, befindet sich im ventrotemporalen Bereich der Retina, direkt unterhalb der optischen Furche (Ora serrata). Dieser entspricht der Blickrichtung nach vorne und oben und enthält die mit dem Polarisationssehen bei der Sardelle in Zusammenhang gebrachten Vielfachzapfenreihen in besonders klarer Ausprägung.

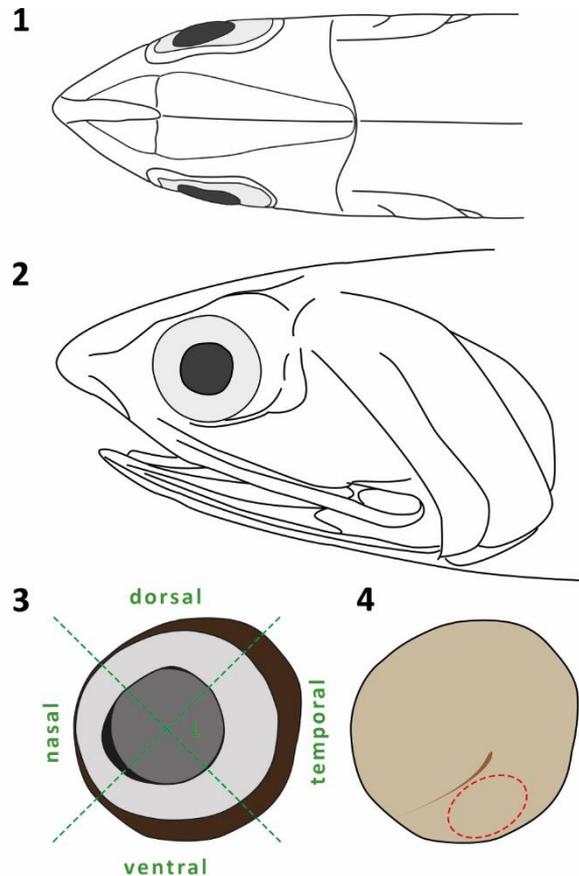


Abbildung 4: Das Auge von *Engraulis encrasicolus*. Kopf der europäischen Sardelle mit den weit frontal und seitlich liegenden Augen von dorsal (1) und von lateral (2). (3) Vergrößerte Ansicht des Auges in derselben Orientierung wie in (2). Die Linse (L) liegt zentral im Auge und die vier Sehquadranten nasal, dorsal, temporal und ventral sind eingezeichnet. (4) zeigt den Augenhintergrund – die Retina – in der selben Orientierung. Ventral der Mitte liegt der längliche blinde Fleck der Sardelle. Ventrotemporal dazu liegt die „Area“ (roter Kreis) mit der höchsten Dichte an Photorezeptoren (Zapfen).

1.3.3 Die „innere“ Retina

Direkt an die äußere Retina schließt sich vitreal die sogenannte „innere“ Retina mit der **äußeren nukleären Schicht** (Abbildung 5: IV, outer nuclear layer) an. Hierbei handelt es sich um die Zellkerne der Photorezeptoren, die in mehreren Schichten übereinanderliegen (Haesendonck & Missotten 1938-a, Wässle & Boycott 1991).

Vitreal dazu liegt die **äußere plexiforme Schicht** (Abbildung 5: V, outer plexiform layer). Hier sind die Axone der Photorezeptoren an ihren vitrealen Enden über sogenannte (End-) **Terminalen** oder **Pedicles** (Sjöstrand 1958) synaptisch mit den nachfolgenden Sekundärneuronen verbunden (Scholes 1975). Hier gibt es sowohl konvergente, wie auch divergente Verschaltungsmuster (Haesendonck & Missotten 1979, 1984). Grundsätzlich kann man sagen, dass verschiedene Zapfentypen spektral unterschiedliche Erkennungspfade für Kontrastinformationen in der inneren Retina repräsentieren (Chatterjee & Callaway 2003). In manchen Fällen stehen die Terminalen über sogenannte Telo-

dendriten miteinander in Kontakt. Die Zelltypen, die in der äußeren plexiformen Schicht mit Dendriten die elektrischen Informationen „abholen“, sind **Bipolar- und Horizontalzellen**. Während die Horizontalzellen hauptsächlich verschiedene Photorezeptoren lateral miteinander verbinden (z.B. Kolb 1970), leiten die Bipolarzellen die Informationen nach vitreal (Boycott & Wässle 1991) und damit in Richtung des zentralen Nervensystems. Üblicherweise findet der Kontakt zwischen Photorezeptor und Sekundärneuronen in Form einer „Triade“ statt. Ein synaptisches Band (**ribbon**) in der Terminalen wird dabei von Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen flankiert. Bei den sogenannten Bändern handelt es sich um flache, längliche und elektronendichte Strukturen nebst Ansammlungen von präsynaptischen Botenstoffen, die in vielen sensorischen Nervenzellen für optische und akustische Wahrnehmung zu finden sind (Lagnado 2003). So sind sie auch in den Terminalen der retinalen Neurone von *E. encrasicolus* vorhanden (Witkovsky & Stell 1973, Heß et al. 2002).

Vitreal dazu liegen die Zellkörper der **Horizontalzellen (Abbildung 5: VI)** (Typ H1 und H2) als oberster Teil der **inneren nukleären Schicht** (inner nuclear layer). Diese Sekundärneurone verbinden verschiedene Photorezeptortypen miteinander (Stell 1967). Sie bilden damit die erste Verrechnungsebene für Kontrastbildungen. So werden zum Beispiel um einen Photorezeptor herum alle anliegenden Photorezeptoren gehemmt. Dadurch wird das Signal dieses einen Photorezeptors passiv verstärkt (Kramer & Davenport 2015) nach dem Prinzip der lateralen Inhibition. Diese relativ großen Zellen liegen parallel zur Retinaschichtung flach (Stell 1975) zwischen den Dendritenarmen der Bipolarzellen, die auf dieser Höhe zu Bündeln zusammengefasst sind.

Darauf folgt dann (bei verschiedenen Teleostei-Arten) ein **Doppelband aus Müllerzellen (Abbildung 5: VII)**, durch das die Dendriten der Bipolarzellen in Bündeln hindurchführen. Hierbei handelt es sich um eine flächige zweilagige Isolationsschicht, möglicherweise um den elektrisch aktiven Bereich der Photorezeptoren und den Verschaltungshorizont der äußeren plexiformen Schicht vom Rest der Retina zu trennen. In der vorhergehenden „Seitenansicht“, in der die Retina untersucht wird, erscheint diese Doppelschicht als Bänder (siehe auch Abbildung 44), zwischen den beiden Bändern liegen die H3-Zellen.

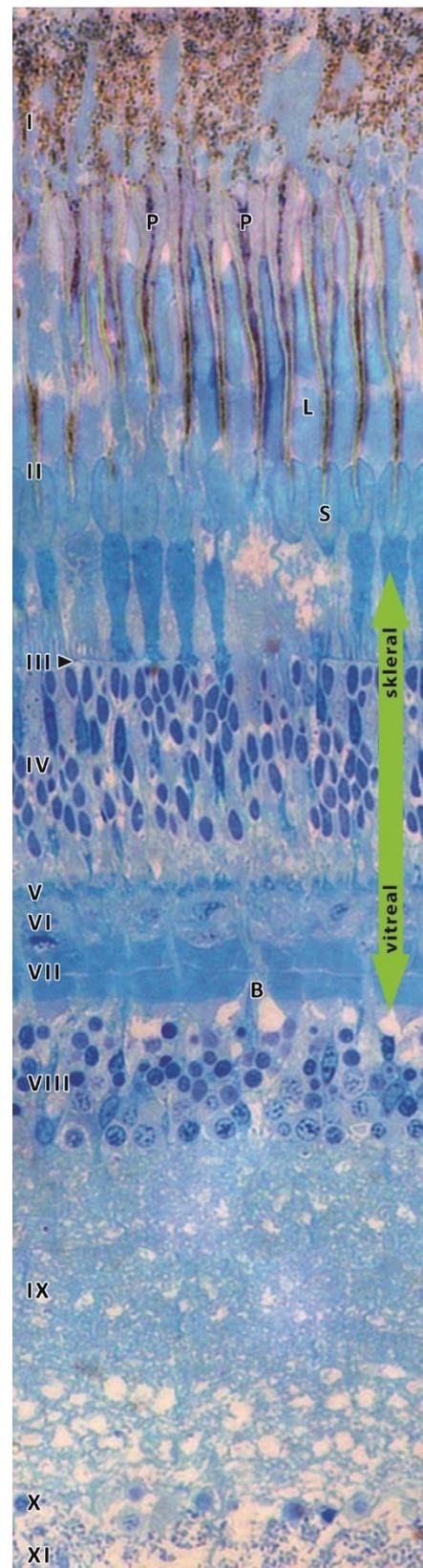


Abbildung 5: Aufbau und Schichtung der Retina am Beispiel von *Engraulis encrasicolus*. (I) Pigmentepithel, mit den Pigmentepithelkeilen (P), (II) Außenglieder der Photorezeptoren mit den langen (L) und kurzen (S) Zapfen, (III) äußere Grenzmembran, (IV) äußere nukleäre Schicht (Zellkerne der Photorezeptoren), (V) äußere plexiforme Schicht (Verschaltung Photorezeptoren zu Sekundärneuronen), (VI) Horizontalzellschicht, (VII) Doppelband aus Müllerzellen (Isolationsschicht) mit den Dendritenbündeln der Bipolarzellen (B), (VIII) innere nukleäre Schicht (Zellkerne der Sekundärneuronen), (IX) innere plexiforme Schicht (Verschaltung Sekundärneurone untereinander und zu Ganglienzellen), (X) Ganglienzellschicht, (XI) Axone der Ganglienzellschicht, führen auf der Innenseite der Retina zum Sehnerv und über diesen zum zentralen Nervensystem.

Darunter befindet sich der Hauptteil der **inneren nukleären Schicht** (Abbildung 5: **VIII**, inner nuclear layer), in der sich die Axonterminalen der H1-Zellen (ganz skleral) und vor allem die Zellkörper aller Bipolarzellen befinden. Diese Schicht ist mehrere Zellschichten dick. Im vitrealen Drittel der inneren nukleären Schicht befinden sich zudem die Zellkerne von Amakrinzellen (Haesendonck & Missotten 1987). Die Amakrinzellen verbinden die Bipolarzellen auf Höhe der inneren plexiformen Schicht untereinander und modulieren deren Aktivität (Polyak 1941).

Vitreal dazu liegt die **innere plexiforme Schicht** (Abbildung 5: **IX**, inner plexiform layer). In mehreren Verschaltungshorizonten kontaktieren die Bipolarzellen die Dendriten von Ganglienzellen (Kolb 1979). Zusätzlich bilden die Axone und Dendriten der Amakrinzellen Verbindungen und Synapsen zu jeweils mehreren Bipolarzellen aus (Tomita 1986). Dieses komplexe und unübersichtliche Netzwerk ist eine signifikante Verschaltungsebene für die Verarbeitung von visuellen Informationen. Aspekte wie Schärfe, Kantenkontrast, Farbinformation, Lichtpolarisierung und vieles mehr werden eventuell bereits hier moduliert und optimiert (Remington 2012-b), bevor die Informationen das Auge verlassen.

Die Ordnung und Verschaltungsregeln der inneren plexiformen Schicht, wie schon in der äußeren plexiformen Schicht, zu kennen und zu verstehen, ist für ein umfassendes Verständnis der Retina unabdinglich. Hier Vorarbeit zu leisten und erste Erkenntnisse zu erlangen, ist ein primäres Ziel dieser Arbeit.

An die innere plexiforme Schicht schließt sich die meist einschichtige **Ganglienzellschicht** (Abbildung 5: **X**, ganglion cell layer) an. Mit nach skleral führenden Dendriten werden die Terminalen der Bipolarzellen kontaktiert (Dowling & Boycott 1966). Die von den Ganglienzellen **ausgehenden Axone** verlaufen in der am weitesten vitreal gelegenen Schicht der Retina, der Ganglienfaserschicht (Abbildung 5: **XI**), in Richtung des Nervendurchtritts und bündeln sich dort zum Sehnerv (Goebel et al. 2012). Dieser leitet die in elektrische Signale umgewandelten Sehinformationen zu den höheren Verschaltungszentren weiter (Remington 2012-c, Sieber 2018). Die ersten elektrophysiologischen Nachweise für eine intraretinale Modulation der elektrischen Signale wurden anhand der Ganglienzellen entdeckt (Hartline 1938).

1.3.4 Die Retina der Teleostei

Bei den Knochenfischen (Teleostei) finden sich, wie bei allen Vertebrata, zwei Typen von Photorezeptoren. Deswegen spricht man von einer **Duplexretina**. Dabei handelt es sich um sogenannte **Stäbchen** (rods) und **Zapfen** (cones). Stäbchen haben längliche Außensegmente und funktionieren bereits bei niedrigen Lichtintensitäten wie bei Dämmerungslicht oder nachts und bieten ein monochromes Lichtsehen. Bei schwachen Lichtverhältnissen sind sie die dominanten optischen Detektoren. Das Opsin ist bei den Stäbchen in Membranscheiben eingelagert. Die Zapfen sind deutlich kürzer und breiter in ihren Außensegmenten und benötigen vergleichsweise hohe Lichtintensitäten. Ihre lichtsensitiven Membranfalten stehen in der Regel senkrecht zum einfallenden Licht. Die Zapfen sind zumeist für die Wahrnehmungen von Farben zuständig (Gouras 1968). Die spezifische Wellenlänge der Zapfen hängt vom Sehpigment ab, mit denen das Opsin assoziiert ist (Archer 1995). Diese Opsine liegen bei den Zapfen in Membraneinfaltungen (Lamellen) vor, was eine große morphologische Variabilität ermöglicht und eine Reihe von morphologischen Spezialisierungen.

In der Retina gibt es meist mehrere Zapfen-Photorezeptortypen mit Aktivierungspräferenzen für verschiedene Wellenlängen (Kondrashev et al. 2012). Um ein höher aufgelöstes Farbsehen über ein größeres Farbspektrum hinweg zu ermöglichen, müssen mehrere Zapfentypen mit unterschiedlichen Anregungsspektren in halbwegs geordneten Mustern vorliegen (Engstöm 1960). Diese Zapfenmuster der äußeren Retina sind bei vielen Knochenfischen zu finden. Die speziesspezifischen Muster weisen dabei eine hohe geometrische Ordnung auf. Zapfenförmige Photorezeptoren sind zudem immer

wieder in Form von „Komplexzapfen“ vorzufinden. Diese bestehen aus mehreren Einzelementen wie zum Beispiel Doppelzapfen (Marchiafava 1985), Dreifachzapfen (Collins & MacNichol 1979) oder Vielfachzapfen (Fineran & Nicol 1976, 1978, Heß 2009).

1.3.5 Die Retina von *Engraulis encrasicolus*

Die Retina der europäischen Sardelle (*Engraulis encrasicolus*) ist, unter anderem, mit zwei fest assoziierten Zapfentypen mit orthogonal zueinander ausgerichteten Sensitivitäten ausgestattet, die mit der Wahrnehmung von Polarisationskontrasten in Verbindung gebracht werden (Novales-Flamarique & Hawryshyn 1998). Zudem finden sich vor allem in den peripheren Retinabereichen Dreifachzapfen für bichromatisches Sehen (Zueva & Govardovskii 1991).

Die beiden für die Detektion von Polarisationskontrast zuständigen Zapfentypen sind abwechselnd zueinander in Reihen angeordnet. Jede Reihe bildet – durch eine enge Verschränkung der beiden Zapfentypen – einen **Vielfachzapfen** (Abbildung 6.1) (O’Connell 1963 ging noch von Doppelzapfen aus).

Viele dieser Vielfachzapfenreihen liegen in der Retina nebeneinander, jeweils mit einem Zapfen Versatz. Unterschieden werden in den Reihen „kurze Zapfen“ (short cones = SC) und „lange Zapfen“ (long cones = LC) (siehe auch Abbildung 5). Die Detektionsmembranen der langen Zapfen sind 90° zur Vielfachzapfenreihe ausgerichtet, die kurzen Zapfen hingegen weisen eine Ausrichtung der Detektionsmembranen parallel zur Vielfachzapfen-Reihe auf (Abbildung 6.2) (Heß 2000). Damit ist die Voraussetzung der senkrecht zueinander stehenden e-Vektoren für eine Detektion der Lichtpolarisation erfüllt. Zudem weisen die Pigmente und Kristallite der Pigmentzellen eine hochgradig gegliederte Anordnung auf (Heß 2000, Heß et al. 2006).

Ein erster Schritt dahin, Erkenntnisse über die dieser Wahrnehmung zugrunde liegenden neuronalen Netzwerke und deren Organisation zu erlangen, ist es, die Verschaltungen in der äußeren plexiformen Schicht zu entwirren. Dies ist in dieser Arbeit angegangen worden, indem die Feinstruktur und 3D-Morphologie der Zapfenterminalen der Sardelle mittels dreidimensionaler Bilderstapel mit elektronenmikroskopischer Auflösung dargestellt und beschrieben wurde. Dabei finden die horizontalen Muster, radiären Schichtungen, Zahl und Anordnung der präsynaptischen Bänder und nicht zuletzt die interterminalen Kontakte Beachtung.

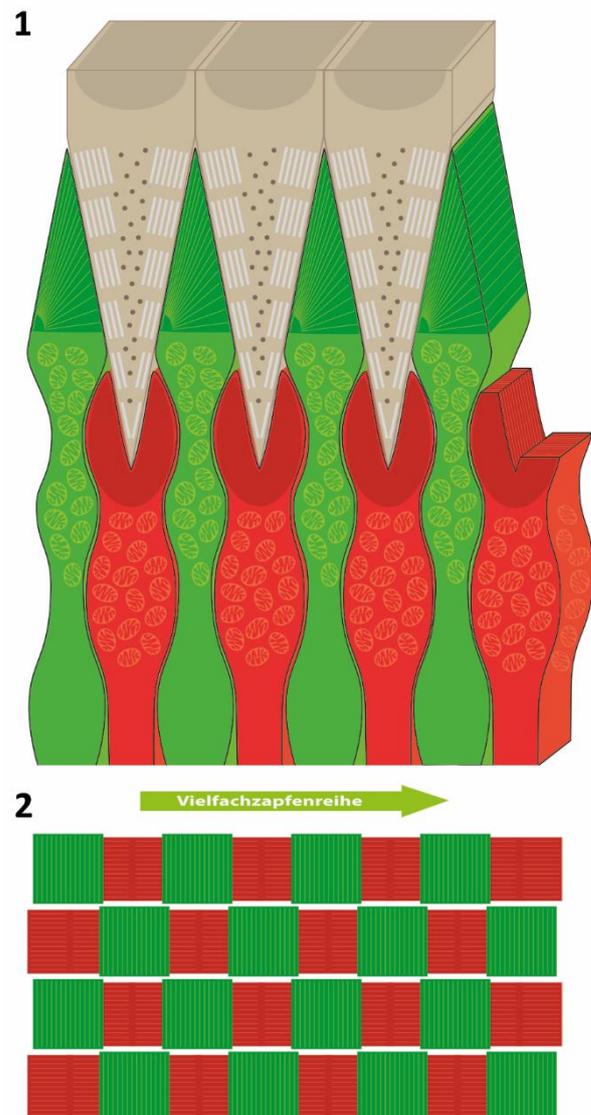


Abbildung 6: Schema der Vielfachzapfenreihen (nach Heß 2000). **(1)** Anordnung der Außensegmente einer Vielfachzapfenreihe in einer Seitenansicht. Skleral ist oben, vitreal unten. Die langen Zapfen sind in **grün** dargestellt, die kurzen Zapfen in **Rot**, die Keile des Pigmentepithels in **braun** (Nach Heß 2000). Zu erkennen sind die orthogonal zueinander angeordneten sensitiven Membranen am skleralen Ende der Photorezeptoren. **(2)** Ausrichtung der sensitiven Membranen der Photorezeptoren mehrerer Vielfachzapfenreihen in einer Aufsicht.

1.4 Warum 3D-EM?

Nur mit elektronenmikroskopische Auflösungen besteht die Möglichkeit die Zellmorphologie der retinalen Neurone bis in ihre feinsten Dendriten (etwa 20 nm im Durchmesser) verfolgen zu können. Da unter anderem das komplexe und feinverzweigte Netzwerk der äußeren plexiformen Schicht im Fokus dieser Arbeit liegt, führte kein Weg an der **dreidimensionalen Elektronenmikroskopie (3D-EM)** vorbei.

Die 3D-Elektronenmikroskopie eröffnet vor allem die Möglichkeit, durch Segmentierung der 3D-EM-Daten dreidimensionale Modelle der Strukturen zu erstellen. Das ermöglicht nicht nur das freie Drehen und Skalieren der Zell-Modelle, sondern auch das Ein- und Ausblenden aller Strukturen.

Ein großer Vorteil der, durch die 3D-EM vollständigen Erfassung aller drei Raumachsen einer Probe ist die Möglichkeit, alle räumlichen Zusammenhänge eines ursprünglich natürlicherweise dreidimensionalen Objektes visualisieren zu können. Es hat sich herausgestellt, dass durch eine dreidimensionale Betrachtung von Zellen und Geweben oft Sachverhalte erschlossen werden können, die sonst nicht wahrgenommen werden könnten (Ware & Lopresti 1975). Zweidimensionale Bilder ermöglichen bereits viele Aussagen über Strukturen und deren Verflechtung. Doch es ist immer nur ein Betrachtungswinkel beziehungsweise eine Schnittebene, die dabei genutzt werden kann. Eine Bilderserie, die aus allen drei Raumrichtungen betrachtet werden kann, hat einen vielfachen Informationsgehalt und erheblich erweiterte Freiheitsgrade in der Darstellung und Strukturanalyse.

Letztendlich entspricht eine dreidimensionale Darstellung am ehesten dem normalen Seherlebnis des Menschen. Komplexe Sachverhalte können so natürlicher aufgenommen werden und sind oft verständlicher und greifbarer. Sei es in Form von interaktiven 3D-Modellen in digitalen Publikationen (Ruthensteiner & Heß 2008) oder als physikalische Modelle (siehe dazu „Erstellung von dreidimensionalen Papiermodellen“ Seite 150).

1.5 Elektronenmikroskopische Verfahren und Kombinationen

Für diese Arbeit wurde eine Kombinationsmethodik aus zwei 3D-EM-Verfahren (Briggmann & Bock 2012) gewählt, um die Vorteile beider Ansätze zu nutzen, und den Informationserhalt pro Probe zu maximieren. Warum ein derart komplexer und zeitaufwendiger Ansatz? Lückenlose Ultradünnschnittserien sind ein Muss für 3D-Rekonstruktionen auf nm-Niveau. Dies gilt umso mehr, wenn bei den hochkomplex verflochtenen Strukturen eines Nervennetzes einerseits Neuriten-Erstreckungen von $\pm 100 \mu\text{m}$ und andererseits Neuriten-Durchmesser und synaptische Feinstrukturen von wenigen Nanometern abgebildet werden sollen.

Die Grundlagen aller verwendeter elektronenmikroskopischer Verfahren (Zandbergen 1997) soll hier kurz vorgestellt werden, um die Hintergründe der Methodenkombination zu beleuchten.

1.5.1 TEM – Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der **Transmissionselektronenmikroskopie** (Abbildung 7.1) werden Elektronen mit magnetischen Linsen, in einer Weitfeld-Beleuchtung, auf eine Probe gelenkt und das „Verhalten“ der Elektronen nach dem Durchtritt durch die Probe mit einer elektronenempfindlichen CCD-Kamera gemessen. Hierfür hat die Kamera eine Phosphorschicht, die beim Auftreffen der Elektronen Photonen erzeugt (Lindemann 2018). Dies folgt optisch demselben Prinzip wie bei einem Durchlichtmikroskop, nur dass hierbei beschleunigte Elektronen (zum Beispiel 80 kV) mit vergleichsweise kurzen Wellenlängen verwendet werden.

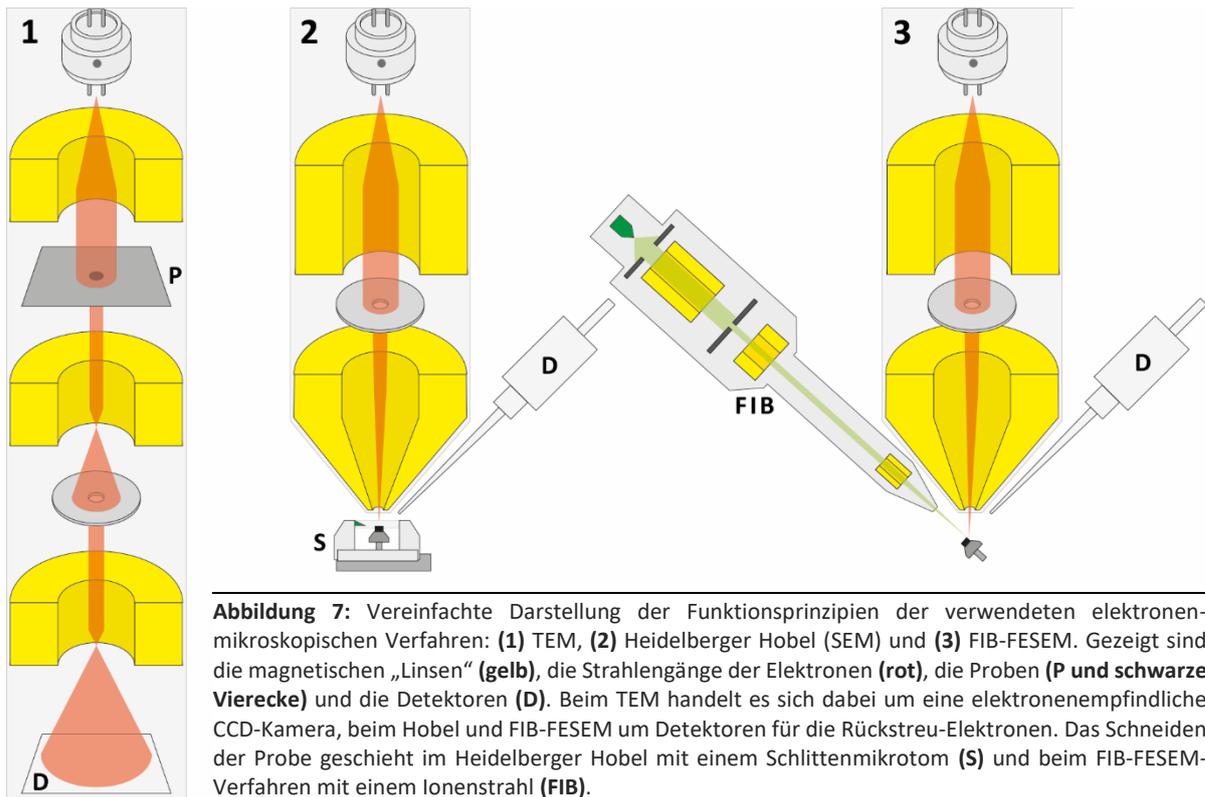


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Funktionsprinzipien der verwendeten elektronenmikroskopischen Verfahren: **(1)** TEM, **(2)** Heidelberger Hobel (SEM) und **(3)** FIB-FESEM. Gezeigt sind die magnetischen „Linsen“ (gelb), die Strahlengänge der Elektronen (rot), die Proben (**P** und schwarze Vierecke) und die Detektoren (**D**). Beim TEM handelt es sich dabei um eine elektronenempfindliche CCD-Kamera, beim Hobel und FIB-FESEM um Detektoren für die Rückstreu-Elektronen. Das Schneiden der Probe geschieht im Heidelberger Hobel mit einem Schlittenmikrotom (**S**) und beim FIB-FESEM-Verfahren mit einem Ionenstrahl (**FIB**).

Die Transmissionselektronenmikroskopie erlaubt in der biologischen Praxis sehr hohe Auflösungen von bis zu 1 nm/px. Dafür werden Schnitte von 50 nm bis 70 nm angefertigt (Harris et al. 2006, Bock et al. 2011, Lee et al. 2016), sowie für die Elektronenmikroskopie angepasste Kontrastierungen benötigt. Dafür am besten geeignet sind Schwermetallkontrastierungen, die sich an die Lipide und Proteine im Gewebe binden. Da alle Zellmembranen und Organellmembranen primär aus Lipiden bestehen, kann so ein großer Teil der zellulären Strukturen auch im Elektronenstrahl sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit ist eine Dreifachkontrastierung mit Osmiumtetroxid und danach mit Bleicitrat und Uranylacetat das Standardprotokoll für die Transmissionselektronenmikroskopie. Dabei findet die Kontrastierung mit Osmiumtetroxid so schnell wie möglich nach Probenentnahme statt. Neben einer Anlagerung des Osmiums an die fettreichen Strukturen findet über das Tetroxid nach dem Glutaraldehyd eine weitere Fixierung der Probe statt, da die Sauerstoffgruppen eine Quervernetzung der Makromoleküle des Gewebes herbeiführen. Dadurch werden die Gewebe kontrastiert und vorfixiert, die Probe selbst wird dadurch allerdings sehr spröde. Als Nebeneffekt ist die Kontrastierung mit Osmium auch lichtmikroskopisch sichtbar, und bildet genug Kontrast für die Darstellung von Semidünnschnitten im Lichtmikroskop.

Der aufwendigste Schritt bei der TEM-Bildgebung ist das Ein- und Ausschleusen der Proben in die Vakuumkammer des Mikroskops. Dies liegt unter anderem auch daran, dass das für die Messungen notwendige, Hochvakuum nach jedem Schleusenvorgang neu hergestellt werden muss.

Für die Aufnahme großer Flächen, wie sie in dieser Arbeit benötigt werden, gibt es bei der TEM grundsätzlich zwei Optionen:

- a) Die detektierende Kamera hat einen Chip mit ausreichender Pixelzahl, um bei der gewünschten Pixelgröße die gewünschte Fläche abzubilden (z.B. Gatan OneView).
- b) Es müssen mehrere, an den Rändern überlappende Einzelbilder aufgenommen werden, sogenannte *multi image arrays*, die danach passend aneinandergelagt werden. Diesen Prozess bezeichnet man als „Stitchen“.

Auch wenn jede Aufnahme mit einem TEM den beobachteten Schnitt belastet, so kann ein Schnitt mehrfach bestrahlt und fotografiert werden. Auch die Größe der gewählten Abbildungsfläche spielt eine Rolle – es empfiehlt sich, immer zuerst die Übersichtsaufnahme zu machen (bei gleichmäßiger „Beleuchtung“ einer großen Fläche) und danach Detailaufnahmen bei einer höheren Flächendosis.

Wird mit der Transmissionselektronenmikroskopie eine Serie von hintereinanderliegenden Schnitten abgebildet, spricht man von **serial sectioning Transmissionselektronenmikroskopie** oder **ssTEM** (Stevens et al. 1980).

1.5.2 REM – Rasterelektronenmikroskopie

Bei der **Rasterelektronenmikroskopie** (die englische Abkürzung **SEM**: „*scanning electron microscopy*“ wird im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet, da die Methodik-Bezeichnungen ausschließlich englisch sind) wird die Probe mit einem gerichteten fokussierten Elektronenstrahl abgetastet. Detektiert werden hierbei im Standardfall aus der metallbeschichteten Probenoberfläche herausgeschlagene niederenergetische Elektronen – sogenannte „*secondary electrons*“. Das SEM-Verfahren findet hauptsächlich Anwendung, um dreidimensionale Oberflächen darzustellen (zum Beispiel die komplex geformte Oberfläche einer Insektencuticula), mit dem Effekt einer schrägen Beleuchtung, die aber von einer schrägen Detektion herrührt. Die Auflösung ist, mit circa 5 nm/px, nicht so hoch wie bei der TEM.

Da der ursprüngliche Elektronenstrahl auch in die Proben selbst eindringen kann, ist es möglich, bei ausreichender Schwermetallkontrastierung Informationen über die Gewebezusammensetzung zu erhalten (über Rückstreuелеktronen „*backscatter electrons*“). So kann man in bestimmten Fällen die arbeitsaufwändige und verlustreiche Erstellung von Ultradünnschnitten umgehen. Für die Erstellung eines Bilderstapels im Sinne einer optischen Schnittserie reicht die Eindringtiefe des Elektronenstrahls jedoch nicht. Um tiefere Schichten sehen zu können, muss eine dünne Schicht abgetragen werden, bevor ein neuer Scan durchgeführt wird. Dies würde bei der klassischen SEM ein beständiges Entfernen der Probe aus dem Vakuum des Mikroskops mit erneutem Einspannen in ein Mikrotom, dann Abtragen der obersten Schicht gefolgt von einem wiederholten Einbringen in das Vakuum des SEM bedeuten. Dies würde enorme Zeitkontingente in Anspruch nehmen und im absoluten Reinraum stattfinden müssen, um Verunreinigungen der Probe zu vermeiden. Jedes Mal müsste man am Ultramikrotom wieder Messer und Probe aneinander annähern, und jedes Mal müsste der erste Schnitt perfekt passen, damit keine Schnitte und damit wertvolle Informationen verloren gehen und man eine konstante Schnittdicke für die 3D-Rekonstruktion erhält. Alles im allem ist dieser Ansatz nicht praktikabel.

Die Lösung für dieses Problem ist das **SBFS**, das **Serial Block Face Scanning** (siehe Kapitel 1.5.3 und 1.5.4) (manchmal auch SBFSEM oder SBEM, *Serial Bloc-Face Electron Microscopy*). Hierbei wird die jeweils oberste Schicht der Probe im Vakuum des SEM abgetragen und verworfen und es kann direkt das nächste Bild der soliden Blockoberfläche, anstelle der empfindlichen Schnitte, aufgenommen werden (Leighton 1981). Die Vorteile sind vor allem, dass die Probe und die Bedingungen konstant gehalten werden. Damit sind die Bildparameter und die Orientierung der einzelnen Bilder der Serie zueinander quasi unverändert. Dies führt zu homogenen und hochgradig registrierten Bilderstapeln (Kubota 2016).

Der Kunstharzblock, in den die Probe für den Schneideprozess eingegossen wird, ist im Vergleich zu Ultradünnschnitten (siehe Kapitel 1.5.1) thermisch stabil. Dadurch kann er mit dem SEM-Verfahren großflächig und vor allem ohne strukturelle Verzerrungen abgetastet werden (Denk & Horstmann 2004). Elektronenoptische Verzerrungen durch den Elektronenstrahl sind dabei konstant und können

gegebenenfalls automatisiert herausgerechnet werden (Preibisch et al. 2009). Zwei Varianten des Serial Block Face Scanning stehen zur Verfügung: **Heidelberger Hobel** und **FIB-FESEM**.

1.5.3 Automatisiertes Schneiden mit Diamantmesser – „Heidelberger Hobel“

Beim sogenannten „**Heidelberger Hobel**“ oder „Denk-Hobel“ (Abbildung 7.2) handelt es sich um ein spezialisiertes Schlittenmikrotom (Denk & Horstmann 2004). Die Probe wird in den Probenhalter eingespannt und zusammen mit dem Mikrotom in die Vakuumkammer des REM eingebracht.

Dadurch, dass die abgeschnittenen Teile nicht mehr aufgefangen, auf Grids aufgebracht, kontrastiert und wieder ins Mikroskop eingebracht werden müssen, können die Schnittdicken, und damit die Voxelgröße entlang der z-Achse, geringer ausfallen als beim TEM-Verfahren. Voxel bezeichnet die dreidimensionale Variante von Pixeln. Sind sie isometrisch, also in jeder Raumrichtung gleich groß, sind sie für eine 3D-Rekonstruktionen der Bilddaten ideal. Für die erreichbaren Voxel-Größen gibt es jedoch eine praktische Untergrenze. Werden zu kleine Schnittdicken eingestellt, rutscht das Messer ohne zu schneiden über die Oberfläche des Kunstharzblocks. Neben möglichen Oberflächenschäden fällt der nächste Schnitt dann dementsprechend dicker aus. Dadurch können am Rand des Blockes Stücke herausgebrochen werden bis – im Extremfall – zum Abbrechen der Probe vom Probenhalter. Dies limitiert die Schnittdicke auf etwa 30 nm (Stand 2015). Bei dieser Dicke kann zuverlässig geschnitten werden und es sind mit den aktuellen Systemen lange Schnittserien mit mehr als 1000 Ebenen möglich. Die mögliche Auflösung der Bildpunkte (bis zu 10 x 10 nm sind machbar) hängt von der Pixelzahl des Detektors und von der Größe des gescannten Bereiche, sowie von der Probenqualität und der verwendeten Elektronenoptik ab.

Die große Stärke des Heidelberger Hobels ist die Möglichkeit mit *multi image arrays*, mit elektronenmikroskopischen Vergrößerungen, große Flächen pro Ebene abzubilden und dabei intern verzerrungsfreie Bilderstapel zu erhalten.

1.5.4 Automatisiertes Schneiden mit Ionenstrahl – „FIB-FESEM“

Einen ähnlichen Ansatz des Schneidens der Probe im Elektronenmikroskop verfolgt das **Focused Ion Beam Field Emission Scanning Electron Microscope**, kurz **FIB-FESEM** (Abbildung 7.3) (Gnauck et al. 2002). Hierbei wird die Probe nicht mit einem Messer geschnitten, sondern mit einem fokussierten Ionenstrahl (Focused Ion Beam, FIB) aus einer Gallium-Quelle (Knott et al. 2008) die oberste Schicht verdampft. Da es nicht mehr zu einem physikalischen Kontakt zwischen dem Schneideinstrument und der Probe kommt, fallen viele messerbezogene Faktoren weg, die beim oben genannten „Hobel“ die Schnittdicke limitieren. So können mit dem Ionenstrahl Schnittdicken von 3 nm erreicht werden (Knott et al. 2011, Luckner & Wanner 2018). Dies funktioniert allerdings nur über kleinere Bildserien, mit etwa 100 bis 200 Schnitten. Stabile Schnittdicken zwischen 8 und 12 nm und damit isometrische Voxel sind jedoch auch mit langen Serien umsetzbar.

Die Eigenschaften des Ionenstrahls und das Volumen, beziehungsweise die Form der Probe können durch Temperaturänderungen variieren. Das führt vor allem bei längeren Scanserien dazu, dass sich die Ausrichtung der einzelnen Komponenten im nm-Bereich verschiebt. Dies äußert sich konkret dadurch, dass der Ionenstrahl die Probe nicht mehr – oder auch viel zu tief – verdampft, da sich die Position des Probenblocks minimal verändert hat. Eine andere Möglichkeit ist, dass der scannende Elektronenstrahl aus dem Fokus gerät und die detektierten Bilder dadurch unscharf werden. Um diese Probleme zu verhindern, ist es – neben konstanter Kontrolle der entstehenden Bilder – sinnvoll, keine zu hohen Auflösungen (weniger als 8 nm/px) für längere Serien zu verwenden.

Im Unterschied zum Heidelberger Hobel war das zur Verfügung stehende FIB-FESEM-System nicht in der Lage, *Multi Image Arrays* aufzunehmen. Da eine minimale Voxelgröße das vorrangige Ziel dieser Arbeit ist, um die feine Verästelung der skleralen Neuriten der retinalen Bipolaren darstellen und verfolgen zu können, mussten mit dieser Methode Abstriche bei der Abbildungsfläche gemacht werden.

Weitere limitierende Faktoren für die Größe der Abbildungsfläche sind die Hitzeentwicklung und der Strahlungsschaden beim Verdampfen der obersten Schicht durch den Ionenstrahl (Drobne et al. 2007). Die eingebrachte Energie muss vom Kunstharzblock verteilt und abgeleitet werden können. Ist dies nicht möglich, kann es zu physikalischen Veränderungen der Probe kommen, unter anderem zu Volumenveränderungen, die die Präzision der Schnitte beeinträchtigen. Zudem beschädigen die Hitze und die Strahlung dieses Vorganges das direkt am Schnitt anliegende Gewebe, also die Strukturen, die nach dem nächsten Schnitt abgebildet werden sollen. Es kann dabei zu Kontrastverminderungen kommen. Ein weiteres Problem sind elektrische Aufladungen in der Probe. Wenn diese Aufladungen nicht oder nicht schnell genug abgeleitet werden, beeinflussen diese die Reflexion der Elektronen und führen zu schwarzen Flecken auf den endgültigen Bildern. Bei den Block Face Scanning-Verfahren im SEM wird zusätzlich immer wieder dieselbe Stelle mit Elektronen beschossen, was bei längeren Scanvorgängen unvermeidlich zu Aufladungen führt. Beim FIB-FESEM kommen zu den Elektronen des Bildgebungsvorgangs noch zusätzlich elektrische Spannungen durch den Ionenstrahl hinzu. Die Leitfähigkeit der Probe ist deswegen zu optimieren (siehe Kapitel 2.3.1), damit der zeitliche Aufwand nicht durch Abklingzeiten der Aufladungen steigt.

Ein ergänzender Faktor, der beim Betrieb und damit auch bei der Verwendung des FIB-FESEM eine Rolle spielt, sind die Kosten. Für das Scannen muss die Probe mit einer leitfähigen Schicht aus Platin bedampft werden. Zudem ist der Gallium-Emitter, der die Ionen für den Schneidestrahler liefert, ein teures Verbrauchsmaterial. Dies führt zu relativ hohen Betriebskosten des FIB-FESEM.

Nichtsdestotrotz bietet das FIB-FESEM mit isometrischen Voxeln im einstelligen nm-Bereich und fast automatisch gut registrierten Bilderstapeln die besten Voraussetzungen für die 3D-Rekonstruktion feinsten Neuriten.

1.5.5 Kombination von Methoden

Um maximale Informationen zu erhalten, muss für jede Probe und jede Fragestellung ein Kompromiss aus mehreren Möglichkeiten der Bildgebung gefunden werden (sofern verfügbar):

- kleiner Bildausschnitt, hohe Auflösung XYZ-Achsen, teuer → **FIB-FESEM**
- großer Bildausschnitt, sehr hohe Auflösung XY-Ebene, niedrige Auflösung Z-Achse, kostengünstig → **ssTEM**
- großer Bildausschnitt, gute Auflösung XY-Ebene, gute Auflösung Z-Achse, mittlere Kostenlage → **Heidelberger Hobel**

Für die vorliegende Fragestellung – die Analyse feiner neuronaler Netzwerke in Kombination mit großen Neuronen-Netzwerken - bietet keine der Optionen alleine eine zufriedenstellende Lösung an. Eine Kombination mehrerer Möglichkeiten hingegen könnte alle Aspekte bedienen: (1) Eine **hohe Auflösung** im Bereich der fein verzweigten Verbindungen der äußeren plexiformen Schicht und (2) eine **großflächige Abbildung** der Gesamtzellen in der inneren nukleären und plexiformen Schicht sowie der Ganglienzellschicht.

Das FIB-FESEM-Verfahren ist für die feinen Strukturen der äußeren plexiformen Schicht ideal und gut mit den anderen Verfahren zu kombinieren. Die Änderung der Schnitttrichtung um 90° (siehe auch Abbildung 7.2 und 7.3) erlaubt es, mit dem großflächigen Verfahren des Heidelberger Hobels nach dem

FIB-FESEM-Scan lückenlos weiterzuschneiden. Es bleibt die Frage, welche Methode besser für den kombinierten Ansatz ist: das ssTEM oder der Heidelberger Hobel. Dabei müssen mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden:

- Verfügbarkeit der nötigen Geräte
- Arbeitsaufwand der Vorbereitung
- Arbeitsaufwand des Scanvorgangs
- Geldaufwand für Vorbereitungen, aber vor allem für den Scan
- Arbeitsaufwand Nachbearbeitung
- Resultierende Bildqualität (Kontrast und Auflösung x/y-Achse, z-Achse)
- Anwendbarkeit für 3D-Rekonstruktionen (Alignment)
- Kombination mit den FIB-FESEM-Daten (Anschluss finden)

1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit sollen anhand des Tiermodells *Engraulis encrasicolus* zu folgenden Punkten Antworten gefunden werden:

1.6.1 Biologische Fragestellungen

Analyse der äußeren plexiformen Schicht von *Engraulis encrasicolus*, insbesondere der Morphologie und Verschaltungen der Terminalen der Photorezeptoren der Vielfachzapfenreihen.

Dies geschieht als Fortsetzung der Arbeiten der Arbeitsgruppe Heß zur 3D-Feinstruktur der Sardellenretina. Basis sind die Erfahrungen mit der FIB-FESEM durch Dr. Petra Koch (Koch 2011).

Generierung neuer Datensätzen zur 3D-Feinstruktur und Konnektivität von Retinazellen der Sardelle aus der Methodenarbeit.

Der methodische Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 1.6.2 und 3.2) hat unter anderem auch große Datensätze von dreidimensionalen Bilderstapeln als Ergebnis. In diesen Datensätzen sollen die Zellen der Retina in bisher nicht möglichem Detailgrad und Ausdehnung rekonstruiert werden.

1.6.2 Methodische Fragestellungen

Austesten des Potentials und des Aufwandes der ssTEM für retinal connectomics.

Als mögliche Alternative zu den SBFS-Verfahren (Heidelberger Hobel, FIB-FESEM) soll das ssTEM auf Durchführbarkeit und Effizienz im Vergleich mit den anderen Ansätzen überprüft werden. Gleichzeitig soll eine Anleitung für mögliche zukünftige Anwendungen erstellt werden.

Austesten und Erfahrungen sammeln mit dem Heidelberger Hobel.

Positive Erfahrungen mit dem FIB-FESEM-Verfahren (Koch 2011) und gleichzeitige Erkenntnis der Grenzen dieses Ansatzes machen die Methodik des Heidelberger Hobels attraktiv. Neben ersten Tests mit der Methodik, auch im Kontext der Erstellung von 3D-Modellen auf Basis der Datensätze, sollen Durchführungsanleitungen erstellt werden.

Kombination von ssTEM und Heidelberger Hobel mit FIB-FESEM.

Die Grenzen und Möglichkeiten der verschiedenen Abbildungsverfahren legen die Kombination mehrerer Ansätze nahe. In dieser Arbeit sollen hierfür Protokolle für die Kombination von ssTEM mit FIB-FESEM und des Heidelberger Hobels mit FIB-FESEM erarbeitet werden und die Kombinationen in

Durchführbarkeit und Aufwand verglichen werden, mit dem Ziel am Ende vollständige 3D-Modelle von Sekundärneuronen zu erhalten.

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND 2 METHODEN

ERGEBNISSE 3

DISKUSSION 4

LITERATUR 5

Einen großen Teil dieser Arbeit bildet die Austestung der verschiedenen Abbildungsverfahren und Kombinationen, sowie das Zusammenstellen und Optimieren der nötigen Arbeitsabläufe. Die in diesem Kapitel ausgeführten Arbeitsabschnitte zum „Heidelberger Hobel“ und zum „ssTEM“ sind deswegen als Teil der Ergebnisse dieser Arbeit zu sehen.

2.1 Akquise und Fixierung des Probenmaterials

Exemplare von *Engraulis encrasicolus* aus dem Meeresaquarium in San Sebastian wurden mit einer Überdosis Betäubungsmittel (0,5% Ethylenglycol in Seewasser, entsprechend der Tierschutzbestimmungen vor Ort) getötet und die Augen mit einer Mikroschere aus dem Fischkopf extrahiert. Dabei wurde darauf geachtet, dem Sehnerv keinerlei Zug- oder Scherkraft auszusetzen. Die Linse und der Glaskörper wurden vorsichtig entfernt, um anschließende Fixations- und Kontrastmedien möglichst direkt an der Retina applizieren zu können. Die Augen wurden dann sofort in Glutaraldehyd (2,5% in 0.1M Cacodylatpuffer, pH 7,2) mit 1% Osmiumtetroxid und 3% Zuckersatz fixiert. Der Zucker ist dem Fixativ hinzugesetzt worden, um isosmotische Bedingungen für optimale Strukturhaltung zu schaffen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Retinae gekühlt in 0,1 M Cacodylatpuffer gelagert.

Der ventrotemporale Quadrant der gekrümmten Retina wurde in mehrere Streifen unterteilt (Abbildung 8). Diese Streifen konnten dann quasi flach weiter bearbeitet werden, um die feinere Unterteilung mit der nötigen Präzision durchführen zu können. Hierbei wurde darauf geachtet, das bereits fixierte Probenmaterial möglichst wenig mechanischem Stress auszusetzen, welcher zu Rissen und Brüchen im Gewebe führen könnte. Der ventrotemporale Quadrant wurde gewählt, da sich dort die höchste Dichte an Photorezeptoren in Vielfachzapfenanordnung befindet (Koch & Heß 2011).

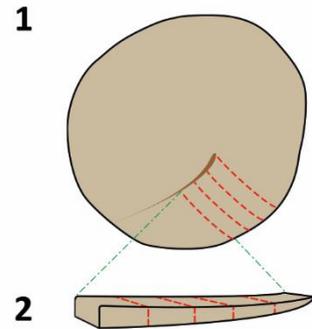


Abbildung 8: Präparation der Retinastücke. Die Area wurde in mehrere Streifen aufgeteilt (1), die dann wiederum in Stücke unterteilt wurden (2).

2.2 Kontrastierung und Einbettung

2.2.1 Standardverfahren

Für ssTEM (Kapitel 2.3.2) und FIB-FESEM (Kapitel 2.3.4: Scan 1, Probe „FIB 703“) wurde die fixierten und mit Osmium vorkontrastierten Retinastücke (**SS M02**) mit 2% Uranylacetat für 5 Minuten und in Bleicitrat für 2,5 Minuten weiter kontrastiert. Anschließend wurden die Retinastücke in Epon-Kunstharz eingebettet (siehe Tabelle „Einbettungsprotokolle“, Seite 147). Das 2-Komponenten Kunstharz EPON wurde im A:B Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Infiltration erfolgte zunächst für 3 Stunden in einem Gemisch von Kunstharz und Aceton (50:50), dann in 100% Kunstharz für 24 Stunden.

Zudem wurde in der Vorbereitung bereits eine dünne Schicht Kunstharz in den Silikonformen über Nacht bei 60°C ausgehärtet. Auf diese Schicht wurde dann die Probe gelegt und mit Kunstharz umgeben. Dieses Vorgehen birgt den Vorteil, dass das Probenstück mitten im Kunstharzblock zum liegen kommen. So besteht nicht das Risiko, dass kaum Kunstharz auf einer Seite der Probe vorhanden ist. Bei Kontakt mit der Silikonform besteht zusätzlich die Gefahr, dass das Gewebe nicht gleichmäßig mit dem Kunstharz durchtränkt ist und die Probe nicht zu verwenden ist.

Die Präparate wurden im Wärmeschrank für 48 Stunden bei 60°C auspolymerisiert (TEM). Um für den FIB-FESEM-Scan eine hohe Härte des Kunstharzes zu erreichen, wurden nochmal 48 Stunden bei 100°C nachpolymerisiert.

2.2.2 OTO-Staining

Für das Schneiden und die Bildgewinnung am Heidelberger Hobel (Kapitel 2.3.3, „Scan 1-3“) und die Kombination mit FIB-FESEM (Kapitel 2.3.4: Scan 2, Probe „FIB 1085“) kam die sogenannten OTO-Kontrastierung (Briggmann & Denk 2011) zur Anwendung. Hierbei wird den zellulären Strukturen (Probe **SS13 03 A5**) deutlich mehr Schwermetall für eine intensive Kontrastierung zugeführt, um auch mit dem SEM gut kontrastierte Membranlipide und Proteine zu erhalten. Vorversuche in Kooperation mit dem Mikroskop-Hersteller Gatan (Hersteller Gatan3View, ein kommerzieller Heidelberger Hobel) in Kalifornien und der der Arbeitsgruppe von Professor Kubota am NIPS in Okazaki (Nagoya, Japan) ergaben, dass die Standardkontrastierung für die Bildgebung mit dem SEM des Hobels zu schwach ist. Dies war überraschend, da die, ebenfalls auf Rückstreuelektronen gestützte, Bildgebung im FIB-FESEM bereits mit der TEM Standardkontrastierung (siehe Kapitel 2.2.1) sehr brauchbare Ergebnisse geliefert hatte. In Absprache mit den oben genannten Arbeitskreisen und dem Arbeitskreis Connectomics von Dr. Moritz Helmstaedter am MPI für Hirnforschung (Frankfurt) wurde das Protokoll nach Briggmann angepasst (siehe auch Tabelle „Einbettungsprotokolle“, Seite 147).

So wurde die Probe für die Heidelberger Hobel-Scans für 2 Stunden bei Raumtemperatur in eine Lösung mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumhexacyanoferrat gegeben und danach zweimal mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gewaschen. Danach folgte eine 1% Thiocarbohydrazidlösung in destilliertem Wasser für eine Stunde bei 50°C. Nach drei Waschvorgängen mit Cacodylatpuffer wurde die Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur in 2% Osmiumtetroxid gelagert. Nach weiteren 3 Waschvorgängen mit Cacodylatpuffer wurde die Probe über Nacht in 1% Uranylacetat kontrastiert. Am nächsten Tag folgten 3 Waschvorgänge mit destilliertem Wasser, bevor die Probe für 12 Stunden bei Raumtemperatur in eine Lösung mit 0,02 M Bleicitrat und 0,03 M L-Asparaginsäure gegeben wurde, die zuvor mit Kaliumhydroxid auf einen pH von 5,5 eingestellt wurde. Nach 3 Waschvorgängen in destilliertem Wasser wurde die Probe in 30% Aceton überführt. Darauf folgte eine Entwässerungsreihe mit 50%, 70%, 90%, 96%, 99% für je eine Stunde. Die aufsteigende Acetonreihe wurde mit dreimal 15 Minuten in 100% Aceton abgeschlossen. Anschließend an die Acetonreihe wurden die Retinastücke für 3 Stunden in einen 50:50 Mix aus 100% Aceton und EPON-Kunstharz (Mischverhältnis der Kunstharzkomponenten A:B war 3:4) gegeben. Darauf folgte eine 24-stündige Infiltration mit reinem EPON. Das 2-Komponenten Kunstharz wurde bei 60° über Nacht ausgehärtet.

2.3 3D-Elektronenmikroskopie

Um die fixierten und vorkontrastierten Proben mit zwei verschiedenen Bildgebungsansätzen untersuchen zu können, mussten diese präzise vorbereitet werden. Die in Kunstharzblöcke eingebetteten Gewebeproben waren zunächst noch viel zu groß, um sie am Ultramikrotom oder per SBFSEM schneiden zu können. In der Regel lag der relevante Gewebebereich auch (noch) nicht unmittelbar an der Kunstharzoberfläche. Die Proben mussten zunächst auf einen geeigneten Probenhalter montiert und dann zurechtgetrimmt werden.

2.3.1 Mesa-Präparation

Unter einer Mesa versteht man im Kontext der Elektronenmikroskopie ein Kunstharz-Probenstück, welches für das Serienschneiden auf das Nötigste reduziert ist – in der Regel in Form eines kleinen Quaders. Alle überflüssigen Bereiche sind entfernt. Dies geschieht zum einem, um die Schnittfläche zu

minimieren (optimiertes Bändern bei ssTEM, Minimierung der Messerbelastung). Zum anderen lädt sich eine kleine Probenfläche unter den starken Bestrahlungsströmen der Untersuchungsverfahren nicht so stark auf und die trotzdem vorkommenden Aufladungen klingen schnell wieder ab. In der Seitenansicht sieht eine derart präparierte Probe aus wie eine „Mesa“ in Anklang an die geologische Form der Tafelberge (Abbildung 9.6, Abbildung 14.4 und Abbildung 17).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden letztlich zwei spezifisch getrimmte Präparate angefertigt: (1) für die FIB-FESEM Untersuchung der Zapfenterminals und die Kombination der Abbildungsverfahren FIB-FESEM und ssTEM und (2) für die Kombination der Abbildungsverfahren FIB-FESEM und Heidelberger Hobel.

Ziel der Präparation war es im vorliegenden Fall, eine exakt orientierte Mesa zu erhalten, bei der die Fläche **A** (gemäß Abbildung 9.6) im 90° Winkel zu den Vielfachzapfen verläuft, das heißt senkrecht zur Längsachse der Zellen, und die Fläche **B** parallel zu den Photorezeptoren der Vielfachzapfen liegt, aber ebenso einen 90° Winkel zur Fläche **A** hat. Fläche **B** zeigt dabei nach oben und Fläche **A** zur Seite. Dabei liegt die Fläche **A** etwas skleral der Terminalen der Photorezeptoren.

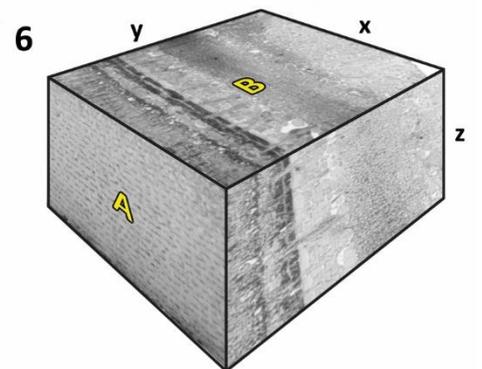
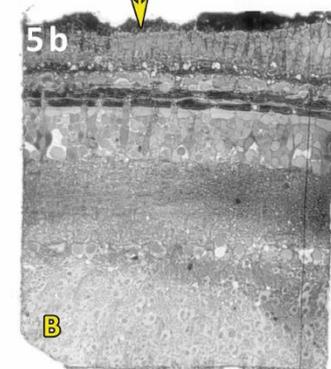
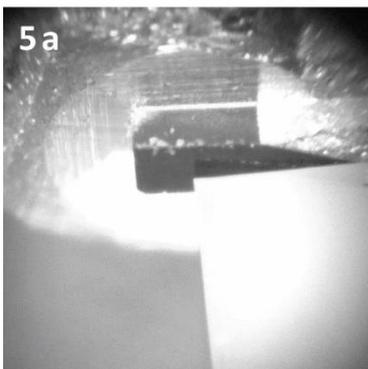
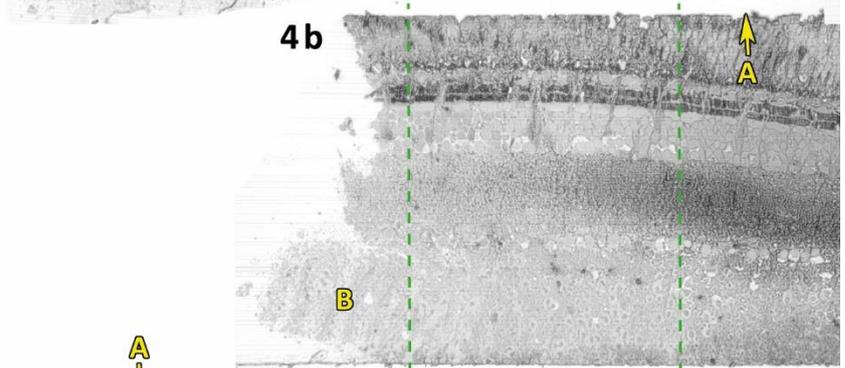
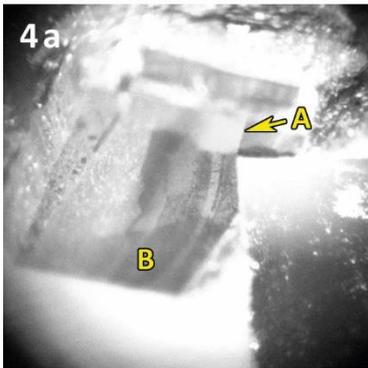
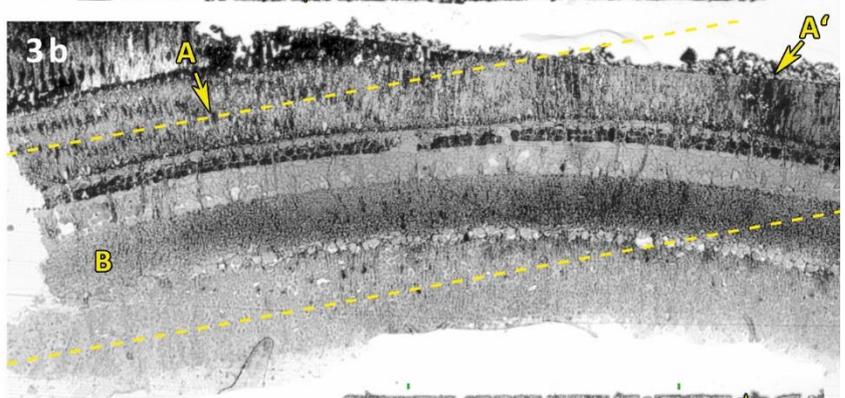
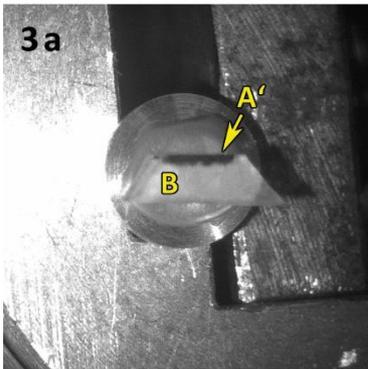
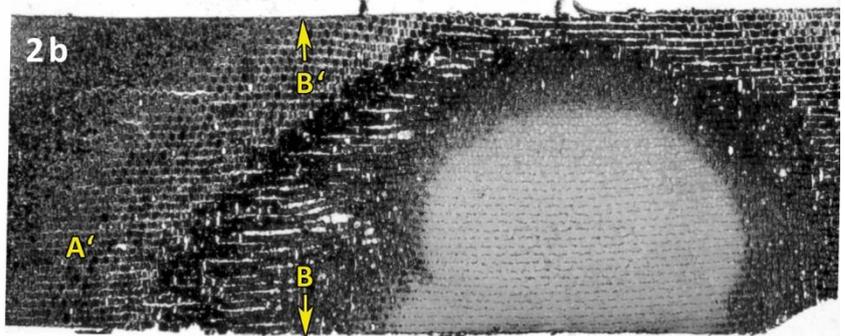
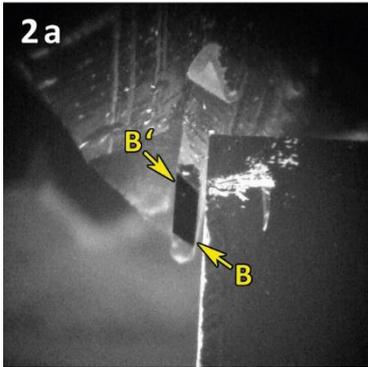
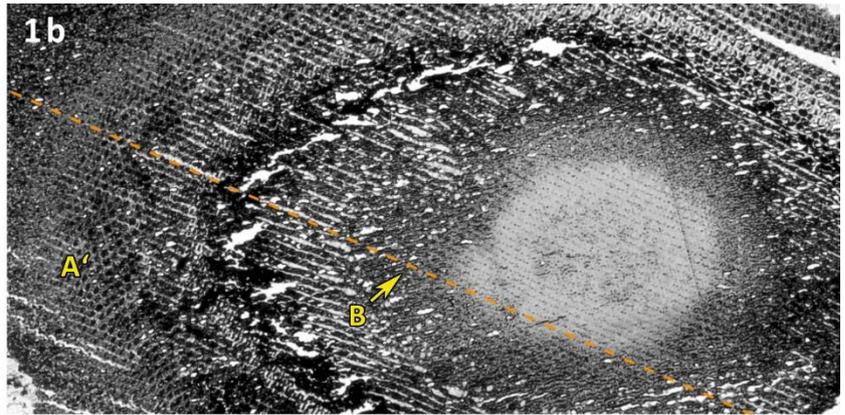
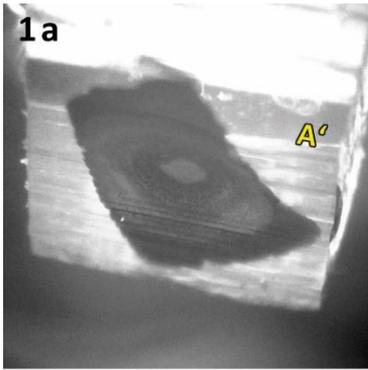
Die sklerale Seite der Probe wurde ermittelt und die gesamte Probe so vom restlichen Kunstharzblock abgesägt, dass die Retina mit der skleralen Seite nach oben auf einen Bearbeitungsblock geklebt werden konnte. Anschließend folgte eine Trimmung des Kunstharzblockes, sodass die Probe in der Aufsicht von möglichst wenig Kunstharz umgeben war. Nun wurden das Kunstharz und die Probe in einem RMC MT7000 Rotationsmikrotom mit schwenkbarem Probenträger schnittweise abgetragen, bis die Retina von der skleralen Seite her erreicht war (Pigmentepithel touchiert).

Währenddessen, und auch im weiteren Präparationsverlauf, wurde die Ausrichtung der Probe immer wieder durch sukzessive Kippen in kleinen Schritten angepasst. Dabei wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollschnitte mit einem Diamantmesser gemacht. Diese erhielten eine Färbung mit Richardson-Blau (nach Richardson et al. 1960). Unter dem Lichtmikroskop wurden dann der Präparationsfortschritt sowie die Ausrichtung der Probe zum aktuellen Schnitt überprüft. Basierend darauf wurden die folgende Arbeitsschritte (vor allem die Kipprichtung) angepasst.

Für das Zurechtschneiden der Mesa fanden jeweils frisch angefertigte Glasmesser Verwendung. Für das Glasmesser gibt es mehrere Gründe: (1) Es bietet eine hohe Schärfe (allerdings nur für wenige Schnitte). (2) Glasmesser sind gut in großen Mengen herzustellen und bei einer beschädigten Klinge wird das Messer einfach ausgetauscht. Die Kosten sind, im Vergleich zu einem Diamantmesser, sehr gering. Der Hauptgrund ist jedoch, dass (3) bei einem Glasmesser auch mit der seitlichen Messerkante „geschnitten“ werden kann (siehe Abbildung 9.2a und Abbildung 10.6 und 10.7), da die Schnittkante links und rechts frei liegt (im Gegensatz zu einem Diamantmesser, das fest im zugehörigen Wasserbecken verankert ist). So können seitliche Bereiche einer Probe stückweise abgetragen werden, ohne andere Bereiche zu beschädigen. Dies ermöglicht es Material im 90° Grad Winkel zur eigentlichen Schneiderichtung des Mikrotoms abzutragen.

Abbildung 9: Nächste Seite. Arbeitsschritte bei der Herstellung der Mesa für FIB-FESEM und Hobel-Scans. **(a)** zeigt immer die Probe in der Ansicht durch das Binokular des Mikrotoms, **(b)** zeigt immer die dazugehörigen Semidünnschnitte, die zur Fortschrittskontrolle angefertigt wurden. Die Flächen **(A)**, **(B)**, **(A')** und **(B')** sind angegeben. Ohne Pfeil beschreibt der Buchstabe die Fläche, auf der er liegt. Mit Pfeil beschreibt er die Fläche, auf die der Pfeil zeigt.

(1) Die Probe wird von skleral her geschnitten, durch die kugelförmige Morphologie der Retina werden die Schichten der Retina in konzentrischen Kreisen angeschnitten. Parallel zu den Vielfachzapfenreihen (**orange Linie**) wird die Probe seitlich abgetragen **(2)**, dies wird an beiden Seiten der Probe durchgeführt. Danach wird die Probe auf die zweite der eben geschaffenen Seiten **B'** geklebt **(3a)** und die andere Seite glatt geschnitten. Dann wird ein Semidünnschnitt **(3b)** herangezogen, um die endgültige ROI zu definieren und die Schnittkante oberhalb der Terminalen zu finden (**gelbe Linien**). Entlang dieser Linien wird die Probe wieder abgetragen **(4a)** und danach wieder ein Semidünnschnitt herangezogen **(4b)**. Auf diesem werden die seitlichen Grenzen der zukünftigen Mesa definiert (**grüne Linien**) und diese wieder abgetragen **(5a)**. Das Ergebnis wird mit einem letzten Semidünnschnitt kontrolliert **(5b)**. Die so entstandene Mesa **(6)** hat im Teilprojekt „Zapfenterminals“ (Kapitel 3.1) Kantenlängen von **(x)** 247 µm und **(y)** 214 µm und eine Höhe **(z)** von 127 µm.



Nach dem Erreichen der Retina wurde weitergeschnitten, bis man den skleralen Rand der äußeren nukleären Schicht erreicht hat (Abbildung 9.1a und 9.1b). Da die Retina annähernd halbkugelförmig ist, war der Anschnitt nun kreisförmig, diese Fläche ist **A'**. Mit dem Glasmesser wurde nun parallel zu den Vielfachzapfenreihen am Rand der Probe, mit genug Sicherheitsabstand zu relevanten Strukturen, Material abgetragen bis deutlich hinter die Probe. Diese neue Fläche **B'** steht 90° zu **A'**. Dann wurde die Probe um 180° gedreht und auf der anderen Seite der Probe ebenso parallel Material abgetragen, die dadurch entstehende Fläche ist **B** (Abbildung 9.2a und 9.2b).

Die Probe wurde nun vom restlichen „darunterliegenden“ Kunstharz abgetrennt und – um Aufladungen schnellstmöglich aus der Probe ausleiten zu können – mit leitfähigem Epoxidkleber (nach Nguyen et al. 2016) CW2400 (CircuitWorks) auf den endgültigen Probenhalter auf die Fläche **B'** geklebt (Abbildung 9.3a). Der Probenhalter ist dabei ein Aluminium-Stub (siehe Abbildung 11) – gerätespezifisch für den Hobel und für das FIB-FESEM – und kann auch in den Probenhalter des Ultramikrotoms eingespannt werden.

Die, nun oben liegende, Schnittebene **B** wurde bis in die Probe hinein abgetragen und dabei regelmäßig die Parallelität der Schnitte zu den Photorezeptoren überprüft. Bei Bedarf wurde durch Kippen der Probe der Winkel von **B** angepasst. Dabei wurde vor allem die Kippung entlang der Vielfachzapfenreihen korrigiert. Die musste geschehen, wenn mehr vom vitrealen Teil der Retina angeschnitten wurde. Wenn zuerst der sklerale Teil der Retina angeschnitten wurde, lag dies vor allem an der Krümmung der Retina. Diese Kippung konnte durch weiteres Schneiden der Probe korrigiert werden.

Die Fläche **B** wurde erneut glattgeschnitten und die Fläche **A** parallel zu einer geeigneten Stelle der äußeren plexiformen Schicht, und damit schräg zu **A'** und 90° zu **B** abgetragen (Abbildung 9.3b und 9.4a). Genauso wurde auf der andere Seite der Probe verfahren: Hier wurde, parallel zu **A**, vitreal der Ganglionzellschicht die Probe abgetragen (siehe auch Abbildung 10.5 bis 10.7).

Im Folgenden wurden die beiden Seiten, jeweils im 90° Winkel zu **B** und **A**, abgetragen (Abbildung 9.5a). Dies geschah mit circa $50\ \mu\text{m}$ Abstand zum endgültigen Scanbereich. Der Grund hierfür ist das Mesa-Volumen möglichst klein zu halten. Die Leitfähigkeit dieses Probengewebes in Epon ist deutlich schlechter als die des leitfähigen Kunstharz-Klebers, mit dem die Probe in einem späteren Schritt umschlossen wurde (Abbildung 10 und Abbildung 14). Zu große Volumina an Probenmaterial führen zu Aufladungen der Probe, die dann die Sensoren in diesen Bereichen überlasten. Die Alternative zu dieser Volumenverkleinerung wäre es, eine Abklingzeit zwischen den Scans einzelner Bilder einzufügen. Dies würde die Scan-Zeiten jedoch deutlich erhöhen.

Zur abschließenden Kontrolle wurde noch ein Schnitt mit einem Diamantmesser abgetragen und unter dem Mikroskop fotografiert (Abbildung 9.5b). Zum einen diente dieser Schnitt als Orientierungshilfe für die Scanschritte. Zum anderen ermöglichte eine, durch den Diamantmesserschnitt, sehr glatte Oberfläche der Mesa ein gutes Bild der Zellen im SEM (Auriga).

Im Falle der FIB-FESEM-Arbeiten für das Zapfenterminalen-Projekt (Kapitel 3.1) und die Kombination mit ssTEM (Kapitel 3.2.1) hatte die fertige Mesa eine Fläche von $247 \times 214\ \mu\text{m}$ und eine Höhe von $127\ \mu\text{m}$ (Abbildung 9.6). Beim Projekt der Kombination von FIB-FESEM mit dem Heidelberger Hobel war es eine Fläche von $203 \times 254\ \mu\text{m}$ und eine Höhe von $200\ \mu\text{m}$.

Für den FIB-FESEM-Scan im Projekt mit der Kombination mit dem Heidelberger Hobel musste die Mesa nach dem ersten Hobel-Scan nochmals zugeschnitten werden, damit nicht nur die Oberfläche **B** der Mesa frei zugänglich war, sondern ebenso die äußere plexiforme Schicht. Da dieses Verfahren orthogonal zur Probenoberfläche schneidet und scannt, musste die entsprechende Seite **A** möglichst nah an die zu beobachtenden Strukturen der äußeren plexiformen Schicht abgetragen werden. Hierfür wurde mit einem Glasmesser das unnötige Probenmaterial abgeschilfert (Abbildung 10).

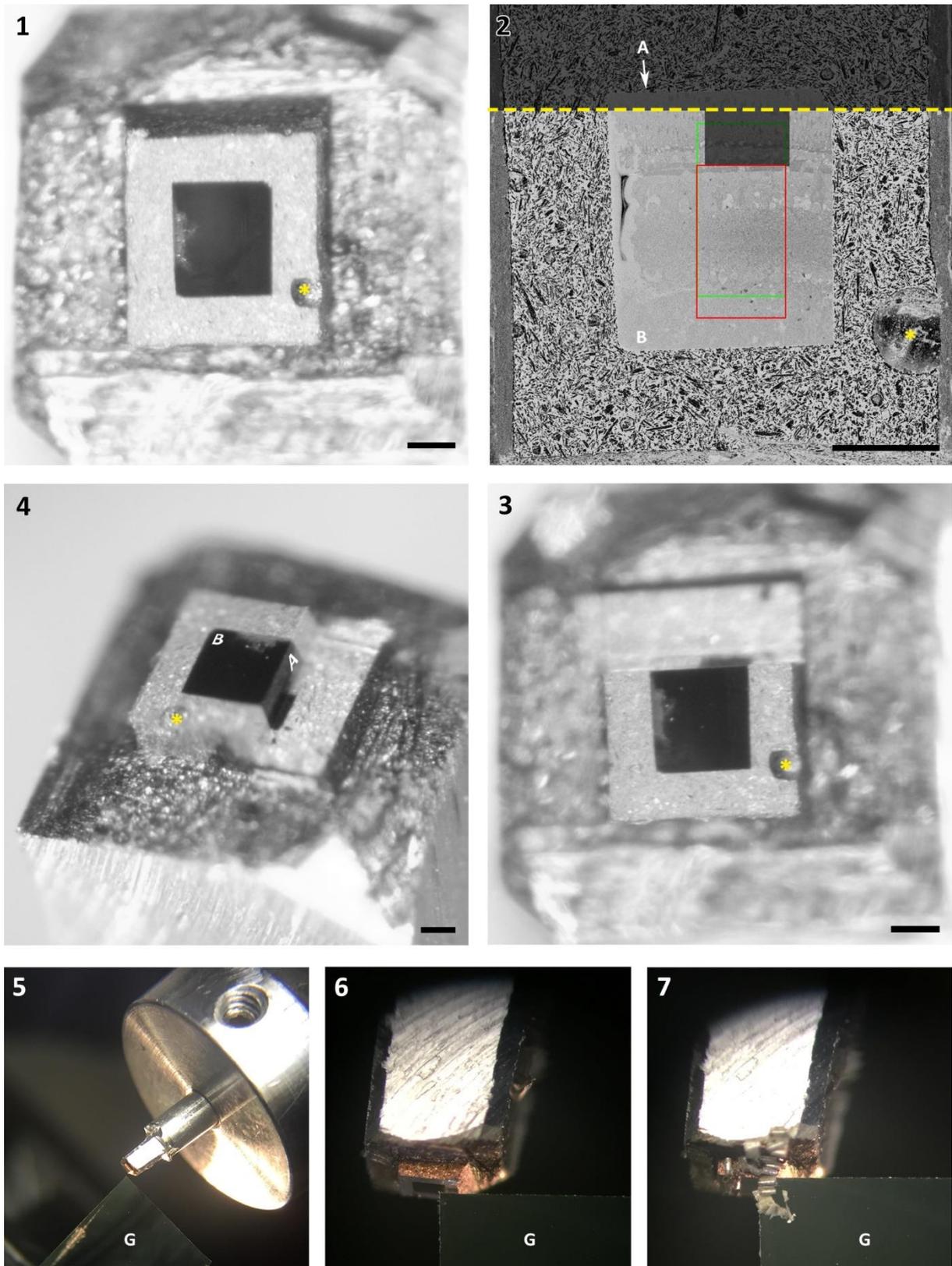


Abbildung 10: Übersicht der Prä-FIB-FESEM Mesa-Präparation. Zur Orientierung dient die Luftblase im leitenden Kunstharz (**gelber Stern**). (**A**) und (**B**) entsprechen den Flächen aus Abbildung 9. (**1**) Ansicht der Mesa im Mikrotom. (**2**) SEM-Rückstrahlerelektronenbild nach dem ersten Hobel-Scan. Eingezeichnet ist die Schnittkante für die Präparation (**gelbe gestrichelte Linie**), das Scanfenster des ersten Hobel-Scans (**grüner Kasten**) und das des zweiten Hobel-Scans (**roter Kasten**). Die zu erwartende Kante nach dem FIB-FESEM-Scan ist mit der dunkelgrauen eingefärbten Fläche im oberen Bildbereich angedeutet. Selbe Ausrichtung wie in (**1**). Mesa nach dem Abschleifen des in (**1**) angezeigten Bereiches in einer gleich orientierten Aufsicht (**3**) und in einer Schrägansicht von der Seite (**4**). Maßstabsbalken: 100 μm . (**5**) bis (**7**) zeigen den Prozess des Abschleifens durch das Binokular des Rotationsmikrotoms mit einem Glasmesser (**G**).

Der Stub mit Adapter

Eine besondere Problemstellung des Scannens einer Probe mit verschiedenen Abbildungsverfahren ist, dass die jeweiligen Geräte meistens unterschiedliche Probenhalter verwenden. So verwenden auch die in diesem Fall eingesetzten Geräte für das FIB-FESEM-Verfahren und das Heidelberger Hobel-Verfahren verschiedene Stubs. Unter dem Stub versteht man die Trägerkonstruktion, auf der eine Probe aufgebracht werden muss, um sie in ein Messgerät einspannen zu können.

Ein Umsetzen der Probe von einem Stub auf den anderen ist dabei nicht praktikabel. Neben dem Risiko einer Beschädigung der präzise präparierten Mesa oder deren Verlust besteht zudem das Problem der Orientierung. Für die Scanverfahren sind die Oberfläche und die Seitenkanten parallel zum Probenhalter ausgerichtet. Ein Umsetzen und neu Aufkleben geht immer mit einem Verlust dieser Parallelität einher. Diese müsste dann wieder durch ein erneutes Zuschneiden der Probe hergestellt werden. Da das Ziel der Methodik die Erstellung verlustfrei aneinanderpassender Datensätze ist, war dies keine Option.

Die Lösung hierfür war, die Probe auf dem Stub mit dem kleineren Basisdurchmesser, hier der des Gatan 3View Systems (für den „Hobel“), aufzukleben. Dann wurde von der hauseigenen Forschungswerkstatt ein Adapter hergestellt, in den der Stub mit der Probe fixiert werden konnte (Abbildung 11.6a). Dieser Adapter, mit größerem Basisdurchmesser (Abbildung 11.2), passte in das FIB-FESEM-System von Auriga. So konnte garantiert werden, dass die Probe sicher und wiederholt in beide Systeme eingebracht werden kann und dabei weder die Orientierung der Probe noch die Parallelität verloren geht.

Für die Heidelberger Hobel-Scans musste der Stub noch neu zugeschnitten werden, da es eine kurzfristige Änderung des Probenträgersystems gab. Dafür wurde der Aluminiumstub in ein Mikrotom eingespannt und mit einem Stahlmesser in Form geschnitten. Dies gelang, ohne die Mesa zu beschädigen.

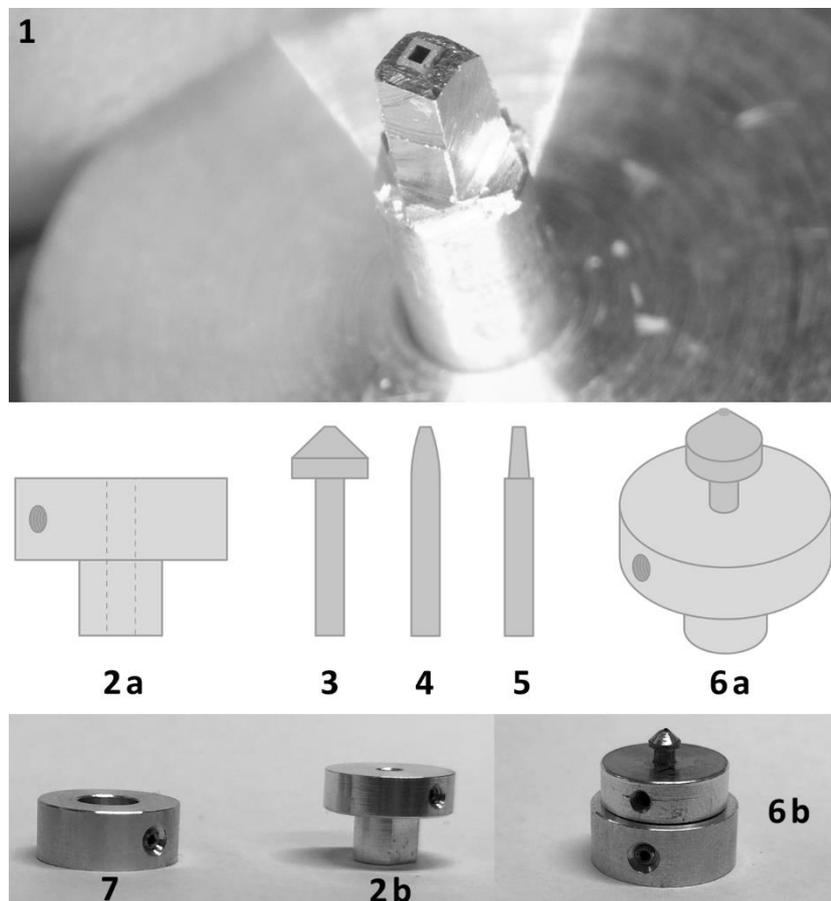


Abbildung 11: Probenhalter („Stub“) für Heidelberger Hobel und FIB-FESEM und das Adaptersystem. **(1)** Der Aluminiumstub (**zentraler Stub**) für den Heidelberger Hobel nach dem Zuschchnitt für das aktualisierte Gatan 3View System. Gehalten wird der Stub im Adapter für das FIB-FESEM-System. Seitenansicht der verschiedenen Stubs: **(2)** FIB-FESEM Adapter mit einem zentralen Loch (**gestrichelte Linien**). **(3)** Stub Heidelberger Hobel alt. **(4)** Stub Heidelberger Hobel neu. **(5)** Der verwendete „Heidelberger Hobel alt“-Stub nachdem er für das neue System zugeschnitten wurde. **(6a)** Der Probenhalter für den Heidelberger Hobel kann in das zentrale Loch des FIB-FESEM-Adapters gesteckt und mit einer Schraube fixiert werden. Zum Transport **(6b)** wurde ein passender Ring mit Inbus-Schraube für den FIB-FESEM Stub angefertigt **(7)**.

2.3.2 ssTEM

Schneiden und Bändern konventioneller Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnittserie für das ssTEM wurden mit einem Rotations-Ultramikrotom (Leica EM UC6) geschnitten. Die Probe SS M02 wurde zuvor einem FIB-FESEM-Scan unterzogen (siehe Kapitel 2.3.4, „Scan 1“). Als Messer kam ein Diamantmesser für Ultradünnschnitte von Diatom® zum Einsatz.

Die Ultradünnschnitte wurden auf sogenannte Loch-Grids aufgebracht. Hierbei handelt es sich um flache Metallringe aus Kupfer mit circa 3 mm Durchmesser, deren zentrales ovales Loch (1 x 2 mm) mit einer für Elektronen durchlässigen Formvar-Kunststoffolie überspannt wird, auf der die Schnitte liegen. Meist können nur wenige Schnitte auf ein Grid gepackt werden. Dies ist stark abhängig von der Größe der Schnittfläche und ob sie sich bändern (nach Ruthensteiner 2008) lassen (siehe Kapitel 2.3.2 „Schneiden und Bändern konventioneller Ultradünnschnitte“) oder nicht.

Mehrere Faktoren beeinflussen den Zustand der Probe und des Kunstharzes:

- Qualität der Fixierung (Zeitpunkt, Eindringtiefe, Dauer)
- Härte des Einbettungskunstharzes
- Gegebenenfalls (Rest-)Wassergehalt der Probe
- Qualität der Einbettung (Luftblasen)

Sie können jedoch durch Vorarbeiten optimiert werden. Zusätzlich gibt es Faktoren, die den Schneideprozess selbst beeinflussen:

- Temperatur
- Luftfeuchtigkeit
- Luftzug
- Hintergrundvibrationen, Gebäudevibrationen, andere Menschen

Bei den nur ein paar dutzend Nanometer dicken Ultradünnschnitten (ssTEM) schlagen sich die äußeren Faktoren wesentlich deutlicher nieder als beim Semidünnschnittverfahren (circa 1,5 µm pro Schnitt). Schon leichte Schwankungen der Temperatur und Luftfeuchtigkeit können zu einer Ausdehnung oder Schrumpfung des Kunstharzes führen. Dadurch kann die Schnittdicke variieren, bis zu dem Punkt, dass einmal gar nicht geschnitten wird und im nächsten Annäherungsschnitt die doppelte Dicke. Damit ist eine potenziell durchgehende Schnittserie unterbrochen. Hintergrundvibrationen des Gebäudes (oder vor dem Raum vorbeilaufende Personen) und die Luftfeuchtigkeit beeinflussen ebenso die Schnittqualität. Eine hohe Luftfeuchtigkeit verändert die Konsistenz des Kunstharzes – es wird klebriger. Dadurch gleitet das Diamantmesser nicht mehr durch die Probe, sondern bleibt gelegentlich hängen. Dadurch kommt es zu einer Vibration, die zu einem wellenartigen Schnitt führt. Man spricht dabei von „sceddern“. Hintergrundschwingungen führen ebenso zu einer Vibration von Probe und Messer und verhindern glatte Schnitte. Kam es trotz aller Vorkehrungen zu einem Sceddern der Schnitte, wurden diese mit Chloroform gestreckt, um die Effekte auf die Schnitte zu mindern.

Durch den relativ isolierten Stellplatz des Ultramikrotoms in einem klimatisiertem Kellerraum wurde vielen dieser Faktoren entgegengewirkt. Zudem wurden Zeiträume für den Schneideprozess gewählt, die eine Beibehaltung einer konstanten Temperatur und Luftfeuchtigkeit während des Schneidens ermöglichten.

Um die für eine Schnittserie unabdingbare richtige Reihenfolge der Schnitte zu erhalten, wurden die Schnitte gebändert. Dabei wird die „obere“ und „untere“ Fläche des zuvor auf die richtige Größe getrimmten Kunstharzblocks mit einem Diamantmesser angeschrägt und die entsprechenden Kanten möglichst parallel ausgerichtet. Durch die glatten Kanten und die damit hohe Kontaktfläche „kleben“

benachbarte Schnitten aneinander. Die so entstehenden Bänder, mit automatisch richtig sortieren Schnitten, sind stabil genug, um im Wasserbad schwimmend bewegt zu werden (zum Beispiel mit einer Wimper an Zahnstocherspitze) und es können im Idealfall mehrere Bänder auf einem Objektträger (Grid) untergebracht werden. Bei ausreichend kleinen Objekten sind Bänder um die 10 Schnitte möglich, im Vergleich zu etwa 2 bis 3 Schnitten, wenn die Ultradünnschnitte einzeln gefischt werden. Dies bringt zudem eine deutlich Material- und Zeitersparnis. Bei der vorliegenden Probe konnten die Kanten nicht angeschrägt werden, da die Mesa zuvor schon für den FIB-FESEM-Scan geschnitten wurde (siehe Kapitel 2.3.1). Ein Anschrägen zweier Kanten hätte zu einer signifikanten Verkleinerung der Oberfläche und damit zu Informationsverlusten geführt. Dies hatte Anteil an dem, zum Teil, sehr schwachen Bändern der Schnitte. Sollten die Schnitte nur schwach bändern, mussten die Kontaktkanten nachgeschnitten werden, da der wahrscheinlichste Grund eine zu raue Schnittkante war. Dadurch gab es nicht genug Kontaktfläche für das Bändern. Alternativ konnten mit etwas Acetondampf die Kontaktkanten leicht aufgeweicht werden. Ein Reißen der Schnitte, Umklappen von Teilschnitten oder verkehrt herum liegende Schnitte kamen weiterhin vor, waren aber vergleichsweise selten.

Die Schnittbänder wurden im Wasserbad des Diamantmessers aufgefangen. Die Bänder wurden darauf ausgerichtet und die Orientierung der einzelnen Schnitte dokumentiert. Beim erneuten Annähern nach den Schnittpausen gab es gelegentlich einen Materialverlust von etwa einer halben Schnittdicke und einzelne Schnitte wiesen Risse und Überlappungen auf.

Tabelle "Aufteilung der Schnitte ssTEM". Übersicht der Anzahl an Schnitten, die beim ssTEM-Verfahren pro Grid (A1 bis M2) platziert wurden. Angegeben ist, ob die Schnitte gebändert haben (+) oder nicht (-), sowie die Schnittdicke in nm.

Grid	Anzahl Schnitte	Bändern	Schnittdicke (nm)	Grid	Anzahl Schnitte	Bändern	Schnittdicke (nm)
A1	3	-	70	F5	3	+	75
A2	1	-	70	G1	1	-	75
A3	2	-	70	G2	2	-	75
A4	2	-	70	G3	1	-	75
A5	2	-	70	G4	1	-	75
B1	2	-	80	G5	2	-	75
B2	1	-	80	H1	2	-	75
B3	1	-	80	H2	1	-	75
B4	3	-	80	H3	2	-	75
B5	1	-	80	H4	1	-	75
C1	1	-	80	H5	1	-	75
C2	2	-	80	J1	6	-	75
C3	1	-	80	J2	1	-	75
C4	1	-	80	J3	6	-	75
C5	3	-	80	J4	2	-	75
D1	1	-	80	J5	1	-	75
D2	2	-	80	K1	1	-	75
D4	2	-	80	K2	1	-	75
D5	1	-	80	K3	2	-	75
D3	2	-	80	K4	3	-	75
E1	3	+	75	K5	1	-	75
E2	0	-	75	L1	1	-	75
E3	8	+	75	L2	7	+	75
E4	5	+	75	L3	2	+	75
E5	4	+	75	L4	1	-	75
F1	3	+	75	L5	2	+	75
F2	1	-	75	M1	3	+	75
F3	2	+	75	M2	10	+	75
F4	10	+	75				

Wie erwartet kam es zu Schwingungs- und Stauchungsschwierigkeiten, aufgrund derer die Arbeit öfters unterbrochen werden musste. Im Endeffekt konnte jedoch eine fast verlustfreie Schnittserie von über 140 Ultradünnschnitten mit einer Schnittdicke von 70 bis 80 nm erstellt werden. Diese wurden auf 57 Grids untergebracht. Anzahl, Reihenfolge und Lage der Schnitte wurden dokumentiert.

Kontrastierung

Die auf den nummerierten Grids liegenden Bänder wurden für 5 Minuten in 2% Uranylacetat kontrastiert und danach viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Darauf folgten 150 Sekunden in Bleicitrat (nach Reynolds) gefolgt von vier Waschgängen mit destilliertem Wasser.

TEM

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem JEOL Transmissions-Elektronenmikroskop (JEM-1230, 40-120 KV am MPI für Neurobiologie, Martinsried) mit einer Gatan Orius CCD Kamera, mit einer Auflösung von 3840 x 2492 px, aufgenommen. Bei einer 5000-fachen Vergrößerung ergab sich eine Pixelgröße von 9,8 x 9,8 nm.

Um die mit 40 x 120 μm relativ große Region of Interest (ROI) erfassen zu können, wurden jeweils mehrere Bilder aufgenommen (*multi image array*). Zuerst wurde die Lage der Schnitte auf dem Grid aufgezeichnet und mit der Schnittdokumentation die Reihenfolge abgeglichen (Abbildung 13.1 und 13.2 oben links). Dann wurden die *multi image arrays* von der FIB-FESEM-Kerbe aus (von skleral nach vitreal, siehe ROI in Abbildung 12) in 2 oder 3 Reihen aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass es immer einen ausreichenden Überlappungsbereich zwischen benachbarten Bildern gibt, um die ROI lückenlos zu erfassen (Abbildung 12.2). Die Reihenfolge dieser Bilderreihen wurde ebenso dokumentiert (Abbildung 13).

Um die benötigte Anzahl an Bildern für die *multi image arrays* nach Möglichkeit zu reduzieren, wurde ein Sonderfunktion des JEM-1230 genutzt: die Möglichkeit, die Ansicht des Schnittes zu rotieren. Dies kann notwendig sein,

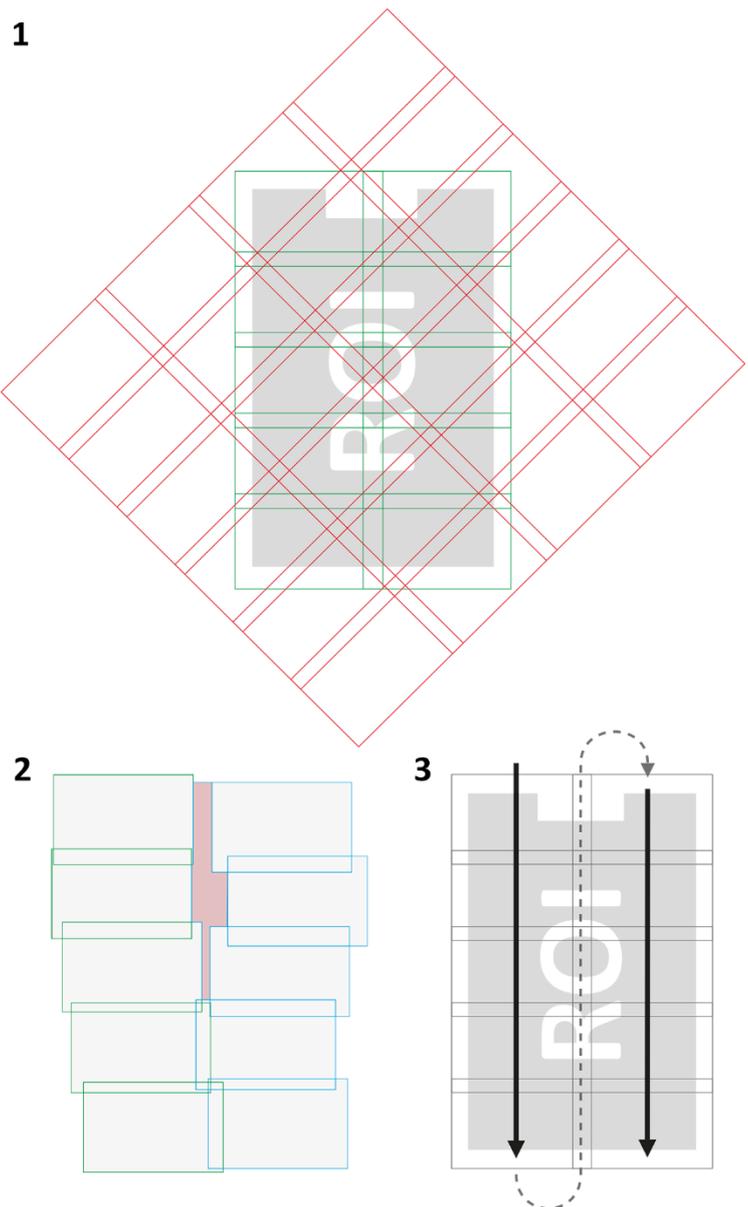


Abbildung 12: Rotation der Bildansicht bei TEM-Aufnahmen. **(1)** Zur Erfassung derselben ROI (**grau**) können, je nach Winkel, in dem der Schnitt zur Bildansicht liegt, zwischen 10 (**grün**) und maximal 22 (**rot**) Bilder notwendig sein. **(2)** Damit es beim Zusammenfügen („stitchen“) der Einzelbilder zum Gesamtbild nicht zu Lücken kommt (**roter Bereich**), müssen die Einzelbilder sequentiell und in einer dokumentierten Reihenfolge aufgenommen werden **(3)**, in der sie auch gestitcht werden. So wird zudem verhindert, dass Bereiche der ROI im Bildmaterial nicht erfasst werden. Die Seitenverhältnisse der Bildausschnitte und deren Größenverhältnis zur ROI entsprechen denen der ssTEM-Serie.

wenn die ROI nicht parallel zum Bildausschnitt der TEM-Kamera liegt. Dies führt dazu, dass man zur Abbildung derselben Fläche deutlich mehr Einzelbilder benötigt (siehe dazu Abbildung 12).

Der Einsatz der Rotations-Funktion führte neben einer Zeit- und Datenvolumenersparnis, besonders in den nachfolgenden Bearbeitungsschritten, auch zu einer deutlichen Senkung der Strahlungsbelastung der Ultradünnschnitte. Diese „Rotation“ findet innerhalb des Strahlengangs statt, die Probe selbst wird dabei nicht bewegt. Die Rotation wurde derart gewählt, dass eine der kurzen Kanten der ROI in der Ansicht oben zum Liegen kommt. Die Rotation (ROT) wurde dokumentiert (Abbildung 13).

Für jede verwendete Rotationseinstellung und verwendete Vergrößerung wurde ein „Grated Grid“ aufgenommen. Dabei handelt es sich um geeichte, orthogonale Gitter mit exakten Abständen zwischen den einzelnen Gitterlinien.

Danach wurden alle Schnitte anhand der Bilder auf die richtige Reihenfolge überprüft. Das anschließende Prozedere mit den primären TEM-Bildern (Rohdaten) ist in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

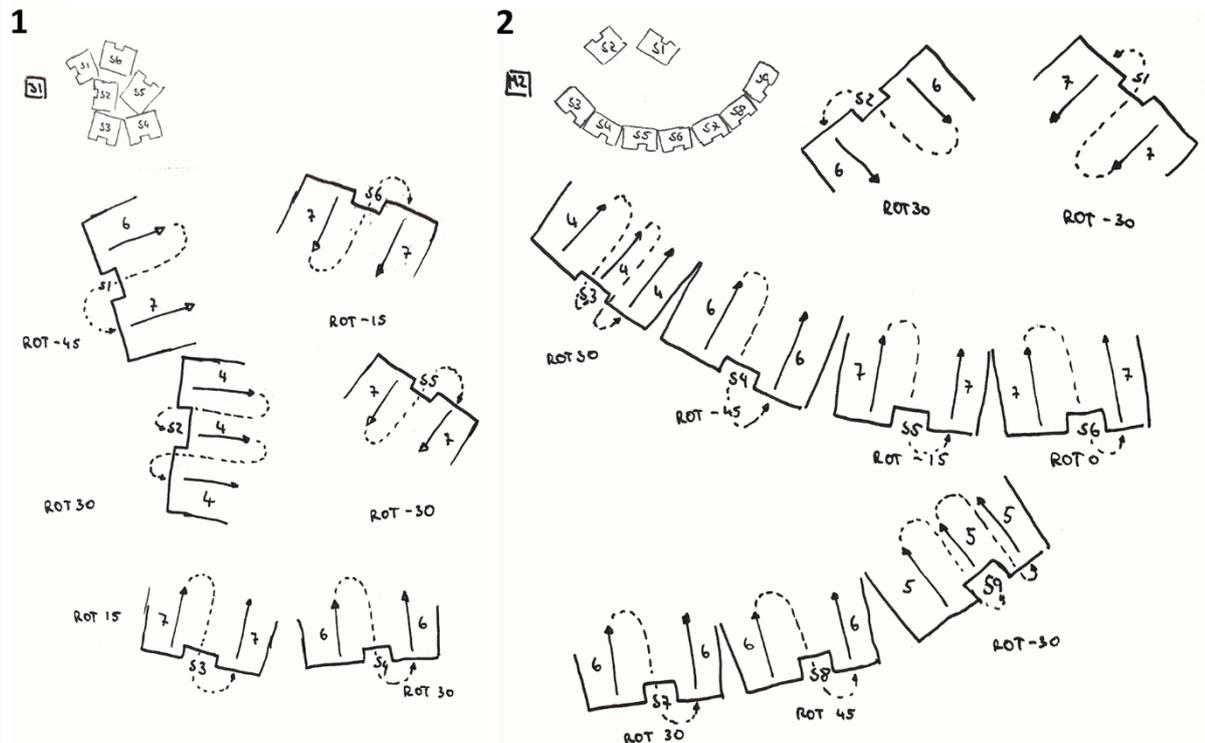


Abbildung 13: Dokumentation der TEM *multi image* Aufnahmen für das ssTEM-Verfahren an zwei Beispielen: **(1)** Grid J1, **(2)** Grid M2. Jeweils links oben in der Ecke ist eine Übersicht aller auf dem Grid liegender Schnitte mit der richtigen Reihenfolge (**S1 bis SX**) zu sehen. Jeweils darunter sind die skleralen Seiten der Schnitte (erkennbar an der Kerbe des FIB-FESEM-Scans), in der selben Orientierung, vergrößert dargestellt. Die Beschriftung entspricht der Reihenfolge der Schnitte und der Übersicht jeweils oben links. Jeder Schnitt ist mit der eingestellten Rotierung des TEM beschriftet (**ROT -45 bis ROT 45**), sowie mit der Reihenfolge der erstellten Einzelbilder zusammen mit der Einzelbildanzahl pro Reihe.

2.3.3 Heidelberger Hobel

Die Mesa der Probe SS13 03 A5 wurde komplett mit leitfähigem Kunstharz CW2400 (CircuitWorks) umgeben, um die Leitfähigkeit zu verbessern und die Probenränder zu stabilisieren. Dieses wurde für 30 Minuten bei 70°C und dann über Nacht bei 30°C ausgehärtet. Das ausgehärtete Kunstharz wurde

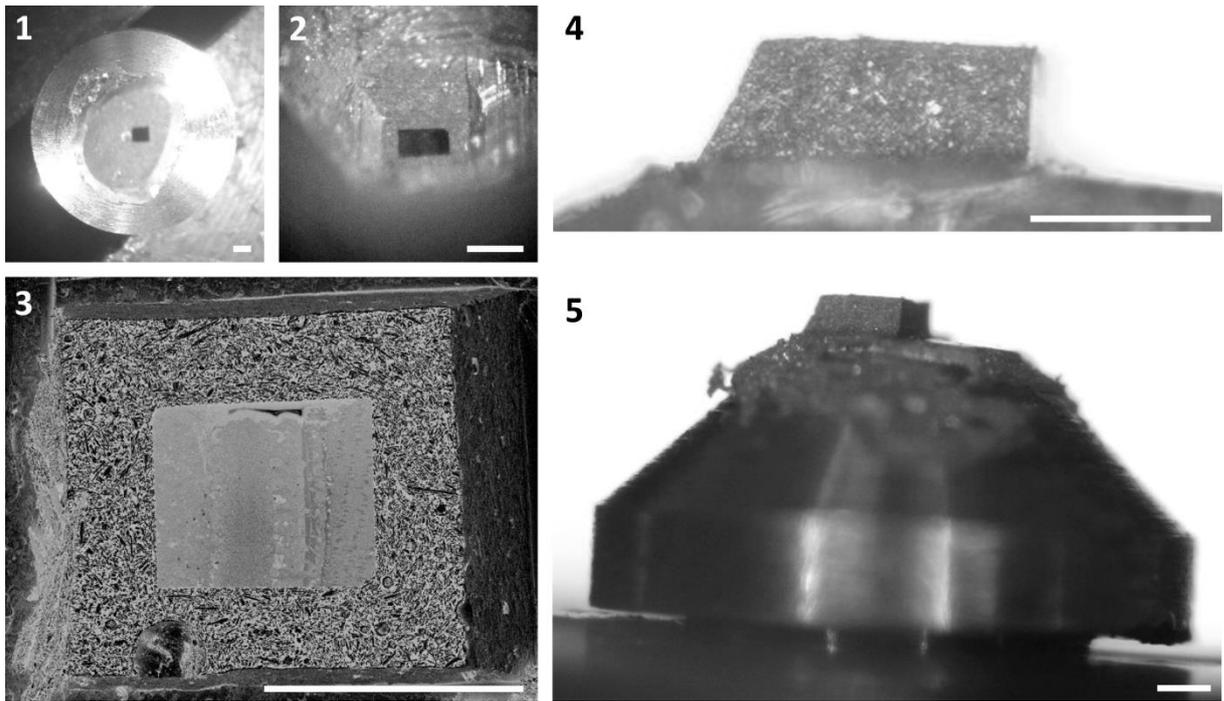


Abbildung 14: Arbeitsschritte bei der Mesa-Erstellung für den ersten Hobel-Scan. Zusätzlich zu den in Kapitel 2.3.1 ausgeführten Arbeitsschritten wird die fertige Mesa **(1)** mit leitfähigem Kunstharz umgeben und dieses nach dem Aushärten bis zur Oberfläche der Mesa abgeschnitten. **(2)** Dann werden 3 Seiten (Seite A und die beiden anschließenden Seiten) in einem 90° Winkel geschnitten und die letzte Seite mit einer Rampe. **(3)** zeigt eine Aufsicht der fertigen Mesa mit leitfähigem Kunstharz im Elektronenrückstreubild. In **(4)** sieht man die Mesa in einer Seitansicht. **(5)** zeigt die Positionierung der Mesa auf dem Stub für den Heidelberger Hobel-Scan. Bis auf **(3)** wurden alle Bilder durch das Mikrotom-Binokular gemacht. Der sklerale Teil der Probe zeigt immer nach rechts. Maßstabsbalken: 250 µm.

dann an der Seite **A** und den beiden anliegenden Seiten 90° zu **B** abgeschnitten. Die **A** gegenüberliegende Seite wurde mit dem Glasmesser zu einer Rampe geformt (Abbildung 14).

Dann wurde die Mesa-Oberfläche mit einem Diamantmesser wieder freigelegt und die Fläche **A** parallel zu **A'** und 90° zu **B** abgetragen. Die durch den Diamantmesserschnitt entstandene glatte Oberfläche der Mesa war für die Orientierung innerhalb der Probe im SEM nötig.

Erster Scan

Der erste Scan fand am MPI für Neurobiologie in München als Kooperation mit der Abteilung für Connectomics von Dr. Moritz Helmstaedter statt. Unter Betreuung von Dr. Kevin Boergens und Anjali Gour wurde die Serie mit einem selbstentwickelten Prototypen des Schneidesystems (nach Denk & Horstmann 2004) in einem Quanta FEG 250 (FEI) SEM aufgenommen. Das Programm zur Steuerung von Schneidesystem und SEM wurde von Dr. Boergens entwickelt.

Um die Leitfähigkeit der Probe zu erhöhen, wurde die Mesa durch eine Evaporations-Bedampfung mit einem BTT-IV (Denton Vacuum, LLC) mit einer etwa 10 nm dicken Goldschicht beschichtet. Nach dem Einschleusen der Probe in die Vakuumkammer des SEM wurde diese über Nacht im Elektronenmikroskop gelassen, um sich zu akklimatisieren.

Zu Beginn wurde mit Annäherungsschnitten von 100 nm Dicke in die Mesa hinein geschnitten, bis die Probe zu erkennen war. Darauf wurde die ROI bestimmt und die Serie mit einer Schnittdicke von 30 nm gestartet. Die Messspannung betrug dabei 300 kV und es wurden 1003 Ebenen mit je 24 Einzelbildern aufgenommen. Um Störungen und Artefakte durch Pausen und einen Neustart des Schneidesystems und des EM zu unterbinden, lief der Scan (**SBFS 1**) ununterbrochen. Um über den gesamten Scan-Zeitraum (bis zu 156 Stunden) hinweg eine gleichbleibende Qualität gewährleisten zu

können und bei Schnitt- oder Scanfehlern sofort eingreifen zu können, wurde das Gerät durchgehend überwacht und betreut. Dabei wurde:

- Überprüft, ob das Gerät auch wirklich schneidet. Dafür wurden in regelmäßigen Abständen Bilder desselben Bereichs aus dem Zentrum des Schnittes verglichen.
- Überprüft, ob die automatische Fokussierung richtig funktioniert. Hierfür wurden in regelmäßigen Abständen überprüft, ob die Bilder noch scharf sind. Falls nicht wurde der Arbeitszyklus des Gerätes im Programmcode gestoppt. Dann wurde das aktuelle Bild nachfokussiert, bevor der Zyklus wieder gestartet wurde.
- Gleichzeitig wurde überprüft, ob eine ausreichende Überlappung der Einzelbilder für das anschließende automatisierte Stitching (etwa 100 px) gegeben ist.
- In regelmäßigen Abständen die bereits gescannten Bilder auf eine externe Festplatte gesichert.

Im Folgenden wurde nun der FIB-FESEM-Scan durchgeführt. Dies geschah an dieser Stelle, um maximalen Informationsgehalt in den resultierenden kombinierten Stapeln zu erhalten. Mit dem hier verwendeten Vorgehen kann im ersten Heidelberger Hobel-Scan die gesamte Retina abgebildet werden (siehe Abbildung 46.3).

Zweiter Scan

Der zweite Scan fand 6 Monate später an der selben Probe (nach der Anwendung von FIB-FESEM, siehe Kapitel 2.3.4 „Scan 2“) mit einem kommerziellen Gatan 3View Schneidesystem in einem Quanta FEG 250 (FEI) am MPI für Hirnforschung in Frankfurt statt. Der Scan geschah wieder in Zusammenarbeit mit Dr. Kevin Boergens und Anjali Gour in der Abteilung für Connectomics von Dr. Moritz Helmstaedter. Das Programm zur Steuerung von Schneidesystem und SEM war eine weiterentwickelte Version des Programms von Dr. Boergens.

Im ersten Schritt wurde die Mesa mit einem LEICA ACE 600 mit einer „dicken“ Schicht Gold besputtert, um den Block beim Anschneiden zu schützen. Es wurde einmal eine Schicht von 20 nm bei 20° Neigung aufgetragen und eine weitere Schicht von 20 nm bei 60° Neigung. Dabei rotierte die Probe durchgehend. Dies war notwendig, da davon auszugehen war, dass durch den Wechsel zwischen den Geräten trotz aller Vorsicht eine absolute Parallelität der Oberfläche zum vorherigen Scan nicht herzustellen ist. Die Probe würde damit an einer Kante oder Ecke zuerst geschnitten werden. Durch die dicke Goldschicht wird anfangs nur das Gold geschnitten, sodass kein Material aus der Probe herausbrechen oder anderweitig Schaden nehmen kann. Sobald die Mesa dann geschnitten wird, stabilisiert die Goldschicht weiterhin die Probenränder.

Als zusätzlicher Schutz wurde die Mesa im Mikrotom so orientiert, dass die stabilste Seite zuerst geschnitten wurde, das heißt die der FIB-Kerbe gegenüberliegende Seite (Abbildung 15). Die Kerbe selber war mit den scharfen Ecken und schmalen Kanten relativ instabil und

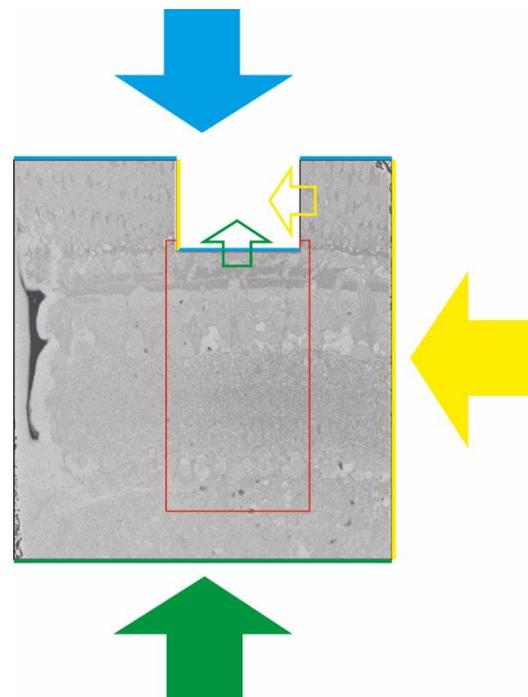


Abbildung 15: Möglichkeiten für Schnittrichtungen für den zweiten Hobel-Scan. Aus Richtung der FIB-Kerbe (**blau**) besteht das Risiko, die Anschlussstelle zu beschädigen. Ein seitliches Schneiden (**gelb**) birgt das Risiko, dass die Seiten der FIB-Kante abbrechen und die Anschlusskanten durch den orthogonalen Schnitt beschädigt werden. Die Schnittrichtung von gegenüber der FIB-Kerbe (**grün**) birgt das geringste Risiko für die ROI (**roter Kasten**).

abbruchgefährdet und somit als Schneidekante nicht geeignet. Dasselbe galt für ein Schneiden orthogonal zum FIB-FESEM-Scan. Hierbei würde die Innenkanten der FIB-Kerbe einem Abbruchrisiko ausgesetzt. Das geringste Risiko, große Teile der Probe zu verlieren, bestand bei der der Kerbe gegenüberliegenden Kante. Dies lag an der unterbrochenen und relativ schmalen Schneidefront und der Tatsache, dass die direkt an dieser der Kante anliegenden Strukturen nicht für den Scan benötigt wurden. Trotzdem kam es zu einem Materialabbruch an der FIB-Kerbe (siehe Abbildung 32.1).

Die Parameter und Abläufe für den zweiten Scan entsprachen größtenteils denen des ersten Scans. Lediglich die Abkühlzeit konnte, aufgrund des neueren Detektors, von 5 Sekunden auf 2 Sekunden reduziert werden. Zudem wurden nur 21 statt 24 Bilder für die ROI benötigt, da der sklerale Bereich der ROI des ersten Scans durch den vorhergehenden FIB-FESEM-Scan nicht mehr vorhanden war.

Während des Schneidens der 823 Ebenen stellte sich heraus, dass bereits eine Kohlenstoffschicht mit 100 nm auf der Mesa vorhanden war. Diese war beim Erstellen des Referenzsystems für das Atlas 3D des FIB-FESEM-Scans (siehe Kapitel 2.3.4 „Scan 2“) entstanden. Da die Referenzmarkierungen mehrfach erneuert wurden, war die Schicht deutlich dicker als erwartet ausgefallen. Diese Schicht hätte alleine als Schutz vor Beschädigung gereicht.

Wie erwartet, wurde die Probe leicht schräg angeschnitten. Zufällig war die Neigung der Probe derart, dass der stabilste Teil der Mesa, die der FIB-Kerbe gegenüberliegende Kante an der linken Seite, zuerst geschnitten wurde. Da dieser Anschnitts-Bereich mit den Gold- und Kohlenstoffschichten nur teilweise Gewebe-Informationen enthielten und um die weitere Bearbeitung zu vereinfachen, wurde der Scan (**SBFS 2**) digital in drei Unterstapel aufgeteilt (siehe Kapitel 3.2.2).

Dritter Scan

Zu dem Zeitpunkt, an dem die Ganglienzellschicht von der gewählten ROI gerade noch erfasst wurde (ein Resultat der gekrümmten Retina), wurde der Scan SBFS 2 beendet und ein dritter Scan **SBFS 3** gestartet. Der Scanbereich wurde dafür nach vitreal um eine Bilderreihe auf 24 Einzelbilder pro Schnitt erweitert und weitere 1280 Schnitte aufgenommen. Diese Erweiterung der Daten entlang der z-Achse garantierte, dass die gesamten Dendriten-Felder von großen Sekundärneuronen im Probenvolumen komplett rekonstruiert werden können.

Das anschließende Prozedere mit den primären Bildern (Rohdaten) ist in Kapitel 2.4.2 beschrieben.

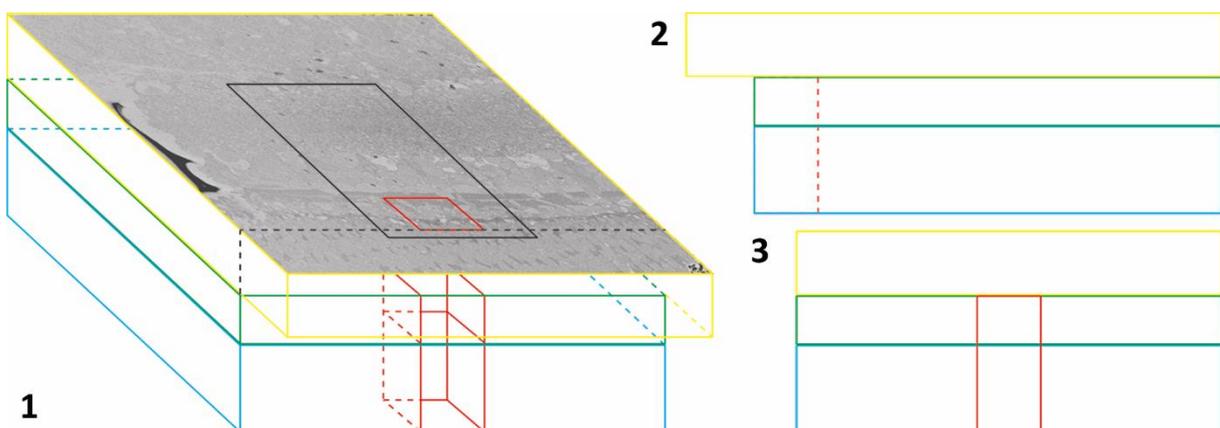


Abbildung 16: Schnittplan für die Kombination Hobel und FIB-FESEM. **(1)** Schrägansicht, **(2)** Seitenansicht und **(3)** Frontalansicht. Zuerst wird ein Hobel-Scan durchgeführt (**gelber Kasten**). Nach einem Nachtrimmen der Mesa nahe an die Terminalen der Photorezeptoren (**gestrichelte schwarze Linie**) wird der FIB-FESEM-Scan durchgeführt (**roter Kasten**). Danach folgen weitere Hobel-Scans. Einer, um die Zellen direkt im Anschluss an den FIB-FESEM-Scan verfolgen zu können (**grüner Kasten**) und einer, um die gesamten Dendriten-Felder der Sekundärneuronen zu erfassen (**blauer Kasten**). In der Schrägansicht **(1)** ist das Bild eines Ultradünnschnittes zur Orientierung in der Retina zu sehen. Die Region of Interest (ROI) für den Hobel-Scan (**schwarzes Viereck**) und für den FIB-FESEM-Scan (**rotes Viereck**) sind darauf projiziert.

2.3.4 FIB-FESEM

Die Mesa wurde mit einer 20 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft, um eine gute Oberflächenleitfähigkeit zu erhalten und die oberste Schicht der Mesa vor möglichen Strahlenschäden durch den FIB-FESEM-Scan zu schützen. Im Falle eines Einsatzes mehrerer SBFS-Methoden, würden diese

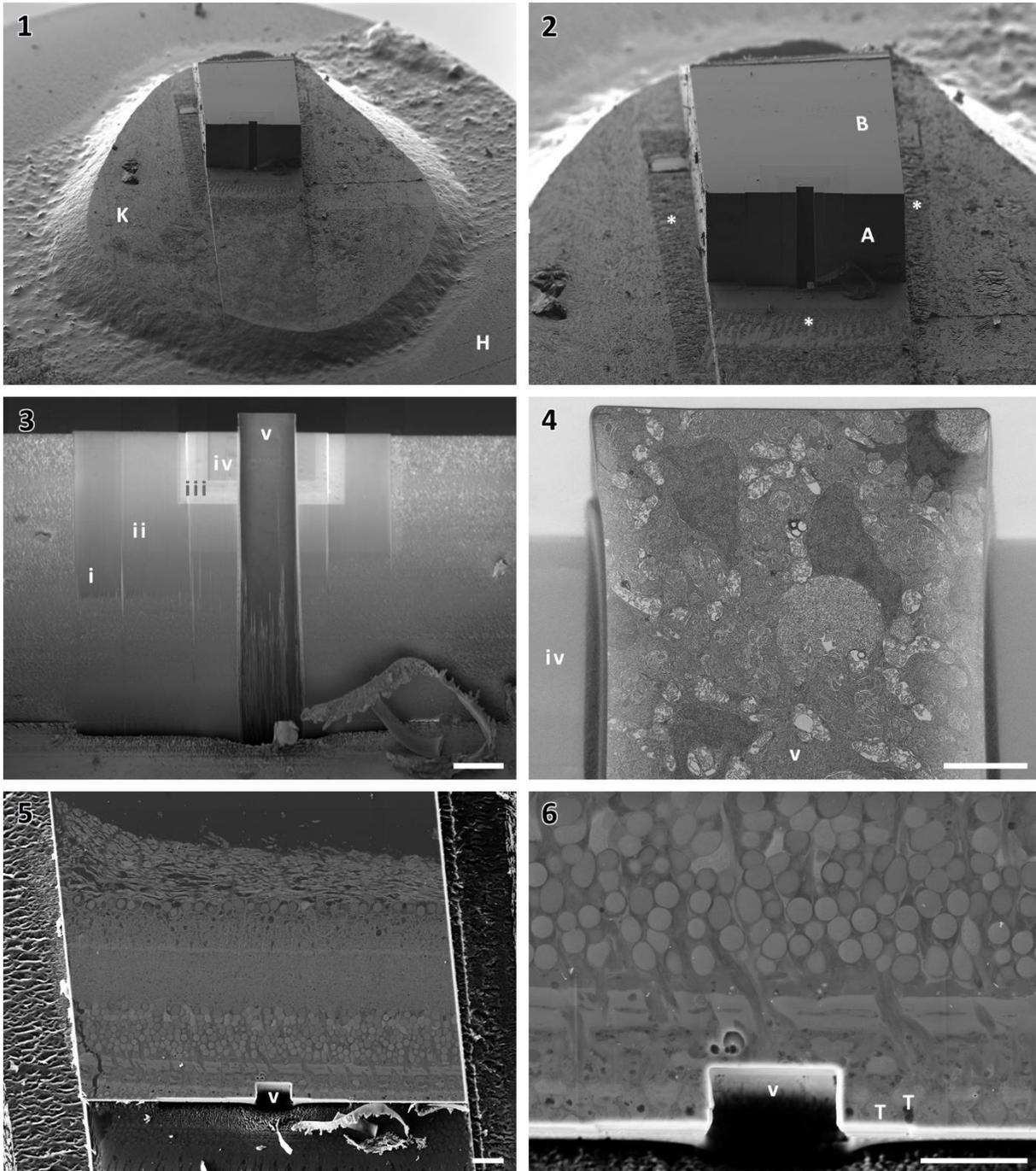


Abbildung 17: Mesa der Probe SS M02 nach dem FIB-FESEM-Scan. (A) und (B) entsprechen den Flächen aus Kapitel 2.3.1. (1) Mesa der Probe auf dem Probenhalter (H) und dem leitenden Kunstharz (K). (2) Stärker vergrößertes Bild der Mesa. Um die Mesa herum erkennt man die Schnittspuren (*) vom Abschleifen der Seiten und der Front. (3) Aufsicht der Front der Mesa mit den Spuren der Annäherungsschnitte des Ionenstrahls (i bis iv) und dem Schnittkanal (v), der beim Scannen der Bilderserie entstanden ist. (4) Vergrößerte Ansicht des Schnittkanals (v), deutlich erkennt man die Strukturen der Retina. Ansicht entspricht dem letzten Bild des FIB-FESEM Bilderstapels. (5) Aufsicht auf die Mesa. Durch den abschließenden Schnitt mit einem Diamantmesser ist im Sekundärelektronenstrahl die Schichtung der Retina gut zu erkennen. (6) Vergrößerte Ansicht der Oberfläche der Mesa mit der FIB-Kerbe (v) im Zentrum. Deutlich erkennbar ist der um die Terminalen (T) geschnittene Bereich und wie tief der FIB-FESEM-Scan in die Mesa hinein geht. Die Fläche (A) in (1) und (2) ist 203 μm breit. Der sklerale Teil der Probe zeigt immer nach unten. Maßstabsbalken in (3), (5) und (6): 20 μm , Maßstabsbalken in (4): 5 μm .

Schäden einen direkten Anschluss der Serien aneinander stark erschweren. Zusätzlich werden die Probenränder dadurch stabilisiert.

Schließlich wurde die Mesa mit ihrem Probenträger in eine Auriga FIB-FESEM Workstation mit SmartSEM® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany) eingeschleust. Mit dem Focused Ion Beam wurde zuerst die Fläche **A** glattgefräst und danach in mehreren Schritten, und mit sukzessiv kleiner werdenden Kantenlängen, in die Probe hineingeschnitten, bis der Anfang des zu scannenden Bereiches erreicht war (Abbildung 17.3). Daraufhin wurde das abwechselnde FIB-Fräsen und FESEM-Imaging gestartet. Die Stärke des Ionenstrahlstroms wurde (abhängig von der Stabilität des Kunstharzes) zwischen 50 pA und 10 nA gewählt.

Zwei 3D-elektronenmikroskopische Datenerhebungen wurden an der Auriga-Workstation durchgeführt:

Scan 1: Äußere plexiforme Schicht mit den Photorezeptorterminalen der ventrotemporalen Retina der Sardelle (für die Kombination mit ssTEM – Probe SS M02 I-I)

Als Auflösung wurden 8 nm auf der X- / Y-Achse sowie 8 nm für die Frästiefe pro Ebene gewählt, um isometrische Voxel zu erhalten. Aufgrund des guten Kontrastes konnte die Fräs- und Scan-Zeit pro Bild (2048 x 1536 px) mit etwas über 3 Minuten gering gehalten werden. Nach 37 Stunden Scan-Zeit lag ein 1332 Bilder umfassender Datenstapel vor (**FIB 703**).

Die Mesa (siehe Abbildung 17) wurde anschließend für die Herstellung der Ultradünnschnittserie (ssTEM, Kapitel 2.3.2) verwendet.

Scan 2: Äußere nukleäre und plexiforme Schicht (für die Kombination mit Heidelberger Hobel – Probe SS13 03 A5)

Die FIB-FESEM-Scan zwischen dem ersten und zweiten Hobel-Scan (siehe Kapitel 2.3.3) wurde wiederum mit der Zeiss Auriga Workstation durchgeführt, diesmal zusätzlich ausgerüstet mit dem Atlas 3D (Fibics incorporated, Ottawa, Canada) zur automatisierten Erstellung von *multi image arrays* entlang der z-Achse (Abbildung 18) und damit einer verbesserten automatischen Registrierung der Bilder.

Nach der Bestimmung des Zielbereiches in der zuletzt geschnittenen Annäherungskerbe (II in Abbildung 18) wurden Referenzmarken für die automatische Registrierung mit dem Atlas 3D (Fibics incorporated, Ottawa, Canada) System angebracht. Dafür wurde zuerst eine 50 nm dicke Platinschicht aufgedampft. In diese wurden Referenzlinien, orthogonal zur Schnittfläche, gefräst. Dann wurde eine dünne Schicht Kohlenstoff aufgebracht. Darüber wurde wiederum eine Platinschicht aufgedampft, diesmal 35 nm dick, um die Kohlenstoffschicht zu schützen und den Kontrast zu verstärken. Die gefrästen Rillen bieten durch die Kohlenstoffschicht eine gute Referenz zwischen den beiden Platinschichten (Abbildung 18.2 und 18.3).

Die fertige Bilderserie mit 1866 Ebenen wurde von Seiten des Auriga-Operators als „**FIB 1085**“ bezeichnet.

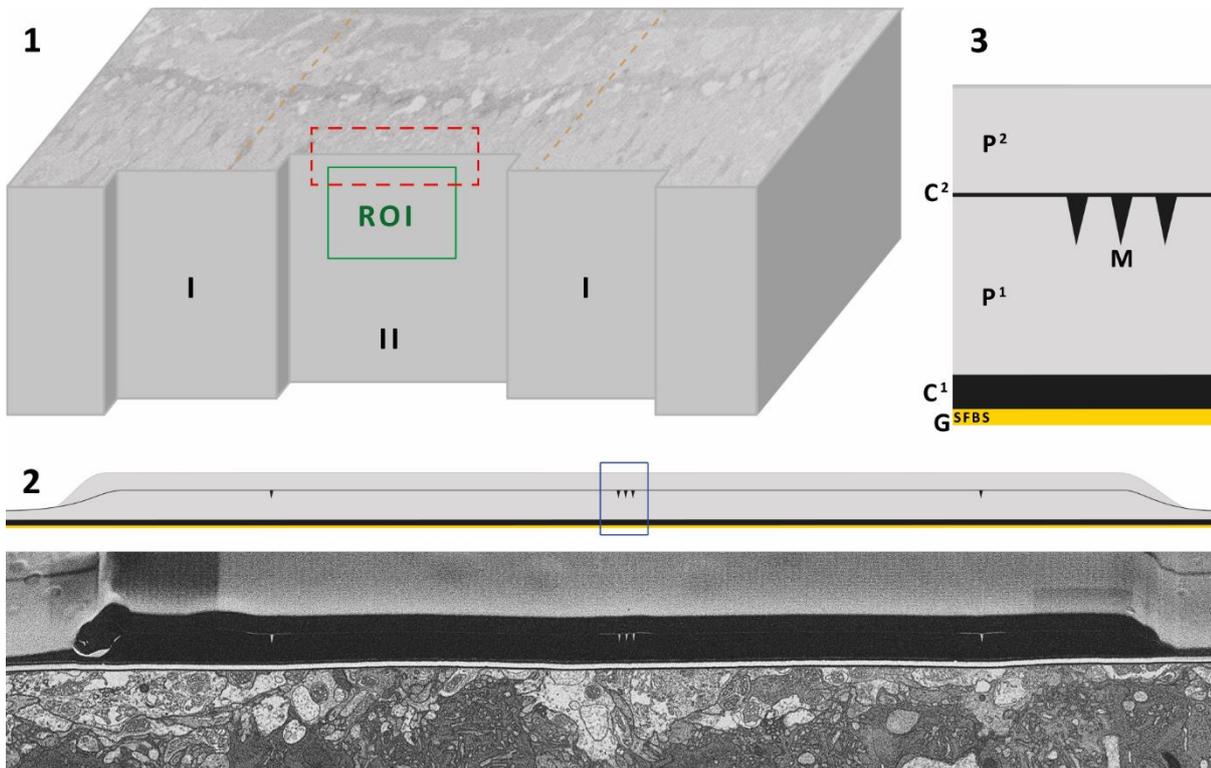


Abbildung 18: Vorarbeiten für den FIB-FESEM-Scan mit dem Atlas 3D System für die Probe SS13 03 A5. **(1)** In zwei Schritten (I und II) wurde die Front der Mesa mit dem Ionenstrahl geglättet und an die Zielebenen herangeschnitten. Nach der Auswahl des Scanfensters (ROI) wurde der Bereich für die Bearbeitung mit Atlas 3D vorbereitet. **(2)** zeigt den markierten (rot gestrichelten) Kasten aus **(1)** mit den darüber aufgebracht Referenzmarkierungen. Unten als Elektronenrückstrahlbild der Probe, darüber als graphische Übersicht. In der Übersicht werden die aufgedampften Schichten aus Gold (gelb), Kohlenstoff (schwarz) und Platin (hellgrau) visualisiert. Im unteren SEM-Bild erscheinen die Gold- und Platinschichten schwarz und die Kohlenstoffschichten weiß. **(3)** zeigt den Bereich im blauen Kasten aus **(2)** oben. Mit der Goldschicht (G^{SFBS}) aus dem vorherigen Hobel-Scan und der initial aufgetragenen Kohlenstoffschicht (C^1). Darüber liegt die erste Platinschicht (P^1), in die mit dem Ionenstrahl die im Profil dreieckigen Referenzkanäle (M) gefräst wurden. Diese wurden mit einer weiteren dünnen Schicht aus Kohlenstoff (C^2) gefüllt bevor eine weitere Schicht Platin (P^2) als Kontrast aufgebracht wurde.

2.4 Digitales Imaging

2.4.1 Aufbereitung der Rohdaten für ssTEM

Damit die durch Schneiden, Aufbringen auf die Grids und den Elektronenstrahl gestauchten und verzerrten Schnitte der ssTEM-Serie zu SS M02 einen über alle drei Raumachsen fortlaufenden Datenstapel ergeben können, müssen zuerst die Einzelbilder entzerrt und zu Gesamtbildern zusammengefügt werden. Anschließend müssen die, zueinander verzerrten Gesamtbilder aufeinander registriert werden, sodass die abgebildeten Strukturen über den gesamten Datenstapel hinweg verfolgt werden können. Man spricht hierbei auch von einer Registrierung der Bilder.

Welche der folgenden Arbeitsschritte an welchen Bildern der Serie vorgenommen wurden, kann der Tabelle „Schnittserie ssTEM“ entnommen werden (Seite 144-146).

Verzeichnung korrigieren

Verzeichnung des Elektronenstrahls

In einem Elektronenmikroskop gibt es keine Linsen aus einem physikalischen Material wie die präzise geschliffenen Glaslinsen, die man in optischen Mikroskopen findet. In Elektronenmikroskopen wird der Elektronenstrahl durch elektromagnetische „Linsen“ gesteuert. Wie Glaslinsen den Weg des

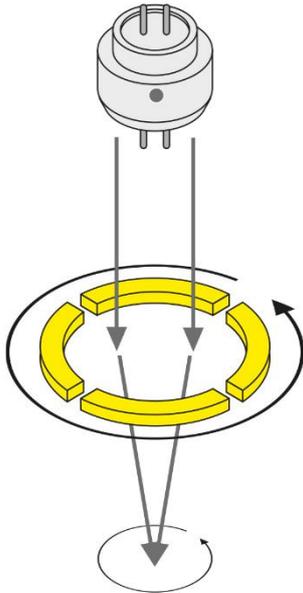


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines Elektronenmikroskops. Oben in der Säule ist der Elektronenemitter (**grau**), der einen parallelen Elektronenstrahl (**graue Pfeile**) zur Verfügung stellt. Weiter unten in der Säule sind Elektromagnetische Linsen (**gelb**). Die durch den elektrischen Strom auf Höhe der Elektromagneten eingebrachte Rotation (**schwarzer Pfeil**) bleibt im weiteren Strahlengang erhalten.

sichtbaren Lichts beeinflussen, können damit die Elektronen fokussiert oder gestreut werden. Allerdings kann eine Glaslinse immer nur den konkreten Lichtbrechungseffekt (Kaskade) ausführen, für den sie zugeschliffen wurde. Um die optischen Eigenschaften des Strahlengangs verändern zu können, müssen neue und/oder andere Linsen in das System eingebracht werden. Die elektromagnetischen Linsen des Elektronmikroskops müssen hingegen in ihren Eigenschaften angepasst werden, um so den Strahlengang des Elektronenstrahls zu modulieren. Durch den Strom, der durch die Magneten fließt, wird eine kreisförmige, im rechten Winkel zum Strahlenweg wirkende Kraft in das System eingebracht (Abbildung 19) welche beim Vergrößerungswechsel sichtbar wird. Diese Rotation ist klar von der in Kapitel 2.3.2

beschriebenen gezielten Rotation der Bilder zur Aufnahmeoptimierung zu unterscheiden.

Die Verzeichnung des Elektronenstrahls ist ein davon unabhängiges Phänomen das unvorhersehbar und für jede Einstellungskombination unterschiedlich ist. Gegebenenfalls äußert sich dies als internes Rotationsmuster (siehe Abbildung 21.3). Diese Verzeichnung fällt bei Einzelbildern nicht weiter auf, spielt jedoch für den Fall einer Kombinationen zweier nebeneinanderliegende Bilder eine große Rolle.

Die genau Ausprägung der Verzerrung ist unter anderem abhängig von der Vergrößerung, der gewählten Elektronenspannung und der gewählten Bildrotation (Kapitel 2.3.2). Da auch Faktoren wie die Strahlungsquelle eine Rolle spielen und die Verzerrung in keiner Weise symmetrisch ist, sollten bei jedem Scanvorgang neue Referenzaufnahmen gemacht werden.

Individuelles elastische Registrieren der Einzelbilder mit Hilfe von „Grated Grid“ Aufnahmen

Die Verzeichnung der Einzelbilder musste korrigiert werden, bevor diese zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden konnten. Als Referenz dienten die Bilder der „Grated Grids“ für jede verwendete Einstellungskombination (v.a. die verschiedenen Rotationen) erstellt wurde (Abbildung 21.1).

Zuerst wurde für jede Rotationseinstellung (ROT -45, ROT -30, ROT -15, ROT 0, ROT 15, ROT 30, ROT 45) eine Transformationsanweisung erstellt. Hierfür wurde zuerst in Adobe Photoshop® ein Bild mit einem idealen Gitter erstellt – wie es auf den Grated Grids zu finden ist (Abbildung 21.2). Mit Hilfe dieses idealen Gitters wurde in FIJI im Modul **bUnwarpJ** eine Landmark-basierte Transformationsanleitung erstellt. Hierfür wurde auf dem Gitter des Referenzbildes einer Rotation (**source image**) an jedem zweiten Kreuzungspunkt eine Markierung gesetzt. Auf der korrespondierenden Stelle im idealen Gitter wurde dann eine damit verknüpfte Markierung auf dem Bild des idealen Gitters (**target image**) gesetzt. Das Ganze wurde flächendeckend mit jeweils um die 490 Landmarks durchgeführt. Das Modul **bUnwarpJ** ist nun in der Lage, anhand dieser Landmarks das **source image** dem **target image** anzugleichen und dabei alle Bereiche zwischen den Markierungen, in diesem Fall linear, elastisch zu verformen. Die dem zugrunde liegende, vom Programm ermittelte Transformationsanleitung (Abbildung 21.3) wurde als .txt-Datei gespeichert. Dies wurde für jede Rotation durchgeführt. Nun konnten die Einzelbilder der ssTEM-Serie mit der Funktion **load elastic transformation** in **bUnwarpJ** direkt mit den Transformationsanleitungen ihrer jeweiligen Rotationseinstellung elastisch registriert werden.

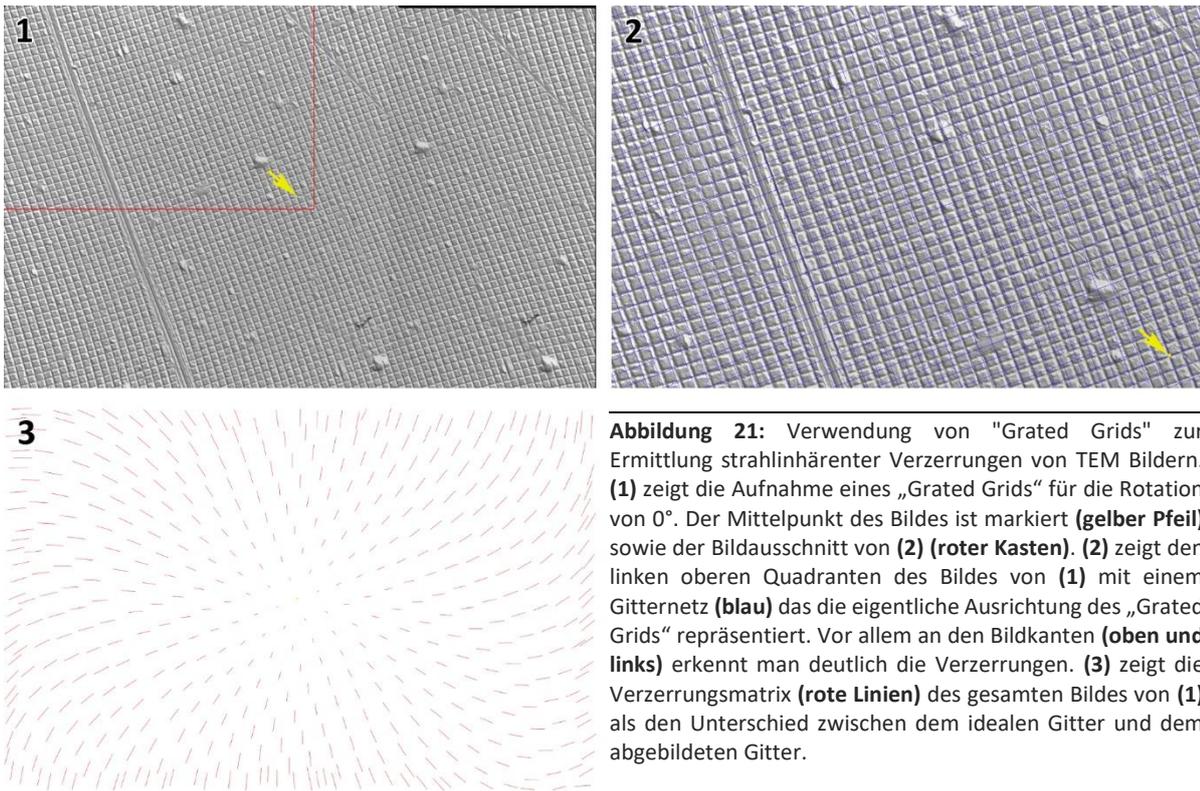


Abbildung 21: Verwendung von "Grated Grids" zur Ermittlung strahlhärer Verzerrungen von TEM Bildern. **(1)** zeigt die Aufnahme eines „Grated Grids“ für die Rotation von 0° . Der Mittelpunkt des Bildes ist markiert (**gelber Pfeil**) sowie der Bildausschnitt von **(2)** (**roter Kasten**). **(2)** zeigt den linken oberen Quadranten des Bildes von **(1)** mit einem Gitternetz (**blau**) das die eigentliche Ausrichtung des „Grated Grids“ repräsentiert. Vor allem an den Bildkanten (**oben und links**) erkennt man deutlich die Verzerrungen. **(3)** zeigt die Verzerrungsmatrix (**rote Linien**) des gesamten Bildes von **(1)** als den Unterschied zwischen dem idealen Gitter und dem abgebildeten Gitter.

Durch die elastische Entzerrung kam es an den Bildecken zu einem Verlust von Bildinformationen, da die ursprünglichen Ecken aus dem Bildformat „herausrotieren“ (Abbildung 20.1). Wenn die Überlappung von nebeneinanderliegenden Bildern in Kenntnis dieser Problematik groß genug gewählt wird, werden diese „Verluste“ in den Einzelbildern nicht auf das gestitchte Gesamtbild übertragen. Dies bedeutete auf der anderen Seite, dass eine größere Überlappung bei der Bildaufnahme gewählt werden musste und somit mehr Einzelbilder entstanden, um dieselbe Probenfläche abzudecken (Abbildung 20.2).

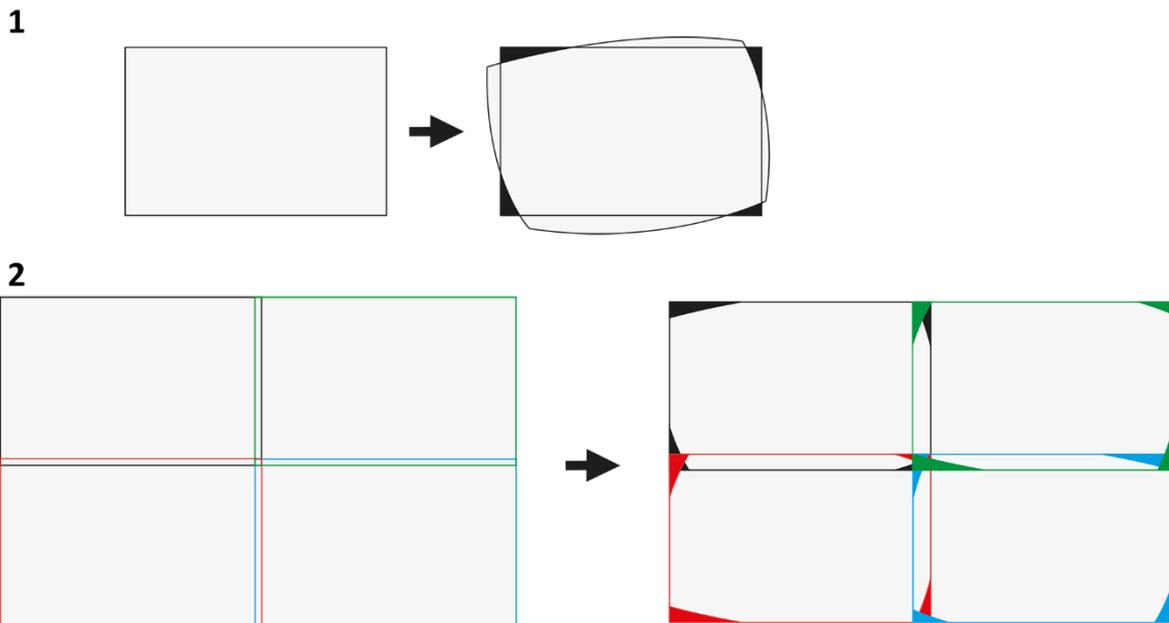


Abbildung 20: Entfernen der durch den Elektronenstrahl eingebrachten Verzerrung aus den Einzelbildern. **(1)** zeigt den Informationsverlust (schwarze Bereiche) an den Ecken durch die zirkuläre Entzerrung. **(2)** zeigt die daraus resultierende größere Überlappung, die nötig ist, um nach dem Zusammensetzen der Einzelbilder ein lückenloses Gesamtbild zu erhalten. Die Seitenverhältnisse der Bildausschnitte entsprechen denen der ssTEM-Serie.

Es verblieb jedoch eine gewisse Restverzerrung in den Bildern. Diese Unterschiede zwischen nebeneinanderliegenden Bildern wurden im nächsten Schritt in der Bildbearbeitung, dem Stitching, mit dem „Transform“-Modul von Adobe Photoshop® individuell korrigiert.

Zusammenfügen der Einzelbilder eines Schnittes

Im Gegensatz zu den automatisierten Vorgängen des Heidelberger Hobels können die Einzelbilder eines Schnittes beim ssTEM nicht automatisch zu einem Gesamtbild zusammengefügt (man spricht auch von „stitching“) werden.

Die Einzelbilder wurden im Grafikprogramm Adobe Photoshop® als einzelne Ebenen in eine Arbeitsfläche geladen. Diese wurde deutlich größer angelegt als das zu erwartende Gesamtbild. Die Einzelbilder wurden, in jeweils eigenen Bearbeitungsebenen und nach Bedarf transparent (40%), deckungsgleich an- und übereinander gelegt. Aufgrund der heterogenen Anordnungen und Formen der Nervenzellen als Referenz ist dies gut möglich.

Dank der elastischen Vorregistrierung funktionierte dies meist gut. Das Zusammenfügen der Bilder erfolgt zuerst in Reihen der Aufnahmereihenfolge folgend (Abbildung 12.3 schwarzer Pfeil) und benötigte nur kleine Nachkorrekturen wie eine Rotation eines Einzelbildes um ein paar Grad. Dies wurde mit dem **Transformation**-Werkzeug von Photoshop® durchgeführt. Bei dem anschließenden Zusammenfügen der Bilderreihen waren mehr Korrekturen nötig, um eine gute Passform der Bildern zueinander zu gewährleisten. Mit dem **Transformation**-Werkzeug von Photoshop® wurden die Bilder durch Rotation und, wenn nötig, durch die **Verzerren**-Funktion zur Deckung gebracht.

Der Grund für die Notwendigkeit dieser Korrekturen liegt wahrscheinlich in der individuellen Verzerrung der Bilder beziehungsweise Grid-Folien durch den Elektronenstrahl. Diese ist, trotz aller Sorgfalt, für jedes Bild unterschiedlich. Dafür spricht, dass die gängigste notwendige Korrektur eine Drehung des Bildes um wenige Grad war. Da es nicht praktikabel ist, für jedes einzelne Bild ein Referenzbild mit einem „Grated Grid“ aufzunehmen, konnten durch die vorhergehende elastische Registrierung nicht alle Verzerrungen herausgerechnet werden.

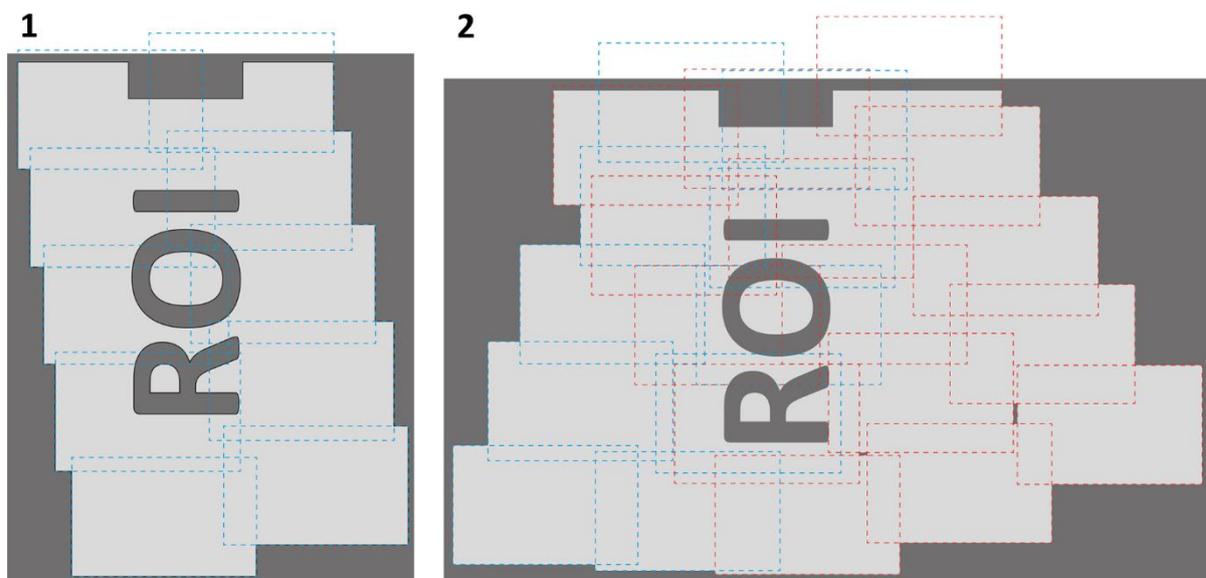


Abbildung 22: Für die weitere Bearbeitung müssen alle Gesamtbilder dieselbe Größe haben. **(1)** Dafür kann nicht die Arbeitsfläche (**dunkelgrau**) des kleinsten zusammengesetzten Bildes verwendet werden. **(2)** Es wird die Arbeitsfläche (**dunkelgrau**) ermittelt, bei der die Ausdehnung aller zusammengesetzter Bilder erfasst wird (**hellgrau**). Dabei werden auch die Extremfälle (**blaue und rote Kästen**) erfasst. Die Seitenverhältnisse der Bildausschnitte und deren Größenverhältnis zur ROI entsprechen denen der ssTEM-Serie.

Wo möglich wurden nur Teilbereiche der Einzelbilder oder der Reihen mit dem **Transformation**-Werkzeug bearbeitet. Hierbei wurde darauf geachtet, jeweils eine möglichst große Flächen zu bearbeiten, um die künstlich eingebrachten Verzerrungen auf kurzen Distanzen möglichst gering zu halten. Diese Auswahl wurde dadurch begrenzt, dass bereits zur Deckung gebrachte Bereiche nicht aus der Passung gezogen werden sollten. Um die Notwendigkeit dieser korrigierenden Eingriffe zu minimieren, sollten die Einzelbilder und die Reihen in der Aufnahmereihenfolge zusammengefügt werden. In der Aufnahmereihenfolge wurde von Bild zu Bild nur wenig am Elektronenstrahl umgestellt. Dadurch sind die Veränderungen des Elektronenstrahls so klein wie möglich und die Verzerrungsunterschiede zwischen den Bildern gering. Zusätzlich hilft es, wenn eine Stitckante der einen Reihe nicht auf die Stitckante der Nachbarreihe trifft (Idealfall siehe Abbildung 22.1). An diesen Kanten sind die individuellen Verzerrungen nach der Bearbeitung am größten. Ein unveränderter Bildbereich als Referenz hilft zudem, eingebrachte Veränderungen an den Rändern der Bilder der anliegenden Reihe zu kompensieren.

Abschließend wird ermittelt, wie groß die Hintergrundfläche sein muss, damit alle gestitchten Gesamtbilder darauf passen würden (Abbildung 22.2). Dafür wurden die Gesamtbilder mit der größten Fläche übereinandergelegt. Als Registrierungsreferenz konnte im vorliegenden Fall der rechteckige Ausschnitt des vorausgegangenen FIB-FESEM-Scans verwendet werden. Wenn diese auf den Bildern fehlte, wurden große Strukturen als Referenz verwendet, die idealerweise die gesamte Bildserie durchziehen. Die Arbeitsfläche aller Gesamtbilder wurde dann auf die ermittelte Größe von 10000 x 17000 px gebracht. Als Hintergrund wurde ein Mittelgrau (RGB = 128) gewählt.

Es hat sich retrospektiv herausgestellt, dass zu diesem Zeitpunkt noch unklar ist, wie sehr die Gesamtbilder durch die vorangegangenen Einflüsse relativ zueinander verzerrt wurden. Dennoch muss, bei Erhaltung von möglichst vielen Bildinformationen, die kleinstmögliche Zuschnittsgröße gefunden werden, um mit den Daten in den nachfolgenden Schritten noch gut arbeiten zu können. Die großen Datenmengen der Gesamtbilderserie strapazieren in den nächsten Arbeitsschritten den RAM der Computer deutlich, was zu erhöhtem Zeitaufwand führt. Bei der Minimierung der Datenmenge sollten zu diesem Zeitpunkt noch keine Informationen verloren gehen.

Risse flicken

Das Stitching fand vor der Korrektur der Risse (Abbildung 23) statt, da nicht gewährleistet werden kann, dass die Risse immer nach den gleichen Parametern „geflickt“ werden, wenn dies schon auf der Bearbeitungsebene der Einzelbilder passiert. Wahrscheinlich würde dies zu unterschiedlichen Korrekturverzerrungen führen, die während des Stitching-Prozesses dann nachkorrigiert werden müssten. Da die Risse ein makroskopisches Problem sind, das vor der Bildaufnahme entsteht, kann man sich den Mehraufwand sparen und die Risse erst in den Gesamtbildern flicken. Sie müssen jedoch auf jeden Fall korrigiert werden, da die folgenden elastischen Registrierungen die informationsfreien Flächen der Risse nicht verarbeiten können. Jeweils im nächsten Bild, mit dem das aktuelle Bild bei diesen Registrierungen verglichen wird, findet sich nie der selbe Riss. Dies hindert die entsprechenden Programme daran, die Schnitte zur Deckung zu bringen.

Die schnellste Methode für kleine Serien (wenige 100 Ebenen) ist dabei das händische Schließen der Risse in einem Grafikprogramm. Bei Rissen, die den gesamten Schnitt von einer Seite zur anderen überspannen, wurden die beiden Hälften in zwei „Ebenen“ unterteilt und der Riss durch das Verschieben einer der Ebenen geschlossen. Für Risse, deren Enden innerhalb des Bildes sind, musste anders vorgegangen werden: Hierfür wurde das **Transformation**-Werkzeug von Adobe Photoshop® verwendet. Dabei wird eine Seite des Risses der anderen angepasst. Es wurde mit dem **Auswahl**-Werkzeug ein möglichst großer Bereich gewählt, damit die durch diese Methode eingebrachten Verzerrungen auf einen möglichst großen Bereich verteilt werden und feine Strukturen in der Nähe

des Risses nur minimal verändert werden. Diese große Bereiche können durch die folgende elastische Registrierung besser korrigiert werden.

Trotzdem ist es wichtig, so wenig weitere Veränderungen wie möglich einzubringen. Die Risse bestehen nicht aus glatten Schnitten durch das Gewebe. Vielmehr reißt der Ultradünnschnitt entlang von Zellgrenzen. Dies ergibt eine mehr oder weniger zerklüftete Risskante. Dabei lässt sich die „Ausgangssituation“ des Gewebes vor dem Riss meist gut erkennen (Abbildung 23.2). Dieser lässt sich idealerweise mit einem einzelnen Transformationsvorgang schließen. In einigen Fällen sind jedoch mehrere Schritte nötig. Dies ist der Fall, wenn: (1) Der Riss durch Kräfte in mehrere Richtungen entstanden ist (Abbildung 23.3) oder (2) es sich um ein System aus mehreren Rissen handelt. Hier ist

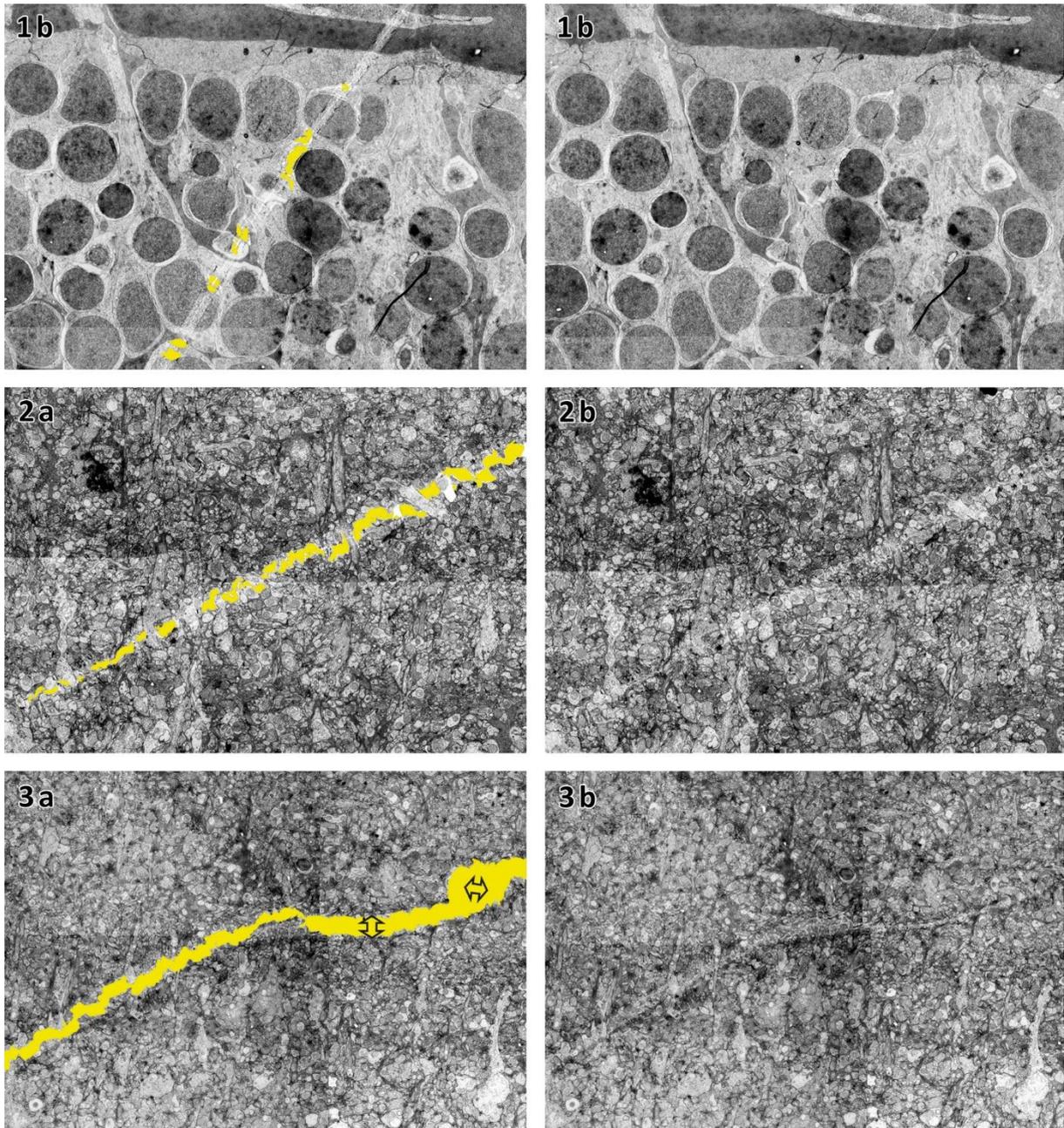


Abbildung 23: Korrektur von Rissen in den Schnitten. (a) zeigt die Form der Risse (gelb) und (b) den Zustand nach der Korrektur mit dem Transformation-Werkzeug von Adobe Photoshop®. Es sind verschieden starke Ausprägungen von Rissen zu sehen. In (1) ist das Gewebe gestreckt und es sind vereinzelte Risse zu erkennen, bei (2) ist der Riss deutlich zu erkennen aber es gibt noch vereinzelte Gewebebrücken. (3) zeigt einen kompletten Riss ohne Brücken. An der großen Rissfläche auf der rechte Seite erkennt man zudem den Einfluss von mehr als einer Krafrichtung (Pfeile).

eine einzelne Transformation nicht ausreichend. Meist sind mehrere Transformmasken anzulegen um die Risse „zu schließen“. Dies ist ungünstig da es zu einer wiederholten Verzerrungen einzelner Strukturen kommen kann. Aber ein möglichst lückenloser Verschluss des Risses ist essenziell, um weitere Korrekturverfahren überhaupt anwenden zu können.

Zusätzlich wurden in diesem Arbeitsschritt alle, durch elektrische Aufladungen entstandenen, schwarzen (255) Bereiche mit dem **Wand-Tool** (Toleranz 0) ausgewählt und gelöscht. Dies ist notwendig, da derart dunkle Grauwerte, die nichts mit dem Gewebe der Schnitte zu tun haben, die Kontrasterkennung von automatisierten elastischen Registrierungen stark beeinflussen würden.

Elastische Registrierung der Gesamtbilder

Bei einer normalen oder auch „linearen“ Registrierung (auch Alignierung genannt) werden die Bilder nur zueinander verschoben und skaliert, um zwei Bilder zur Deckung zu bringen. Bei einer elastischen Registrierung werden verschiedene Bildbereiche unterschiedlich stark gestreckt oder gestaucht. Die Länge, über die eine elastische Registrierung von einem Referenzbild aus zu benachbarten Bildern einer Schnittserie durchgeführt werden kann, ist begrenzt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt summieren sich kleine Fehler in der Registrierung so stark auf, dass die Ergebnisse nicht mehr zu verwenden sind. In der vorliegenden, sehr großflächigen, Serie war dieser Punkt bei etwa 60 Bildern erreicht.

Zusätzlich kam bei der vorliegenden Bilderserie hinzu, dass die Verzerrungen der ursprünglichen Bilder so stark sind, dass nach 55 Bildern (in eine Richtung) ein zunehmend großer Bereich an den Bildrändern nicht mehr in der ROI liegt. Damit war eine Registrierung über Landmarks an diesen Stellen unmöglich. Bei 50 Bildern Abstand zum Referenzbild war die Registrierung noch gut. Deswegen wurde aus der 140 Bilder langen Serie eine lückenlose Teilserie mit 100 Bildern ausgewählt.

Beim erneuten Annähern (aufgrund einer neuen Schneide-Session) für Schnitt # 028 an das Messer erneut kam es zu einem Verlust von 1 bis 2 Schnittdicken und die Schnitte # 029 bis # 032 wurden nicht auf der gesamten ROI geschnitten. Da dies alles die Strukturerkennung für eine Landmark-Registrierung sehr erschwert und eine lückenlose Serie für die 3D-Rekonstruktionen zu bevorzugen ist, wurde die Schnittserie von Schnitt # 037 bis # 137 für die weitere Bearbeitung verwendet (siehe Tabelle „Schnittserie ssTEM“, Seite 144).

Für eine (elastische) Registrierung einer Bilderserie müssen die folgenden Voraussetzungen hergestellt werden: (1) Die Bilder müssen alle gleich groß sein, damit die Koordinaten bei beiden Bildern übereinstimmen können. (2) Die gewählte Bildgröße muss groß genug sein, dass auch die extremen Verzerrungen herausgerechnet werden können und die Gesamtbilder trotzdem noch in die Arbeitsfläche passen (siehe „Zusammenfügen der Einzelbilder eines Schnittes“). (3) Die Bilder müssen so klein wie möglich sind, um die Rechenzeiten gering zu halten.

Landmark-Registrierung (elastisch)

Die Landmark-Registrierung ist eine Unterkategorie der elastischen Registrierung. Hierbei werden auf zwei hintereinanderliegenden und zueinander verzerrten Bildern sogenannte Landmarks gesetzt. Dabei ist ein Bild die Referenz, das **target image**, auf welches das zweite Bild, das **source image**, registriert wird. Die Landmarks werden dann automatisiert zur Deckung gebracht und dabei die Bildbereiche zwischen den Markierungen unterschiedlich stark gestreckt oder gestaucht. Deswegen spricht man auch hier von einer elastischen Registrierung. Für die vorliegende ssTEM-Serie wurde die Landmark-Funktion im Modul TrakEM2 von FIJI verwendet.

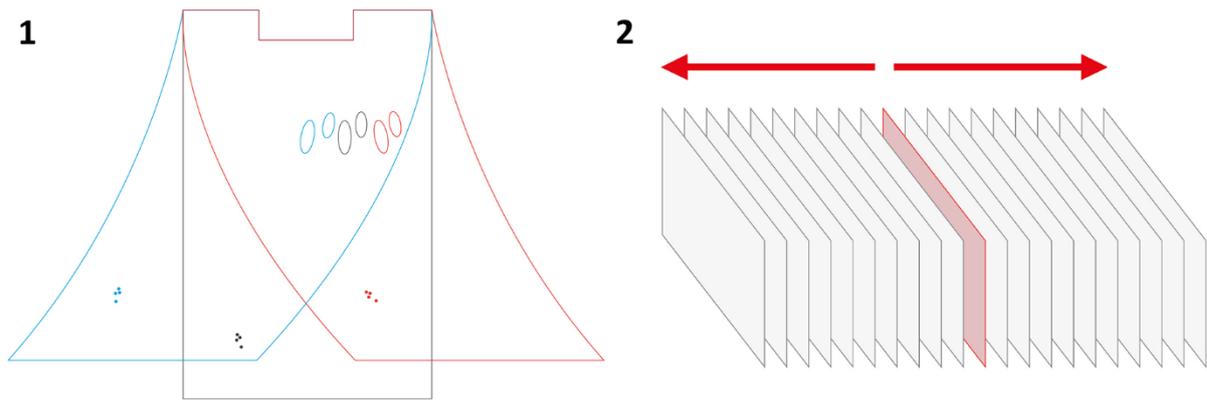


Abbildung 24: (1) Ausgangslage vor der elastischen Landmark-Registrierung (schematisch). Ausgehend von einem Referenzbild (**dunkelgrau**) sind die Bilder in Extremfällen (**rot und blau**) derart verzerrt, dass eine automatische Registrierung Strukturen (**Ovale oben und Punkte unten**) nicht über mehrere Schnitte verfolgen kann, da diese, durch die Verzerrung, zu weit auseinander liegen. (2) vom Referenzbild (**rot**) aus wird die Serie in beide Richtungen auf das direkt benachbarte Bild registriert.

Die Landmark-Registrierung ist bei der ssTEM-Serie notwendig, da die Schnitte zum Aufnahmezeitpunkt bereits deutlich verzerrt waren und die bisherigen Schritte dies nicht korrigiert haben. Die Feststellung dieses Umstandes war jedoch erst möglich, nachdem eine automatisierte elastische Registrierung keine brauchbaren Ergebnisse liefern konnte. Eine genauere Überprüfung des gesamten Bilderstapels ergab, zusammen mit einer stichpunktartigen ausgeführten Landmark-Registrierung, dass es eine erhebliche Verzerrung der Ultradünnschnitte gab (Abbildung 24.1). Die Landmark-Registrierung ist in diesem Fall eine Vor-Registrierung der Gesamtbilder, um überhaupt eine automatisierte elastische Registrierung durchführen zu können.

Die vorherrschende Ansicht mit der Verzerrung im unteren Bereich der Gesamtbilder basiert – bei der vorliegenden Arbeit – darauf, dass die vor der Erstellung der ssTEM-Serie geschnittene „FIB-Kerbe“ als Referenzstruktur und als „oben“ definiert wurde. Sie bildet ein einfaches und eindeutiges Merkmal, das über alle Schnitte gleich ist.

Die Landmarks wurden dabei auf Strukturen gesetzt, die in den beiden Bildern deckungsgleich sein sollten. Jede Markierung hat ein Äquivalent im anliegenden Bild und muss an der relativ selben Stelle sitzen. Hierzu bieten sich das Zentrum von Dendriten, Zellmembran-„Kreuzungen“ oder noch besser Schnittkanten, wie die FIB-Kerbe, an. Alle Merkmale außer der FIB-Kerbe mussten für jeden Vergleich zwischen zwei Schnitten neu gewählt werden. Ansonsten würde die Annahme gemacht, dass eine Struktur genau im rechten Winkel zur Schnittebene durch die Probe läuft. Vergleichbar mit der Registrierung einer Banane. Wenn man nur die runden Anschnitte hat ist die naheliegendste Anordnung, immer den Mittelpunkt übereinander zu legen. So wird die Banane am Ende aber gerade. Die Landmarks müssen deswegen sorgfältig und für jedes Bilderpaar neu gewählt werden.

Für eine Landmark-Registrierung wird zudem immer ein zentrales Referenzbild benötigt. Dieses fungiert letztendlich als Registrierungs-Referenz für die gesamte Serie (Abbildung 24.2). Das Referenzbild selber bleibt unverändert. Jedes fertig registrierte Bild wird dann zum Referenzbild für das nächste Bild. Für das ursprüngliche Referenzbild gibt es einige Kriterien:

- Das Referenzbild sollte, im Verhältnis zum Großteil der Bilder des Stapels, möglichst unverzerrt sein. Hier hilft nur ein sorgfältiges Überprüfen der gesamten Bilderreihe. Ob das richtige Bild gewählt wurde ist erst klar, sobald einige Bilder in beide Richtungen registriert wurden.
- Das Referenzbild sollte möglichst in der Mitte des Bilderstapels liegen, da sich bei jeder Art der elastischen Registrierung bei jedem Einzelschritt kleine Fehler einschleichen, die sich mit zunehmendem Abstand zum ursprünglichen Referenzbild aufsummieren und verstärken.

Die Verwendung mehrerer Referenzbilder wäre sinnvoll um ein aufsummieren von Fehler zu unterbinden, war aber mit der Landmark-Methode in FIJI nicht machbar. Das Ergebnis wären mehrere Bilderstapel, die an ihren Endbildern nicht zueinander-passen. Somit wurde für die eine zu registrierende Bildserie das Bild # 65 als Referenzbild ausgewählt.

Konkret wurde als Programm für die Landmark-Registrierung FIJI mit dem Modul TrakEM2 (Cardona et al. 2010) verwendet. Zunächst wurden im *target image* und im *source image* etwa 80 – 100 Markierungen pro Bild gesetzt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Landmarks über das gesamte Bild geachtet. TrakEM2 berechnete dann die Transformationsanleitung, um die Markierungen zur Deckung zu bringen, und gab das registrierte „source image“ als .tiff-Datei aus. Dieser Vorgang benötigte für die verwendete Anzahl an Landmarks und die gewählten Einstellungen („mono“) etwa 20 bis 30 Minuten für das Setzen der Landmarks und etwa 10 Minuten für die elastische Registrierung pro Bild.

In einigen Fällen konnten einzelne Bilder aufgrund von Fehlerstellen (Risse, Dreck, Kontrastprobleme) nicht als *target image* verwendet werden. Dann wurde jeweils das nächste Bild der Reihe als *target image* verwendet. Das *target image* darf im vorliegenden Fall maximal 4 Bilder vom *source image* entfernt sein, damit die Landmark-Registrierung verwendbare Ergebnisse liefert (siehe auch Tabelle „Schnittserie ssTEM“, Seite 144).

Zum Abschluss wurden die nun vorregistrierten Bilder auf 8000 x 14500 px zugeschnitten. Wie schon zuvor wurde versucht, die Datenmenge möglichst klein zu halten, um die folgenden Abläufe, Berechnungen sowie das Laden und Speichern der Bilder zeitlich kurz gestalten zu können. Auch kann es bei längeren Berechnungs- und Ladezeiten eher zu einem Programmfehler und damit zu einem Abbruch des Gesamtvorgangs kommen. Bei der Bestimmung dieser Arbeitsflächengröße wurde das Referenzbild hinzugezogen und etwas Puffer (100 px pro Kante) hinzu gegeben. Diesmal kam es beim Zuschnitt allerdings zu Strukturdaten-Verlusten (Abbildung 25). Da diese Bereiche aber außerhalb des für die 3D-Rekonstruktion ausgesuchten Bereichs lagen und die benachbarten Schnitte keine Bilddaten an derselben Stelle hatten, war dies vertretbar. Zudem würden die, nach allen vorangegangenen Bearbeitungsschritten sehr unregelmäßigen, Außengrenzen der Gesamtbilder eine automatische elastische Registrierung erschweren.

Automatisierte elastische Registrierung

Bei einer automatisierten elastischen Registrierung berechnet das Programm alle möglichen Anpassungsmöglichkeiten zweier Bilder zueinander, um die beste Überlappung zu finden. Es werden dabei auf Kontrastbasis Strukturen erkannt und diese zwischen den beiden Bildern zur Deckung gebracht. Für diese elastische Verzerrung

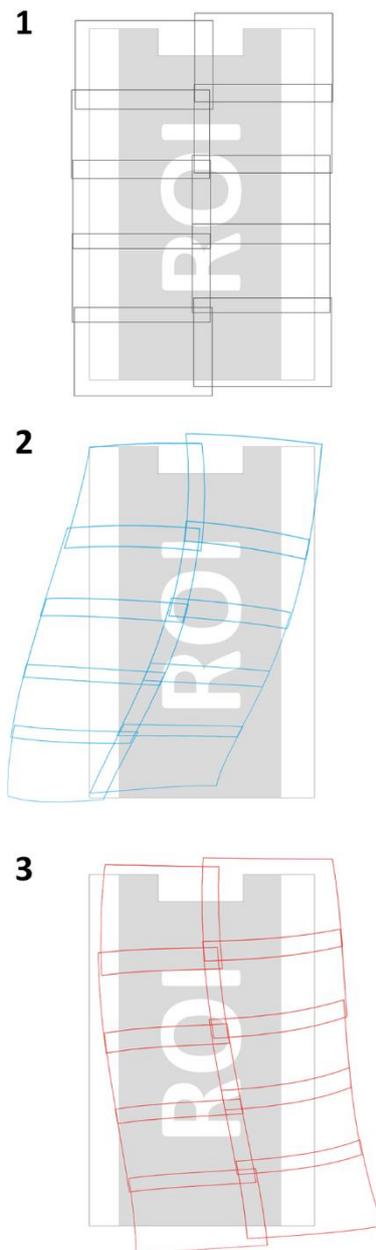


Abbildung 25: Zuschnitt der Bilder nach der elastischen Landmark-Registrierung. Hierfür wird am Referenzbild (1) die ROI gewählt. Dieser Ausschnitt wird dann bei allen Bildern beibehalten (2 und 3), unabhängig von Verlusten an Bildmaterial. Die Umrisse der gestitchten Gesamtbilder mit ihren Einzelbildern sind als Gitter dargestellt (schwarze, blaue und rote Kästen) Die relativen Seitenverhältnisse der Bildausschnitte und deren Größenverhältnis zur ROI entsprechen denen der ssTEM-Serie.

werden nicht nur die benachbarten Bilder herangezogen, sondern bis zu 20 umliegende Bilder.

Die erkannten „Strukturen“ sind hierbei die Grauwerte in einem vorher fest definierten Radius um jeden Pixel des Bildes herum. Dabei sind ein paar Aspekte wichtig:

- Die Bilder sollten möglichst wenig „künstliche“ harten Kanten aufweisen. Der Algorithmus arbeitet auf Basis von Kontrastunterschieden und deren Stärke. Zusammengesetzte Bilder sowie längere Bilderserien weisen jedoch oft methodisch bedingte Kontraste auf, die einen starken Einfluss auf das Ergebnis der elastischen Registrierung haben können. Die Ränder der Einzelbilder und der des Gesamtbildes (sollte dieser sich nicht mit dem Rand der Arbeitsfläche decken) sind ein Beispiel. Oft werden die eigentlich interessanten Strukturen, wie zum Beispiel Zellumrisse, im Vergleich dazu in der Gewichtung des Programms als weniger relevant eingestuft. Als Folge dessen wird die Bildserie dann, zum Beispiel, auf die Ränder der Einzelbilder registriert und nicht auf die wissenschaftlich relevanten Zellumrisse. Dies kann vermieden werden, indem: (1) möglichst wenige Bildränder und möglichst wenig informationsfreier Hintergrund auf den Bildern vorhanden sind. (2) Der Hintergrund in einem auf der Gradationskurve des Bildes basierenden Mittelgrau gehalten wird.
- Innerhalb der Bildserie sollte es keine zu starken Schwankungen des Kontrasts und der Grauwertausnutzung geben. Unterschiedliche Kontraststärken und Durchschnittsgrauwerte zwischen aneinander liegenden Bildern beeinträchtigen die Mustererkennung. Das ist bei „voll-automatisierten“ Systemen wie Hobel oder FIB-FESEM kein Problem, da sowohl der Probenblock einheitlich durch-kontrastiert ist, als auch die Aufnahmebedingungen der Bilder immer gleich sind. Bei der Ultradünnschnittkontrastierung kommt es jedoch immer wieder zu unterschiedlich starken Kontrastierungen. Dementsprechend muss bei der Bildaufnahme im Rahmen der Möglichkeiten nachjustiert werden. Zudem kann es durch unterschiedlich lange Strahlverweildauern bei der ROI-Suche und Einstellung von Vergrößerung, Rotation und Schärfe zu verschiedenen starken Ausbleichungen des Hintergrundes kommen. Um diese Effekte bei der automatisierten elastischen Registrierung möglichst klein zu halten, wurden zuvor alle Bilder der Serie in Adobe Photoshop® auf den selben Kontrastgrad und die selbe Bildhelligkeit gesetzt. Außerdem wurde über eine Einstellung der Gradationskurve für jedes Bild das Grauwertspektrum maximal ausgenutzt.
- Der Datenstapel sollte bereits voraligniert sein, damit die selben Strukturen auf benachbarten Bildern physikalisch nicht zu weit voneinander getrennt liegen. Zwar kann der „Suchbereich“ des Algorithmus beliebig groß eingestellt werden, jedoch steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit von Fehlzuordnungen. Es gibt immer wieder ähnliche Strukturen (z.B. Dendriten) in Nervengewebe, die als „gleich“ erkannt werden könnten. Je kleiner der eingestellte Suchradius ist, umso geringer die Chance einer Fehlerkennung.

Der Grad an Elastizität und der Radius für Verschiebung von Bildteilen kann dabei eingestellt werden. Primär fanden aber die voreingestellten Modelle Anwendung. Die wenigen individuellen Einstel-

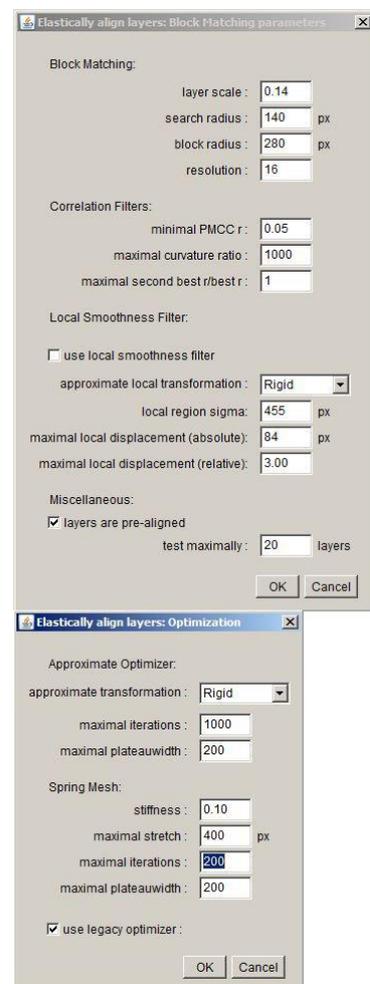


Abbildung 26: Parametereinstellung für die automatisierte elastische Registrierung mit TrakEM2 in FIJI.

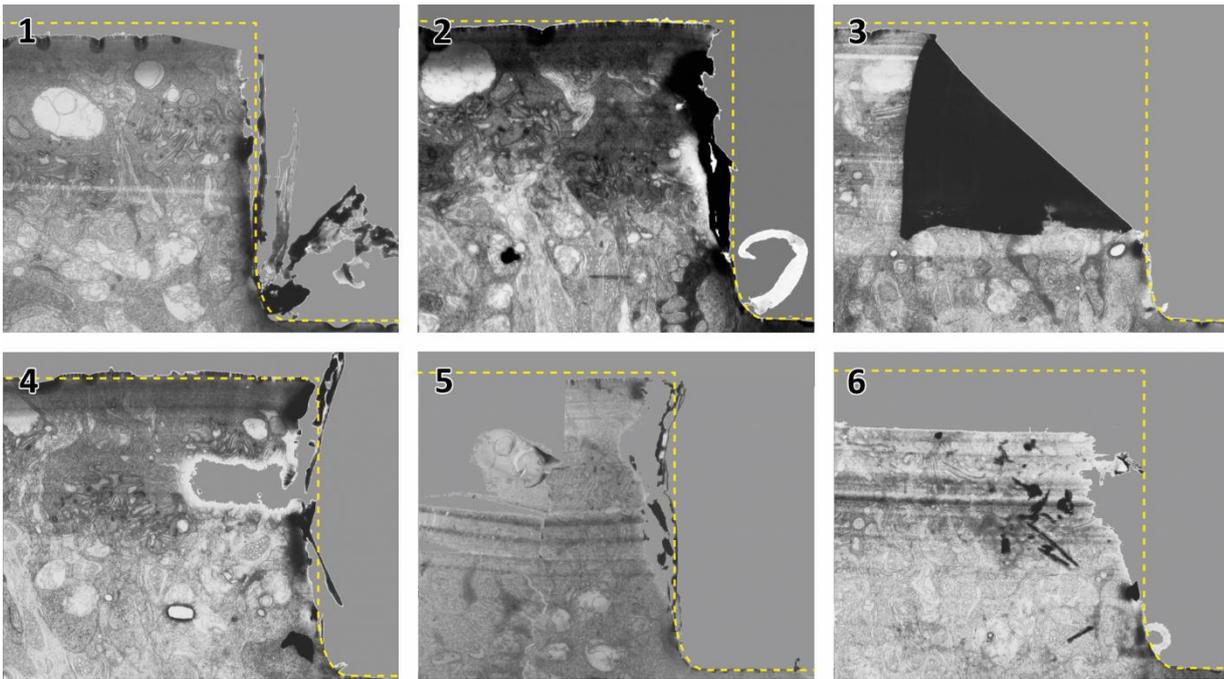


Abbildung 27: Beschädigungen der Kanten der FIB-Kerbe durch den Schneideprozess. Ursprünglich sind die Kanten gerade und im rechten Winkel zueinander (**gelbe Linien**), wie am Beispiel des Referenzbildes (**2**) zu sehen. Tatsächlich kam es jedoch zu Ausfransungen (**1**), Umklappen von Schnittteilen (**3**), Rissen (**4**) bis hin zu Verlusten (**5**) und zu Delaminierungen (**6**). Zu erkennen sind auch die durch den Hitzeintrag des FIB entstandenen Verdunklungen mit Kontrastabschwächungen an den Rändern (**schwarze Bereiche**).

lungen (Abbildung 26) wurden in Vorversuchen (Scheungrab 2012) ermittelt und an den aktuellen Bilderstapel angepasst.

Die ssTEM-Serie ließ ausreichend gut automatisch registrieren, vor allem im Bereich der inneren plexiformen Schicht. Auf Höhe der äußeren plexiformen Schicht kam es durch die Schnittkanten der FIB-Kerbe zu gelegentlichen Fehlregistrierungen. Dies lag an der hohen Variabilität in der Form der Kerbe (Abbildung 27) durch Umklappen von Kanten, Ausfransen und durch Risse. Zudem gab es am Schnitttrand des FIB-FESEM-Scans starke Kontrastunterschiede im Gewebe. Diese waren eine Folge des hohen Energieeintrags beim FIB-FESEM-Scan, der zu Aufladungen und zu Denaturierungen des Gewebes geführt hat.

Vereinzelt kam es trotz aller Vorarbeiten zu signifikanten Fehlern während der automatisierten Registrierung. Um dies zu kompensieren musste, vom letzten gut elastischen alignierten Bild ausgehend, die „Lücke“ mit einer elastischen Landmark-Registrierung überbrückt werden. Hierfür wurden diesmal mehr (+50%) Einzellandmarks als in der vorangegangenen Vor-Registrierung benötigt, um den aus dem automatisierten Verfahren hervorgehenden Ergebnissen zumindest nahe zu kommen.

Am Ende des dreistündigen Berechnungsprozesses der automatischen elastischen Registrierung durch TrakEM2 konnten die 100 aufeinander registrierten Schnitte als TIFF-Bilderserie exportiert werden.

Vorarbeiten für Amira®-Rekonstruktion

Zuschnitt und Aufteilung

Bevor mit der Segmentierung im Rekonstruktionsprogramm (siehe Kapitel 2.4.3 „Segmentierung in Amira“) begonnen werden kann, mussten die Bilderstapel erneut zugeschnitten werden. Der Grund hierfür sind wiederum die große Datenmenge, die schon eines der gestitchten Gesamtbilder hat, geschweige denn eine ganze Bildserie (siehe Tabelle „Datengrößen Imaging“). Am Beispiel der ssTEM-Serie dieser Arbeit sind das zwischen 105 und 250 MB pro Gesamtbild und 11,4 GB für die Serie.

Um möglichst keine Informationen zu verlieren, wird die Region of Interest unter Berücksichtigung aller Bilder des Datenstapels so eng wie möglich definiert und die restlichen Bildinformationen, zumindest für die folgende 3D-Rekonstruktion, verworfen (Abbildung 28). Die unbeschnittenen Gesamtbilder werden für den Fall, dass doch wichtige Strukturen außerhalb des gewählten Rekonstruktionsvolumens vorhanden sind, aufgehoben.

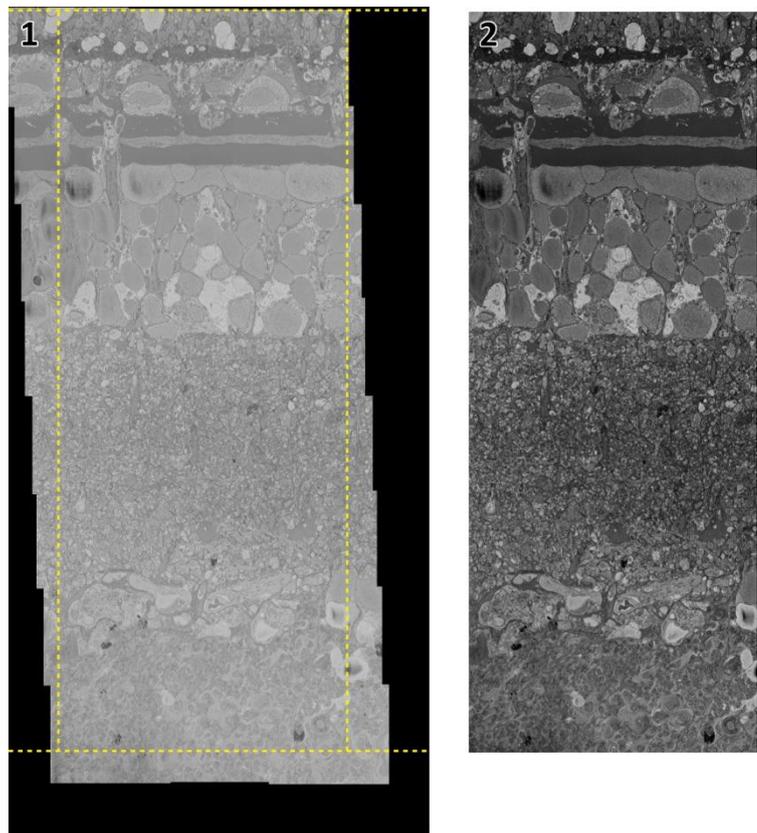
Tabelle "Datengrößen Imaging" Gesamtgröße der Bilddaten verschiedener Arbeitsschritte während des Imaging-Prozesses für ssTEM (100 Schnitte) sowie SBFS 1 (1003 Schnitte) und SBFS 2-2 (714 Schnitte) vom Heidelberger Hobel in GB. Für die automatische Registrierung von SBFS 2-2 wurde ein eigenes Dateiformat verwendet, das vor dem Zuschnitt in das schwächer komprimierte TIFF-Format umgewandelt wurde.

	ssTEM	Heidelberger Hobel	
		SBFS 1	SBFS 2-2
Rohdaten Einzelbilder	11,5	81,6	50,8
Einzelbilder (Rotation korrigiert)	11,5	-	-
Gesamtbilder (mit Ebenen)	21,9	-	-
Gesamtbilder (Risse korrigiert)	11,4	-	-
Vorregistrierung (Landmark)	12,5	-	-
Zuschnitt (vor automatischer Registr.)	9,9	-	-
Automatische Registrierung	9,9	121	44,7
Zuschnitt (nach automatischer Registr.)	7,9	58,4	48,9
Amira (Bilderstapel)	7,0	55,0	50,0
Amira (Labelfields)	0,1	1,4	1,3

Das für die 3D-Rekonstruktion verwendete Programm Amira® benötigt mindestens die doppelte Menge an RAM der eigentlichen Datengröße des Bilderstapels (undo-buffer). Die zur Verfügung stehende RAM-Ausstattung auf den Arbeitsrechnern waren zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit 64 GB. Mehrere Versuche bezüglich der Bearbeitbarkeit verschieden großer Bilderstapel ergaben, dass es keinen Sinn macht, Bilderserien zu verwenden, die größer als 20 GB sind. Selbst bei dieser Datengröße machen sich bereits Verzögerungen im alltäglichen Gebrauch der Software bemerkbar, die auf der Lesegeschwindigkeit des RAM basieren.

Eine Alternative zum Zuschnitt, und damit Verlust von peripheren Informationen, ist das Unterteilen der Bilderstapel in mehrere Einzel-

Abbildung 28: Zuschnitt für Amira® am Beispiel des Datenstapels SBFS 1. Von den registrierten Gesamtbildern (1) wurden alle Randbereiche, die außerhalb der relevanten Retinaregion liegen (**horizontale gelbe Linien**), und solche, auf denen entlang der skleral-vitrealen Achse nicht alle Schichten der Retina vertreten sind (**vertikale gelbe Linien**), abgeschnitten. (2) das resultierende Bild wurde anschließend kontrastoptimiert.



stapel. Die daraus resultierenden Teilstapel sind in Amira® gut zu bearbeiten, es erhöht sich allerdings der Arbeitsaufwand nach den Rekonstruktionen. Die einzelnen berechneten Oberflächenmodelle einer Zelle, die sich über den ganzen Datenstapel erstrecken (im vorliegenden Fall der Heidelberger Hobel-Datenstapel), müssen wieder passend zusammengesetzt werden.

Aufgrund der hohen Qualität der Datenstapel war jedoch ein weiterer Zuschnitt der Bilder, nach dem Entfernen der informationsfreien Ränder, nicht zielführend. Zudem hätte ein Zuschnitt, um eine im Rekonstruktionsprogramm direkt verwendbare Datengröße zu erhalten, einen Volumenverlust von gut 50% bedeutet. Ferner war für die vier Datenstapel des kombinierten Hobel- und FIB-FESEM-Verfahrens bereits ein Aneinandersetzen der rekonstruierten Zellen aller Unterstapel notwendig. Im Vergleich zum Orientieren dieser zueinander rotierten und verschobenen Datensätze ist das Aneinanderlegen von weiteren Unterdatenstapeln einfach und bildet einen minimalen Mehraufwand im Vergleich zum maximierten Informationsgewinn.

Die Heidelberger Hobel-Datenstapel **SBFS 1** und **SBFS 2-2** (siehe Abbildung 46) wurden deswegen in drei gleichgroße Blöcke entlang der Y-Achse unterteilt. Dies geschah über einen automatisierten Ablauf in Adobe® Photoshop.

2.4.2 Aufbereitung der Rohdaten vom Heidelberger Hobel

Automatisiertes Stitching und Registrierung

Bei dem Block Face Scanning-Ansatz mit dem Heidelberger Hobel konnte das Zusammenfügen der Bilder und die Registrierung automatisiert durchgeführt werden. Hierfür wurde von Dr. Boergens ein Programm in Matlab® entwickelt, das auf die Parameter des hauseigenen Systems optimiert ist. Beim sogenannten „Cubing“ werden die Einzelbilder der Schnitte zu Gesamtbildern zusammengefügt und gleichzeitig die Bilder auch entlang der Z-Achse des Stapels aufeinander dreidimensional registriert.

Für die Datenstapel **SBFS 2** und **SBFS 3** (Abbildung 16) wurde das Cubing optimiert, so dass ein in SBFS 1 beobachteter Versatz der Bilder zueinander in SBFS 2 und 3 korrigiert werden konnte.

Korrektur der Kippung des Bilderstapels SBFS 1

Ein Vergleich des Bilderstapels SBFS 1 vom Heidelberger Hobel mit dem Datensatz des FIB-FESEM-Scans und den Bilderstapeln SBFS 2 und SBFS 3 ergab, dass das Cubing von SBFS 1 nicht optimal verlaufen war. Die Gesamtbilder waren in der Registrierung mit einem leichten Versatz übereinander gelegt worden. Diese „Kippung“ konnte erst im Kontext mit den anderen Datenstapeln erkannt werden. In der Seitenansicht (Abbildung 29.1 und 29.4) zeigt sich das als Kippung des Stapels.

Um diese Kippung post-Cubing zu korrigieren, musste der Bilderstapel zuerst in Adobe Photoshop® entlang der y-Achse in drei Unterstapel unterteilt werden (Abbildung 29.2). Dies war nötig, da der Gesamtstapel, mit 58 GB und 1003 x 4915 x 12716 px, zu groß für die Arbeitsspeichernutzung des Programms ImageJ ist. Um die Bilder mit dem Verzerren-Tool in Photoshop® „geraderücken“ zu können, wurden die drei Bilderstapel in ImageJ **resliced**. Das heißt, die Bildebenen wurden von der XY-Ebene auf die YZ-Ebene umgerechnet (Abbildung 29.3). Dann wurde in Adobe Photoshop® der Kippungswinkel des Stapels ermittelt (38°). Nach einer Erweiterung der Arbeitsfläche (Abbildung 29.5) um Platz für die Korrektur zu schaffen, wurden alle Bilder der drei YZ-Stapel im **Transformation**-Modul mit der **Verzerren**-Funktion korrigiert (Abbildung 29.6) und die Bilder auf den neuen ROI-Bereich zugeschnitten (Abbildung 29.7).

Abschließend wurden die drei Bilderstapel in ImageJ wieder zurück auf die XY-Ebene **resliced** und in Adobe Photoshop® wieder zu einem einzigen Stapel zusammengesetzt.

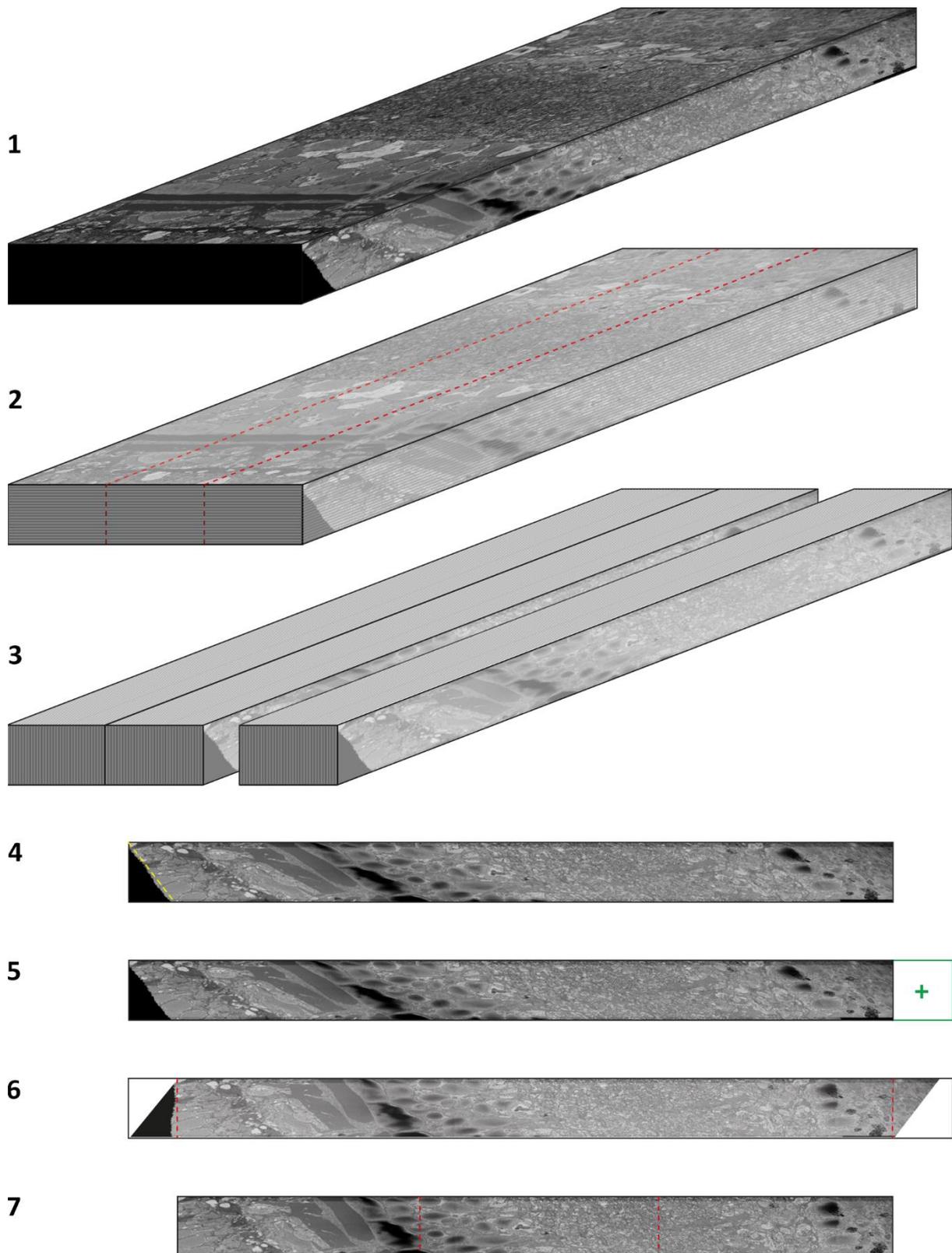


Abbildung 29: Arbeitsschritte zur Korrektur der Kippung des Datenstapels vom Heidelberger Hobel-Scan SBFS 1. **(1)** zeigt den Ausgangszustand des Datenstapels. Im vorderen Bereich erkennt man deutlich die Kippung des Bilderstapels (**schwarzer Bereich**). In ImageJ ist ein Voxel immer als $1 \times 1 \times 1$ definiert, deswegen erscheint der Datenstapel flacher als in anderen Abbildungen. **(2)** Der Datenstapel wurde entlang der langen Kante in drei gleichgroße Stapel unterteilt (**gestrichelte rote Linien**). Die Orientierung der Schnittebenen (XY) sind eingezeichnet (**graue Linien**). **(3)** Nach der Unterteilung wurden die drei Einzelstapel in ImageJ auf die YZ-Ebene resliced (**graue Linien**). **(4)** In Adobe Photoshop® wurde darauf der Winkel der Kippung gemessen (**gestrichelte gelbe Linie**) und **(5)** die Arbeitsfläche erweitert (**grüner Kasten**). Darauf wurde die Kippung korrigiert **(6)** und der Bildbereich zugeschnitten (**gestrichelte rote Linien**). Die daraus resultierenden Datenstapel **(7)** wurden wieder zusammengesetzt und in FIJI wieder auf die XY-Ebene resliced.

2.4.3 3D-Rekonstruktion

Vorarbeiten in Photoshop

Sofern noch nicht geschehen, wurden die Bilder in das TIFF-Format überführt und der Kontrast in Photoshop CS4® von Adobe mit der **Autokontrast**-Funktion automatisiert optimiert, sowie die Arbeitsfläche mit einem mittelgrauen Hintergrund auf jeder Bildseite um 100 px erweitert.

Vorarbeiten in Amira

An einem speziellen Rekonstruktions-Rechner (64 GB RAM, Nvidia GeForce® Quadro 2 GB RAM) wurden die in Photoshop® bearbeiteten Bilder in Amira® (FEI company) geöffnet und mit dem **AlignSlices**-Modul die richtige Ausrichtung der Einzelbilder zueinander kontrolliert. Für die mit dem Heidelberger Hobel erstellten Bilderserien war dies nicht nötig. Das FIB-FESEM-Verfahren gibt ebenso bereits gut registrierte Bilderstapel aus. Es kann jedoch bei Scan-Abbrüchen, und dem damit verbundenen Neustart des Scanvorgangs, zu Versätzen kommen. Zudem kann es aufgrund von Temperaturänderungen und Abnutzungen des Strahlenemitters zu einem leichten Wandern des Bildausschnittes kommen. Dies wurde im **AlignSlices**-Modul korrigiert.

Segmentierung in Amira®

Bei einer Segmentierung im **Segmentierung Editor** von Amira® wird jeweils der Querschnitt einer Struktur in jeder Ebene markiert und dieser markierte Bereich dann in einer spezialisierten Datei gespeichert, einem sogenannten **Labelfield**. So entsteht eine Serie an Scheiben der gewählten Struktur (Abbildung 30.2), aus der in späteren Arbeitsschritten ein dreidimensionales Modell errechnet werden kann. Hierbei handelt es sich um eine volumenbasierte Segmentierung. Dies muss für jede Struktur einzeln durchgeführt werden. Halb/automatisierte Verfahren existieren, sind jedoch nicht für die heterogenen Strukturen geeignet, die sich im beobachteten Bereich der äußeren plexiformen Schicht finden. Neben voluminösen Zellanschnitten, teils rund, teils ringförmig, finden sich direkt daneben sehr

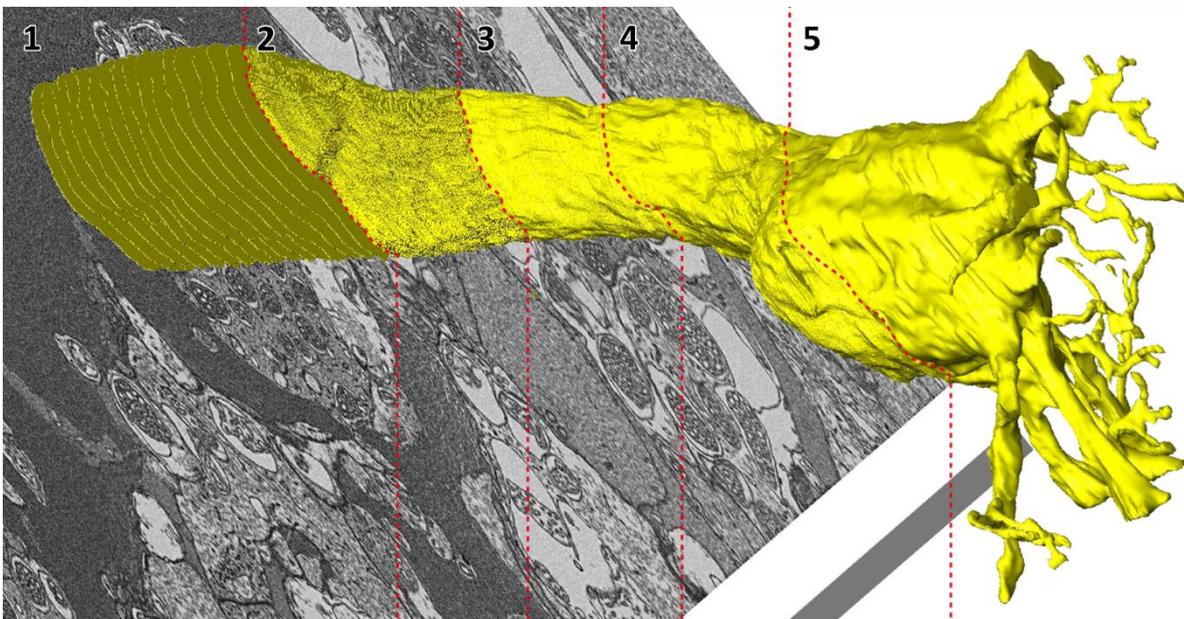


Abbildung 30: Vom Bilderstapel zum 3D-Modell. Arbeitsschritte in Amira®. **(1)** Auf Basis der Einzelbilder (Hintergrund) wird der Umriss einer Struktur zuerst nur in jedem x-ten Schnitt segmentiert. In der 3D-Darstellung erscheinen diese Segmentierungen dann als „Scheibchen“. **(2)** Dann wird durch Interpolation und weiteres Segmentieren die Struktur in jedem Schnitt markiert. **(3)** Die so markierte Struktur wird mit dem **SurfaceGen**-Werkzeug in ein 3D-Modell umgewandelt. **(4)** Da dieses Modell noch zu viele Polygone enthält, um damit arbeiten zu können, werden diese reduziert. **(5)** Die nun kantig erscheinende Oberfläche erhält durch das **SmoothSurface**-Werkzeug eine glatte Oberfläche. **(1)** und **(2)** werden in der 3D-Ansicht des **Segmentation Editor** angezeigt, **(3)** bis **(4)** mit dem **SurfaceView**-Modul im Project Editor.

feine Dendriten die, mit geringen Kontrastunterschieden, dicht gepackt nebeneinanderliegen. Automatische Systeme können für das eine oder das andere optimiert werden, jedoch nicht für beides. So blieb im vorliegenden Fall nur ein händisches Segmentieren der Strukturen.

Um nicht jeden einzelnen Schnitt markieren zu müssen, wurde die **Interpolate Segmentation**-Funktion von Amira® eingesetzt. Hierbei wird nicht jeder einzelne, sondern jeder n-te Schnitt segmentiert (Abbildung 30.1) und das Programm berechnet automatisiert die wahrscheinliche Form der Struktur auf den dazwischenliegenden Schnitten. Dies musste kontrolliert und bei Bedarf nachbearbeitet werden, beschleunigte den Arbeitsprozess jedoch deutlich. Wie viele Schnitte dabei zwischen zwei markierten Schnitten frei gelassen werden können, hängt von mehreren Faktoren ab:

- Wie fein ist die Struktur? Je weniger Pixel die Fläche eine Struktur ausmacht, umso weniger Schnitte können ausgelassen werden.
- Wie stark verändert sich die Struktur sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Position im Datenstapel? Je stärker die Veränderung, umso weniger Schnitte können ausgelassen werden.
- Wie relevant sind Nachbarschaftsverhältnisse zwischen zwei Strukturen? Ist die Frage, ob es einen Kontakt gibt oder nicht, wichtig, können nur wenige Schnitte ausgelassen werden.

Grundsätzlich steigt die Präzision der Segmentierung, je weniger Schnitte ausgelassen werden. Dem gegenüber steht der hohe Arbeitsaufwand und die realistische Einschätzung, welcher Detailgrad am Ende der Rekonstruktion erkennbar sein wird beziehungsweise muss. Die 3D-Modelle, die am Ende des Vorgangs stehen, sollen hauptsächlich Positions- und Kontaktsituationen der Strukturen zeigen. Es werden immer zusätzlich Bilder der einzelnen Schnitte herangezogen, um Sachverhalte und insbesondere Details darzustellen.

Visualisierung in 3D

Erstellung der Oberflächenmodelle

Die Labelfields wurden sowohl einzeln für jede Struktur oder in Gruppierungen mit Strukturen der gleichen Art – zum Beispiel Stäbchenterminalen – gespeichert. Im **Project Editor** wurden die Labelfield-Dateien mit dem **Resample**-Werkzeug kompaktiert. Hierbei wurden die X-, Y- und Z-Achse der Voxel im Verhältnis 2 : 2 : 1 zusammengefasst. Damit wird der Rechenaufwand für die weiteren Schritte ohne großen Qualitätsverlust reduziert.

Daraufhin wurde aus den einzelnen Labelfields mit dem **SurfaceGen**-Werkzeug ein Oberflächenmodell, eine sogenannte **Surface**, berechnet (Abbildung 30.3). Dabei wurden die Standardeinstellungen von Amira® beibehalten. Diese Oberflächenmodelle bestehen aus vielen flachen Dreiecken, die zusammen eine lückenlose Oberfläche bilden. Je mehr dieser Dreiecke verwendet werden, umso aufwendiger ist die Berechnung der Modelle bei der Betrachtung, insbesondere wenn die Ansichten in der Größe verändert, gedreht und verschoben werden. Da für eine Analyse der räumlichen Anordnung und der Kontakte zwischen den einzelnen Strukturen (Zellen) mehrere Modelle auf einmal beobachtet werden müssen, wurde die Anzahl der Dreiecke pro Oberflächenmodell reduziert (Abbildung 30.4). Um wieviel hängt dabei von der Größe und Art der Struktur ab. Große, voluminöse Zellen – meist annähernd kugelförmig – können mit deutlich weniger Flächen dargestellt werden als feine Dendriten. Da die für diese Arbeit zentralen Photorezeptorterminalen beide Gruppen vereinen, musste ein Kompromiss gefunden werden. Dafür wurden die Dreiecke um den Faktor 10 reduziert, ohne dass es sichtbare Verluste am Detailgrad gab. Der Bereich der Vereinfachung insgesamt reichte von Faktor 2, für feine Dendriten-Bäume in Detailansichten, bis zum Faktor 100 für Zellkerne.

Die nun erhaltenen Oberflächenmodelle erscheinen aufgrund der Dreiecke, aus denen sie bestehen, kantig. Um näher an den „realen“ Zustand zu kommen – glatte und geschlossene Flächen, wurde mit

dem **SmoothSurface**-Modul das Erscheinungsbild im **Viewer** verändert (Abbildung 30.5). Dabei wird in der Darstellung eine Maske über die Dreiecke gelegt, ohne dass ihre Anzahl verändert wird. Dadurch erscheint die Oberfläche der Modelle glatt und Strukturen sind besser zu erkennen.

Visualisierung / Auswertung

Alle fertiggestellten Surfaces, die für einen Sachverhalt oder für eine Abbildung relevant sind, wurden im **ProjectEditor** geöffnet und mit einem SurfaceView-Modul im **Viewer** angezeigt. Hierbei wurde die Ansicht nochmals optimiert, indem die Darstellung des Viewers auf **DirectNormals** gestellt wurde. Zusätzlich gibt es die Option, Oberflächenmodelle transparent darzustellen, um zum Beispiel Zellorganellen sichtbar zu machen oder, aus Sicht der „Kamera“, darunter liegende Strukturen zeigen zu können. Die Kameraperspektive wurde auf **parallel** gestellt (die für die Visualisierung von stereoskopischen Bildern optimierte, **perspektivische** Variante verzerrt das Modell künstlich). Nach der Wahl einer aussagekräftigen Ansicht wurde mit dem **Measurement**-Werkzeug ein Referenz-Größenbalken eingeblendet und mit dem **Snapshot**-Werkzeug von Amira® ein Bild gemacht und als JPEG gespeichert.

Zusätzlich können mit dem **AnimationEditor** von Amira® Filme erstellt werden, in denen sich die rekonstruierten Strukturen drehen, Kamerafahrten stattfinden und einzelne Elemente ein- und ausgeblendet werden können.

Auch eine morphometrische Auswertung der rekonstruierten Oberflächenmodelle ist möglich. So können Daten über die Dimensionen der Strukturen ausgelesen werden, wie Volumen, Höhe, Länge oder die Abstände zwischen einzelnen Punkten.

2.4.4 Kombinationen der Bilderstapel

Die Anordnung der einzelnen Bilderstapel einer Probe fand in Amira® mit Hilfe der **BoundingBox** und dem **OrthoSlicer**-Moduls statt. Die BoundingBox zeigt die Außenmaße eines Bilderstapels an. Der OrthoSlicer ermöglicht, eine beliebige Ebene aus dem Bilderstapel anzuzeigen. Die Raumrichtung, XY, XZ oder YZ, kann dabei frei gewählt werden.

Es wurden alle Bilderstapel in den **ProjectEditor** geladen und mit einem Vergleich der Außenflächen, unterstützt durch die Kenntnis über die Orientierung der Scans, angeordnet. Dafür wurde das **Transformations**-Modul in Amira® zur dreidimensionalen Ausrichtung der Bilderstapel zueinander verwendet. Sobald die Orientierung der Bilderstapel derart erschlossen worden war, konnten die zugehörigen 3D-Modelle durch ein Kopieren der Translationsinformationen passend zu den ihnen zugrunde liegenden Bilderstapeln ausgerichtet werden.

ssTEM und FIB-FESEM

Die Anordnung des FIB-FESEM-Bilderstapels FIB 703 zum ssTEM-Bilderstapel (SS M02) konnte nicht ausschließlich durch einen Vergleich der Anschlussflächen erfolgen. Die durch das Schneiden mit dem FIB eingebrachte Hitze hatte die Anschlussfläche auf Seite des ssTEM-Bilderstapels stark denaturiert, was zu einer deutlichen Verdunkelung und Abschwächung der Kontrastunterschiede der verschiedenen Strukturen führte (Abbildung 31.1).

Zur Orientierung wurden deswegen ergänzend Aufnahmen der Proben-Mesa nach dem FIB-FESEM-Vorgang hinzugezogen (siehe Abbildung 17.4 bis 17.6), um die relative Position des FIB-FESEM-Scans zum ssTEM-Bilderstapel bestimmen zu können. Hierbei musste beachtet werden, dass der ssTEM-Stapel erst ab dem 38ten Schnitt (von der Mesa-Oberfläche aus) verwendet werden konnte (Abbildung 31) (siehe „Elastische Registrierung“ Seite 48 ff).

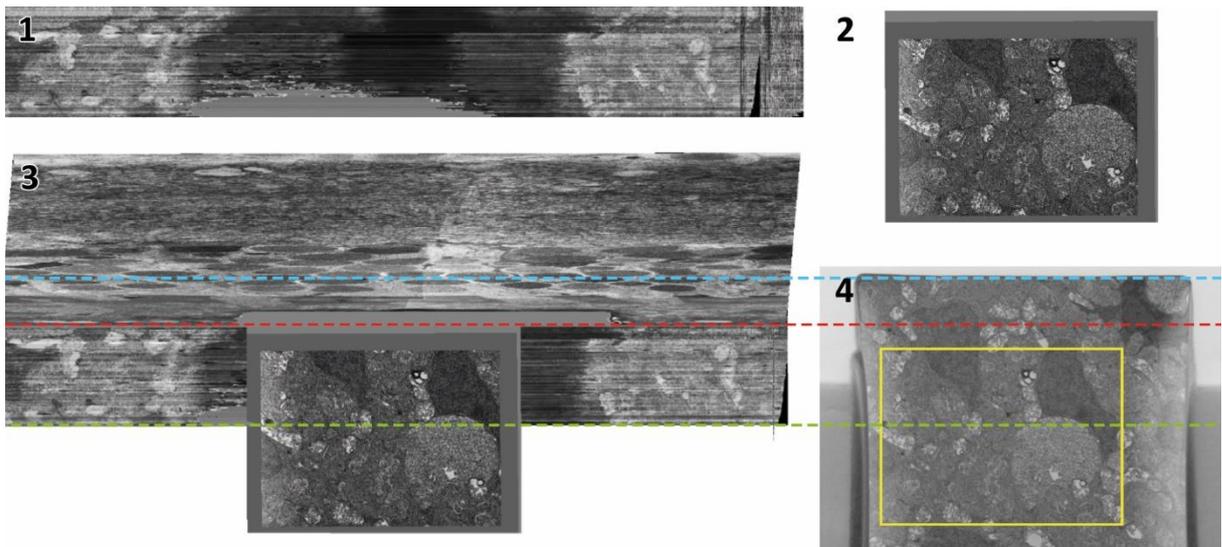


Abbildung 31: Ausrichtung des FIB-FESEM-Scans (FIB 703) zum ssTEM-Bildstapel (SS M02). **(1)** Ansicht auf den Bilderstapel von skleral (YZ-Ebene). Zu erkennen ist der Strahlenschaden im Zentrum des Stapels im Bereich der FIB-Kerbe. **(2)** Letzte Ebene (# 1332) des FIB-FESEM-Bilderstapels. **(3)** Ansicht von schräg „oben“ der aneinander ausgerichteten Stapel der ssTEM-Serie und des letzten Bildes des FIB-FESEM-Scans. Durch die leichte Kippung der Ansicht ist die FIB-Kerbe auf der XY-Ebene zu erkennen. **(4)** zeigt die Mesa mit der FIB-Kerbe, dargestellt in der korrespondieren Höhe zu **(3)**. Eingezeichnet sind der Ausschnitt des FIB-FESEM-Scans in der FIB-Kerbe (**gelber Kasten**), die Ober- (**rote Linie**) und die Unterkante (**grüne Linie**) des ssTEM-Bilderstapels und die Oberkante der Mesa vor dem Schneiden der ssTEM-Serie (**blaue Linie**).

Heidelberger Hobel und FIB-FESEM

Die Registrierung der Bilderstapel des zweiten Scans mit dem Heidelberger Hobel SBFS 2 und SBFS 3 konnte durch ein lineares Verschieben der Stapel entlang der z-Achse erreicht werden. Die Anordnung dieser beiden Stapel zum Bilderstapel des ersten Scans SBFS 1 war komplizierter, da es durch den dazwischenliegenden Scan mit dem FIB-FESEM (FIB 108, siehe Kapitel 2.3.4 „Scan 2“) zu einer leichten Kippung der Probe über zwei Achsen gekommen war. Da ein Aneinanderlegen der Stapel durch den schiefen Anschnitt nicht möglich war, wurde hier die Orientierung über die rekonstruierten 3D-

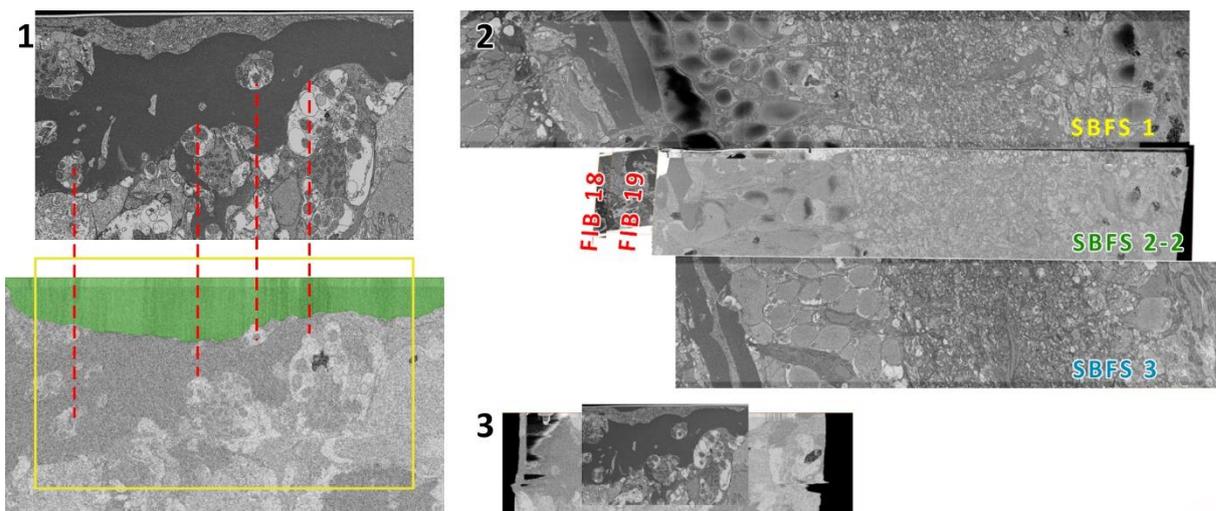


Abbildung 32: Ausrichtung des FIB-FESEM-Scans (FIB 1085) auf die Bilderstapel des Heidelberger Hobels (SS13 03 A5). **(1)** Das letzte Bild der FIB-FESEM-Serie (**oben**) konnte direkt auf einen YZ-Reslice des Hobel-Stapels SBFS 2-2 (**unten**) gelegt werden. Dabei konnten einzelne Strukturen (verbunden durch **rote Linien**) direkt über die Stapel hinweg identifiziert werden. Die Umrisse des letzten FIB-FESEM-Bildes sind auf dem Reslice-Bild des Hobel-Stapels markiert (**gelber Kasten**). Im unteren Bilder erkennt man zudem den beim Scan abgebrochenen Bereich der Anschlussfläche (**grün hinterlegt**). **(2)** zeigt die Anordnung aller Bilderstapel in der Seitenansicht (XZ-Reslice) mit Beschriftung der einzelnen Stapel (**FIB 18**, **FIB 19**, **SBFS 1**, **SBFS 2-2**, **SBFS 3**). Vergleiche dazu den Scan-Plan in Abbildung 16. **(3)** zeigt die Lage des FIB-FESEM-Stapels am Hobel-Stapel SBFS 2-2.

Modelle erschlossen. Diese wurden mittels Translation und Transformation passend aneinandergelegt. Die so ermittelten Verschiebungsparameter wurden dann auf den Datenstapel SBFS-1 übertragen.

Die beiden FIB-FESEM-Bilderstapel FIB 1085 18 und FIB 1085 19 konnten, da sie direkt hintereinander aufgenommen wurden, durch eine Verschiebung entlang der Z-Achse aneinandergelegt werden. Für die Kombination mit den Bilderstapeln des Heidelberger Hobels wurden wieder die 3D-Modelle richtig orientiert und dann die Parameter auf die Bilderstapel übertragen (Abbildung 32 und Abbildung 46). Zur Unterstützung wurde das letzte Bild der FIB-FESEM-Serie FIB 1085 19 mit dem am weitesten skleral liegenden Bild eines YZ-Reslice der anschließenden Hobel-Bilderserie SBFS 2-2 verglichen. Es konnten einzelne Strukturen in beiden Bildern eindeutig identifiziert und die Bilder dadurch sehr gut zur Deckung gebracht werden (Abbildung 32.1 und 32.3). Der beim Schneiden abgebrochene Bereich war klein genug, sodass er diesen Prozess nicht behinderte.

2.4.5 Muster der Zapfenterminalen

Für das Übersichtsdiagramm wurden alle Kontakte zwischen den einzelnen Photorezeptorterminalen sowohl mit den Oberflächenmodellen als auch mit den transmissions-elektronenmikroskopischen Bildern erfasst und zugeordnet (siehe Tabelle "Dendriten der Terminalen im Interterminalen Netzwerk" Seite 149). Die daraus resultierende Tabelle wurde in einer Skizze zusammengefasst und damit die Anordnung mit allen Verbindungen und Distanzen optimiert. In Adobe Illustrator® wurde dann die Übersichtsgrafik erstellt. Dabei wurde sich bei den Zelldimensionen an den relativen Durchschnittslängen der rekonstruierten Zellen orientiert. Zum erweiterten Verständnis der Anordnung der Photorezeptorterminalen wurden auch Schnittansichten parallel zu den Vielfachzapfenreihen und im rechten Winkel dazu erstellt (Abbildung 40).

EINLEITUNG 1

MATERIAL
UND
METHODEN 2

ERGEBNISSE 3

DISKUSSION 4

LITERATUR 5

3.1 Teil 1: 3D-Rekonstruktion der äußeren plexiformen Schicht

3.1.1 Äußere plexiforme Schicht insgesamt

Die in Amira® eingeladene Bilderserie (SS M02) besteht aus 1332 Ebenen und erfasst mit ihrem Volumen von $1920 \mu\text{m}^3$ ($16 \times 12 \times 10 \mu\text{m}$) einen Bereich von der vitrealen Unterkante der Terminalen der stäbchenförmigen Photorezeptoren (Abbildung 33.2 fahlgelb) bis zum skleralen Teil der Zellkörper der ersten Horizontalzellschicht (Abbildung 33.1 türkis, gelb, rosa, grau). Im resultierenden Datenvolumen (Abbildung 33) liegen, basierend auf einer sorgfältigen Mesa-Präparation (Kapitel 2.3.1), die Schichten der Retina (siehe Kapitel 1.3.3) annähernd parallel zu den Schnittebenen des FIB-FESEM-Scans.

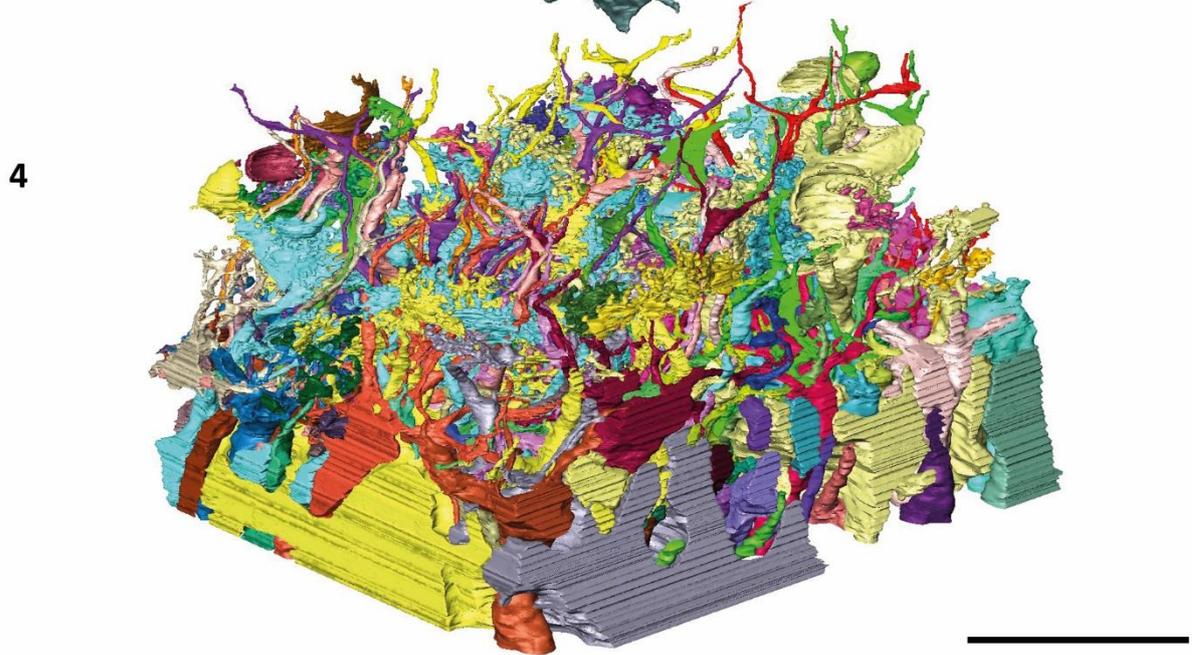
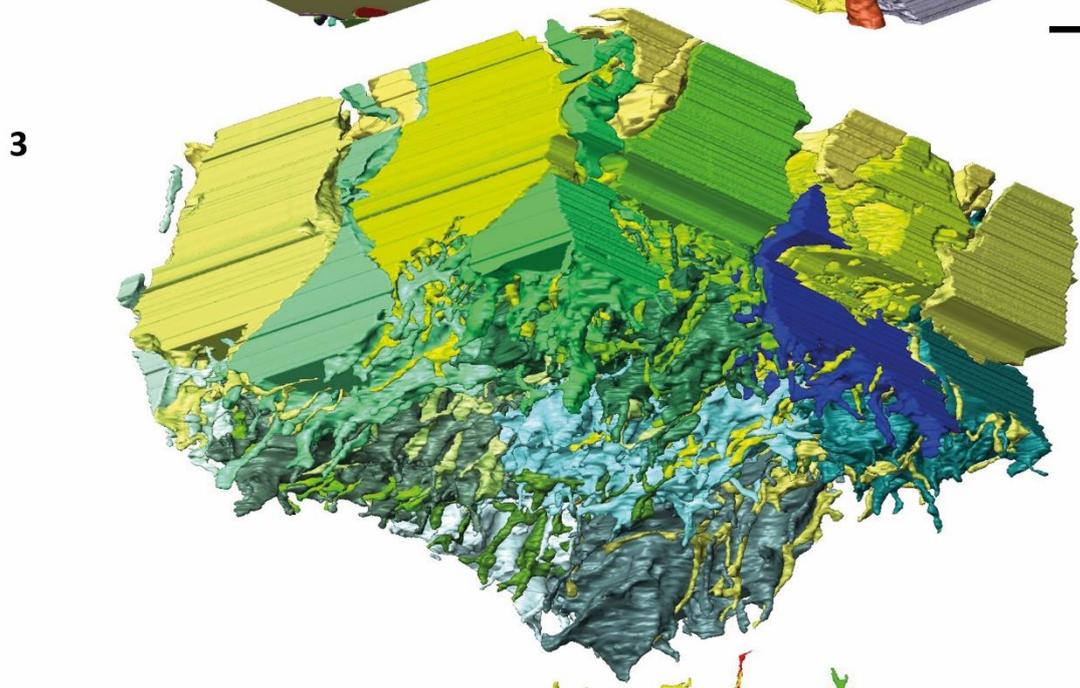
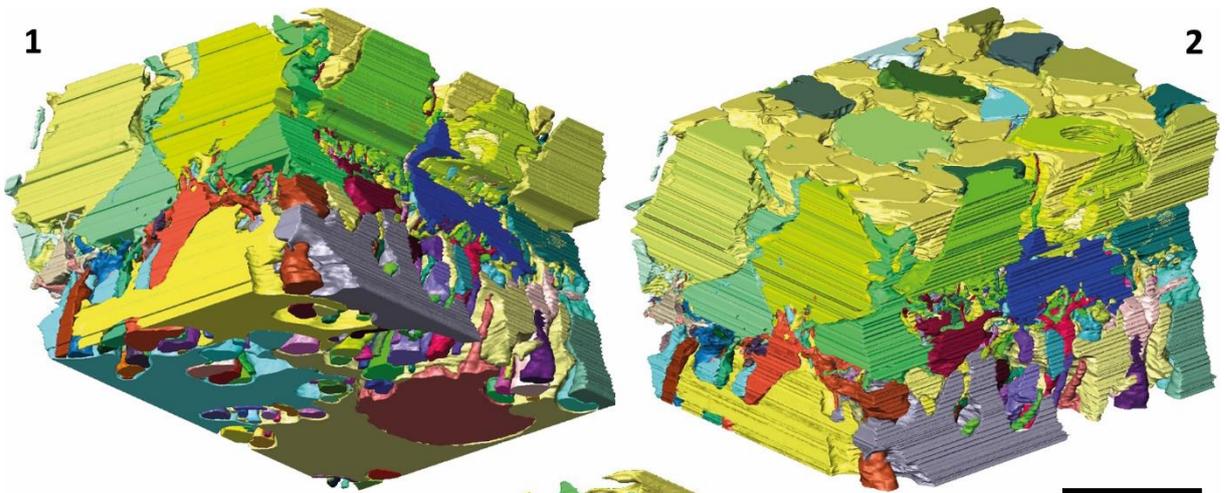
Über 19 Monate (durchschnittliches Zeitsegment pro Tag: 4 Stunden) wurden über 190 Zellen, zum Teil mit Zellorganellen, segmentiert. 8 Terminalen der „kurzen“ Zapfen (short cone pedicles), 10 Terminalen der „langen“ Zapfen (long cone pedicles), 35 Stäbchenterminalen (rod pedicles), alle mit ihren synaptischen Bändern, 7 vollständige und 50 unvollständige Dendritenbäume von Bipolarzellen, sowie 92 Dendriten von Horizontalzellen. Die Rekonstruktion einer kompletten Zapfenterminalen dauerte im Schnitt 20 Stunden, plus etwa weitere 3 bis 4 Stunden für Korrekturen und Nachsegmentierungen. Ein vollständiger Dendritenbaum einer Bipolarzelle nahm im Vergleich dazu etwa 12 Stunden in Anspruch.

Das Muster der gestaffelten Reihen der Vielfachzapfen bleibt von den Außengliedern bis zur Ebene der Terminalen erhalten (siehe Abbildung 50). Bei den Zapfenterminalen zeigt sich ein deutlicher radialer Versatz von circa $1,5 \mu\text{m}$ zwischen den Terminalen der langen und der kurzen Zapfen. Dabei liegen die Terminalen der langen Zapfen weiter skleral als die der kurzen Zapfen. Außerdem konnte ein unerwartet dichtes Netzwerk aus feinen Telodendriten zwischen den Endterminalen nachgewiesen werden (Abbildung 41). Der Anordnung in den Vielfachzapfenreihen folgend, haben die Terminalen dieser Photorezeptoren in der Aufsicht auf die Schichten der Retina eine näherungsweise rechteckige Form und sind entlang der Zapfenreihen ausgerichtet.

Im Probenvolumen sind insgesamt 4 Vielfachzapfenreihen mit jeweils 5 Terminalen pro Reihe vorhanden. Die Terminalen der beiden äußeren Reihen sind dabei jeweils nur bis zur Mitte ihrer Vielfachzapfenreihe im Probenbereich. Von den beiden mittleren Reihen liegen drei Terminalen, einer der langzapfigen (2L2) und zwei der kurzzapfigen (2S2 und 3S2) Photorezeptoren, komplett mit allen Telodendriten im Probenbereich. Bei einem langzapfigen Terminale (3L2) sind auf der probenrandnahen Seite ein Teil der Telodendriten abgeschnitten. Die übrigen Terminalen der zwei zentralen Vielfachzapfenreihen sind mindestens zu 50% außerhalb des Probenvolumens (2L1, 2L3, 3S1 und 3S3) (Abbildung 40 und Abbildung 41).

Für die Morphologie der Terminalen und ihrer synaptischen Verbindungen und Kontakte wurde sich auf die komplett im Scanbereich vorhandenen Zellen konzentriert. Jedoch wurden alle Endterminalen für die Beschreibungen herangezogen.

Abbildung 33: Nächste Seite: Alle rekonstruierten Strukturen des FIB-FESEM Datensatzes der Probe SS M02 (FIB 703) als 3D-Modelle in einer Ansicht von schräg vitreal (**1**) und einer Ansicht von schräg skleral (**2**). Sie zeigen die dichte Anordnung der zahlreichen Strukturen der äußeren plexiformen Schicht. Die enge Verschränkung wird sichtbar, wenn man (**3**) die Primärneuronen (Terminalen der Photorezeptoren) und (**4**) die Sekundärneuronen (Dendritenbäume der Bipolar- und Horizontalzellen) getrennt darstellt. Maßstabsbalken: $5 \mu\text{m}$.



3.1.2 Terminalen der Stäbchen

Die Terminalen der Stäbchen liegen skleral der Zapfenterminalen an der vitrealen Kante der äußeren nuklearen Schicht. Im beobachteten Datenvolumen konnten die Stäbchenterminalen nur als Anschnitte rekonstruiert werden. Nur das vitreale Drittel ist erfasst. Die Terminalen liegen auf Höhe des vitrealen Teils der Axone der zapfenförmigen Photorezeptoren und umschließen den skleralen Teil der Terminalen der langen Zapfen (Abbildung 34.1).

Die Stäbchenterminalen sind in Ihrer Grundform tropfenförmig, durch die Raumauffüllung im Kontext mit den Axonen der zapfenförmigen Photorezeptoren jedoch teilweise verformt (Abbildung 34.3 und Abbildung 35). Dadurch variieren die Ausmaße stark. Im Durchschnitt haben sie einen Durchmesser von 2,59 μm . Zentral in den Terminalen findet sich eine Einbuchtung mit vitrealer Öffnung, in der Dendriten von Horizontalzellen und Bipolarzellen sowie präsynaptische Verdickungen zu erkennen sind. Zudem gibt es sowohl punktuelle, mit klaren synaptischen Strukturen, als auch flächige Kontakte zwischen den Stäbchenterminalen (Abbildung 35). Jede Terminale weist ein einzelnes synaptisches Band auf (Abbildung 34.2 und 34.4 sowie Abbildung 35).

Die Anordnung der Stäbchenterminalen zeigt kein erkennbares Muster. Lediglich die raumfüllende Organisation mit den Axonen der Photorezeptoren der Vielfachzapfenreihe ordnet die Terminalen in Reihen parallel zu den Zapfenreihen. Dies ist anhand der präsynaptischen Bänder der Terminalen gut zu erkennen (Abbildung 38.2a).

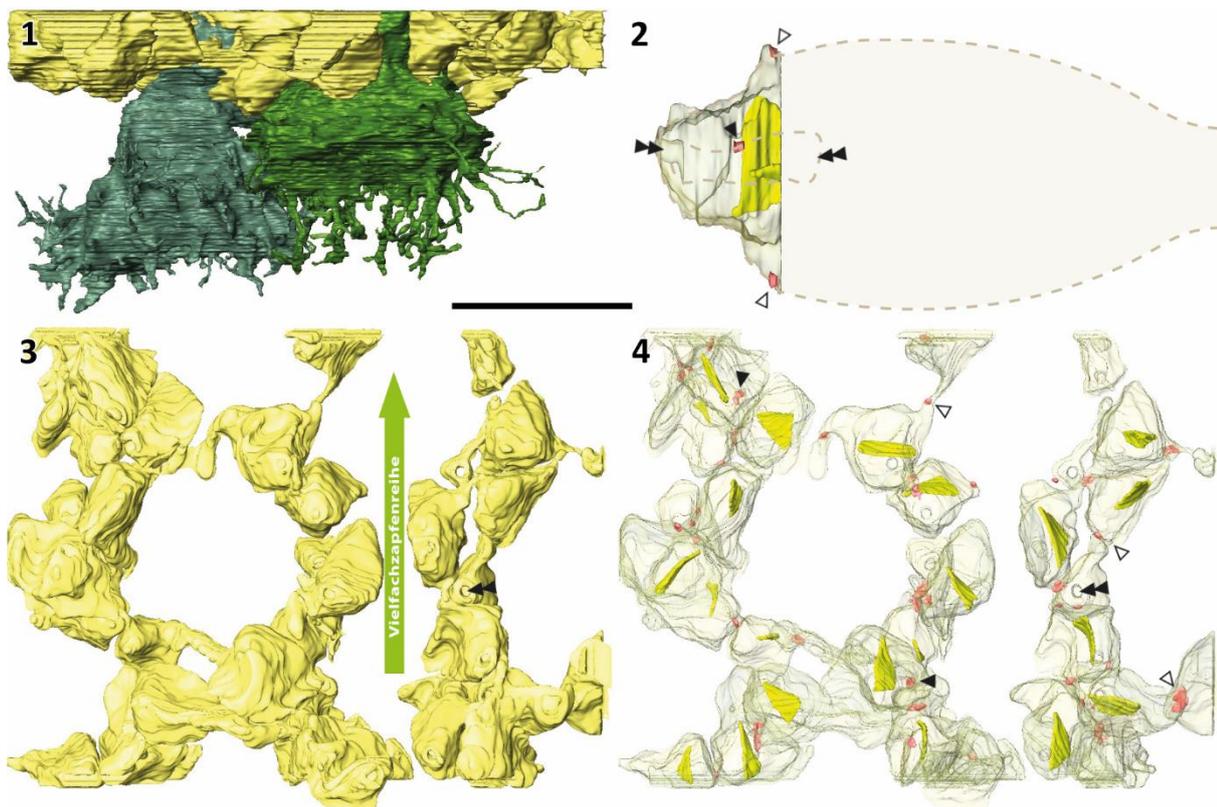


Abbildung 34: Terminalen der Stäbchen-Photorezeptoren (3D-Modelle). **(1)** Laterale Ansicht der Stäbchenterminalen (**beige**) mit ihrer skleralen Lage im Verhältnis zu den Zapfenterminalen (**2L2 grün** und **2S2 petrolgrün**). **(2)** Skizze einer Stäbchenterminalen mit dem rekonstruierten Teil, in transparenter Ansicht, links. Synaptische Kontakte sind als Kappen (**rosa**) rekonstruiert. Im der zentralen Aushöhlung (**doppelte Pfeilspitze**) der Terminalen liegen Dendriten von Horizontalzellen und Bipolarzellen sowie präsynaptische Verdickungen zu erkennen sind. Zudem gibt es sowohl punktuelle, mit klaren synaptischen Strukturen, als auch flächige Kontakte zwischen den Stäbchenterminalen (Abbildung 35). Jede Terminale weist ein einzelnes synaptisches Band auf (Abbildung 34.2 und 34.4 sowie Abbildung 35). **(3)** Aufsicht von vitreal auf die 35 in der ROI vorhandenen Stäbchenterminalen. **(4)** Selbe Ansicht wie in **(3)**, die Zellkörper der Terminalen sind transparent dargestellt, um die Ribbons (**gelb**) und die synaptischen Kontakte (**rosa**) sichtbar zu machen. Pfeile wie in **(2)**. Maßstabsbalken für **(1)**, **(3)** und **(4)**: 5 μm .

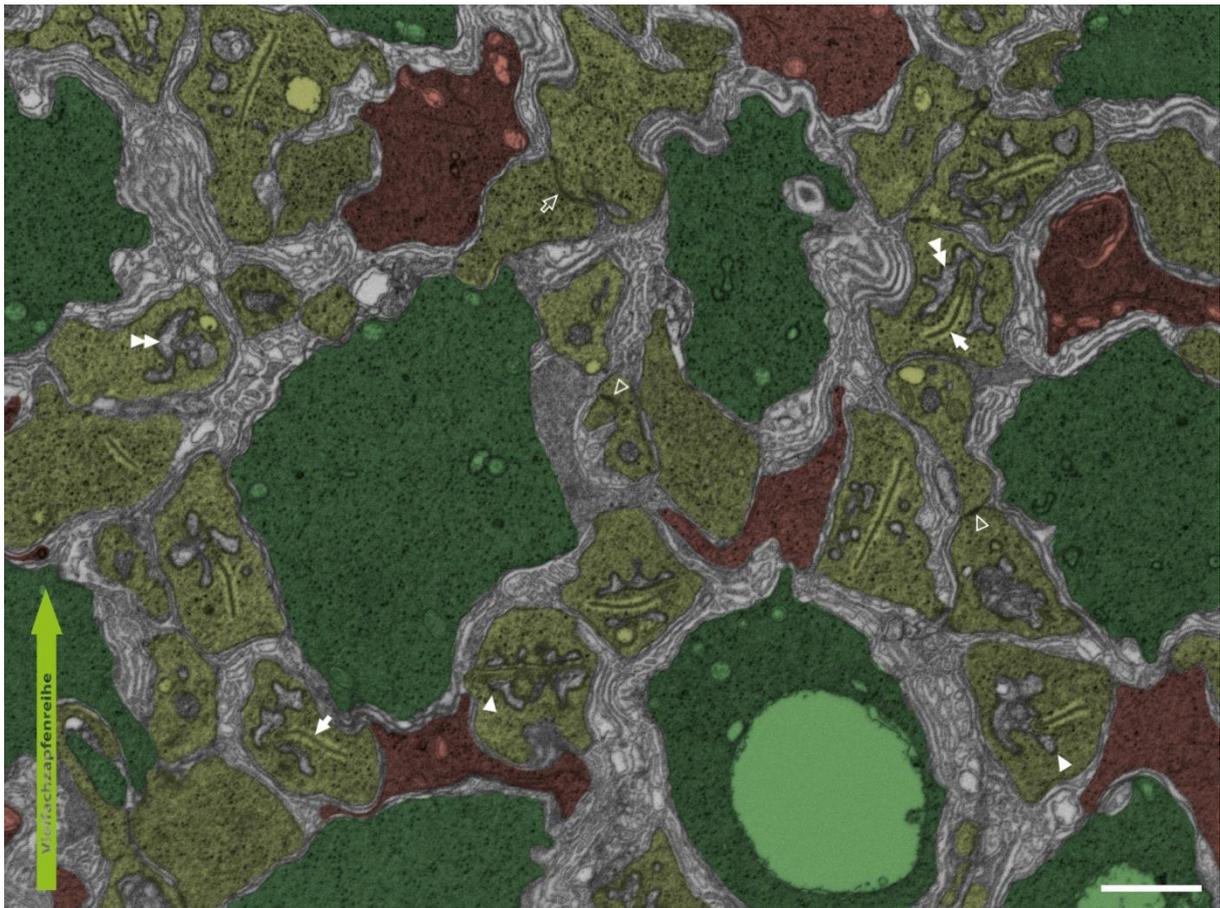
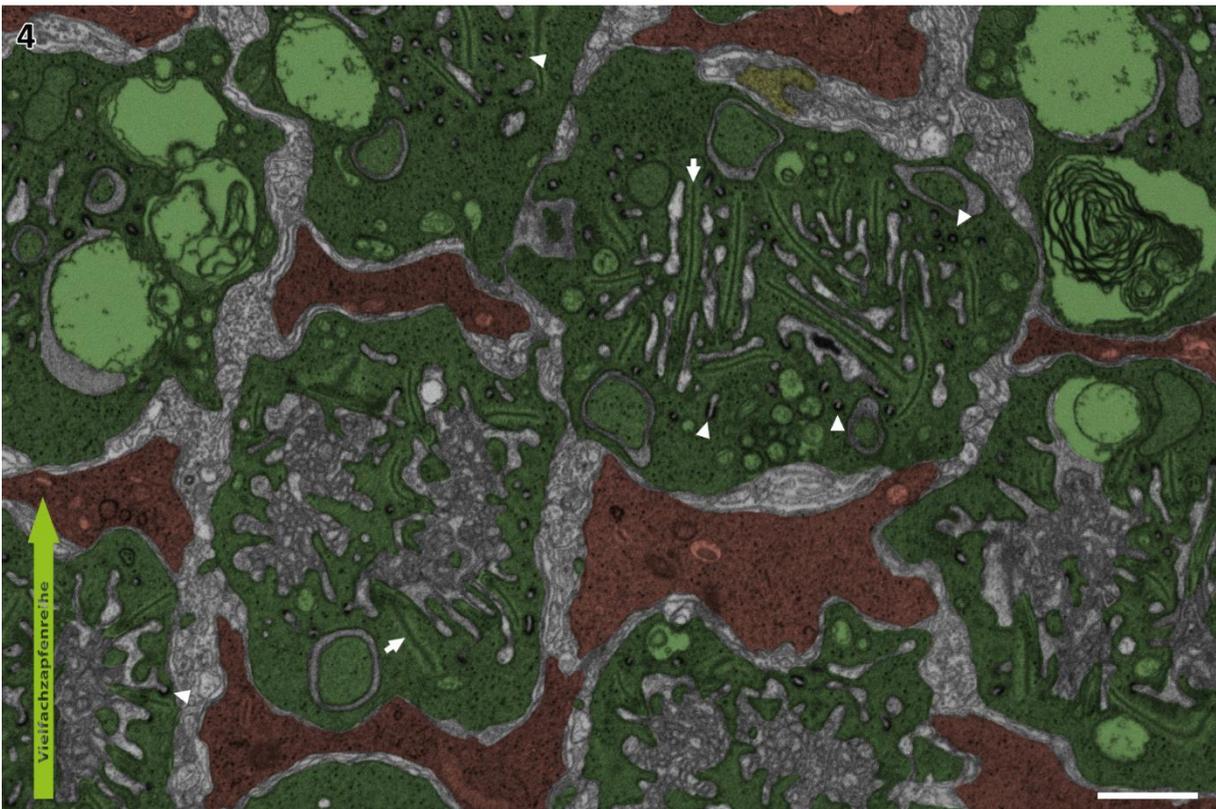
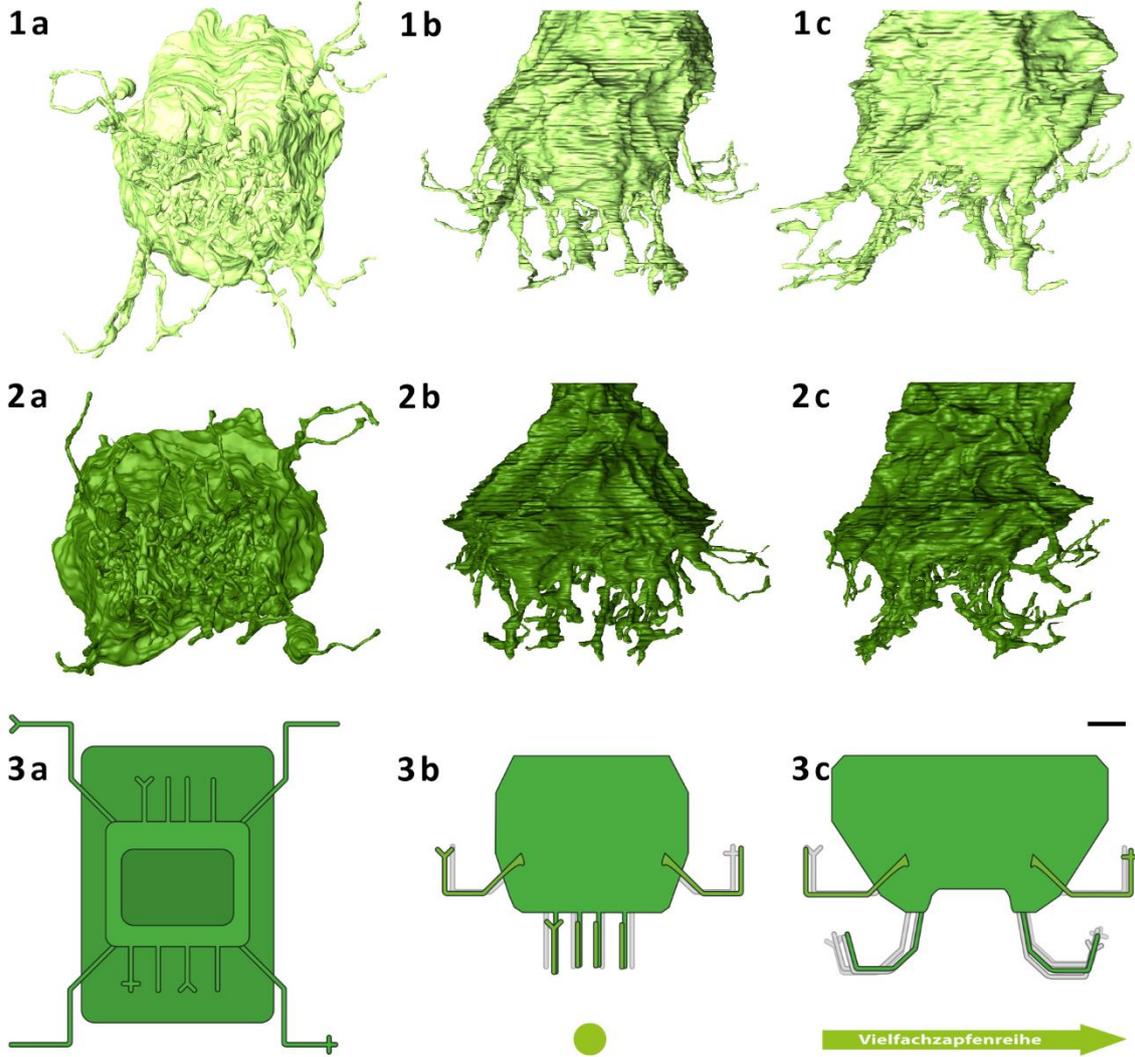


Abbildung 35: FIB-FESEM-Aufnahme aus dem Bereich der Stäbchenterminalen (Ebene #0084). Die Terminalen der Stäbchen (gelb), langen Zapfen (grün) und kurzen Zapfen (rot) sind farblich hinterlegt. Neben der Anordnung der Stäbchenterminalen zwischen den Terminalen der Vielfachzapfenreihen erkennt man Dendriten der Horizontalzellen in der singulären Aushöhlung der Terminalen (doppelte Pfeilspitze), die Bänder (gefüllter Pfeil) und die synaptischen „Kappen“ (gefüllte Pfeilspitze). Es sind Terminalen-Terminalen-Kontakte mit synaptischen Strukturen (Pfeilspitze) und welche ohne synaptische Strukturen, dafür mit großer Kontaktfläche (Pfeil), zu finden. Maßstabsbalken: 1 μm .

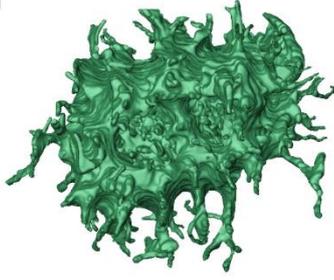
3.1.3 Terminalen der langen Zapfen

Die Terminalen der langen Zapfen haben entlang der Vielfachzapfenreihe eine durchschnittliche Länge von 7,44 μm und eine Breite von 6,58 μm . Die im Datenvolumen erfasste „Höhe“ ist durchschnittlich 5,29 μm . Die Volumenschwerpunkte der Terminalen der langzapfigen Photorezeptoren (Abbildung 36) liegen weiter skleral als die der kurzzapfigen Photorezeptoren. Sie sind in ihrer Form in der lateralen Ansicht oval und entlang der Zapfenreihen gestreckt. In der Aufsicht erscheinen sie näherungsweise rechteckig. Am vitrealen Ende der Terminalen findet sich eine komplex geformte Einbuchtung mit zwei Hauptkavitäten. Diese ist in der Länge etwa 1/3 so groß wie die maximale Ausdehnung der Terminalen

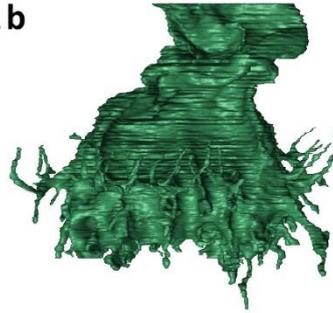
Abbildung 36: Nächste Seite: Morphologie der Terminalen der langzapfigen Photorezeptoren am Beispiel von (1) 3L2 und (2) 2L2 als 3D-Modell, sowie (3) dem Schema einer durchschnittlichen Terminalen. (a) zeigt jeweils eine vitreale Ansicht der Terminalen mit der zentralen Einbuchtung und zwei Reihen an Telodendriten, die parallel zur Zapfenreihe stehen, sowie 4 eckständige, lange Telodendriten. In der Ansicht entlang der Vielfachzapfenreihen (b) sieht man die kammförmige Anordnung der Reihen an Telodendriten. In der Ansicht orthogonal zur Vielfachzapfenreihe (c) sieht man, wie die kammförmig angeordneten Telodendriten von der Mitte der Terminalen weggebogen sind. Zudem sind die eckständigen Dendriten weiter skleral an der Terminalen angesetzt und verlaufen auch weiter skleral. (4) FIB-FESEM-Aufnahme auf Höhe (Ebene #0458) des voluminösesten Teil der Terminalen der langen Zapfen. Die leichte Kippung der Schnittserie (oben im Bild weiter skleral) sorgt dafür, dass die Terminalen auf verschiedenen Höhen geschnitten sind. Die Terminalen der Stäbchen (gelb), langen Zapfen (grün) und kurzen Zapfen (rot) sind farblich hinterlegt. Neben der Anordnung der Terminalen in den Vielfachzapfenreihen und der feinteiligen Strukturierung der zentralen Einbuchten der Terminalen erkennt man die Bänder („ribbons“, gefüllter Pfeil) und die synaptischen „Kappen“ (gefüllte Pfeilspitze). Maßstabsbalken: 1 μm .



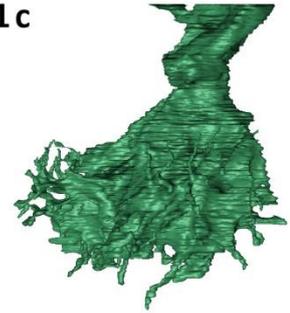
1a



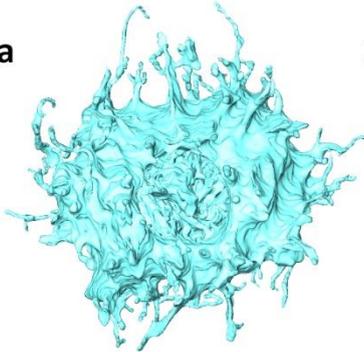
1b



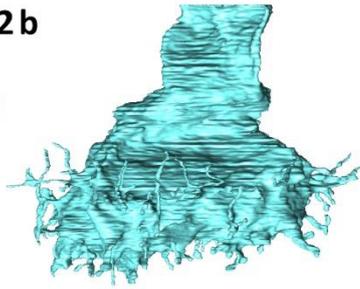
1c



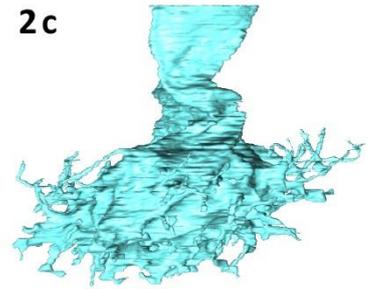
2a



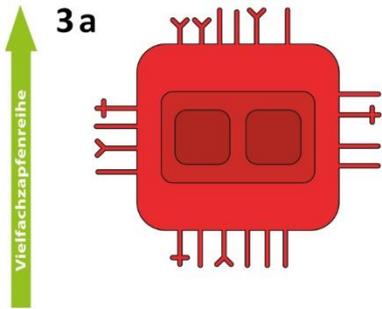
2b



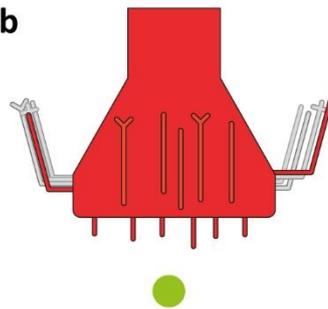
2c



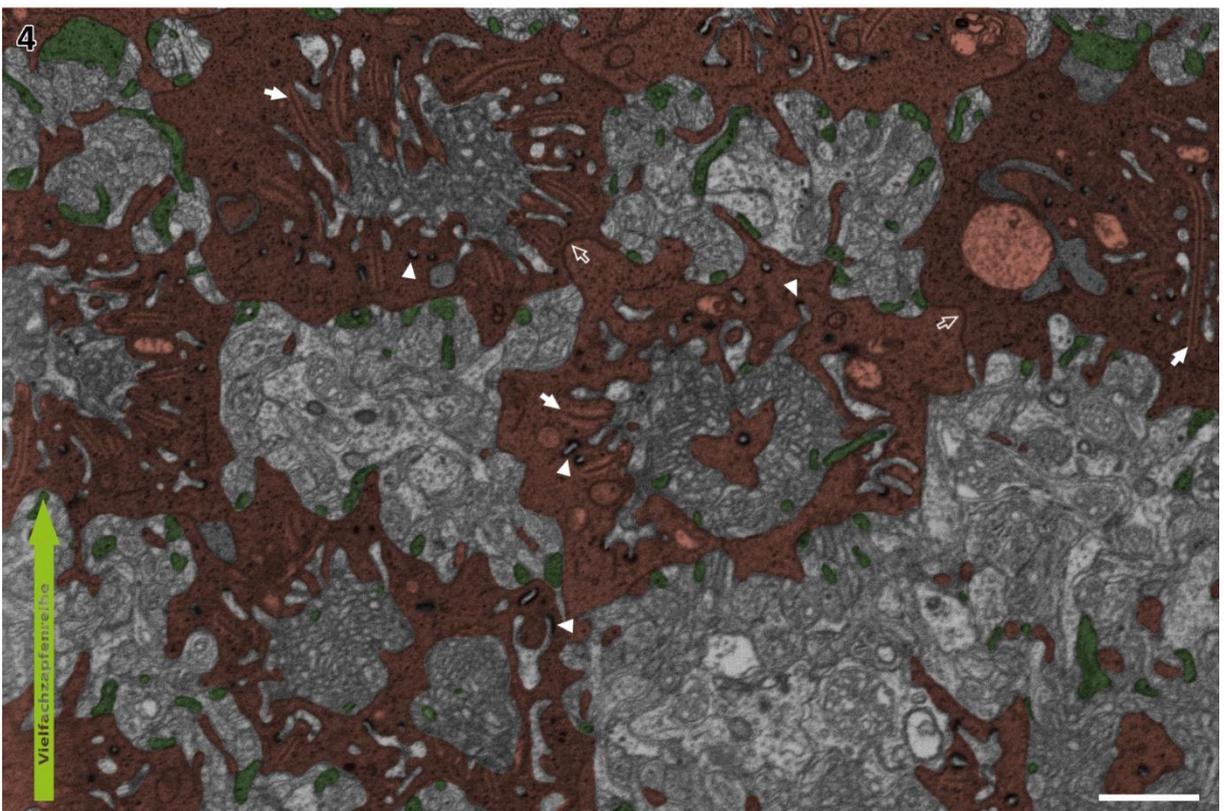
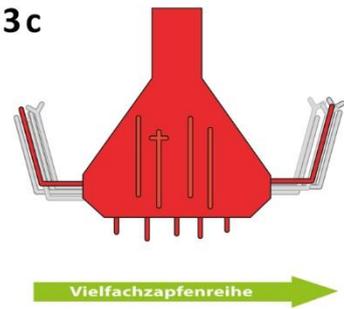
3a



3b



3c



und in der Breite 3/5 der maximalen Ausdehnung der Terminalen. Am Rand der Einbuchtung und gleichzeitig an den Kanten, die entlang der Vielfachzapfenreihe liegen, setzen 3 bis 5 fingerartige Telodendriten mit etwa 4 μm Länge an. Diese führen erst nach vitreal und dann, entlang der Zapfenreihen, von der Mittellinie der Terminalen weg. Gegen Ende ändert sich die Richtung und sie führen in skleraler Richtung zu den benachbarten Photorezeptor-Terminalen. In weniger als 40% aller Fälle spalten sich die Telodendriten im distalen Fünftel auf. Wenn das passiert, enden sie meist mit 2 Enden, maximal mit 3.

An jeder der 4 „Ecken“ der Terminalen findet sich jeweils ein einzelner Telodendrit. Diese Telodendriten setzen wesentlich weiter skleral am Körper der Terminalen an als die des Telodendriten-Kamms. Diese einzelnen Dendriten sind verhältnismäßig lang – zwischen 5 und 7 μm - und führen diagonal von der Terminalen weg, leicht nach vitreal, bevor sie auf Höhe des vitrealen Endes der Aushöhlung wieder nach skleral führen. Diese Telodendriten können sich früh in ihrem Verlauf aufspalten – bereits bei einem Fünftel der Gesamtlänge.

3.1.4 Terminalen der kurzen Zapfen

Die Terminalen der kurzen Zapfen haben entlang der Vielfachzapfenreihe eine durchschnittliche Länge von 4,61 μm und eine Breite von 8,07 μm . Die gesamte im Datenvolumen erfasste „Höhe“ ist durchschnittlich 6,26 μm .

Die Terminalen der kurzzapfigen Photorezeptoren (Abbildung 37) liegen etwas weiter vitreal als die der langzapfigen Photorezeptoren und bilden den am weitesten vitreal gelegenen Teil aller Anteile der Photorezeptoren des Vielfachzapfen. In ihrer Form sind sie in der Seitenansicht trichterförmig mit dem breitesten Abschnitt Richtung der Horizontalzellschicht. Im Querschnitt ist dieser Trichter auf seiner gesamten Länge annähernd rechteckig und orthogonal zu den Zapfenreihen gestreckt. An der Basis der Terminalen ist ein Bereich zu erkennen, an dem sie die Nachbarterminalen umschließen (siehe auch Abbildung 41.2). Vitreal auf der „Unterfläche“ der Terminalen befindet sich eine tiefe Aushöhlung, die weiter skleral in zwei Einbuchtungen aufgeteilt ist.

Am Rand der Aushöhlung, und damit gleichzeitig am breitesten Teil der Terminalen, der etwa 2 μm hoch ist, befindet sich ein mehrschichtiger Kranz an Telodendriten mit etwa 2 bis 4 μm Länge. Diese Telodendriten zeigen in alle vier Richtungen, sowohl entlang der Vielfachzapfenreihe wie auch orthogonal dazu. Diese führen entweder direkt von der Terminalen weg oder zuerst etwas nach vitreal, bevor sie dann von der Terminalen wegführen. Die eher dem skleralen Kranz zugehörigen Dendriten biegen dann wieder in Richtung skleral ab. Weiter vitreal ansetzende Telodendriten führen weiter vitreal in die äußere plexiforme Schicht hinein. Die skleral ansetzenden Telodendriten können sich im letzten Fünftel ihrer Länge ein- bis mehrfach aufspalten. Dies geschieht in etwa 40% aller Fälle.

Abbildung 37: Vorherige Seite: Morphologie der Terminalen der kurzzapfigen Photorezeptoren am Beispiel von (1) 2S2 und (2) 3S2 als 3D-Modell sowie dem Schema einer durchschnittlichen Terminalen (3). (a) zeigt jeweils eine vitreale Ansicht der Terminalen mit der zentralen Einbuchtung, die nochmals in zwei tiefergehende Einbuchtungen unterteilt und umgeben von einem Kranz an Telodendriten ist. Die „Ecken“ der Terminalen sind abgerundet. In der Ansicht entlang der Vielfachzapfenreihen (b) sieht man, dass die Telodendriten erst von der Mittellinie der Terminalen wegführen und dann nach skleral. In der Ansicht orthogonal zur Vielfachzapfenreihe (c) sieht man, stärker noch als in (b), dass die Terminalen an der Basis dünn sind und nach vitreal an Umfang zunimmt. (4) FIB-FESEM-Aufnahme auf Höhe (Ebene #0729) des voluminösesten Teils der Terminalen der kurzen Zapfen. Die leichte Kippung der Schnittserie (oben im Bild weiter skleral) sorgt dafür, dass die Terminalen auf verschiedenen Höhen geschnitten sind. Die Terminalen der Stäbchen (gelb), langen Zapfen (grün) und kurzen Zapfen (rot) sind farbig hinterlegt. Neben der Anordnung der Terminalen in den Zapfenreihen und der feinteiligen Strukturierung der zentralen Einbuchtungen der Terminalen erkennt man die Bänder („ribbons“, gefüllter Pfeil) und die synaptischen „Kappen“ (gefüllte Pfeilspitze). An den vier „Ecken“ der Terminalen der kurzen Zapfen sieht man die großen Kontaktbereiche (Pfeil) mit den benachbarten kurzen Terminalen der anliegenden Vielfachzapfenreihen. Maßstabsbalken: 1 μm .

Dadurch können bis zu fünf Endpunkte eines Dendriten entstehen, in den meisten Fällen sind es jedoch zwei oder drei.

3.1.5 Synaptische Strukturen

In allen Photorezeptorterminalen sind sogenannte präsynaptische Bänder („ribbons“) zu finden. Diese präsynaptischen Andockstationen für synaptische Vesikel haben ihren Namen von ihrer flachen und länglichen Form. Sie liegen jeweils im voluminösen Teil der Terminalen. Dort sind sie eher vitreal zu finden. Die Bänder eines Photorezeptortypen liegen jeweils in einer Ebene und sind hochkant entlang der Retinaschichten ausgerichtet (Abbildung 38.2a).

Die **Bänder beider Typen von zapfenförmigen Photorezeptoren** sind in Form, Länge und Anordnung weitgehend identisch. Während die Länge der Bänder zwischen 1,10 μm und 2,60 μm variiert, ist die Breite mit etwa 0,49 μm konstant. Die Bänder liegen pro Terminale in Gruppen von 10 bis 15 Bändern vor. Diese Gruppen erstrecken sich über einen Bereich mit einem Durch-

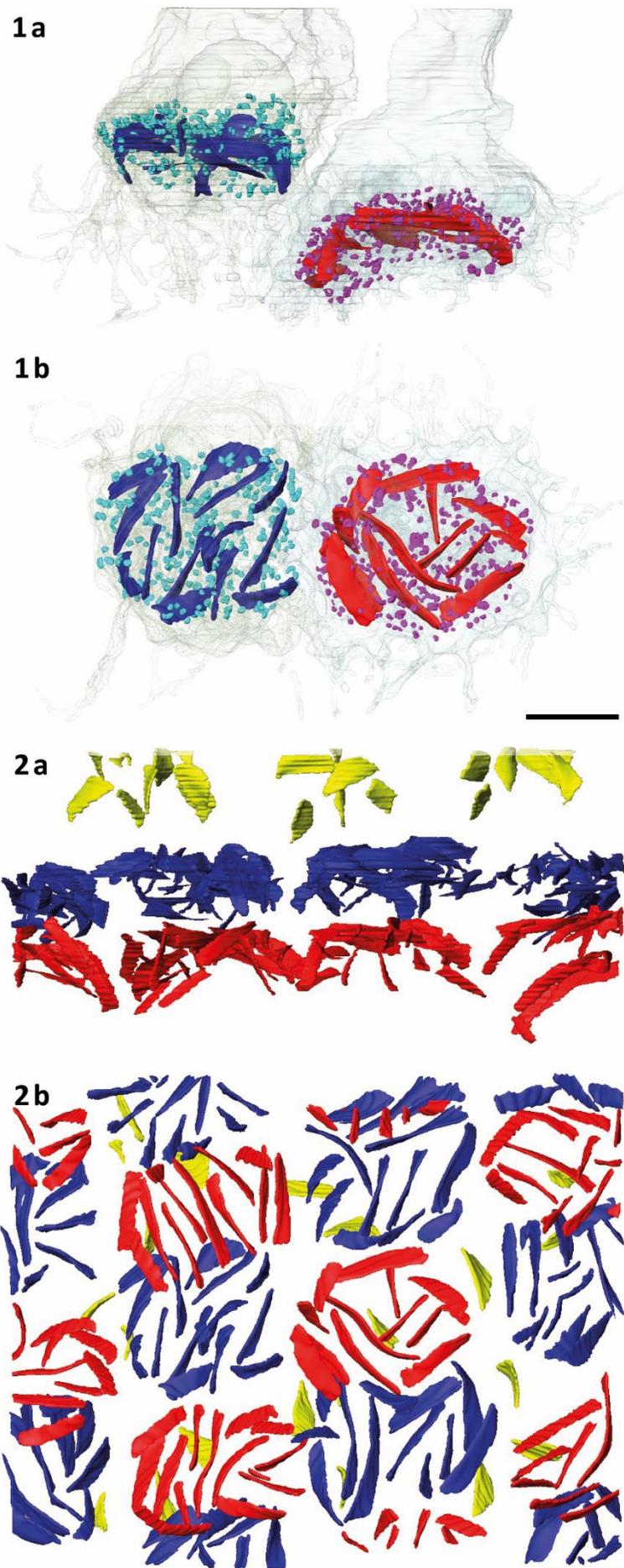


Abbildung 38: Synaptische Strukturen in den Zapfenterminals (3D-Modelle). (1) Die Bänder (**blau**) und Kappen (**türkis**) der langen Zapfen (**hellgrün**, **transparent**) liegen skleraler (**1a**) als die Bänder (**rot**) und Kappen (**magenta**) der kurzen Zapfen (**türkis**, **transparent**). In der Ansicht von vitreal (**1b**) ist zu erkennen, dass bei beiden Zapfentypen sowohl die Bänder wie auch die Kappen gleichmäßig in der Terminalen verteilt sind. (2) Die Bänder liegen, wie die Terminalen, sehr geordnet vor. In der Seitenansicht (**2a**) erkennt man die Stratifikation der Bänder der Zelltypen von vitreal nach skleral – Bänder der kurzen Zapfen (**rot**) → Bänder der langen Zapfen (**blau**) → Bänder der Stäbchen (**gelb**). In der Ansicht von vitreal (**2b**) erkennt man die gestaffelten Reihen der Zapfenbänder (Schachbrettmuster) und die, relativ dazu, eher ungeordnet vorliegenden Bänder der Stäbchen. Maßstabsbalken: 2 μm .

messer von etwa $4,50\ \mu\text{m}$ (entlang der Vielfachzapfenreihe $4,33\ \mu\text{m}$, orthogonal zur Zapfenreihen $4,74\ \mu\text{m}$) über den gesamten Durchmesser der Terminalen (Abbildung 38.1b). Die Form der Gruppen der Bänder folgt den Formen der Terminalen (Abbildung 38.1a). Dadurch haben die Gruppen der kurzen Zapfen mit durchschnittlich $2,46\ \mu\text{m}$ entlang der skleral-vitreale-Achse eine etwas größere Ausdehnung als die der langen Zapfen mit durchschnittlich $2,12\ \mu\text{m}$. Die Schicht der Bänder der Terminalen der kurzen Zapfen liegt etwa $2,2\ \mu\text{m}$ weiter vitreal als die der Terminalen der langen Zapfen. Dieser Versatz bewirkt in der Aufsicht eine leichte Überlappung der unterschiedlichen Gruppen von synaptischen Bändern der Terminalen einer Vielfachzapfenreihe (Abbildung 38.2b).

Die Bänder liegen entlang ihrer vitrealen Seite eng an der Außenmembran der Terminalen. Direkt benachbart dazu liegen zahlreiche Dendriten von Bipolar- und vor allem Horizontalzellen im extrazellulären Raum.

Die **kappenförmigen synaptischen Strukturen der zapfenförmigen Photorezeptoren** (Abbildung 38.1a und 38.1b, türkis und magenta) sind ebenfalls im gesamten vitrealen Bereich der Terminalen zu finden. Sie sind mit der Außenmembran der Terminalen assoziiert und entsprechen den „postsynaptic densities“ in den „synaptic spines“ der zahlreichen Dendriten der Horizontalzellen.

Die **Bänder der stäbchenförmigen Photorezeptoren** sind mit einer Länge von $1,41\ \mu\text{m}$ und einer Breite von $0,74\ \mu\text{m}$ im Durchschnitt deutlich kürzer und breiter als die der Zapfenterminalen. In jeder Stäbchenterminalen findet sich nur ein einzelnes synaptisches Band (Abbildung 34.3). Die Schicht dieser Bänder liegt deutlich skleraler als die der Bänder der zapfenförmigen Photorezeptoren (etwa $3\ \mu\text{m}$). Wie schon die Terminalen der stäbchenförmigen Photorezeptoren selbst, liegen auch die Bänder in relativ ungeordneter Form innerhalb der Schicht. In der Seitenansicht entlang der Vielfachzapfenreihen (Abbildung 38.2a) ist jedoch die Anordnung der Bänder parallel zu Zapfenreihe zu erkennen. Dies spiegelt die Anordnung der Terminalen wieder, welche aufgrund der raumausfüllenden Ausdehnung der Terminalen nicht deutlich zu erkennen ist. Zwischen den Stäbchen-Terminalen gibt es zusätzlich Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 34.4).

Mit der Membran assoziierte synaptische Strukturen (Abbildung 34.4, rosa) finden sich in allen Stäbchenterminalen. Die ein bis vier synaptischen Kontakte pro Terminale sind zum einen im Inneren der zentralen Einbuchtung zu finden, als Kontaktpunkt zu Horizontal- und Bipolarzellen. Zum anderen befinden sie sich an Ausstülpungen der Terminalen und bilden dort synaptische Kontakte zwischen benachbarten Terminalen (Abbildung 34.2).

3.1.6 Die (Telo-)Dendriten der Zapfenterminalen

Jeder Zapfentyp weist ein spezifisches dreidimensionales Verschaltungsmuster zu benachbarten Zapfen auf. Dabei konnten bei manchen Dendriten synaptische Strukturen nachgewiesen werden und bei manchen nicht.

Die kurzen Terminaldendriten („Telodendriten“) der **langen Zapfen** kontaktieren primär die benachbarten kurzen Zapfenterminalen. Zusätzlich werden mit vier eck- und diagonalständigen langen einzelnen Dendriten die umgebenden vier langen Zapfen der benachbarten Vielfachzapfenreihe kontaktiert (Abbildung 39.1).

- (A) Lange Zapfen der (direkt) benachbarten Vielfachzapfenreihe werden jeweils mit einem einzelnen Dendriten kontaktiert. Dieser läuft diagonal über den Kontaktpunkt zweier nachbarreihiger kurzer Zapfenterminalen hinweg, um den gestaffelten langen Zapfen der nächsten Reihe zu erreichen.
- (B) Kurze Zapfen derselben Vielfachzapfenreihe werden durch 3 – 5 Dendriten des langen Zapfens kontaktiert. Zudem gibt es in Richtung der kurzen Zapfenterminalen noch einige (pro

Terminale 1 – 4) Dendriten, die es nicht bis zur Terminalen „geschafft“ haben. Unklar ist, ob es sich hierbei um Kontakte zu anderen Strukturen beziehungsweise um ein bewegliches System handelt oder ob sie einfach blind enden.

- (C) Kurze Zapfen stehen gelegentlich auch über eine Abzweigung eines der langen diagonal verlaufenden Dendriten mit den direkt anliegenden kurzen Zapfenterminalen derselben Vielfachzapfenreihe in Kontakt (Abbildung 39, C und Abbildung 40: **2L3 zu 2S2**, **2L2 zu 2S2**, **2L2 zu 2S1** und **4L3 zu 4S2**).

Bei einer der 10 im Beobachtungsvolumen vorhandenen Terminalen der langen Zapfen gab es zudem einen direkten Kontakt von Dendriten zweier langer Zapfen derselben Vielfachzapfenreihe (Abbildung 40: **4L2 zu 4L1**). Dieser Kontakt kam an drei Stellen vor.

- Zweimal in der synaptischen „Höhle“ der dazwischenliegenden kurzen Zapfenterminalen → funktional sind dies zu Beginn Dendriten wie in (B).
- Einmal am langen diagonalen Dendriten des anderen inreihigen langen Zapfens, der eigentlich zum langen Zapfen der benachbarten Vielfachzapfenreihe führt → wie in (A).

Besonders dabei ist zusätzlich, dass in diesem Fall zwei Dendriten einer einzelnen langen Zapfenterminalen die Nachbarreihe kontaktieren (Abbildung 40: **4L2 zu 3L2**). Einer davon berührt diese wie in (A) beschrieben. Der andere beginnt als Kontakt wie in (B). Der Dendrit spaltet sich jedoch auf und bildet dann die drei untypischen inreihigen Kontakte (Abbildung 40: **4L2 zu 4S1** und **3L2**) und einen weiteren Kontakt zur Nachbarreihe (Abbildung 40).

Die Endterminalen der **kurzen Zapfen** stehen mit allen 8 sie umgebenden Endterminalen in Kontakt (Abbildung 39.2).

- (D) Kurze Zapfen der benachbarten Vielfachzapfenreihe werden über direkte Zell-Zell-Verbindungen kontaktiert. Es wurden keine synaptischen Strukturen gefunden.

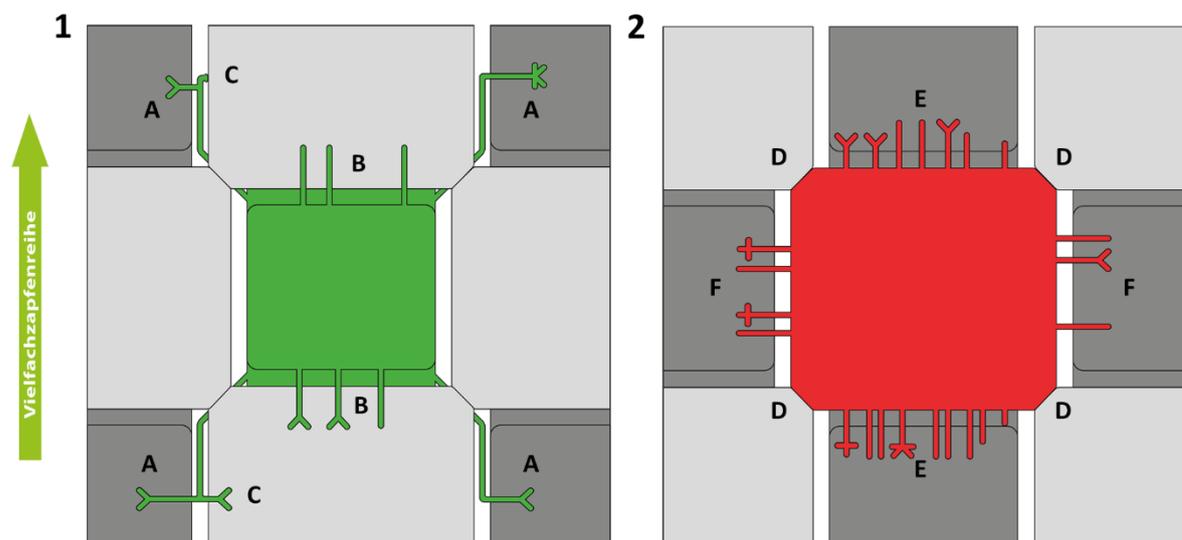


Abbildung 39: Skizze der Verbindungen der Terminalen der Photorezeptoren einer Vielfachzapfenreihe.

(1) Interterminalverbindungen eines langzapfigen Photorezeptors am Beispiel der Terminalen 2L2: (A) Kontakte mit langen diagonalen Dendriten zu den nächstgelegenen Langzapfen-Terminalen der benachbarten Vielfachzapfenreihe. (B) Kurze Dendriten zu den benachbarten Kurzzapfen-Terminalen derselben Zapfenreihe und (C) Kontakte der langen diagonalen Dendriten zu den Kurzzapfen-Terminalen derselben Zapfenreihe.

(2) Interterminalverbindungen eines kurzzapfigen Photorezeptors am Beispiel der Terminalen 3S2: (D) Zellkörperkontakt zu den benachbarten kurzzapfigen Terminalen der benachbarten Vielfachzapfenreihen. (E) Kontakt zu den direkt anliegenden Langzapfen-Terminalen derselben Zapfenreihe mit kurzen Dendriten und (F) Kontakt zu den direkt benachbarten Langzapfen-Terminalen der anliegenden Vielfachzapfenreihe.

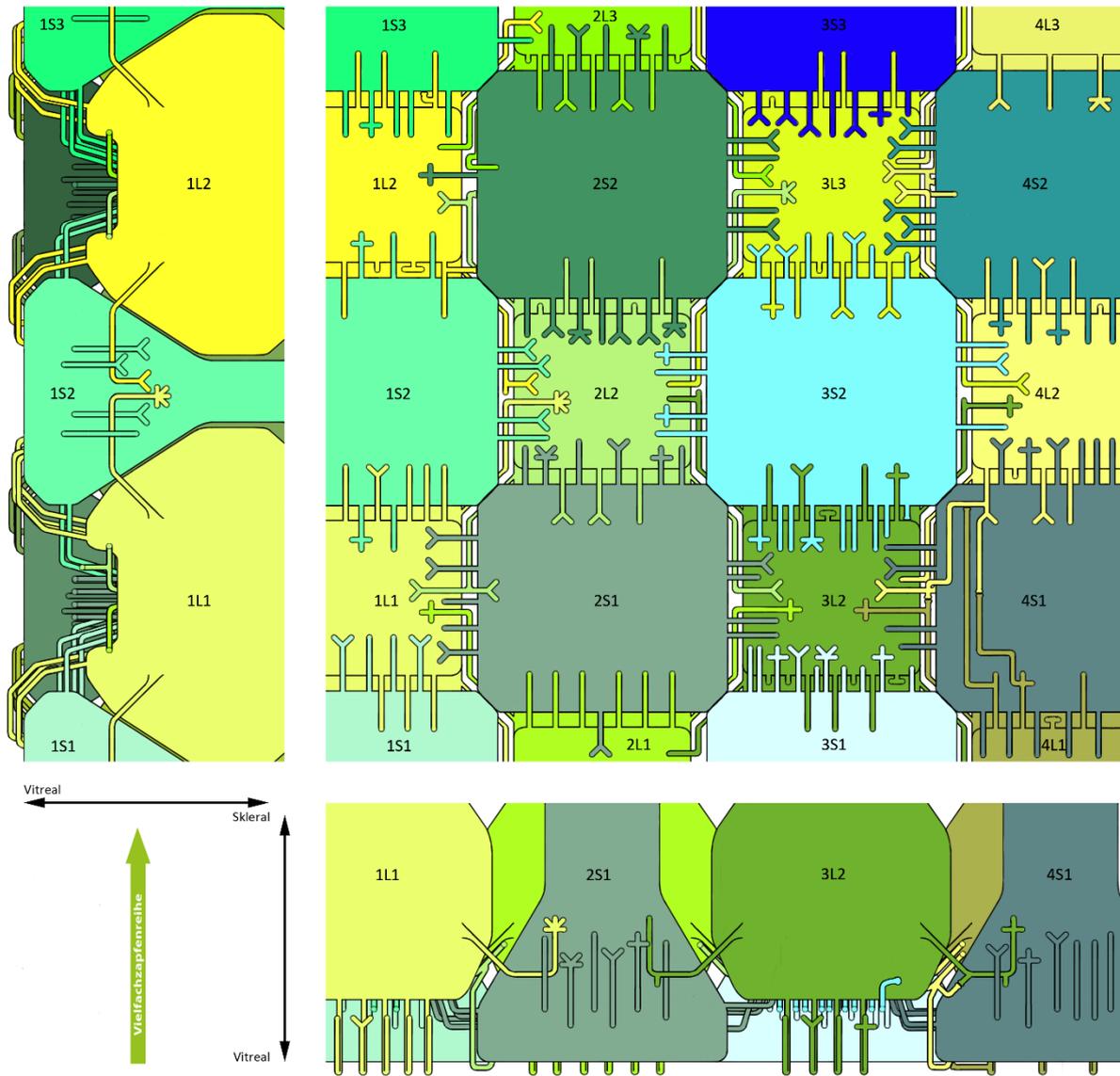


Abbildung 40: Schema des Netzwerkes an interterminalen Kontakten in der äußeren plexiformen Schicht einer Retina mit Vielfachzapfenreihen. Die Farbkodierung entspricht der in Abbildung 41. Die Zapfenterminalen sind nach Reihen **(1-4)**, als kurze **(S)** oder lange **(L)** Zapfen und nach ihrer Position in der Reihe **(1-4)** beschriftet, zum Beispiel **3S2**. Neben einer vitrealen Ansicht (**oben rechts**) gibt es eine Seitenansicht der Vielfachzapfenreihe (**oben links**) und eine Ansicht orthogonal zur Zapfenreihen (**unten**). Basierend auf den 3D-Modelle in Abbildung 41.

- (E) Direkt benachbarte lange Zapfen derselben Zapfenreihe werden durch 5 – 10 Dendriten kontaktiert. Diese Einzeldendriten spalten sich zum Teil in bis zu 4 Untereinheiten auf.
- (F) Die direkt anliegenden langen Zapfen der benachbarten Vielfachzapfenreihe werden mit 1 – 4 Dendriten kontaktiert. Diese Einzeldendriten spalten sich zum Teil in bis zu 3 weitere Dendriten auf.

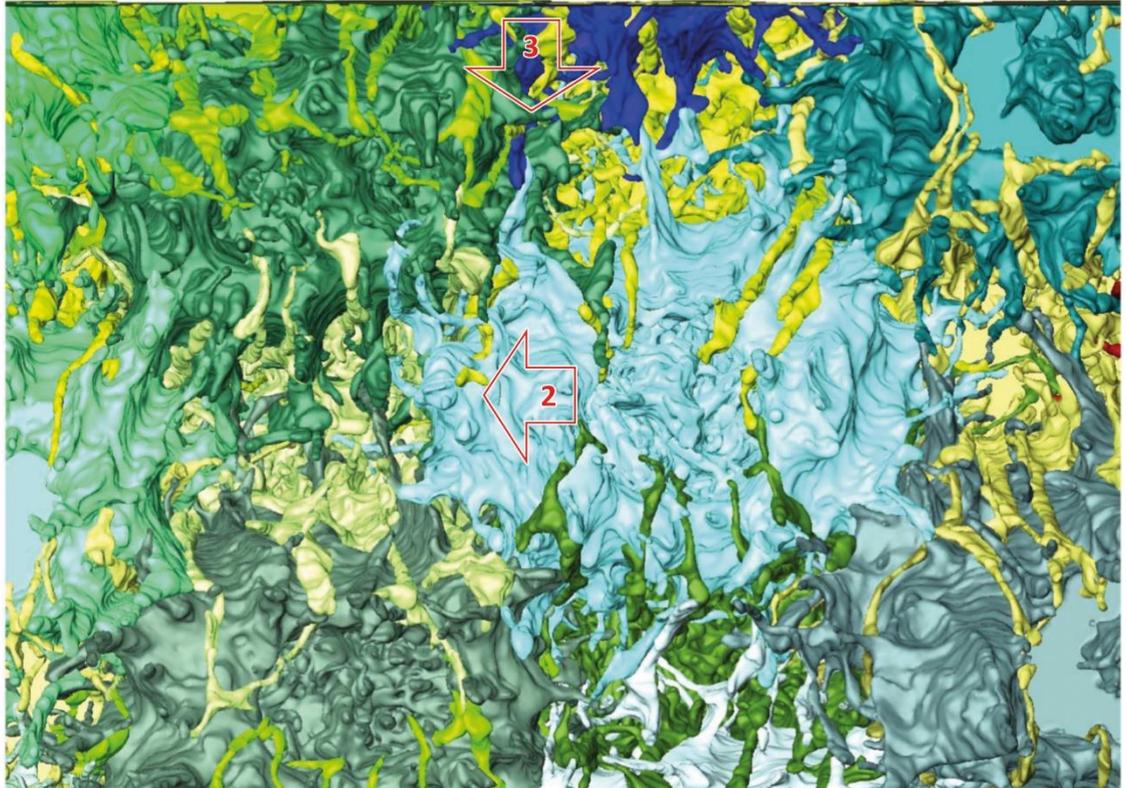
3.1.7 Das interterminale Netzwerk

Die Photorezeptorterminalen sind in der OPL sehr dicht und raumfüllend angeordnet und zusätzlich mit einem vierteiligen Netzwerk aus Dendriten untereinander verbunden. Wie schon auf der Ebene der äußeren Segmente der Photorezeptoren liegen auch die Terminalen der Photorezeptoren in parallelen

Abbildung 41: Nächste Seite: Das Netzwerk der Zapfenterminalen (3D-Modelle). **(1)** Vitreale Ansicht mit den dichtgepackten Terminalen und Telodendriten. Die Ansichtsrichtungen der Seitenansichten sind mit roten Pfeilen markiert. **(2)** Seitenansicht einer Vielfachzapfenreihe. **(3)** Ansicht orthogonal zu den Vielfachzapfenreihen. Maßstabsbalken: 2 μm .

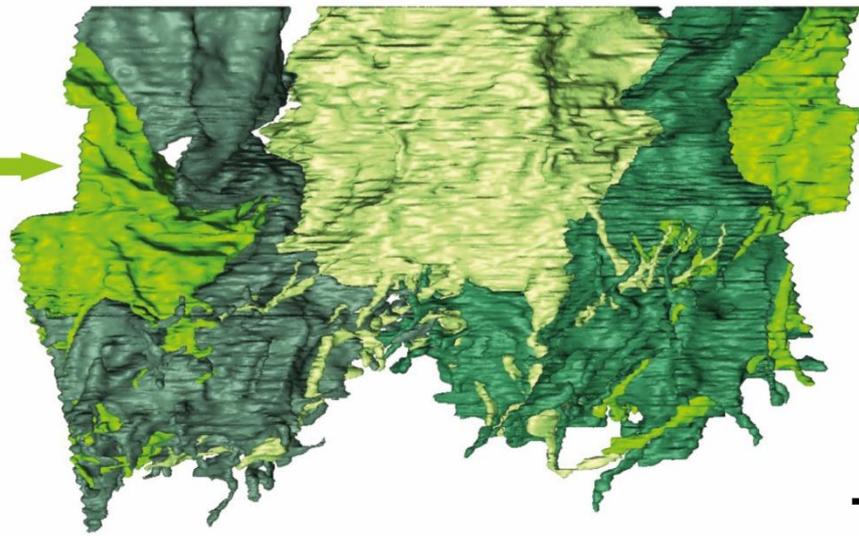
1

Vielfachzapfenreihe

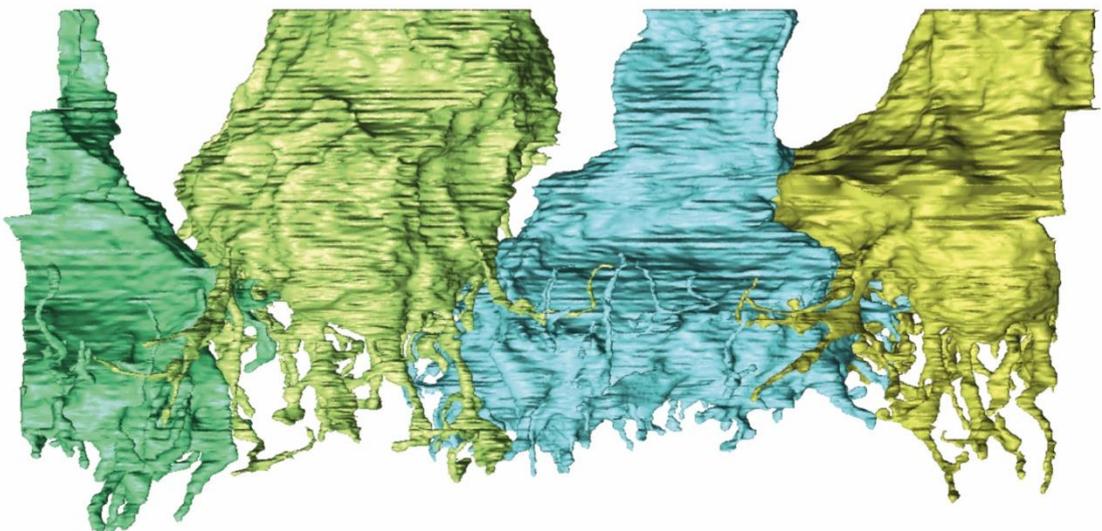


2

Vielfachzapfenreihe



3



Reihen und gestaffelt vor (Abbildung 40 und Abbildung 41). In der Regel reichen die Kontakte einer Terminalen nur bis zu den benachbarten Zellen. Am weitesten reichen hierbei die langen diagonalen Dendriten der langzapfigen Terminalen. Diese kontaktieren die diagonal liegenden Terminalen langer Zapfen der benachbarten Vielfachzapfenreihe.

Der Ort der stärksten Verschränkung findet sich entlang der Vielfachzapfenreihen in Form einer Vielzahl an Dendriten. Diese reichen sowohl von den kurzzapfigen wie auch von den langzapfigen Terminalen zu den benachbarten Zellen derselben Reihe.

Zwischen den Vielfachzapfenreihen gibt es jedoch auch ausgeprägte Verbindungen, wenn weniger ausgeprägt wie innerhalb der Reihen. Diese gehen überwiegend von den Terminalen der kurzen Zapfen aus, die über kurze Dendriten Kontakt zu den direkt neben ihnen liegenden langzapfigen Terminalen haben. Zudem ist durch Zell-Zell-Kontakt auch jeweils eine Verbindung zu den 4 diagonal liegenden kurzzapfigen Terminalen der Nachbarreihen aufgenommen. Hier konnten keine synaptischen Strukturen nachgewiesen werden. Der Kontakt ist jedoch deutlich und bei allen kurzzapfigen Terminalen in alle vier Richtungen zu finden (Abbildung 39.2). Außerdem gibt es die diagonalen Verbindungen der langzapfigen Terminalen zu den Terminalen gleichen Typs in den Nachbarreihen.

3.1.8 Kontakte zu Sekundärneuronen

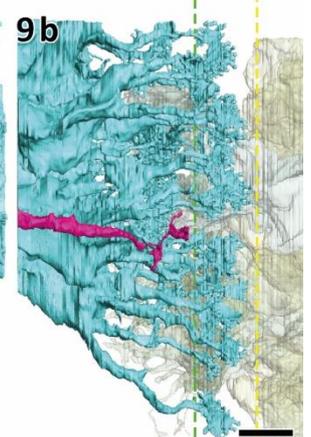
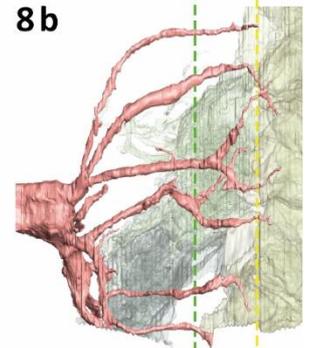
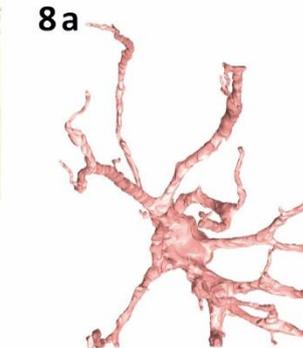
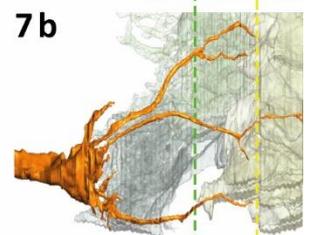
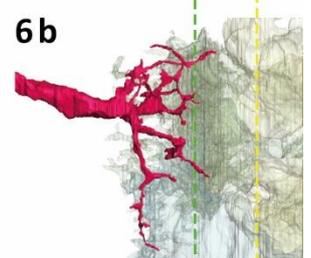
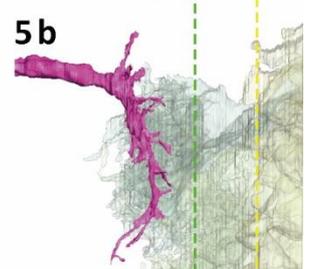
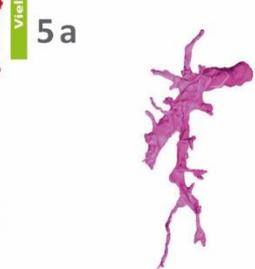
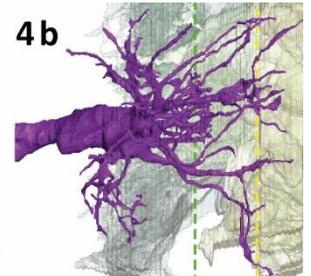
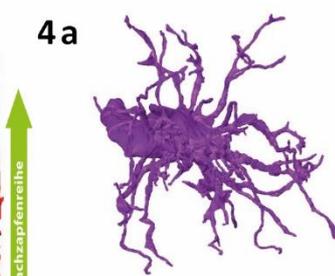
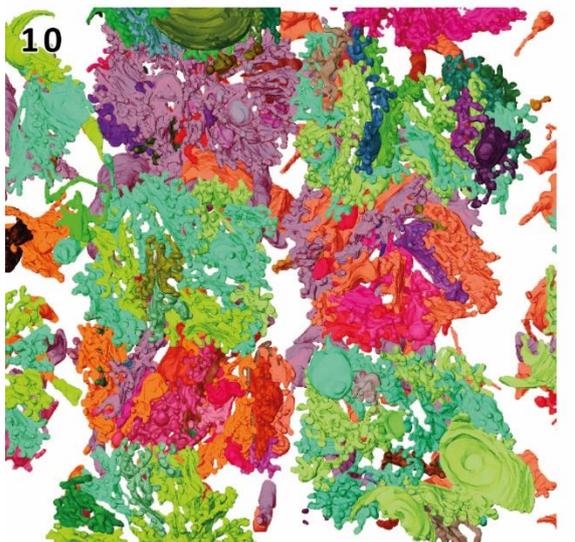
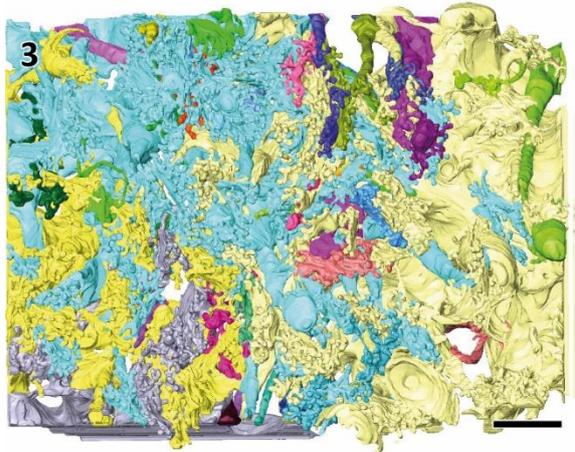
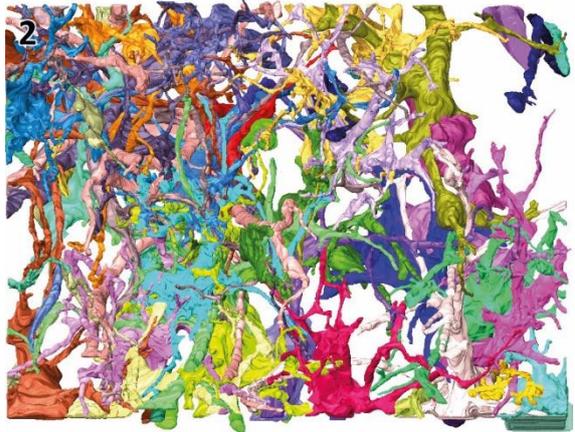
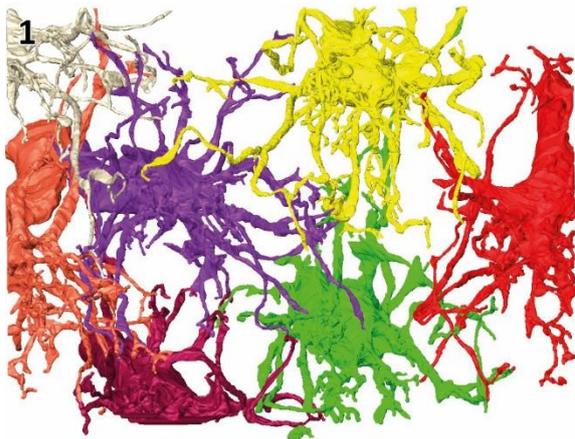
Es konnten einige synaptischen Kontakte zu Bipolar- und Horizontalzellen sowie die zugehörigen Dendriten identifiziert und segmentiert werden (Abbildung 43). Die hohe Anzahl der Dendriten in der Einbuchtung der Terminalen der Photorezeptoren deutet auf deutlich mehr Kontakte mit Sekundärneuronen hin, alle mit prä- und postsynaptischen Strukturen. Diese konnten aber mit der verwendeten Methodik (Färbung, Auflösung) nicht visualisiert werden.

Dies galt auch für einen großen Teil (85% nach Anzahl) der feinen Dendriten, die in die Terminalen hineinreichten (Abbildung 43). Aufgrund zeitlicher Faktoren wurden nur diejenigen Dendriten segmentiert und rekonstruiert, die über mehrere dutzend Schnitte hinweg klar nachverfolgbar waren.

Bipolarzellen

Insgesamt konnten 57 Dendritenbäume von Bipolarzellen rekonstruiert werden (teils vollständig, teils am Rand des VOI gekappt). Dabei konnte eine Gruppe von 7 Dendritenbäumen in Form und Kontakten gleicher Dendriten identifiziert werden, deren Anordnung mit dem Muster der Terminalen der Vielfachzapfenreihen koordiniert erscheint (Abbildung 42.1). Diese Dendritenbäume liegen zentral unterhalb einer Terminalen eines langzapfigen Photorezeptors und bilden Kontakte dazu aus. Zudem werden alle umliegenden kurzzapfigen Photorezeptoren sowie umliegende Terminalen von stäbchenförmigen Photorezeptoren (Abbildung 42.4) kontaktiert.

Abbildung 42: Nächste Seite: Sekundärneuronen der äußeren plexiformen Schicht (3D-Modelle). **(1)** bis **(3)** in einer Aufsicht von skleral, die Ausrichtung zur Vielfachzapfenreihe ist gleich. **(1)** Eine Gruppe von Bipolarzell-Dendriten, die dem Vielfachzapfenmuster folgen, und **(2)** die restliche Dendriten von Bipolarzellen in der VOI. **(3)** Die Horizontalzellen des Datenvolumens. **(4)** bis **(9)** Einzeldarstellungen verschiedener Dendritenbäume der Sekundärneuronen. **(a)** Aufsicht von skleral, **(b)** Seitenansicht (links = vitreal) mit den Terminalen der Photorezeptoren in transparenter Darstellung: **(gelb)** Stäbchen, **(dunkelgrün)** kurze Zapfen, **(hellgrün)** lange Zapfen. Die Verschaltungshorizonte für die langen Zapfen **(grüne Linie)** und die Stäbchen **(gelbe Linie)** sind dargestellt. **(4)** Bipolardendrit „B3“, gehört zur Gruppe aus **(1)**. **(5)** Bipolardendrit „Z48“. **(6)** Bipolardendrit „Z30“. **(7)** Bipolardendrit „Z12“. **(8)** Bipolardendrit „Z24“. **(9)** Horizontalzellendendriten „HZ1_1“ **(türkis)** und „H28“ **(magenta)**. **(10)** Vergrößerte Ansicht des zentralen Bereiches in **(3)**, Verteilung der Horizontaldendriten (Die Zellkörper sind ausgeblendet) in den Terminalen. Die Dendriten sind farblich unterteilt, je nachdem welchen Typ sie kontaktieren. Die Dendriten-Äste mit Kontakt zu kurzen Zapfen sind **rot** und die zu langen Zapfen **grün**. Maßstabsbalken: 2 µm.



↑
Vielfachplienreihe

1

2

3

10

4a

4b

5a

5b

6a

6b

7a

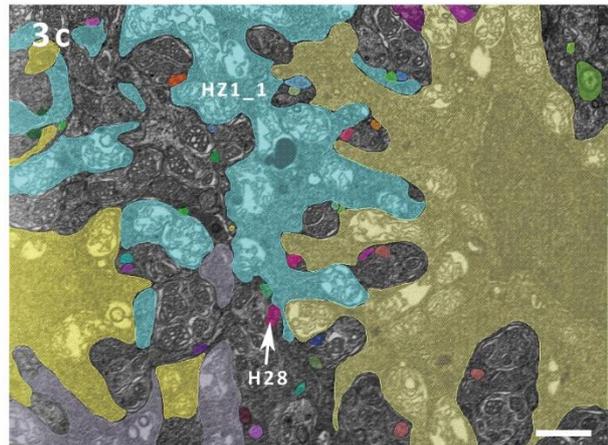
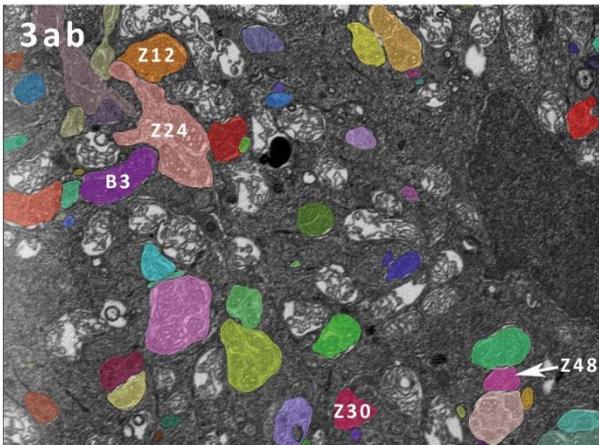
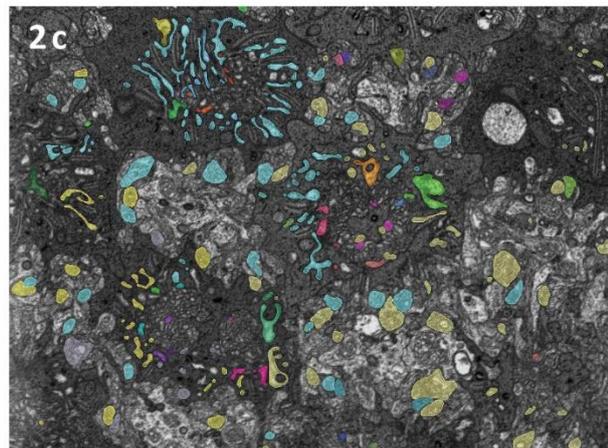
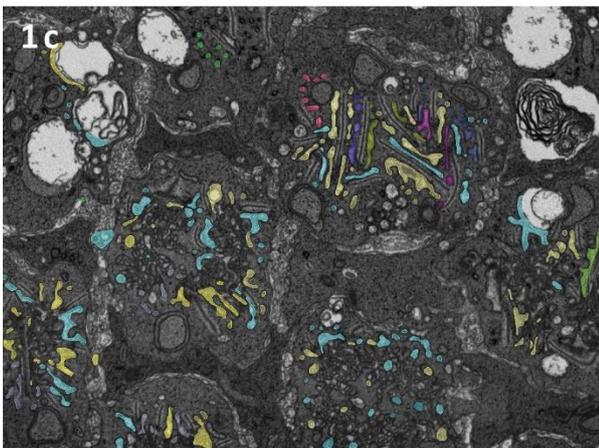
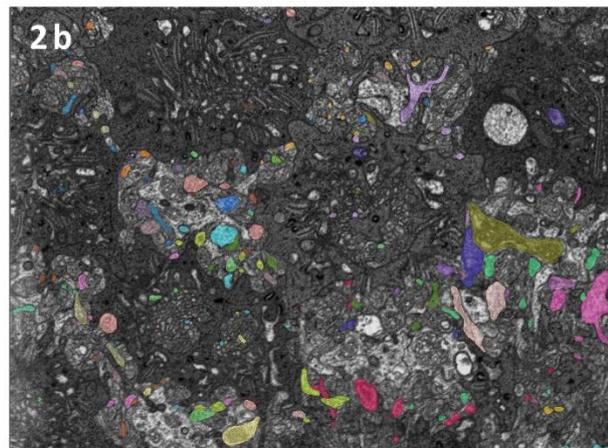
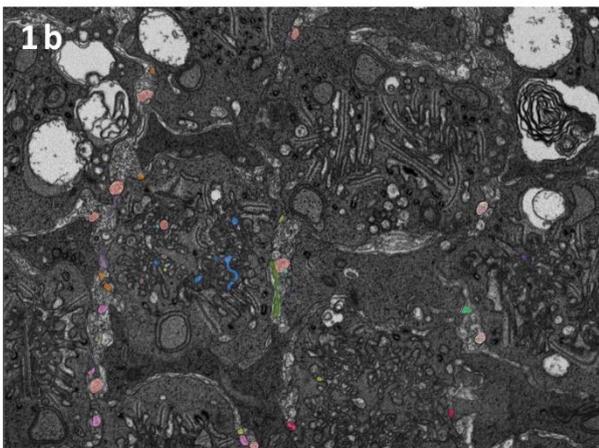
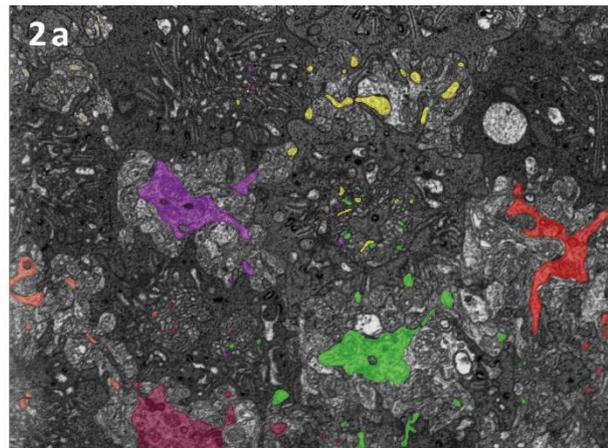
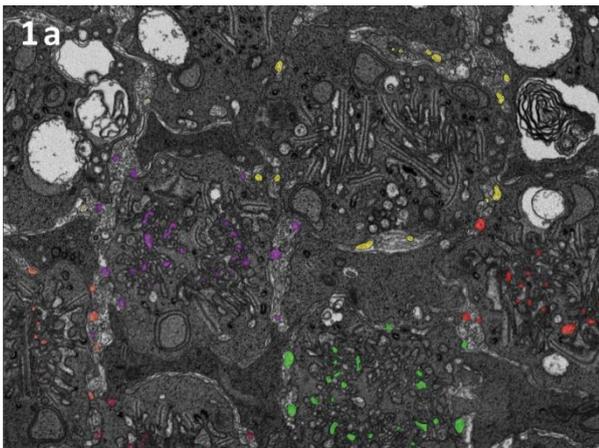
7b

8a

8b

9a

9b



Außerdem konnten weitere 50 Dendriten mit sehr unterschiedlichen Formen und Kontaktmustern rekonstruiert werden (Abbildung 42.2 sowie 42.5 bis 42.8). 40 dieser Dendriten sind nicht vollständig im Volumen erfasst. Bei 21 davon läuft der vitreal führende Hauptast aus dem Datenvolumen heraus, bei den restlichen fehlen Teile des Dendritenbaums. Die Dendriten kontaktieren sowohl die Terminalen der langen und kurzen Zapfen als auch die der Stäbchen. Der von der Anzahl her größte Anteil der Kontakte findet mit den Zapfenterminalen statt. Dabei konnten keine für die einzelnen Terminalen spezifischen Dendritenbäume identifiziert werden. Es konnten Dendritenbäume gefunden werden, die nur die Terminalen von kurzen Zapfen kontaktieren (Abbildung 42.5), und Dendriten, die nur die Terminalen von langen Zapfen kontaktieren (Abbildung 42.6). Es konnten auch zwei Typen von Dendriten identifiziert werden, die eine Terminale eines kurzzapfigen Photorezeptors kontaktieren und dann entweder mit wenigen Stäbchenterminalen (4) in einem kleinen Umfeld (Durchmesser 5,3 μm) um die kontaktierte Zapfenterminale (Abbildung 42.7) oder mit mehreren Stäbchenterminalen (7) in einem größeren Umfeld (Durchmesser 10,9 μm) um die kontaktierte Zapfenterminale (Abbildung 42.8) in Verbindungen stehen. Da dieser Dendritenbaum sehr groß ist, ist er nicht komplett in der VOI erfasst.

Horizontalzellen

Der sklerale Teil der Zellkörper von 5 Horizontalzellen ist im Volumen erfasst. Diese Zellen haben jeweils viele Dendriten, die in Kontakt mit mehreren Zapfenterminalen, sowohl von kurzen wie auch von langen Photorezeptoren, stehen (Abbildung 42.9, türkis). Die Dendriten beginnen als längliche, nach skleral führende Stränge, die sich auf Höhe der skleralen Einbuchtungen der Terminalen in mehrere längliche Strukturen aufteilen und an deren Ende sich viele Bläschen („spines“) befinden. Diese bilden markante kappenförmige postsynaptische Strukturen („postsynaptic densities“) aus (siehe auch Abbildung 38). Gleichzeitig liegen sie direkt neben den synaptischen Bändern der Terminalen (Abbildung 38.1).

Im Volumen wurden 33 Dendriten (Abbildung 42.9, magenta) von Horizontalzellen rekonstruiert, deren Zellkörper außerhalb des Datenstapels liegen. Ob mehrere dieser Dendriten zur selben Horizontalzelle gehören, konnte nicht festgestellt werden. Die Dendriten reichen als relativ „dicke“ zylinderförmige Fortsätze (durchschnittlicher Durchmesser 0,32 μm) bis auf Höhe des vitrealen Endes der Terminalen der kurzen Zapfen. Dort spalten sie sich in einen oder mehrere dünne und längliche (durchschnittliche Länge etwa 1,71 μm) Äste auf. Sie kontaktieren sowohl die Terminalen von kurzen wie auch von langen Zapfen.

Weitere Dendriten von Horizontalzellen (54 Stück) konnten eindeutig in den Terminalen identifiziert, aber nicht bis zum vitrealen Ende der Bilderreihe verfolgt werden. Ein Teil dieser Dendriten (20 Stück) lief dabei seitlich aus dem beobachteten Volumen heraus. Ein anderer Teil (34 Stück) konnte aufgrund von Auflösungs- und Kontrastproblemen auf Höhe der Terminalen nicht weiterverfolgt werden.

Abbildung 43: Vorherige Seite: Sekundärneuronen der äußeren plexiformen Schicht (SEM-Bilder). Im FIB-FESEM-Verfahren erzeugte Bilder mit farblich hinterlegten Dendriten von Bipolar- und Horizontalzellen aus Amira®. **(1)** Ebene #0458 **(2)** Ebene #0729 und **(3)** Ebene #1100. Die Orientierung der Bilder und der Farben entspricht den 3D-Modellen in Abbildung 42.1-3. **(a)** zeigt jeweils die Bipolaren-Population, deren Anordnung der Dendritenbäume mit dem Verlauf der Vielfachzapfenreihen korreliert ist, **(b)** zeigt die restlichen rekonstruierten Bipolarzellen, **(c)** zeigt die Horizontalzellen die im Volumen rekonstruiert wurden. Die in Abbildung 42 gezeigten Einzelzellen sind in **(3)** beschriftet. Maßstabsbalken: 1 μm .

3.2 Teil 2: 3D-Elektronenmikroskopie und Methodenkombinationen

Eine Übersicht der Daten aller verwendeten Bilderstapel findet sich in der Tabelle "Die Bilderstapel: Auflösungen, Dateigrößen, Voxelsize" (Seite 148). Im Folgenden definiert die ursprüngliche Scan-Ebene die Raumachsen X und Y. Die Z-Achse verläuft immer entlang der Schnittrichtung der Bilderstapel.

3.2.1 ssTEM und FIB-FESEM

ssTEM

Das serial sectioning TEM-Verfahren liefert einen 100 Bilder umfassenden Datenstapel, der ein Volumen von $53,9 \times 132,2 \times 8 \mu\text{m}^3$ enthält. Die aufwändige Registrierung des Bilderstapels machte eine 3D-Rekonstruktion von einzelnen Zellen möglich. Es konnten mehrere Bipolarzellen und eine Amakrinzelle identifiziert und teilweise über das gesamten Probenvolumen nachverfolgt werden.

Der Datenstapel ist, vor allem im Vergleich mit anderen hier durchgeführten Schneidemethoden, in der Z-Achse, sehr flach (Abbildung 44.1), da er mit 100 Stück nur aus relativ wenigen Schnitten besteht.

Rekonstruktion anhand des ssTEM-Bilderstapels

Dies zeigt sich deutlich in den 3D-Modellen der segmentierten Bipolar- und Amakrinzellen (Abbildung 44). Keine der Zellen konnte in ihrer gesamten Ausdehnung in allen Achsen verfolgt werden. Es war jedoch möglich, eine Bipolarzelle (türkis) von der äußeren plexiformen Schicht bis zu ihrer, fast bis zur Ganglienzellschicht reichenden, Axonterminalen in der inneren plexiformen Schicht zu segmentieren. Fehlende Bereiche liegen dabei im Bereich des Zellkerns und auch die Axonterminale ist nicht im vollem Umfang erfasst. Trotz einer sorgfältigen und nach Möglichkeit automatisierten, Registrierung der Bilder kam es teilweise zu Versätzen von bis zu $1,4 \mu\text{m}$ zwischen zwei Bildern (Pfeilspitzen in Abbildung 44).

Anliegend an den Dendriten dieser Bipolarzelle, welche als Teil eines Bipolar-Axon-Bündels die Müller'schen Bänder durchqueren, konnte der Dendrit einer weiteren Bipolarzelle (grünblau) verfolgt werden. Deren nach vitreal führendes Axon führt kurz nach dem Zellkern aus dem Bilderstapel heraus.

Beginnend an den Müllerbändern wurden vier weitere Bipolarzellen segmentiert. Davon konnte eine (gelbgrün) bis zu ihren Axonterminalen in der inneren plexiformen Schicht verfolgt werden. Eine andere (rot) wurde ebenso bis in die innere plexiforme Schicht segmentiert, ihre Axonterminale liegt außerhalb des Bilderstapels. Die dritte (orange) und vierte Zelle (grün) liegt bis zur vitrealen Grenze der inneren nukleären Schicht vor.

Eine weitere Bipolarzelle (blau) wurden ausgehend von ihren Axonterminalen in der inneren plexiformen Schicht segmentiert. Sie konnte bis zur skleralen Grenze der IPL verfolgt werden. Damit konnten in der inneren plexiformen Schicht, drei Axonterminale (I, II und III) auf verschiedenen Höhen, entsprechend Verschaltungshorizonten, rekonstruiert werden.

Ausgehend von einer synaptischen Verschränkung mit einer der Bipolarzellen (türkis) konnte eine Amakrinzelle (Abbildung 44.2 A, violett) rekonstruiert werden. Diese ist von ihrem Zellkern bis zu ihren Terminalen in der inneren plexiformen Schicht entlang der skleral-vitrealen Achse komplett im Probenvolumen vertreten.

Um das Doppelband der Müllerzellen herum wurde das Zellsomata einer Horizontalzelle rekonstruiert (Abbildung 44.2 H): Ho1 (hellrot) liegt skleral der Müllerbänder und gehört zum selben Zelltyp wie die einzelnen Horizontalzellen, die bereits in Kapitel 3.1.8 „Horizontalzellen“ beschrieben wurden (Typ H2

FIB-FESEM

Der erstellte Bilderstapel (FIB 703) umfasst, bei einer Datengröße von 4 GB, 1332 Ebenen. Das damit abgebildete Gewebevolumen beträgt $1920 \mu\text{m}^3$ ($16 \times 12 \times 10 \mu\text{m}$). Die Strukturen, die in der Rekonstruktion in Amira® identifiziert werden konnten, sind ausführlich in Kapitel 3.1 beschrieben.

Kombination ssTEM und FIB-FESEM

Die Datenstapel des FIB-FESEM-Scans (FIB 703) und der ssTEM-Schnittserie konnten miteinander kombiniert werden. Zumindest ein Axonbündel der Bipolarzellen aus dem FIB-FESEM-Scan konnte im ssTEM-Stapel identifiziert und damit nachverfolgt werden (Abbildung 45).

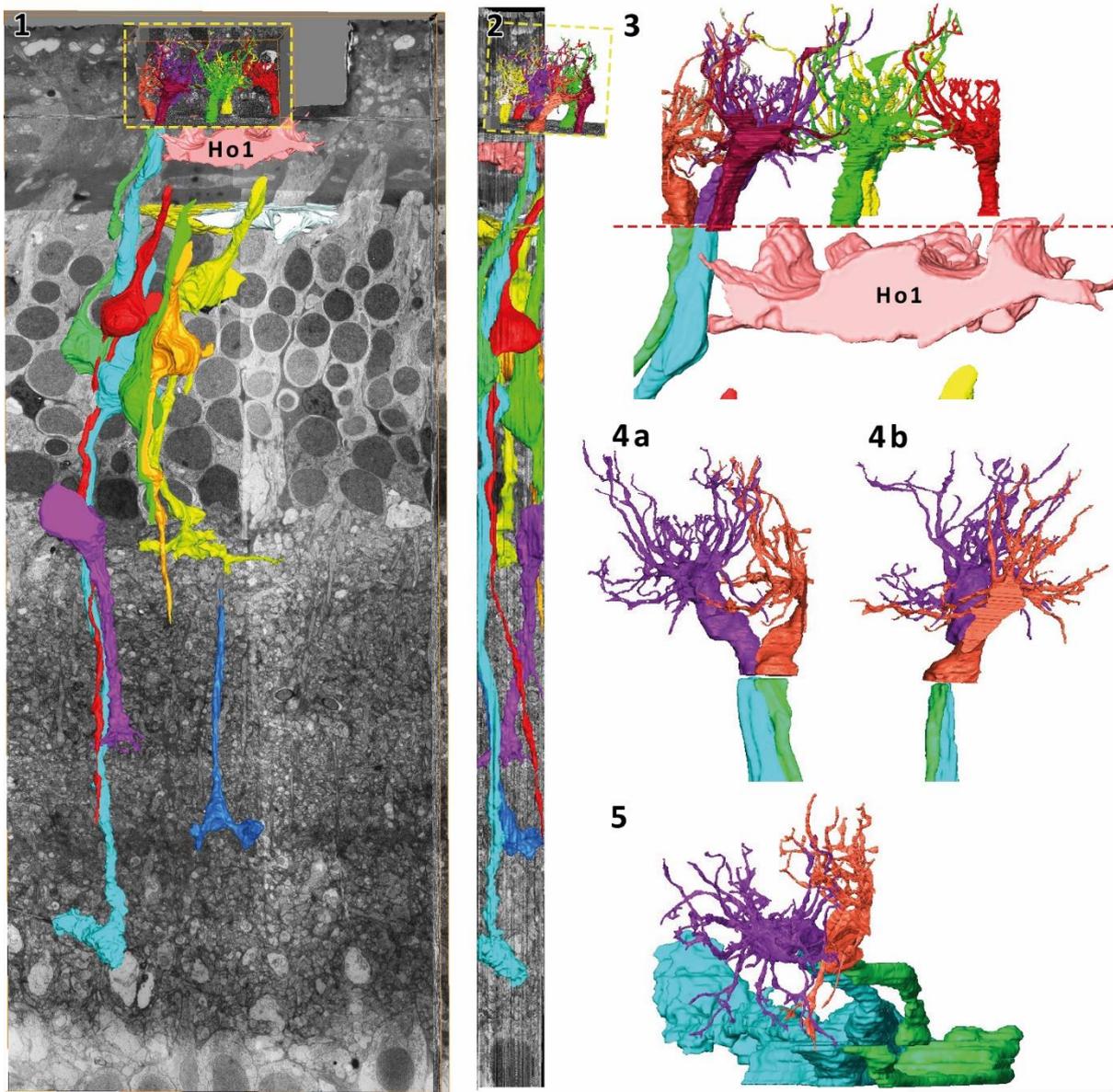


Abbildung 45: Kombination des FIB-FESEM-Bilderstapels FIB 703 mit dem ssTEM-Bilderstapel SS M02. (1) und (2) Ansichten aus zwei Richtungen auf die beiden Datenstapel. Die Ansicht in (1) ist aus der Perspektive der Mesa-Unterseite, (2) eine Seitenansicht. Der größere ssTEM-Datenstapel bildet den Hintergrund für den kleineren FIB-FESEM-Datenstapel (**gelber Kasten**). Aus dem FIB-FESEM-Stapel ist nur ein Teil der Bipolarzellen als 3D-Modelle visualisiert. Alle im ssTEM-Stapel rekonstruierten Zellen sind dargestellt. (3) zeigt eine vergrößerte Darstellung der rekonstruierten Zellen am Übergangsbereich (**rote Linie**) zwischen den beiden Datensätzen. (4a) und (4b) zeigt zwei Bipolarzellen-Dendriten des FIB-FESEM-Datenstapels, die im ssTEM-Stapel gefunden und weiter rekonstruiert werden konnten aus zwei weiteren Ansichten. (5) zeigt die selben Zellen wie in (4) in einer Aufsicht von skleral. Maßstabsbalken: $10 \mu\text{m}$.

Bei dieser Nachverfolgung gab es das Problem, dass ein circa 1 μm breiter Bereich des ssTEM-Datensatzes nur sehr schwach kontrastierte Bildinformationen liefern konnte. Durch den Hitzeeintrag des vorab erfolgten Schneidens mit dem Ionenstrahl im FIB-FESEM-Verfahren wurde der direkt unter dem letzten Bild des FIB-FESEM-Scans liegenden Bereich der Probe in Mitleidenschaft gezogen (Abbildung 31.1). Für die Probe SS M02 wurde eine, im Vergleich zu den anderen Ansätzen, leichte Kontrastierung verwendet. Dadurch konnten in diesen Bereichen im TEM-Bild kaum Strukturdaten gewonnen werden, was die Anschlussrekonstruktion merklich erschwerte.

Trotzdem konnte für zwei Dendriten von Bipolarzellen, die im FIB-FESEM-Datensatz rekonstruiert wurden, mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Anschluss im ssTEM-Bilderstapel gefunden werden (Abbildung 45.4 und 45.5). Selbst wenn es sich bei den beiden Bipolarzellen (**grün und türkis**) nicht um dieselben Zellen handeln sollte wie die Dendritenbäume im FIB-FESEM-Stapel (**violett und orange**), findet der Durchtritt dieser Zellen durch die Müllerbänder in einem sehr engen Verbund statt. Das Passieren der Müllerbänder von Sekundärneuronen-Neuriten in Bündeln ist gut dokumentiert und bestätigt die gute Alignierung der Bilderstapel zueinander.

3.2.2 Heidelberger Hobel und FIB-FESEM

Heidelberger Hobel

Das Serial Block Face Scanning des Heidelberger Hobels an der Probe SS13 03 A5 ergibt qualitativ gute Bilder. Es entstehen Bilderstapel mit einer exakten Registrierung der einzelnen Bilder zueinander.

Erster Scan

SBFS 1 Ergebnis ist eine 1003 Schnitte lange Serie (SS13 03 A5 SBFS 1) mit je 24 Einzelbildern. Somit wurden 24095 Einzelbilder mit 2048 x 1768 px bei 12000x Vergrößerung und einer Gesamtgröße von 81,6 GB erstellt und zu Gesamtbildern der Schnittebenen mit einer Fläche von 7168 x 14336 px und 69,9 GB Größe gestitcht und dann zugeschnitten auf 4915 x 12716 px mit einer Größe von 58,4 GB. Die Voxelsize ist damit am Ende 12,28 x 12,28 x 30 nm und das abgebildete Volumen beträgt 60,4 x 156,2 x 30,1 μm .

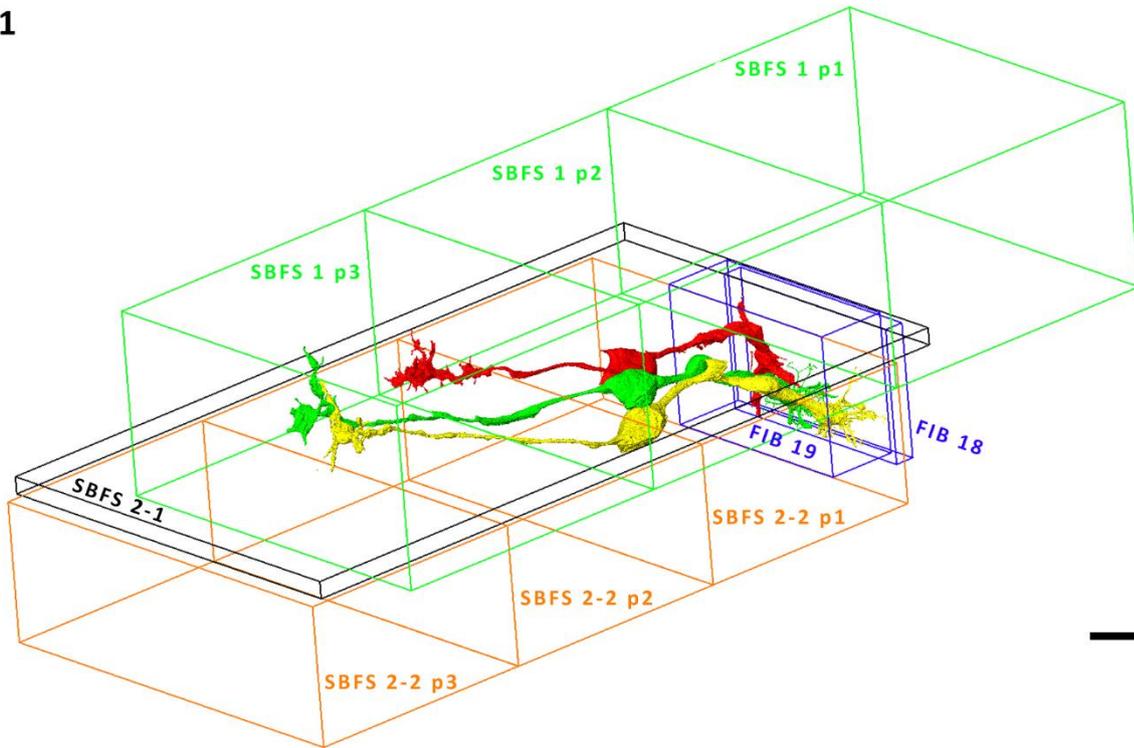
Die Aufnahmezeit pro Bild war dabei 11,86 Sekunden. Bei 1000 geplanten Schnitten mit je 24 Einzelbildern, und damit 285 Sekunden pro Schnitt, dauerte die reine Bildakquise 80 Stunden. Dazu kommen dann noch die Speicherzeiten, die Zeiten für die 1003 Schneidvorgänge und jeweils eine Abkühlzeit von 5 Sekunden nach jedem Scan. Dies macht pro Schnitt weitere 258 Sekunden aus. Zusammen ergibt das eine Scan-Zeit von 156 Stunden.

Zweiter Scan

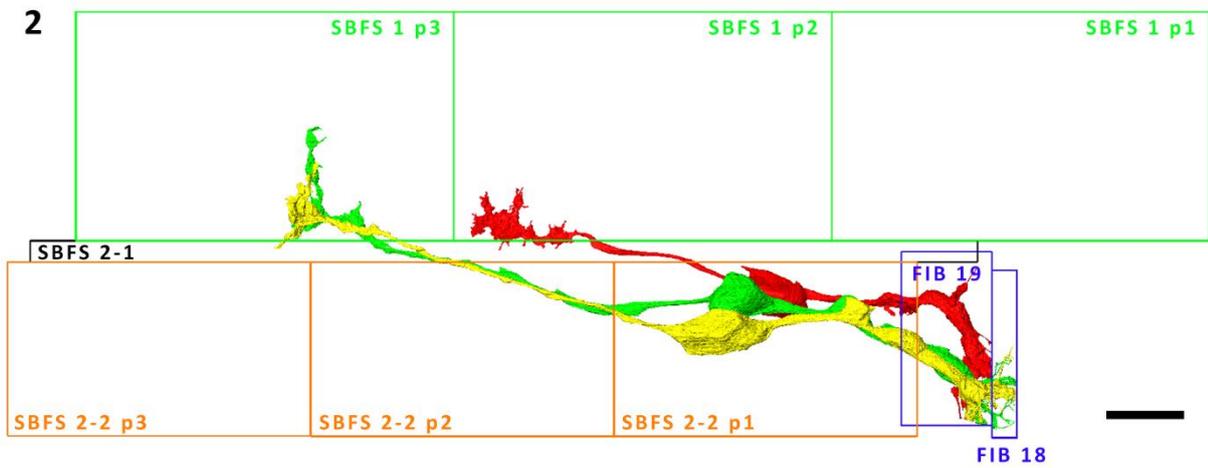
SBFS 2-0 Vom Anfang der Beschichtung (siehe Kapitel 2.3.3) bis zum Anfang der Probenoberfläche im Kunstharz (SS13 03 A5 SBFS 2-0), bestehend aus 16 Schnittebenen mit je 21 Einzelbildern. Somit wurden 336 Einzelbilder mit 2048 x 1768 px bei 12000x Vergrößerung und einer Datengröße von 1,13 GB erstellt. Die Gesamtbilder der Schnittebenen haben 7168 x 13312 px und zusammen 965 MB. Dieser Scan findet keine weitere Verwendung.

SBFS 2-1 Vom Anfang der Probe an einer Ecke der Mesa bis zur Erfassung der ganzen Fläche (SS13 03 A5 SBFS 2-1), bestehend aus 93 Schnittebenen mit je 21 Einzelbildern. Somit wurden 1954 Einzelbilder mit 2048 x 1768 px bei 12000x Vergrößerung und einer Datengröße von 6,62 GB erstellt. Die Gesamtbilder der Schnittebenen haben 7168 x 13312 px und zusammen 4,43 GB. Nach dem Zuschnitt ist die Bildfläche 6532 x 12022 px und umfasst zusammen 6,87 GB. Die Voxelsize ist damit 11,24 x 11,24 x 30 nm und die Dimensionen des Datenstapels sind 73,4 x 135 x 2,8 μm .

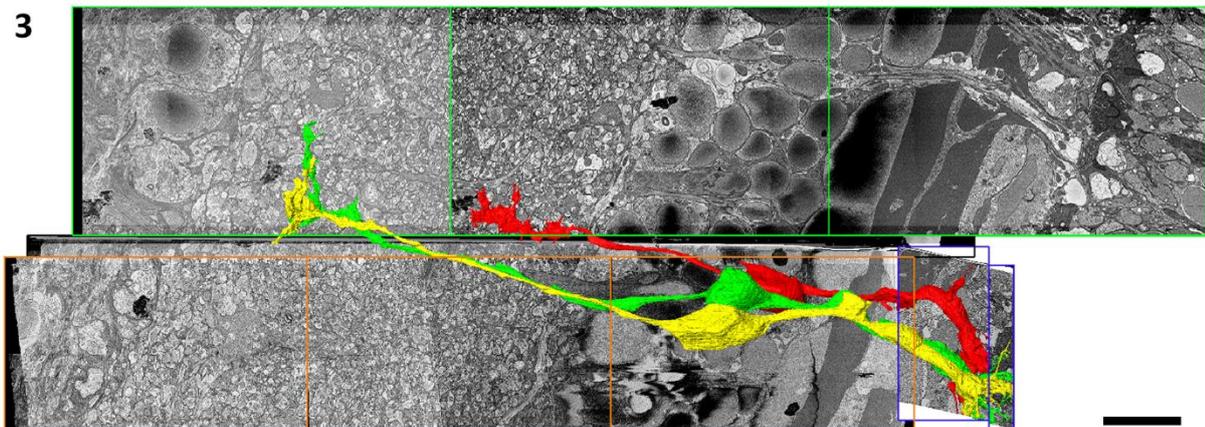
1



2



3



SBFS 2-2 Abbildung der gesamten ROI (SS13 03 A5 SBFS 2-2), bestehend aus 714 Schnittebenen mit je 21 Einzelbildern. Somit wurden 14993 Einzelbilder mit 2048 x 1768 px bei 12000x Vergrößerung und einer Datengröße von 44,7 GB erstellt. Die Gesamtbilder der Schnittebenen haben 7168 x 13312 px und sind zusammen 52,2 GB groß. Nach dem Zuschnitt ist die Bildfläche 6532 x 12022 px und umfasst zusammen 48,9 GB. Die Voxelsize ist dabei 11,24 x 11,24 x 32 nm und die Dimensionen des Datenstapels sind 73,4 x 126,6 x 22,8 μm .

Die Schiefelage der Probe relativ zu den Schnittachsen ließ es nicht zu, die geplanten 1000 Schnitte durchzuführen. Der vitreale Bereich der inneren plexiformen Schicht wäre nach etwa 900 Schnitten nicht mehr im abgebildeten Bereich gewesen. Deswegen wurde die Serie **SBFS 2** nach 823 Schnitten beendet. Der gesamte Scanprozess mit 17282 Einzelbildern dauerte 93 Stunden.

Ursprüngliche Probleme der automatisierten Registrierung der Bilder zueinander konnten durch Anpassungen des Cubing-Algorithmus größtenteils ausgebessert werden. So musste bei der Berechnung der verwendete Überlappungsbereich vergrößert werden. Probleme bei der Registrierung sehr großflächiger Strukturen, wie die Zellkerne der äußeren plexiformen Schicht, konnten jedoch nicht ganz verhindert werden.

Die einzelnen Datenstapel der 2 Scanvorgänge sind gut aufeinander auszurichten (Abbildung 46). Nach dem dazwischen stattfindenden FIB-FESEM-Scan wurde die Mesa, für den zweiten Heidelberger Hobel-Scan nachpräpariert und erneut in das Gerät eingebracht. Trotz größter Sorgfalt (siehe Kapitel 2.3.1) konnte eine leichte Kippung der Probe dabei nicht verhindert werden. Um dies zu kompensieren, wurde der Zwischenstapel SBFS 2-1 geschnitten. Dieser reicht vom ersten Anschneiden der Probe bis zu dem Punkt, an dem das gesamte Volume of Interest geschnitten wurde. Dabei handelt es sich um 93 Schnitte mit je 30 nm Dicke. Durch die Kippung der Probe ist dieser Bildstapel keilförmig (SBFS 2-0). Durch dreidimensionale Translation und Rotation in Amira® konnte der Keil jedoch gut zwischen die beiden großen Datenstapel des ersten (SBFS 1) und des zweiten Scans (SBFS 2-2) eingefügt werden.

Dritter Scan

SBFS 3 Abbildung der gesamten ROI (SS13 03 A5 SBFS 3), bestehend aus 1280 Schnittebenen mit je 24 Einzelbildern. Somit wurden 30720 Einzelbildern mit 2048 x 1768 px und einer Datengröße von 104 GB erstellt. Die Gesamtbilder der Schnittebenen haben 7168 x 14336 px und eine Größe von zusammen 88,3 GB. Nach dem Zuschnitt ist die Bildfläche 6532 x 13792 px und umfasst zusammen 103 GB. Die Voxelsize ist dabei 11,24 x 11,24 x 32 nm und die Dimensionen des Datenstapels sind 70,6 x 155 x 41 μm .

Dieser Scan fand für die folgenden Rekonstruktionen keine Verwendung, da die verfolgten Sekundärneurone in den Bilderstapeln des ersten und zweiten Scans vollkommen erfasst waren. Der Stapel ist jedoch gut geeignet, um horizontal weiter ausladende Amakrin- und Ganglionzellen vollständig zu erfassen.

Abbildung 46: Vorherige Seite: Darstellung der kombinierten Datenstapel des gesamten Bearbeitungsvorganges für SS13 03 A5. 3D-Modelle der rekonstruierten Bipolaren (**grün, gelb, rot**) sind ebenso dargestellt. Die Achse skleral – vitreal verläuft von rechts nach links. **(1)** Schrägansicht von vitrealer Seite. **(2)** Seitenansicht (XZ-Ansicht) auf die Datenstapel (man beachte den Volumenunterschied zur sSTEM-Serie, siehe Abbildung 44.1 und 44.2). Gut zu erkennen ist, wie die Bipolarzellen alle Scanstapel überspannen und nur die Kombination aller Stapel ein Gesamtbild ermöglicht. **(3)** Selbe Ansicht wie in **(2)** mit dem jeweils ersten Bild des VOI (YZ-reslice) im Hintergrund zur Orientierung in der Retina. Der Stapel des ersten Heidelberger Hobel-Scans wurde in 3 Teile unterteilt (**SBFS 1 p1, SBFS 1 p2, SBFS 1 p3**), ebenso wie „darunterliegend“ der Stapel des zweiten Heidelberger Hobel-Scans (**SBFS 2-2 p1, SBFS 2-2 p2, SBFS 2-2 p3**). Der Zwischenstapel (**SBFS 2-1**) wurde nicht unterteilt. Die zwei FIB-FESEM-Datenstapel (**FIB 18, FIB 19**) liegen direkt an **SBFS 2-2 p1** an und enthalten die feinverzweigten Dendritenbäume der Bipolarzellen. Maßstabsbalken: 10 μm .

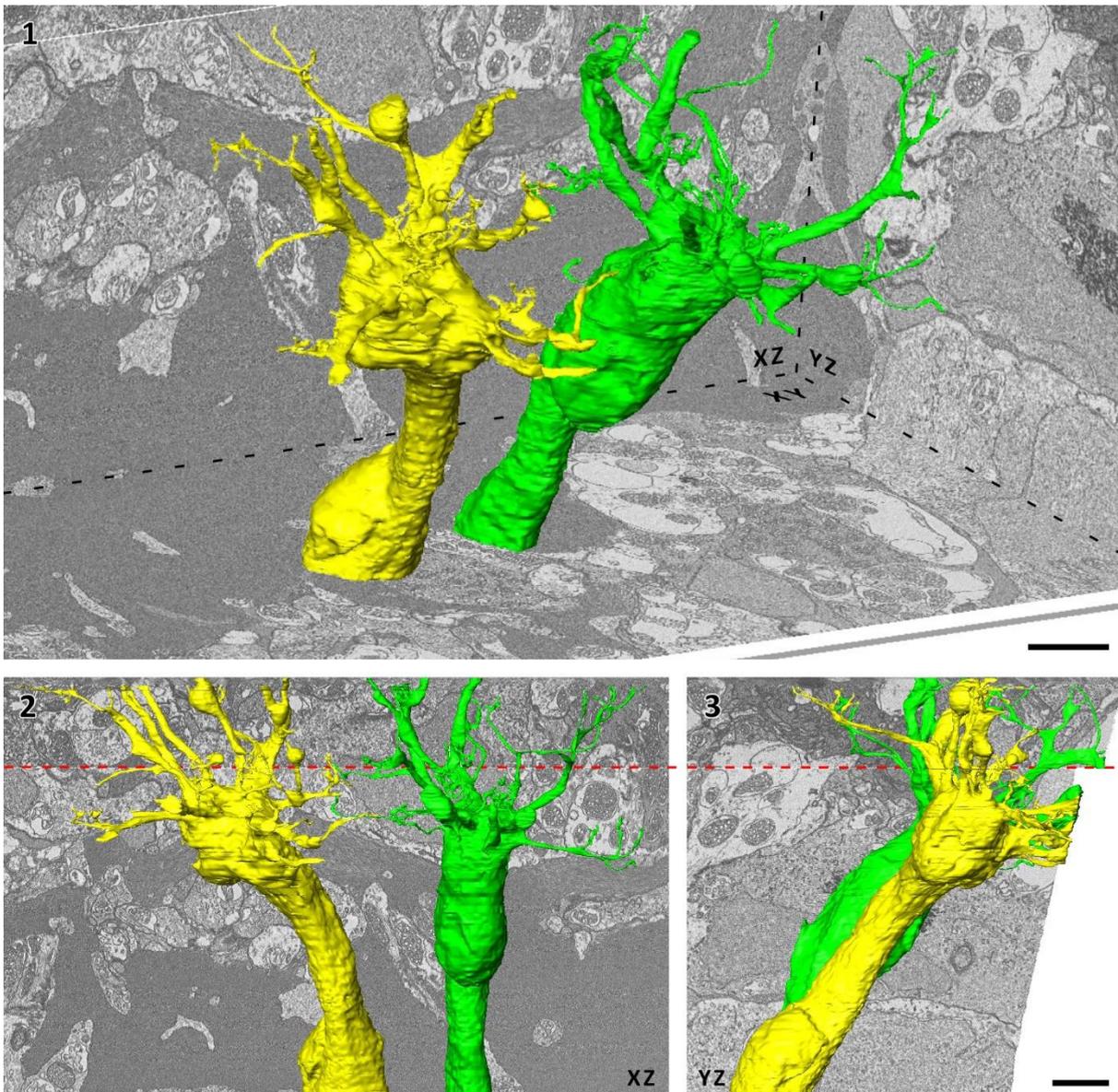
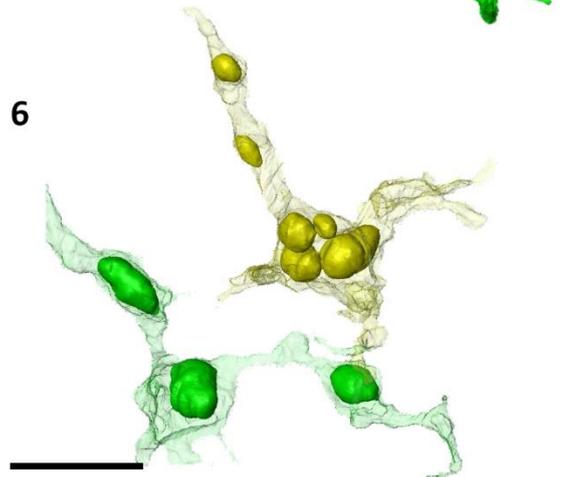
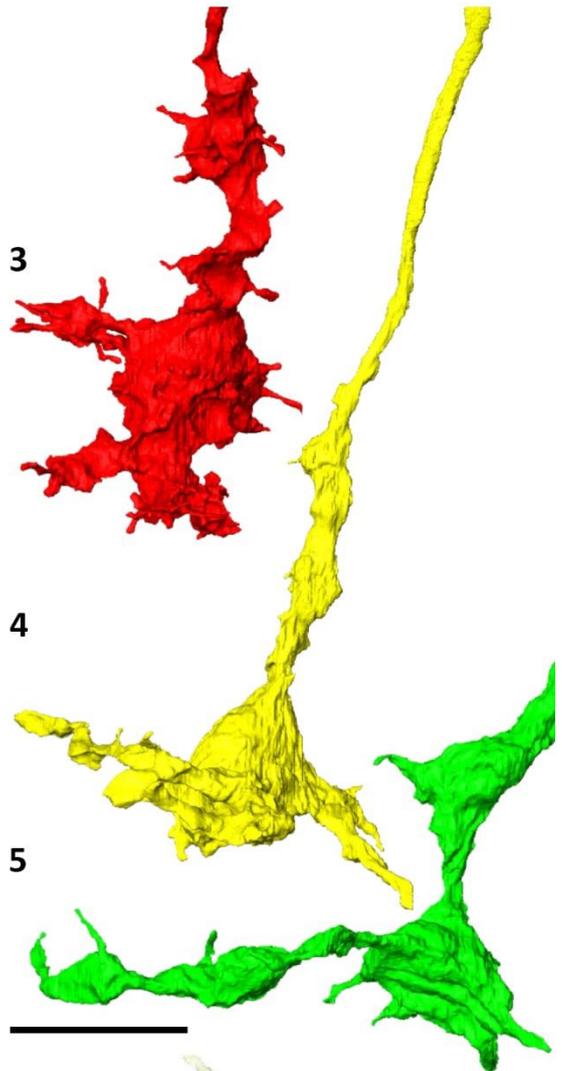
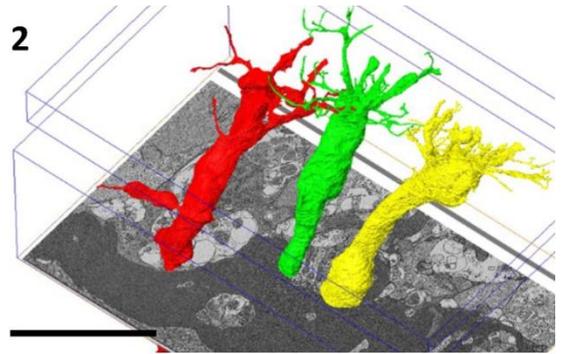


Abbildung 47: 3D-Modelle der Bipolar-Dendritenbäume im FIB-FESEM-Bilderstapel FIB 1085. Die Farbkodierung ist identisch mit der in Abbildung 46 und Abbildung 48. **(1)** Schräge Ansicht von skleral auf die beiden Dendritenbäume. Im Hintergrund sind die Rohdaten in der XY-, XZ- und YZ-Ebene dargestellt. **(2)** Seitenansicht auf die XZ-Ebene und **(3)** Seitenansicht auf die YZ-Ebene. Die Grenzlinie zwischen den beiden verwendeten FIB-FESEM-Datenstapeln FIB 1085 18 und FIB 1085 19 ist eingezeichnet (**rote Linie**). Maßstab: 2 μm .

Drei Bipolarzellen konnten durch die drei Datenstapel SBFS 1, SBFS 2-1 und SBFS 2-2 hindurch verfolgt und segmentiert werden (Abbildung 46 und Abbildung 48). Die Morphologie der Bipolarzellen ist dabei gut zu erkennen und auch in detailreichen Bereichen wie den verzweigten Axonterminalen-Horizonten

Abbildung 48: Nächste Seite: 3D-Modelle der im Kombinationsdatensatz von Heidelberger Hobel und FIB-FESEM (SS13 03 A5) rekonstruierten Bipolarzellen. **(1)** zeigt eine Aufsicht auf die Schnittebene des Heidelberger Hobel-Scans (letztes Bild SBFS 1) zusammen mit den, über alle Einzelstapel rekonstruierten, Bipolarzellen. Deutlich zu unterscheiden sind **(a)** die Dendritenbäume in der äußeren plexiformen Schicht, **(b)** die Bündelungen der Dendriten beim Durchtritt durch das Doppelband der Müllerzellen, **(c)** die Zellkerne in der inneren nukleären Schicht und **(d)** die verzweigten Axonterminalen in der inneren plexiformen Schicht. **(2)** zeigt die feinverzweigten Dendriten-Bäume der Bipolarzellen in einer schrägen Ansicht, insbesondere die der **gelb** und **grün** eingefärbten Zellen. Die Umrisse der beiden FIB-FESEM-Datenstapel (**schwarze Kästen**) sind ebenso dargestellt wie die am weitesten vitreal gelegene Ebene des FIB-FESEM-Bilderstapels. **(3)** bis **(5)** zeigen die Axonterminalen der rekonstruierten Bipolarzellen in einer Seitenansicht (YZ-Ebene). **(6)** zeigt die beiden am weitesten vitreal gelegenen Axonterminalen in einer schrägen Ansicht, die Zellwände sind transparent dargestellt, sodass die Mitochondrien der Terminalen zu sehen sind. Maßstabsbalken: **(1)** und **(2)**: 10 μm , **(3)** bis **(6)**: 5 μm .



der inneren plexiformen Schicht (Abbildung 48) konnten die Formen und Ausbreitungen der Zellen komplett verfolgt werden. Da die Bipolarzellen alle Scanstapel überspannen, ist dies nur durch die Kombination aller Stapel möglich.

FIB-FESEM

Aufgrund des guten Kontrastes konnte die Strahlenbelastung (pixel dwell time) (4350 x 2750 Pixel pro Bild) gering gehalten werden. Nach 51 Stunden Imaging lagen zwei Datenstapel vor, die die gesamte innere plexiforme Schicht beinhalten: ein Stapel (**FIB 1085 18**) mit 409 Bildern mit einer Datengröße von 4,56 GB vor und ein Stapel (**FIB 1085 19**) aus 1457 Bildern mit einer Dateigröße von 16,2 GB. Das damit abgebildete Gesamtvolumen beträgt dabei $10121 \mu\text{m}^3$ ($33,3 \times 20,4 \times 14,9 \mu\text{m}$).

Der FIB-FESEM-Scan ergab in allen Raumrichtungen gleichermaßen hochauflösende Bilderstapel mit einer Voxelgröße von $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 47.1 Hintergrund). Dies ermöglichte die Rekonstruktion von detailreichen 3D-Modellen der Bipolar-Dendritenbäume über beide Bilderstapel (Abbildung 47.2 und 48.3) ohne jeglichen Versatz.

Die Schiefelage des Bilderstapels (siehe Abbildung 47.3) in der Seitenansicht (YZ-reslice) könnte gegebenenfalls von einem Registrierungsartefakt der Generierungssoftware stammen, das heißt ein systematischer Versatz benachbarter Bildebenen um je 1 Pixel in Y-Richtung. Dies wäre für eine publikationstaugliche, finale Rekonstruktion noch zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren.

Kombination Heidelberger Hobel und FIB-FESEM

Die Datenstapel des FIB-FESEM-Scans (**SS13 FIB 1085 18** und **19**) konnten problemlos aneinandergelagt werden. Auch konnten sie lückenlos an den Datenstapel des zweiten SBFS-Scans angelegt werden. Durch die automatisierte Registrierung der Einzelbilder zueinander ist die Auflösung auch entlang der Raumachsen, die nicht der Scan-Ebene entsprechen hoch. Dadurch konnten die Kontaktstellen zwischen den beiden Scanverfahren gut zur Deckung gebracht werden (Abbildung 46).

Die bereits in den Heidelberger Hobel-Scans verfolgten Bipolarzellen konnten in den FIB-FESEM-Bilderstapel identifiziert und bis in die Zapfenterminalen weiterverfolgt werden. Die Zellen wurden segmentiert und als 3D-Modell dargestellt (Abbildung 46 und Abbildung 48).

3.2.3 Vergleich der Methodenkombinationen

Quantität und Qualität

Die Auflösung der Datenstapel aus dem **Heidelberger Hobel** ist aufgrund der größeren Voxelsize von etwa **$12 \times 12 \times 30 \text{ nm}$** etwas gröber (Abbildung 49.2) als die des FIB-FESEM-Datenstapels mit $8 \times 8 \times 8 \text{ nm}$ (Abbildung 49.1). Für die Rekonstruktion und Darstellung der Sekundärneurone in der inneren nukleären und der inneren plexiformen Schicht ist diese Auflösung allerdings vollkommen ausreichend. Insbesondere die stark verzweigten Axonterminalen der Bipolarzellen sind immer noch gut darstellbar (Abbildung 48) und zeigen eine gute Informationserhaltung.

Mit dem Heidelberger Hobel sind lange Serien mit **wenigen Tausend** Schnittebenen möglich. Limitierend ist hierbei nur der Schnittbereich des Hobels auf der Z-Achse.

Der **ssTEM**-Datenstapel weist eine ähnliche Bildauflösung wie der FIB-FESEM-Scan ($8 \times 8 \text{ nm}$) auf, nämlich **$9,8 \times 9,8 \text{ nm}$** . Dabei fehlt hier jedoch das Hintergrundrauschen, das bei SEM-Abbildungsverfahren aufkommt, was die Bilder deutlich schärfer erscheinen lässt (Abbildung 49.3a). Die Zellumrisse und synaptische Strukturen sind gut zu erkennen. Die Auflösung entlang der z-Achse – die Schnittdicke – ist mit durchschnittlich **80 nm** dabei relativ dick. Hier können im nicht abgebildeten Bereich ganze Neuriten verloren gehen. Ein größeres Problem stellt jedoch die relativ schlechte

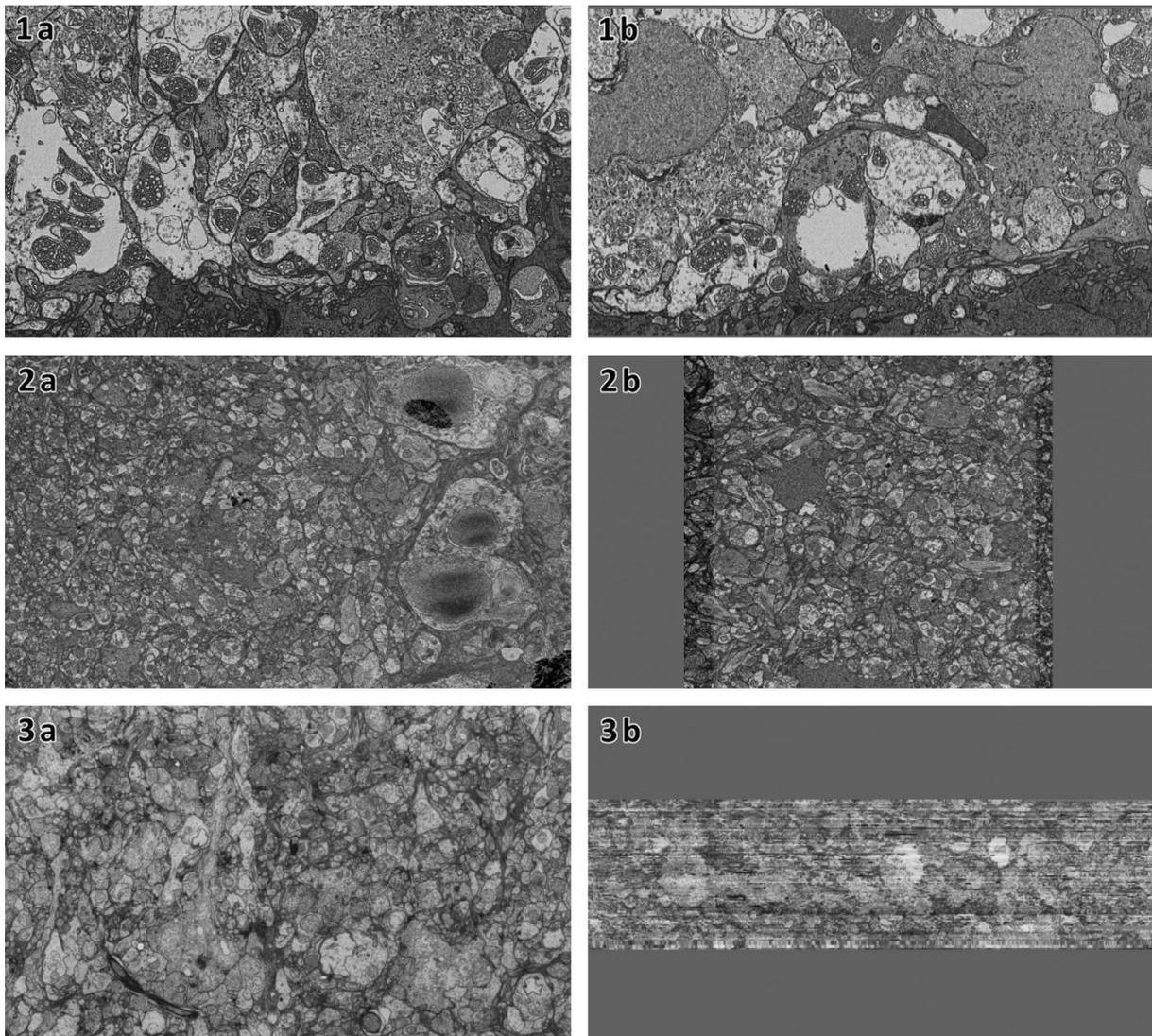


Abbildung 49: Vergleich der Bildqualität von **(1)** Heidelberger Hobel, **(2)** FIB-FESEM und **(3)** ssTEM, wie sie im 3D-Rekonstruktionsprogramm verwendet wurden. Alle sind mit der gleichen Pixelgröße (16 nm) dargestellt. **(a)** zeigt jeweils die Scanebene (XY) und **(b)** einen Reslice in einer anderen Raumachse (XZ). Beim FIB-FESEM **(1a** und **1b)** und dem Heidelberger Hobel **(2a** und **2b)** ist die Auflösung in den allen Ebenen gut. Der Kontrast beim Heidelberger Hobel ist schwächer als beim FIB-FESEM. Beim ssTEM ist die Auflösung in der Scanebene **(3a)** deutlich besser als bei den anderen Methodiken, dafür ist die Auflösung entlang der Z-Achse deutlich schlechter **(3b)**.

Registrierung der einzelnen Bilder zueinander dar. Trotz großen Aufwandes fallen in der Detailansicht, wie sie bei der Segmentierung in Amira® beständig verwendet wird, deutlich Versätze in den Strukturen zwischen einzelnen Bildern auf (siehe Abbildung 44).

Zudem sind diese Versätze nicht konstant, sondern unterliegen Schwankungen in der Stärke der Ausprägung. Damit sind grundsätzliche Aussagen über die Morphologie, Ausdehnung und auch Kontaktstellen zu anderen Zellen möglich. Detaillierte Aussagen über Morphologie von Substrukturen der Zellen oder allgemeine oder detaillierte morphometrische Messungen sind nicht realisierbar. Trotzdem ist eine Rekonstruktion von Zellen über beide Bilderstapel hinweg möglich (Abbildung 45). Größtes Hindernis ist hierbei der durch den FIB eingebrachte Strahlungsschaden an der Anschlussstelle auf Seiten der ssTEM-Serie.

Mit dem ssTEM-Verfahren sind, bei der verwendeten Schnittfläche, Schnittserien **von einigen Dutzend bis wenigen hundert Schnittebenen** sinnvoll. Limitierend sind hier, noch vor den potenziell hohen Verlusten von Einzelschnitten beim Schneideprozess, die Möglichkeiten der Programme für die automatische elastische Registrierung der initial stark verzerrten Einzelbilder.

Zeitaufwand

Für die Ermittlung des Zeitaufwandes werden die Methodik-Anteile des FIB-FESEM außen vor gelassen. Diese sind bei beiden Kombinationen identisch. Aus demselben Grund wird die Vorbereitung für Amira® und die Rekonstruktion im Folgenden nicht mitberechnet, ebenso wie die Erstellung der Mesa und der Kontrastierung. Für die Berechnung der aufzuwendenden Arbeitstage wird von 6 h Arbeit pro Tag ausgegangen.

Ein Scan mit dem **Heidelberger Hobel** dauert für 1000 Schnitte circa 168 h. Da der Scanvorgang ohne Unterbrechung stattfindet, ist die Datenerstellung nach 7 Tagen beendet. Das automatische Cubing dauert etwa 12 h pro Datenstapel. **Für einen Datenstapel mit 1000 Schnittebenen müssen somit 9 Arbeitstage aufgewendet werden.**

Bei der **ssTEM**-Methodik wurden für das Schneiden von 100 Ultradünnschnitten circa 8 h benötigt. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass über den gesamten Zeitraum ideale Bedingungen vorliegen (siehe Kapitel 2.3.2 „Schneiden und Bändern konventioneller Ultradünnschnitte“). Für die TEM-Aufnahmen wurden 17 h benötigt und weitere 4 h für das Sortieren der Bilder. Das Herausrechnen der Rotation der Einzelbilder dauerte 6 h, das Stitching zu den Gesamtbildern 90 h und das Flicker aller Risse 44 h. Dazu kamen noch 6 h für Korrekturen und Nacharbeiten. Die Vorregistrierung durch die Landmark-Registrierung nahm 46 h in Anspruch. Die automatisierte elastische Registrierung konnte in 4 h abgeschlossen werden. **Für einen Bilderstapel mit 100 Schnittebenen werden 225 h, oder 37,5 Tage, benötigt.**

Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf die reine Bearbeitungszeit. In beiden Fällen ist Zeitaufwand für Problemidentifikation und -lösung nicht miteinberechnet. Beim Heidelberger Hobel wäre dies die Einstellung des Programms zur synchronisierten Steuerung von Hobel und SEM und des Programms für das Cubing, die bei jeder neuen Proben- oder Gewebeart anfällt. Zusammen mit Testläufen können hier bis zu 7 weitere Arbeitstage hinzukommen. Beim ssTEM fallen unter diese Kategorie unter anderem das Ermitteln der richtigen Parameter für die elastischen Registrierungen. Auch händisches Nachregistrieren zwischen zwei beschädigten Bildern – etwas, das automatisierte Verfahren (noch) nicht können – ist hier einzuordnen. Hierfür müssen etwa 3 Arbeitstage aufgewendet werden.

EINLEITUNG 1

MATERIAL
UND 2
METHODEN

ERGEBNISSE 3

DISKUSSION 4

LITERATUR 5

Die Fragestellungen, die das **Feld der Connectomics** aufwerfen sind wie geschaffen für die 3D-EM Datenerfassung kombiniert mit einer Rekonstruktion der Zellen. Die, vor allem durch die SBFS-Mikroskopie, vollständige und unvoreingenommene Erfassung aller Zellen und Strukturen einer Probe eröffnet tiefgehende Untersuchungsmöglichkeiten sowie eine hohe Flexibilität bezüglich des Untersuchungsfokus.

Bei klassischen 2D-Verfahren, sowohl lichtmikroskopischer (Shkolnik-Yarros & Podugolnikova 1978) wie auch elektronenmikroskopischer Natur (Scholes 1975, Haesendonck & Missotten 1984) ist die Auswertungskapazität einer Probe durch die spezifische Anfärbungen einzelner bis mehrerer Zelltypen limitiert. In Elektronenmikroskopie ist die Färbungskapazität, aufgrund des resultierenden Graustufenbildes, auf wenige spezifische Färbung begrenzt, da die Färbungen im resultierenden Bild kaum unterschieden werden können. Zudem sind die angewendeten Antikörperfärbungen mit Schwermetallsekundärantikörpern (Zhang et al. 2016) aufwendig. Im Bereich der Lichtmikroskopie ist mit der Fluoreszenzmikroskopie die Kapazität an unterschiedlichen Färbungen innerhalb einer Probe deutlich größer. Doch hier bilden Überlappungen der spektrale Eigenschaften verschiedener Farbstoffe eine physikalische Grenze für die Anzahl der gleichzeitig möglichen Färbungen. Zudem übersteigt das mit feinsten Neuriten dicht gepackte Netzwerk der inneren plexiformen Schicht die Möglichkeiten lichtmikroskopischer Verfahren (Helmstaedter et al. 2009).

Im Gegensatz dazu werden mit der **3D-EM** Methodik alle Zelltypen gleichermaßen kontrastiert und abgebildet. Die angewendete Kontrastierung legt auch hierbei ein Fokus auf bestimmte Zellaspekte. Jedoch werden durch die in dieser Arbeit verwendeten Schwermetallfärbungen die Zellmembranen (Kawaguchi et al. 2006) markiert. Diese definieren die äußere Morphologie aller Zellen, und damit das zentrale Merkmal das für das Feld der Connectomics, die physikalischen Kontakte der Zellen (Hagmann et al. 2005). Des Weiteren ermöglichen die **SBFS**-Verfahren eine davor nie gesehene Auflösungsqualität entlang der, ansonsten durch die physikalisch bedingten Schnittdicken in ihrem Informationsgehalt eingeschränkte, dritten Raumachse. Dadurch kann die Gesamtheit aller Strukturen einer Probe, inklusive der Bereiche, die mit den klassischen Verfahren zwischen den Schnitten verloren gehen, erfasst und ausgewertet werden.

Die **Rekonstruktion** der Zellen als digitale 3D-Modelle als Methodik zur Visualisierung erlaubt die Darstellung verschiedener Zelltypen und Netzwerkaspekte in verschiedenen Kombinationen an einer einzigen Probe, am selben Netzwerk. Die Möglichkeit, die Ergebnisse, mit relativ geringem Aufwand, sowohl in 2D als auch in 3D darstellen zu können, ermöglicht mit der Eröffnung der dritten Raumachse einen großen Erkenntnisgewinn. In einem weiteren Schritt besteht die Möglichkeit die digitalen Daten wieder in den realen Raum zurückzuführen: Beispiele hierfür sind 3D-Druck oder Papiermodelle (siehe Anhang). Die Möglichkeiten die Daten interaktiv zu untersuchen – digital wie analog – erlaubt ein umfassendes Verständnis der Verbindungen und Vernetzungen einer Probe.

Zusätzlich erlaubt es dieser Ansatz, einen einmal aufgenommen Datensatz für mehrere, voneinander unabhängige, Fragestellungen zu verwenden. Jeder Bilderstapel kann nach der Rekonstruktion mit einer spezifischen Fragestellung auch für andere Untersuchungen und Rekonstruktionen herangezogen werden kann. Ebenso wird die Möglichkeit geschaffen, kurzfristig den Fokus einer Fragestellung zu verschieben. Den bei der Untersuchung erhaltenen Erkenntnissen folgend, kann ohne zuvor neue Proben mit anderen Färbungen anfertigen und scannen zu müssen, zum Beispiel ein weiterer Zelltyp in die Beobachtungen eingeschlossen werden.

Letztendlich steht jede einzelne gescannte Probe für weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Fragestellungen zur Verfügung (siehe Behrens et al. 2016). Dies wiegt die Tatsache, dass die physikalische Probe im Prozess vernichtet wird mehr als auf.

Alle diesen Vorteilen folgend sind im Rahmen der Connectomics-Forschung bereits einige Arbeiten an anderen Organsimen mit SBFSEM-Verfahren durchgeführt worden. Von ganzen Mäusegehirnen (Abbott et al. 2020) sind über den Zebrafinken (Kornfeld 2017) bis zum zentralen Nervensystem von Fliegen (Boergens et al. 2018) bereits einige Datensätze entstanden.

4.1 Teil 1: 3D-Rekonstruktion der äußeren plexiformen Schicht

4.1.1 Das Terminalen-Netzwerk

Das Terminalen-Netzwerk der Vielfachzapfen von *Engraulis encrasicolus* hat sich als überraschend vielseitig erwiesen. Maskiert unter den komplexen dreidimensionalen Verschränkungen der volumenfüllenden Photorezeptorterminalen, mit ihren feinen Ausläufern, zusammen mit einer Vielfalt an sich einstülpenden Neurodendriten von Sekundärneuronen versteckt sich ein wohlgeordnetes und nach Zelltypen sortiertes Verschaltungsmuster in der äußeren plexiformen Schicht der Sardellenretina.

Die beiden herausstechenden Merkmale, das gleichmäßige, horizontal angeordnete Muster und die radiäre Schichtung der beiden Zapfentypen, sind deutliche Anzeichen für eine zellspezifische Verschaltung mit einer Informationskanalaufteilung bereits innerhalb der ersten retinalen plexiformen Schicht.

Bei der Anwendung 3D-elektronenmikroskopischer Strukturdatenerfassung in Kombination mit computergestützter 3D-Rekonstruktion lassen sich morphologisch hochpräzise 3D-Modelle der Photorezeptor-Terminalen und der Dendritenbäume der sich vitreal anschließenden Sekundärneurone erstellen. Auf dieser Datengrundlage lassen sich erste Aussagen über das, der retinalen Verschaltung zugrunde liegende, synaptische Netzwerk auf Höhe der äußeren plexiformen Schicht treffen.

Die eindeutig zu erkennenden Dendriten der Sekundärneurone leiten Signale von der äußeren plexiformen Schicht zu der inneren plexiformen Schicht für eine noch intraretinal stattfindende Kontrastberechnung (Smirnakis et al. 1997).

Das dichte und im vorliegenden Fall verblüffend komplexe telodendritische Netzwerk der Terminalen deutet

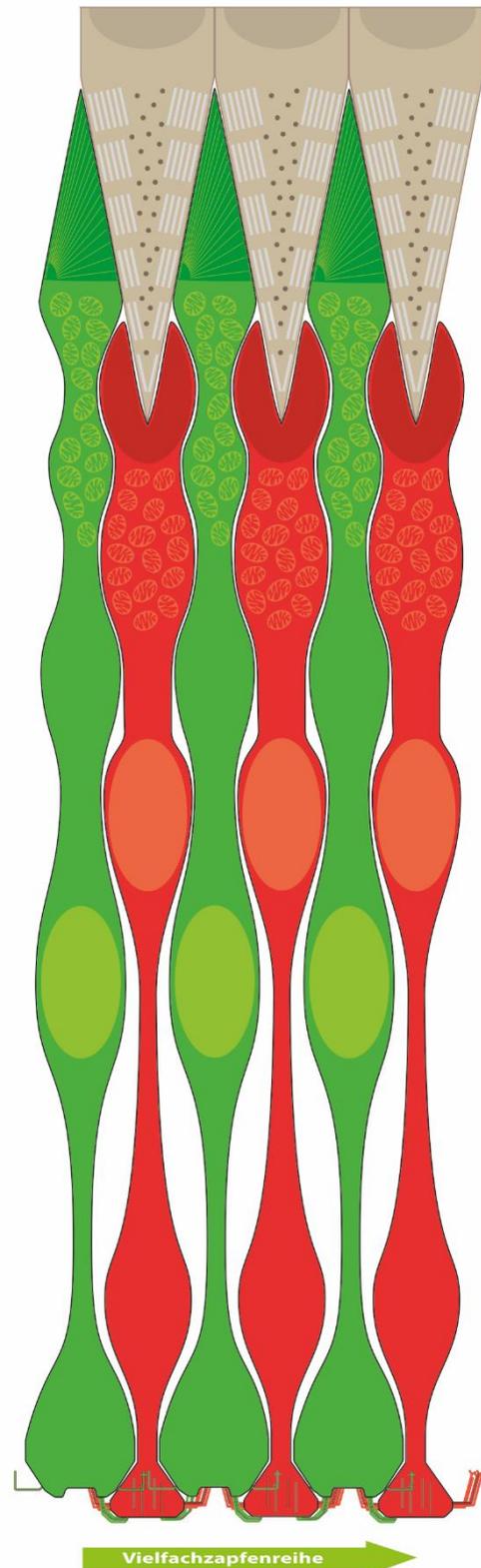


Abbildung 50: Skizze von 6 Photorezeptoren einer Vielfachzapfenreihe (erweitert gegenüber Abbildung 6). Die strenge Ordnung der äußeren Segmente der Photorezeptoren bleibt auf Ebene der Terminalen erhalten. Die langen Zapfen sind in **grün** gehalten, die kurzen Zapfen in **rot**. Die Pigmentepithelkeile sind **hellbraun**.

hingegen bereits skleral der Horizontalzellen auf eine horizontale und gerichtete Modulation der letztlich radial verlaufenden Signalkette.

Bemerkenswert sind die klar unterschiedlichen Verschaltungsmuster der Telodendriten der beiden Photorezeptortypen der Vielfachzapfen, welche jeweils beide bekannten Ausprägungen von Telodendriten aufweisen:

(1) Eine Ausprägung sind die über Zellausstülpungen direkten Zell-Zellkontakte zwischen Zapfen des selben Typs. Vergleichbare Telodendriten sind in der Retina von Makaken, Hasen (Raviola & Gilula 1975) und Katzen (Nelson et al. 1985) zu finden, hier als nachgewiesene Gap-Junctions zu benachbarten Zapfen. Auch in der menschlichen Retina finden sich diese Zell-Zell Gap-Junctions, allerdings werden hier keine benachbarten Zapfen kontaktiert, sondern Stäbchen-Photorezeptoren (Ahnelt et al. 1987). Ebenso wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen bei Makaken (Schneeweis et al. 1995) und Katzen (Nelson 1977) Kontakte zwischen den Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren nachgewiesen. Die Zapfen des selben Retinastücks waren in beiden Fällen voneinander isoliert. Eine Theorie für die Funktion dieser Stäbchen-Zapfen-Kontakte ist es, dass die Stäbchen die Signalkaskaden der Zapfenphotorezeptoren mitnutzen. Dies kann zumindest bei den Vielfachzapfen von *E. encrasicolus* ausgeschlossen werden, da keine Kontakte zwischen den Stäbchen- und den Zapfenterminalen gefunden werden konnten.

(2) Die bei den Vielfachzapfen von *E. encrasicolus* den Großteil des telodendritischen Netzwerk ausmachenden länglichen, fingerartigen Telodendriten sind in vergleichbarer Form beim Glasaugenbarsch (Kraft & Burkhardt 1986) und bei Schildkröten (Ohtsuka & Kawamata 1990) beobachtet worden. Wie bei den Vielfachzapfen sind diese ausschließlich als Zapfen-Zapfen-Kontakte zu finden. Mit dem Vielfachzapfen-Netzwerk vergleichbare Telodendriten-Netzwerke mit unterschiedlichen Telodendriten-Ausprägungen und Kontakte zu verschiedenen Zapfenrezeptoren konnten beim Hornhecht (Reckel et al. 2001) und beim Zebrafisch (Noel & Allison 2018) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Arbeiten konnten jedoch nur einzelne Zapfen beobachten und zeigen ein eher ungeordnetes Kontaktmuster der Terminalen. Weit entfernt von der hohen Ordnung des Telodendriten-Netzwerkes, wie sie in der vorliegenden Arbeit rekonstruiert wurde. Dies kann am umfassenderen Ansatz dieser Arbeit liegen. Zur Klärung wären entsprechende vergleichende Arbeiten an anderen Arten sinnvoll. Es ist anzunehmen, dass die konservativen Verbindungen der einzelnen Zapfentypen eine direkte Folge der hohen Ordnung der Vielfachzapfen-Reihen selbst sind und eine Notwendigkeit für die Verrechnung der visuellen Informationen und damit für das Polarisationssehen darstellen.

Hier dürfte auch die bekannte weitere Modulationen innerhalb der äußeren plexiformen Schicht zum Tragen kommen, das großflächige Netzwerk der Horizontalzellen (Stell & Lightfoot 1975, Kamermans et al. 1998, Stell et al. 1982). Im vorliegenden Fall in Form eines elektrisches Syncytiums via Gap-Junctions auf Höhe der Somata, getrennt nach den Horizontalzelltypen (H1-H3) (Heß et al. 2002). Unterschiedliche Horizontalzelltypen kontaktieren hierzu teils unterschiedliche, teils gleiche Photorezeptor-Populationen (Koch 2011) und wirken lateral hemmend. Durch diese Beeinflussung der umliegenden Photorezeptoren können Kontraste verstärkt und potenzielle Störsignale gehemmt werden. Dies sorgt für klarere „Signalbilder“ für nachfolgende Verschaltungsschritte. Inwiefern dies für das Polarisationssehen der Sardelle relevant ist, ist noch unklar.

Da die genaue Funktion von Photorezeptoren-Verbindungen zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar ist und der Fokus der Forschung zumeist auf Verschaltungsregeln der Sekundärneurone liegt (Noel & Allison 2018), stellen die Erkenntnisse dieser Arbeit über ein hochgeordnetes Terminalen-Netzwerk zumindest einen wichtigen zusätzlichen Schritt zum Verständnis der Funktion von Telodendriten dar.

4.1.2 Die Sekundärneurone

Mit den rekonstruierten Dendritenbäumen der Bipolarzellen und Horizontalzellen können eine Reihe von Kontaktmustern zu den unterschiedlichen Terminalen der langen und kurzen Zapfen-Photorezeptoren, sowie zu den Terminalen der Stäbchen-Photorezeptoren klar gezeigt werden. Da, aufgrund des limitierten Volumen des FIB-FESEM-Datenstapels zum Großteil dieser Zellen keine Informationen außerhalb der äußeren plexiformen Schicht vorliegen, ist eine Zuordnung und ein Vergleich mit anderen Modell-Organismen nicht möglich. Dies ist auch der Grund für den methodischen Teil dieser Arbeit, mittels Methodenkombinationen (ssTEM und FIB-FESEM sowie Heidelberger Hobel und FIB-FESEM) ein gesamtheitliches Bild der Sekundärneurone zu erhalten.

Lediglich eine vorrausgehende Arbeit an der Retina von *E. encrasicolus* mit Fokus auf die Sekundärneurone (Koch 2011 Abb. 3.4.7, Abb. 3.4.8 und 3.4.9 für Bipolarzellen und Abb. 3.4.6 für Horizontalzellen) lässt eine Einordnung der Bipolar- und Horizontalzellen zu:

Die Bipolarzelle „**B3**“ (Abbildung 42.4) ist das einzige rekonstruierte Sekundärneuron des Datenstapels für das es Sicherheit bei der Zuordnung gibt. Diese Zelle konnte in der, an den FIB-FESEM-Bilderstapel anschließenden, ssTEM-Serie ebenfalls rekonstruiert werden (Abbildung 44.2 III). Der Morphologie der inneren plexiformen Schicht folgend kommen für diese Zelle der Typ B7, Typ B8 und Typ 9 (sensu Koch 2011) in Frage. Die Kontaktstellen in der äußeren plexiformen Schicht zu Terminalen der langen Zapfen, der kurzen Zapfen und der Stäbchenzapfen identifizieren diese Bipolarzelle jedoch eindeutig als **Typ B7**. Damit gehören wahrscheinlich alle Bipolar-Dendriten aus Abbildung 42.4 zum Typ B7.

Der Bipolardendrit „**Z48**“ (Abbildung 42.5) gehört mit seinen ausschließlichen Kontakten zu Terminalen der kurzen Zapfen entweder zu einer Bipolarzelle des Typ B3 oder des Typ B5. Aufgrund der sehr ähnlichen Morphologie eines flach liegenden Hauptdendriten auf Höhe der Terminalen der kurzen Zapfen gehört „Z48“ sehr wahrscheinlich zu einer Bipolarzelle vom **Typ B3**. Da das vollständige Kontaktmuster in der Referenzarbeit nicht beschrieben werden konnte, liefert Z48 hier neue Informationen.

Der Bipolardendrit „**Z30**“ (Abbildung 42.6) gehört mit seinen Kontakte zu jeweils einer Terminalen eines kurzen und eines langen Photorezeptors zu einer Bipolarzelle des **Typs B5**.

Der Bipolardendrit „**Z12**“ (Abbildung 42.7) gehört aufgrund seiner Form und seinen zusätzlichen Kontakten am wahrscheinlichsten zu einer Bipolarzellen des **Typs B4**. Hier ist vor allem die trichterförmige Aufweitung des Hauptdendriten, bevor er sich in mehrere feinere Äste aufteilt, ein ausschlaggebendes Merkmal. Auch hier konnte in der Referenzarbeit kein Kontaktmuster identifiziert werden. Die Tatsache, dass „Z12“ nur eine einzelne Terminale eines kurzen Zapfens und zusätzlich mehrere (hier 7 Stück) Stäbchenterminalen kontaktiert, erweitert auch hier das Wissen über die Sekundärneurone der Sardellenretina.

Der Bipolardendrit „**Z24**“ (Abbildung 42.8) ist mit seinen zahlreichen und teilweise sehr dicken Dendriten-Äste, die neben einigen Zapfenterminalen (hier 4 Stück) mehrere Stäbchenterminalen (hier mindestens 11) kontaktiert, eindeutig einer Bipolarzelle des **Typ B8** zuzuordnen.

Die Gruppe der kurzen und zahlreichen Horizontalzellendendriten „**HZ1_1**“ (Abbildung 42.9 türkis) ist, mit ihrem Anschnitt des Zellkörpers eindeutig einer Horizontalzelle vom Typ **H1** (sensu Heß et al. 2002) zuzuordnen. Dabei handelt es sich um den am weitesten skleral liegenden Typ, der sowohl die Terminalen von kurzen, wie auch von langen Zapfen kontaktiert. Alle einzelnen Horizontalzellendendriten des Probenvolumens die die Terminalen von langen Zapfen kontaktieren, dürften ebenso zum Typ H1 gehören.

Die Horizontalzellendendriten, für die „H28“ (Abbildung 42.9 magenta) nur ein Beispiel von vielen ist, kontaktieren ausschließlich die Terminalen von kurzen Zapfen und gehören zu einer Horizontalzelle vom **Typ H2**. Bei diesem Typ liegt der Zellkörper unterhalb der Zellen des Typs H1 direkt auf der Schicht der Müllerbänder auf. Die Tatsache, dass der andere mögliche Horizontalzellkandidat Typ H3 ausschließlich Verbindung zu Stäbchenterminals aufnimmt, sortiert „H28“ eindeutig bei Typ 2 ein.

Von den beiden Bipolarzellen-Axonon mit Terminale, die in der ssTEM-Serie ab der inneren plexiformen Schicht rekonstruiert wurden, kann ein Axon (Abbildung 44.2 I in gelbgrün) eindeutig einer Bipolarzelle vom **Typ B1** zugeordnet werden. Das zweite Bipolarzellen-Axon (Abbildung 44.2 II in blau) kann am ehesten mit der Morphologie des Bipolarzellen **Typ B6** verglichen werden. Ebenfalls sind in der ssTEM-Serie ein Zellkörper und zwei Axon-Aufschwellungen von Horizontalzellen markiert worden, dabei handelt es sich um eine Zelle des **Typs H2** (Abbildung 44.2 Ho1) und bei den Aufschwellungen um den **Typ H1** (Abbildung 44.2. Ho2 und Ho3).

Die drei im Datensatz vom Heidelberger Hobel rekonstruierten Bipolarzellen gehören zum Typ **B7** (Abbildung 48 grün und gelb) und zu Typ **B1** oder Typ **B2** (Abbildung 48 rot).

Ein Vergleich mit den Bipolarzellen der Maus (Behrens et al. 2016) zeigt, dass die Dendritenbäume der in dieser Arbeit rekonstruierten Sardellen-Bipolarzellen deutlich kompakter ausgeprägt sind. Die Dendriten-Horizonte sind das hauptsächliche Vergleichsmerkmal für die folgende Zuordnung. Die Bipolarzellen aus der ssTEM-Serie sind am ehesten mit Typ 1 oder 2 (Abbildung 44.2 I in gelbgrün), mit Typ 5 oder 6 (Abbildung 44.2 II in blau) und mit Typ 6 oder Typ 7 (Abbildung 44.2 III) der Mausretina zur Deckung zu bringen. Bei letzterer Bipolarzelle sind jedoch, im Unterschied zur Maus, neben den Kontakten zu Zapfen-Photorezeptoren auch Kontakte zu Stäbchen-Photorezeptoren vorhanden. Die Zellen aus der Rekonstruktion der Heidelberger Hobel-Serie sind mit dem Typ 1 oder 2 (Abbildung 48 rot) und mit Typ 8 (Abbildung 48 grün und gelb) der Mausretina vergleichbar. Hier finden sich bei allen drei Bipolarzellen zusätzliche Kontakte zu Stäbchen-Photorezeptoren, die bei den Mäuse-Bipolarzellen nicht zu finden sind. Dies deutet auf eine stärkere Kopplung der Signalwege von Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren hin als bei der Mausretina vorhanden ist.

4.1.3 Grenzen des Datensatzes

Aus statistischer Sicht ist das im Rahmen der vorliegenden, methodisch orientierten, Arbeit erfasste, beziehungsweise rekonstruierte Probenvolumen jedoch zu klein für die vollständige Rekonstruktion des „kleinsten vollständigen retinalen Schaltkreises“. Es müssten noch weitere Bilderstapel erstellt und rekonstruiert werden um sichere Aussagen über die Schaltpläne – zum Beispiel des interterminalen Netzwerkes – treffen zu können.

Die vorliegende FIB-FESEM Probe (siehe Kapitel 3.1) war praktisch optimal ausgerichtet, was den Informationsgehalt für das untersuchte Volumen optimiert hat – das heißt die retinalen Ebenen liegen weitgehend parallel zu zwei gegenüber liegenden Flächen des Proben-Quaders. Jedoch sind trotzdem „nur“ 20 Zapfenterminals vorhanden und konnten segmentiert werden, davon 10 kurze Zapfen und 10 lange Zapfen. Auch das spricht für eine gute Ausrichtung der Probe und Auswahl des Beobachtungsbereichs beim Scannen mit dem FIB-FESEM. Von diesen 20 Terminalen sind jedoch nur 6 (3 kurze und 3 langen Zapfenterminals) annähernd vollständig im beobachteten Volumen vorhanden. Wirklich vollständig, ohne jeglichen Verlusten am Probenrand, sind nur 3 Terminalen. Davon gehören 2 zu kurzen Zapfen-Photorezeptoren und 1 zu einem langen Zapfen-Photorezeptor. Das ist ausreichend für einen ersten Eindruck über das Terminalen-Netzwerk, aber sehr wenig für solide statistische Aussagen. Es ist zum Beispiel unklar, ob die Besonderheiten bei den Terminalen 4L1 und 4L2 (Abbildung 40) die Ausnahme oder die Regel sind, was die Verschaltungsregeln zwischen den Terminalen der langen Zapfen angeht.

Die Auflösung durch den FIB-FESEM-Scan ist mit isometrischen Voxel von 8 nm aus methodischer Sicht hervorragend (Stand 2018) (Luckner & Wanner 2018). Für die Segmentierung der Proben im Bereich von dichtgepackten Dendritenbündeln in der äußeren plexiformen Schicht der Wirbeltier-Retina ist sie allerdings gerade so ausreichend. Der Großteil der synaptischen Kontakte in und an den Photorezeptorterminalen konnte nur wenige Schritte lang verfolgt werden. Eine weitere FIB-FESEM-Serie nach dem aktuellen Stand der Technik (2020) dürfte einen noch besseren Datenstapel liefern, um darin alle Kontakte der Terminalen zuordnen zu können.

4.2 Teil 2: 3D-Elektronenmikroskopie und Methodenkombinationen

Das folgende Kapitel über die Aufarbeitung einer mit *serial sectioning* TEM (ssTEM) erstellten großflächigen Bilderserie für eine 3D-Bildgebung von Zellen über die gesamte Abbildungsfläche beschreibt Neuland. Da dieser Prozess mit viel Aufwand verbunden ist und zahlreiche bisher unbeschriebene Problematiken aufgeworfen hat, ist eine ausführliche Auseinandersetzung sinnvoll.

4.2.1 ssTEM

Das serial sectioning TEM hat sich, wider der gängigen Meinung, für die Rekonstruktion retinaler Schaltkreise als grundsätzlich durchführbar herausgestellt. Bisher wurden nur wenige Projekte zu 3D-EM Rekonstruktionen mit mehr als 100 Schnittebenen publiziert (Anderson et al. 2009, Doroquez et al. 2014). Auch eine Segmentierung und Rekonstruktion von einzelnen Strukturen innerhalb des Datenstapels ist möglich und führt zu verwendbaren 3D-Modellen.

Jedoch gibt es einige Punkte, die die Anwendung letztlich unpraktikabel machen. Neben dem hohen Risiko bereits im Schneideprozess einzelne Schnitte oder gar Schnittbänder – und damit die Lückenlosigkeit – zu verlieren, sind es vor allem die zahlreichen Störfaktoren und zeitaufwendigen Korrekturschritte, die diese Methodik schwer umsetzbar machen.

4.2.1.1 Problemfeld „Schneiden“

(1) Äußere Faktoren

Das Schneiden von Serien an einem Ultramikrotom ist nur unter konstanten Umweltbedingungen erfolgsversprechend. Es gibt eine Reihe von Faktoren und deren Kombination, die auf das Kunstharz und das Mikrotom einwirken. Beispiel hierfür sind Hintergrundvibrationen oder die Lufttemperatur (mehr dazu in Kapitel 4.2.5).

(2) Schnittbänder und Dokumentation

Das Verfahren des Bänderns von Ultradünnschnitten (siehe Kapitel 2.3.2 „Schneiden und Bändern konventioneller Ultradünnschnitte“) macht eine Schnittserie erst möglich. Für 3D-Rekonstruktionen ist die richtige Reihenfolge der Schnitte essenziell. Die Alternativen sind allesamt sehr zeitaufwendig:

- (a) Nur einzelne bis sehr wenige Schnitte auf einem Grid, sodass die Reihenfolge der Schnitte aus der Reihenfolge der Grids eindeutig zu erkennen ist.
- (b) Eine sehr genaue Dokumentation der Reihenfolge parallel zum Schneideprozess. Diese stellt allerdings auch einen großen Zeitfaktor dar. Eine dichtere Packung von Schnitten auf einen Objektträger, was an sich eine Zeitersparnis darstellt, macht diese noch notwendiger. Dies ist vor allem relevant, wenn mit mehreren tausend Schnitten und damit potenziell mehreren hundert Objektträgern (Grids) gearbeitet wird.
- (c) Die letzte Alternative wäre eine nachträgliche Zuordnung der Reihenfolge der Schnitte auf einem Objektträger. Dieser Prozess ist bei immer dünneren Schnitten zunehmend schwierig, da die Unterschiede zwischen aufeinander folgenden Schnitten immer kleiner werden.

Auch das Verfahren des Bänderns benötigt eine genaue Dokumentation im Sinne der Variante (b) und eine Überprüfung der Schnittreihenfolgen. Letzteres auch da, es immer wieder dazu kommt, dass sich beim Fischen Einzelschnitte von den Bändern ablösen und deren Platz in der Schnittserie zugeordnet werden muss. Oder es kommt vor, dass Einzelschnitte umgekehrt zum Liegen kommen. Trotzdem bringt das Bändern eine Zeitersparnis um etwa den Faktor 5.

In der verwendeten Probe bänderten die Schnitte nur schwach. Dies lag höchstwahrscheinlich daran, dass die Probe im Vorbereitungsprozess für den vorrausgehenden FIB-FESEM-Scan mehrfach ausgehärtet wurde. Dadurch fehlte es an nicht-auspolymerisierten Anteilen im Kunstharz, die für das Bändern essenziell sind. Ein vorsichtiges Aufweichen der Kunstharzoberfläche mit Acetondampf brachte hier Besserung.

(3) Unterbrechungen und erneutes Anschneiden

Da das ssTEM-Verfahren sehr zeitaufwendig ist, kommt es zu unvermeidlichen Pausen zwischen Schneide-Sessions. Jedes Mal ist eine erneute Annäherung des Diamantmessers an die Probe notwendig. Durch Fehler beim Annähern wie ein falsches Einstellen der Schnitttiefe oder ein falsches Einschätzen der Distanz zwischen Probe und Messer (dies ist schnell passiert, da die Tiefenwahrnehmung durch das Schneidemikroskop beeinträchtigt ist und die Probe meist deutlich über dem Messer ist, wenn die Distanz eingestellt wird) oder durch starke Volumenänderungen der Probe in den Pausen kann es dazu kommen, dass zu tief in die Probe geschnitten wird. Bereits 15 bis 30 Minuten können ausreichen, dass sich die Dimensionen des Kunstharzblocks, auch in Abhängigkeit von seiner Größe, um mehr als eine Schnittdicke verändert. Bestenfalls wird dann nur Luft geschnitten. Meistens wird der nächste Schnitt jedoch zu dick, was Informationsverlust bedeutet. Oder die Probe setzt auf dem Messer auf, was zu internen Brüchen in der Probe führen kann; oder die Probe bricht ganz oder teilweise vom Probenhalter ab.

(4) Stauchungen, Risse, Überlappungen

Ein Problem das grundsätzlich beim Schneiden von histologischen Schnitten in Kunstharz eingebettete Strukturen entsteht sind **Stauchungen** der Schnitte. Diese fallen vor allem bei Schnittserien auf, bei denen die entstehenden Bilder am Ende aufeinander registriert werden. Die Stauchungen sind ein unvermeidbares Artefakt des Schneideprozesses, denn die Schnitte werden eigentlich nicht geschnitten, sondern mit hohem Druck mit einer scharfe Klinge abgeschert („gehobelt“). Dabei werden die Schnitte im schlimmsten Fall bis zu 30% entlang der Schnittrichtung gestaucht (Jésior 1986).

Der Großteil dieser Stauchungen ist allerdings reversibel. Die Schnitte dehnen sich im Wasserbad des Diamantmessers, in dem sie aufgefangen werden, wieder aus – gegebenenfalls forciert durch kurzfristige Applikation von Chloroform-Dampf. Dies bringt jedoch keine hundertprozentige Behebung der Stauchungen. Zudem handelt es sich nicht um einen gleichmäßigen und kontrollierbaren Prozess. Das Streckungsverhalten der Schnitte ist vor allem dann unterschiedlich, wenn eine einzelne Probe aufgrund der hohen Schnittzahl über mehrere Tage hinweg geschnitten werden muss. Hier spielen vor allem Lufttemperatur und -feuchtigkeit eine Rolle. Auch können Methodiken wie das Bändern der Schnitte, die Streckung der Einzelschnitte behindern. Dazu kommen noch Schneideartefakte durch Vibrationen, die sich auf das Schneidegerät übertragen und Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Kunstharzes (siehe Kapitel 4.2.5). Eine Möglichkeit die Kompression der Schnitte und damit die Stauchungen bereits beim Schneiden in Zukunft zumindest teilweise zu verhindern wäre der Einsatz eines oszillierenden Diamantmessers (Studer 2001).

Zu Zerrungen, Überlappungen und einem **Reißen** der Schnitte kann es nach dem Schneidevorgang kommen. Dies geschieht, wenn die Schnitte im Wasserbad vom Diamantmesser weg und beim Übertragen der Schnitte auf den Objektträger manuell bewegt werden müssen. Dieses Bewegen der Schnitte mit feinen Instrumenten ist nötig, um die Schnitte und Bänder in der richtigen Reihenfolge auf die Objektträger zu bekommen. Zusätzlich kommt es gelegentlich dazu, dass sich Schnitte an der Klinge oder an den Rändern des Wasserbades anheften. Bei der manuellen Bewegung der Schnitte von den Wasserbadrändern oder auf die Objektträger werden die Schnitte unvermeidlich mechanischem Stress ausgesetzt. Werden die Zugkräfte auf die Schnitte zu groß, kann es zu Rissen innerhalb der Schnitte kommen.

Zusätzlich gibt es im Moment des Herausnehmens des Grids aus dem Auffangbecken des Diamantmessers keinerlei Kontrolle mehr darüber, ob sich nicht doch ein Schnitt auffaltet oder über einen anderen legt. Diese **Überlappungen** können nicht mehr korrigiert werden und erschweren ein eindeutiges Zuordnen von Schnittreihenfolgen deutlich. Ist der Überlappungsbereich zu groß, sind beide Schnitte für eine Serienrekonstruktion nicht mehr zu verwenden. Durch sorgfältiges Agieren mit den Grids kann dies weitgehend verhindert werden.

Nach dem Aufbringen der Ultradünnschnitte auf die Folien der TEM-Grids unterliegen diese selbst in diesem vermeintlich fixierten Zustand noch äußeren Einflüssen. Bei den geringen Distanzen, die in der Ultrastrukturforschung relevant sind, hat schon die kleinste Veränderung Einfluss auf das Ergebnis.

So spielt der **Wassergehalt** der Schnitte eine große Rolle. Wenn die Schnitte auf der Gridfolie antrocknen sind sie den Spannungsveränderungen in der Folie unterworfen. Wenn die Folie trocknet, und das Gewicht des Wassers damit verschwindet, spannt sich die Folie und zieht sich zusammen. Dies führt gegebenenfalls zu einer Stauchung der Schnitte.

Wie jedes andere Material auch zieht sich die Folie bei kühlen **Temperaturen** zusammen und dehnt sich bei warmen Temperaturen aus. Dies führt zu Spannungen in den Folien, die zum Reißen führen können, wobei sämtliche auf ihr befindlichen Schnitte verloren gehen. Grundsätzlich werden die Folien dick genug hergestellt, dass sie diesen Belastungen standhalten. Anders sieht es bei den, durch Fixierungen und Kontrastierungen vergleichsweise starren Ultradünnschnitten aus. Starke Temperaturänderungen, ab schätzungsweise $\pm 5^\circ\text{C}$, die die Folien noch mühelos kompensieren, können zu Stauchungen und Streckungen der Schnitte führen. Dies resultiert wegen der Sprödigkeit (durch das für die hohen Strahlenbelastungen des FIB nötige sehr harte Kunstharz) der Schnitte nicht selten in feinen Rissen.

4.2.1.2 Problemfeld „TEM-Bildgebung“

Nicht nur beim Schneidevorgang gibt es Schwierigkeiten die zu beachten sind. Auch bei der Abbildung mit einem Elektronenstrahl kommt es zu Verzerrungen des Bildes. So gibt es (1) die optische Verzerrung der elektromagnetischen Linsen (Capitani et al. 2006) (siehe auch Kapitel 2.4.1) und (2) das Deformieren des Schnittes im Elektronenstrahl (Hoppe 1981). In beiden Fällen handelt es sich um Verzerrungen, die in der Nachbearbeitung der Bilder zu berücksichtigen sind. Insbesondere wenn diese Bilder für vergleichende Arbeiten von morphologischen Dimensionen verwendet werden. Jedes Elektronenmikroskop und jede Mess-Sitzung hat andere Verzerrungsparameter. Bereits eine unterschiedliche Strahl-Verweildauer (meist in Form einer wiederholte Bestrahlung einzelner Schnitte) führt zu unterschiedlichen Deformationen. Dies findet aber in den meisten 2D-TEM Arbeiten keine Beachtung. Ein Umstand, der angesichts des signifikanten Korrekturaufwandes verständlich ist, die Vergleichbarkeit von Längen- und Volumenmessungen jedoch in Frage stellt.

Die starke Elektronenstrahlung mit der die Schnitte abgebildet werden, bleicht bei jedem Beobachtungs- und Messvorgang den Hintergrund (sprich das nicht-kontrastierte Kunstharz) aus, was zu einer **Aufhellung und Kontrastverstärkung** bestrahlter Bereiche (Grubb 1974) gegenüber nicht bestrahlten Bereichen führt. Wenn nicht darauf geachtet wird, alle Schnitte einer Serie derselben Strahlenbelastung auszusetzen, können keine vergleichenden Aussagen basierend auf der Kontraststärke einzelner Strukturen getroffen werden.

Das Phänomen des **Elektronenoptischen Verzeichnung** und dessen Korrektur mit Hilfe von **Grated Grids** ist im Unterkapitel „Verzeichnung korrigieren“ im Kapitel 2.4.1 ausführlich beschrieben.

4.2.1.3 Korrekturmaßnahmen

Aus dem oben dargelegten Gründen sind folgende digitale Korrektur- beziehungsweise Nacharbeiten für die sSTEM-basierte 3D-Rekonstruktion notwendig:

- Elektronenstrahl-Verzeichnung korrigieren (siehe Kapitel 2.4.1 „Verzeichnung korrigieren“)
- Stitching (siehe Kapitel 2.4.1 „Zusammenfügen der Einzelbilder eines Schnittes“)
- Risse korrigieren
- Elastische Registrierung I (Landmarks)
- Elastische Registrierung II (Automatisiert)

Bei der digitalen **Korrektur von Rissen** in den Schnitten sind gelegentlich mehrere Transformationsvorgänge nötig. In diesen Fällen handelt es sich nicht um einen einzelnen Riss, sondern um ein Rissystem oder um Risse, die mehreren Kraftvektoren zuzuschreiben sind. Dann müssen diese ursprünglich gleichzeitig entstandenen Rupturen nacheinander wieder geschlossen werden. In den meisten Fällen sind der Großteil der an der Risskante beteiligten Strukturen in ihren Umrissen und in ihrer Fläche unverändert. Dadurch, dass jeder Arbeitsschritt hierbei von Hand ausgeführt wird und direkt dem menschlichen Urteilsvermögen und bildverarbeitungstechnischen Fähigkeiten unterliegt, ist es wahrscheinlich eine der größeren Quellen der Veränderung der ursprünglichen Realität des Gewebes im Nachbearbeitungsprozess. Glücklicherweise sind diese händischen Veränderungen immer auf einen einzelnen Schnitt begrenzt. Theoretisch sind die nachfolgenden Schritte der elastischen Registrierung in der Lage die hier eingebrachten Fehler wieder „auszubügeln“. Dies klappt jedoch nur bis zu einem gewissen Feinheitsgrad.

Die **Elastische Registrierungs**-Schritte waren nötig um die zuvor eingebrachten Verzerrungen durch Einbettung (Kapitel 4.2.5), Schneiden (Kapitel 4.2.1.1) und Bildgebung (Kapitel 4.2.1.2) soweit zu korrigieren, dass die Bilderserie für eine Rekonstruktion verwendet werden konnte (siehe Kapitel 2.4.1). Zuerst musste die Verzeichnung des Elektronenstrahls aus jedem einzelnen aufgenommenen Bild per Landmark-Registrierung mittels händisch angefertigter Translationsanweisungen durchgeführt werden. Anschließend war eine elastische Landmark-Registrierung der zusammengefügten Bilder der Schnittebenen notwendig da die Verzerrungen zu ausgeprägt waren. Teilweise waren einzelne Strukturen auf aufeinanderfolgenden Schnitte bis zu 30 µm voneinander entfernt, sodass eine automatisierte elastische Registrierung nicht sinnvoll gewesen wäre. Dies musste händisch als Landmark-Registrierung für alle 100 Schnitte der Serie, mit je 100+ Landmarks, geschehen und ist eine grobe Vorregistrierung. Darauf folgte die automatische elastische Registrierung als Feinregistrierung der Bereiche zwischen den in der Vorregistrierung verwendeten Landmarks.

Bei all diesen Korrekturschritten ist zu bedenken, dass eingebrachte Korrektur- und Registrierungsfehler beibehalten werden. Die Arbeit für das Schließen der Risse und die Wahl der Landmarks müssen deswegen sehr sorgfältig durchgeführt werden. Auch automatische Registrierungen basieren auf gewissen Annahmen (zum Beispiel die Stärke der nötigen Kontrastunterschiede für die Strukturerkennung), die für jedes Projekt und jeden Scan neu ermittelt werden sollten.

4.2.1.4 Fazit

Ein klassisches Ultramikrotom ist nicht für lange Serienschnitte (>100 Schnitte) mit derart großen Schnittflächen (circa 150 x 60 µm) geeignet und wird deswegen nur selten dafür verwendet. Der zeitliche und personelle Arbeitsaufwand, der betrieben werden muss, um mit den erhaltenen Bilderstapeln einen für die 3D-Rekonstruktion ausreichenden Qualitätsstatus zu erreichen, ist sehr hoch. Rekonstruktionen an längeren Schnittserien wurden deswegen bisher vorzugsweise mit kleinen Bildausschnitten (circa 5 x 5 µm) durchgeführt (z.B. Mishchenko 2009).

Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass das Serienschneiden mit einem Ultramikrotom auch über längere Strecken grundsätzlich möglich ist. Jedoch sind einige Nachbearbeitungsschritte nötig, um die Serie für eine 3D-Rekonstruktion verwendbar zu machen. Zudem ist die Auflösung entlang der z-Achse mit minimal 70 nm relativ niedrig, steht einer Rekonstruktion grundsätzlich aber nicht im Wege.

Allgemein lässt sich sagen, dass das ssTEM-Verfahren durchaus sinnvoll Bilderstapel für die Rekonstruktion kleiner Strukturen ergeben kann. Die im konkreten Fall der vorliegenden Arbeit anvisierten Dendritenhorizonte von Sekundärneuronen konnten, aufgrund der geringen Schnitzzahl, mit dieser Serie leider nicht erfasst werden. Obwohl die in der vorliegenden Arbeit erstellte Bilderserie mit klassischen Ultramikrotom-Schneiden, die beste derzeit mögliche 3D-ssTEM-Serie darstellt.

4.2.2 Heidelberger Hobel

Im Vergleich zum ssTEM-Verfahren (Kapitel 4.2.1) ist der Vorbereitungsaufwand vor dem ersten Scan nur um die verstärkte Kontrastierung der Probe erhöht (etwa 14 Stunden mehr). Zudem ist ein weiterer Mesa-Präparationsschritt notwendig (etwa 3 Stunden).

In Anbetracht der hochgradig registrierten Datenstapel mit konstanter Bildqualität – sowohl innerhalb jedes Bildes als auch zwischen den einzelnen Bildern – ist dieser Mehraufwand ein kleiner Preis. Zudem liegen die Kosten für die Bildgewinnung sehr nahe an denen für die klassische TEM. Problematisch ist nach wie vor der Zugang zu einem „Heidelberger Hobel“, der – im Gegensatz zum FIB-FESEM – im Zeitraum der Datenerfassung für die vorliegende Arbeit nicht im Hause verfügbar war. Die Nachbearbeitungszeit für die Optimierung der Rohdaten vor der 3D-Rekonstruktion (und damit die Personalkosten) sind bei der SBFS-Methode um Größenordnungen geringer als bei ssTEM. Letztere ist natürlich, bezüglich der lateralen Auflösung einem auf Rückstreuielektronen basierendem Rasterverfahren weit überlegen.

Die dennoch gute Rekonstruierbarkeit der Axonterminalen der Bipolarzellen (und sinngemäß auch der Dendriten von Amakrin- und Ganglienzellen) machen den Heidelberger Hobel zum besten Kandidaten für weitergehende Untersuchungen zur Verschaltung der inneren Retina. Nach dem Kontakthorizont zwischen Photorezeptorterminalen und Horizontal- und Bipolarzellen in der äußeren plexiformen Schicht, bilden die synaptischen Kontakte der inneren plexiformen Schicht die nächste Verrechnungsebene der Retina. Dabei konnte nun erstmals an Fischen die, bisher nur in Ableitungsversuchen beobachteten, Verschaltungsereignisse (Novales-Flamarique & Hawryshyn 1998) physikalisch nachgewiesen werden. Tatsächliche synaptische Kontakte können gezeigt werden und ermöglichen es, dass Verschaltungsnetzwerk der inneren plexiformen Schicht zu verfolgen. Dies geschieht am besten durch weiterführende Rekonstruktionen der kontaktierenden Sekundär- und Tertiärneurone. Dadurch können die Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche (Tomita 1959) und die daraus ermittelten Verschaltungstheorien (Lebedev & Marshak 2007) überprüft und erweitert werden. An den zentralen Nervensystemen von Wirbeltieren (Muroidea) (Schmidt et al. 2017) und Insekten (*Drosophila sp.*) (Kleinfeld et al. 2011) gab es großflächig angelegte morphologische Connectomics-Arbeiten auf Basis derselben SBFS-Methodik. Entsprechende Ansätze für das menschliche Nervensystem haben sich bisher, aufgrund der schieren Größen und der eher diffusen Vernetzung, als schwierig erwiesen (Helmstaedter 2017).

Eine noch kleinere Schnittdicke als die in dieser Arbeit erreichten 30 nm wäre wünschenswert, da in diesem Bereich theoretisch eine Biomembran komplett innerhalb der Schnittdicke verschwinden kann. In Anbetracht der, im Vergleich zu anderen Abbildungsverfahren, sehr große Scanflächen, sind die 30 nm jedoch ein großer Schritt nach vorne und für eine Erschließung der Verschaltungsregeln innerhalb der Retina ausreichend.

In der abgebildete Fläche (150 x 60 μm) war die Verfolgung der Bipolarzellen und mancher Amakrinzellen gut umsetzbar. Jedoch ist fraglich, ob die ROI-Breite von 60 μm für die komplette Erfassung der Dendritenbäume aller Typen von Amakrin- und Ganglienzellen der Retina ausreichend ist. So sind beim Menschen (Kolb et al. 1992) und beim Rhesusaffen (Mariani 1990) für Amakrinzellen laterale Ausbreitungen von bis zu 600 μm gefunden worden. Die gleiche Größenordnung ist bei Katzen (Wässle et al. 1981) und Hasen (Amthor et al. 1989) für Ganglienzellen zu finden. Selbst wenn die Zellen in der Sardellenretina entsprechend der unterschiedlichen Augengrößen (Mensch ~23 mm, Katze ~20 mm, Hase 10-20 mm, Sardelle ~10 mm) kleiner sind, liegen sie mit 300 μm nicht komplett in der ROI.

Dies ließe sich durch die Verwendung von mehr Einzelbildern im *Multi Image Array* lösen, was gleichbedeutend mit längeren Scanzeiten ist. Allerdings lässt die konstante Entwicklung im Bereich der 3D-EM (siehe dazu Kapitel 4.2.6) darauf hoffen, dass in naher Zukunft deutlich größere Flächen bei gleichem Aufwand abgebildet werden können. Allein der Methodenfortschritt zwischen den beiden Scan-Sessions mit dem Heidelberger Hobel (6 Monate): (1) stabilerer Scanprozess und (2) deutlich verbessertes Cubing zeigen das Entwicklungspotential in diesem Bereich.

4.2.3 FIB-FESEM

Die „beste“ Scan-Serie im Rahmen dieser Arbeit war mit einer isotropen Auflösung von 8 x 8 x 8 nm bei einer abgebildeten Fläche von 33 x 22 μm über 1457 „Schnitte“ der FIB-FESEM Scan aus Kapitel 3.2.2 („FIB 1085 19“). Hier begrenzt die gewünschte Auflösung (= Pixelsize) das field-of-view mit der die Fläche abgebildet werden kann. Der Detektor des FIB-FESEM-Systems ist bauartbedingt in seiner Abmessung limitiert (im vorliegenden Fall auf 3450 x 2650 Pixel). Je kleiner die Pixelgröße gewählt wird, umso kleiner wird damit auch die Fläche, die aufgenommen werden kann.

Wenn die, für eine 3D-Rekonstruktion optimalen, isometrischen Voxel angestrebt werden, bildet hingegen die Schnittdicke den limitierenden Faktor. Je „dünner“ abgetragen wird, umso präziser muss der Ionenstrahl kontrolliert werden. Andersherum können kleinste Veränderung von Probe oder Gerät zu Fehlschnitten führen. Damit werden lange Serien, mit mehr als ein paar 100 Schnitten, zunehmend riskant. Mögliche Lösungsansätze für die Kontrolle des Ionenstrahls (Boergens & Denk 2013) sind noch nicht in kommerziellen Geräten umgesetzt worden.

Abgesehen von der reinen Scanzeit (siehe unten) fallen bei dieser Methodik, zusätzlich zur Einbettung noch ein bis zwei Arbeitstage für die Ausrichtung der Probe und das Zuschneiden der Mesa (siehe Kapitel 2.3.1) an. In der Vorbereitung auf die Rekonstruktion müssen die Datenstapel noch nachaligniert werden, um den leichten Drift der Probe im SEM zu kompensieren. Dieser muss unter Betrachtung jedes einzelnen Bildes geschehen, da die Drift nicht konstant ist. Abhängig von der Bildanzahl der Serie sind das nochmals um die 3 bis 5 Stunden Arbeitsaufwand.

All dieser Aufwand lohnt sich jedoch, da das FIB-FESEM derzeit die geringsten Pixel-Dimensionen in 3D-EM-Serien bei gleichzeitig hochgradig registrierten Bilddaten ermöglicht. Diese Faktoren sind für 3D-Rekonstruktionen, die sich in den letzten Jahren zu einem der Standbeine für die Forschung an Konnektomen entwickelt haben, essenziell. Die in dieser Arbeit erstellten Datensätze der Retina von *E. encrasicolus* schaffen ein neues Modellsystem für die Connectomics-Forschung, welches sich in die bereits untersuchten Organismen einreicht und als erste Teleosten-Connectomics-Arbeit eine Lücke füllt. Neben der Makaken Fovea als einziges bisheriges Beispiel der Retina-Forschung (Tschulakow et al. 2018) wurden die meisten anderen Arbeiten mit dem FIB-FESEM am zentralen Nervensystem durchgeführt. So ist das Cerebellum (Knott et al. 2008) und der somatische Kortex (Santuy et al. 2018) der Muroidea gut untersucht. Die Morphologie der Zellen des menschlichen Hippocampus sind im Rahmen medizinischer Studien ebenfalls mehrfach mit dem 3D-EM-Verfahren abgebildet worden (Schmidt et al. 2011, Montero-Crespo et al. 2020). Außerhalb der Vertebrata gab es Untersuchungen

am visuellen Neuropil der Asselspinne (*Achelia langi*) (Lehman et al. 2014) und an *Drosophila sp.* (Kleinfeld et al. 2011). An letzterem konnte, dank neuen FIB-Systemen und dabei immer größer werdenden möglichem Scanvolumen (Xu et al. 2019), zunehmend große Konnektome erfasst werden. Bis hin zur kompletten Abbildung des zentralen Nervensystems von *Drosophila sp.* (Scheffer et al. 2020). Hier wurde der Zeitfaktor durch eine Unterteilung des Gehirns in, perfekt kombinierbare, Untersektionen mittels eines heißen Diamantmessers (Hayworth et al. 2015) und parallelem Scannen an mehreren FIB-FESEM-Arbeitsstationen deutlich reduziert.

Probleme des FIB-FESEM

Im Rahmen eines FIB-FESEM Prozesses dieser Arbeit (FIB 1085, siehe Kapitel 2.3.4 „Scan 2“) kam es mehrfach zu Problemen. Zunächst wurde der Startpunkt des Scans zu weit skleral der Terminalen gewählt und die Schnittstrecke dadurch deutlich verlängert. Durch die daraus resultierende längere Scan-Strecke konnte eine Reihe von Fehlerarten dokumentiert werden.

Diese längere Scan-Strecke leitet zu einem bei diesem SBFS-Verfahren wichtigen Punkt: den Kosten. In circa 16 Stunden konnte eine radiale Strecke von 9,6 μm geschnitten (etwas mehr als 1100 Ebenen) werden (Stack 1 in der Tabelle „FIB-FESEM SS13 03 A5“). Dies konnten nach Optimierung aller Generationsparameter als zügig angesehen werden, kostete aber dennoch bei € 90 pro Stunde etwa € 1400,00.

Insgesamt wurden 19 Scanvorgänge, beziehungsweise Ansätze, benötigt, um die gesuchten Bereiche der äußeren Plexiformen Schicht abzubilden. Bei den Scans 1, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 gab es Probleme mit dem Gallium Emitter für den FIB, wodurch zu „dünn“ oder nicht wurde. Bei den Scans 4, 6, 10 gab es Probleme mit dem automatischen Nachfokussieren (Abbildung 51). Die hohe Anzahl der Scans zeigt auch, dass die Scantiefe pro Scan-Vorgang grundsätzlich limitiert ist. Hier spielen Drift, Aufladung und thermische bedingte Veränderungen der räumlichen Parameter sowie Gallium-Ablagerungen eine Rolle (Hayworth et al. 2015).

Ein großer Teil der betroffenen Scanvorgänge (5 bis 17) fand im Bereich der Zapfenterminalen statt. Es ist im vorliegenden Fall glücklicher Zufall, dass von dem für die Segmentierung benötigten Bereich, noch genug ausreichend Volumen in guter Qualität gescannt werden konnte und es nicht zu großen Bildverlusten kam. Im Nachhinein war es vorteilhaft, dass sich der Startpunkt zu weit skleral befand. Leider sind die Schichten der Retina in der Probe SS13 03 A5 nicht völlig parallel, beziehungsweise orthogonal zu den Kanten des Volumens ausgerichtet (Abbildung 46). Dadurch mussten die Bilderstapel zusätzlich etwas länger ausfallen, um den gesamten Bereich von Interesse, hier die Zapfenterminalen und die Dendritenbäume der Bipolarzellen, zu erfassen. Diese Schiefstellung lässt sich in der Präparation nicht immer verhindern. Die Retina ist ein gekrümmtes Gewebe und der Präparationsfortschritt kann nur mit Dünnschnitten der Außenseiten des zu schneidenden Kunstharzblocks kontrolliert werden.

Fazit

Die FIB-FESEM Methodik erbringt, wenn sie funktioniert, hochaufgelöste, gut fokussierte und perfekt registrierte Bildserien. Allerdings ist sie, trotz beständiger Upgrades (bessere Kamera, ATLAS-System) im Verlauf dieser Arbeit, immer noch fehleranfällig. Insbesondere was den Ionen spendenden Gallium-Emitter angeht. Nur genaue und beständige Kontrolle des Operators kann bei diesem automatisiertem Verfahren verhindern, dass Daten verlorengehen. Im Kontext mit anderen, ebenfalls aufwendigen

Methodiken eines kombinierten Ansatzes, muss man sich dieser Anfälligkeit bewusst sein. Ein mehrmonatiger Prozess kann an einem abgebrochenem oder fehlerhaftem Scan scheitern.

Tabelle "FIB-FESEM SS13 03 A5". Übersicht der verschiedenen Scanansätze beim FIB-FESEM-Verfahren für SS13 03 A5 (FIB 1085). Angegeben sind die Bildzahlen (entsprechen den Schnittzahlen) pro Ansatz, die geschnittene Strecke in μm . Außerdem aufgeführt ist der Zustand der Probe und eventuelle Probleme des Scanvorgangs sowie die Position des Bilderstapels in der Retina.

Stack	Bildanzahl	μm	Kommentare	Bereich
1	1131	9,6	Schneidet gut und schnell, gegen Ende Probleme mit dem Gallium Emitter	äußere nukleäre Schicht
2	1432	11,46	Schneidet gut	In die Stäbchenterminalen
3	0	0	Platinbeschichtung mit Referenzmarken erneuert, Testbild	In die Stäbchenterminalen
4	217	1,7	Bilder unscharf, Probleme beim nachfokussieren	Mitte bis Ende Stäbchenterminalen
5	3	0,02	Bilder wieder gut fokussiert	Ende Stäbchenterminalen, Anfang Zapfenterminalen
6	0	0	Parameter lassen sich nicht einstellen	
7	19	0,15	Bilder gut fokussiert	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
8	20	0,16	Schneidet nicht mehr	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
9	21	0,17	Bilder gut fokussiert	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
10	20	0,16	Probleme beim nachfokussieren	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
11	9	0,07	Schneidet nicht	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
12	70	0,56	Schneidet hinter der letzten Ebene	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
13	0	0	Schneidet nicht	
14	1	0,01	Schneidet nicht tief genug	Ende Stäbchenterminalen, Zapfenterminalen
15	15	0,12	Schneidet nicht tief genug	Zapfenterminale, Horizontalzellen
16	0	0	Schneidet nicht, Detektorprobleme	
17	0	0	Schneidet nicht, Detektorprobleme	
18	409	3,27	Schneidet gut, fokussiert gut	Zapfenterminale, Horizontalzellen
19	1457	11,6	Schneidet gut, fokussiert gut	Ende Zapfenterminalen, Mitte Müllerbänder

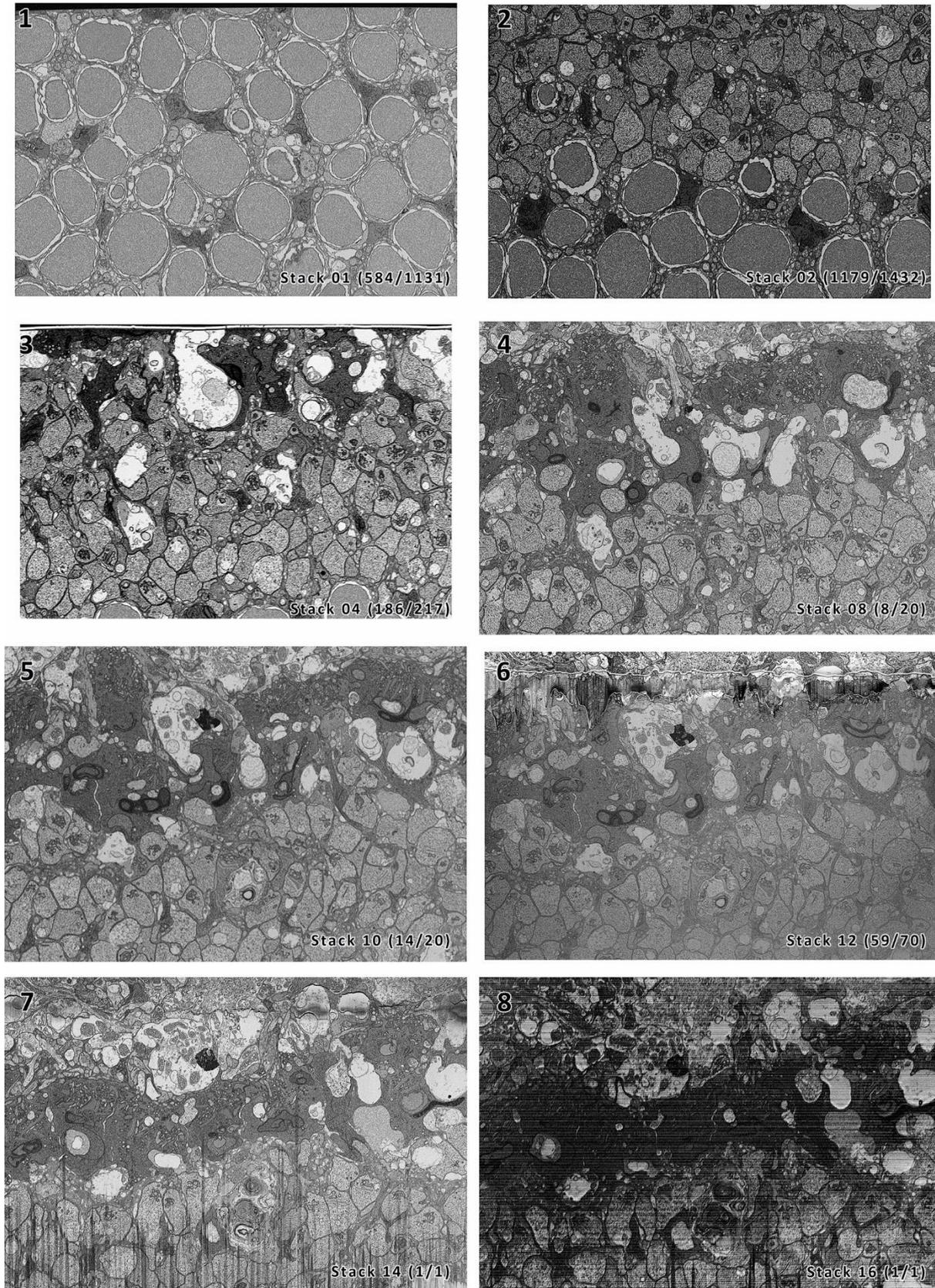


Abbildung 51: FIB-FESEM Scanvorgänge – Beispielbilder. **(1)** Im Bereich der Stäbchenzellkörper. **(2)** Übergangsbereich zwischen Stäbchenzellkörpern und Stäbchenterminalen. **(3)** Übergangsbereich zwischen Stäbchenterminalen und Zapfenterminalen, mit schlechtem Fokus. **(4)** Nach Neueinstellung des Mikroskops mit gutem Fokus. **(5)** Mit schlechtem Fokus. **(6)** Am oberen Rand erkennt man, dass hinter der Abbildungsebene geschnitten wurde. **(7)** Wie (6) aber mit Schneideartefakten (**Streifen**) im unteren Bildbereich. **(8)** Wie (7), zusätzlich mit Abbildungsartefakten (**Querstreifen**). In der rechten unteren Ecke ist jeweils angegeben, um welchen Scanvorgang („Stack“) und welches Bild es sich handelt.

4.2.4 Methoden-Kombination

Bei beiden Kombinationsansätzen konnten die FIB-FESEM-Datenstapel mit dem dazugehörigen großflächigeren 3D-Datenstapel kombiniert werden. Ebenso konnten in beiden Ansätzen Bipolarzellen von ihren Dendritenbäumen im FIB-FESEM-Stapel in den angeschlossenen ssTEM- (siehe Kapitel 3.2.1 „Kombination von ssTEM und FIB-FESEM“) beziehungsweise Heidelberger Hobel-Stapel (siehe Kapitel 3.2.2 „Kombination von Heidelberger Hobel und FIB-FESEM“) hinein bis zu ihren Terminalen in der inneren plexiformen Schicht verfolgt und rekonstruiert werden.

ssTEM und FIB-FESEM

Trotz der überraschend guten Rekonstruktionsergebnisse fällt bei dieser Methodenkombination der große Zeit- und Arbeitsaufwand für die Nachbearbeitung der ssTEM-Serie (siehe Kapitel 2.4.1 und Kapitel 4.2.1) ins Gewicht. Zudem war das Ergebnis, dass Zellen über beide Stapel hinweg verfolgt werden konnten, unerwartet. Aufgrund der Aufladungen durch den Ionenstrahl innerhalb der FIB-Kerbe kam es zu starken „Elektronenschatten“ (Lamvik 1991) im Anschlussbereich in der ssTEM-Serie zur FIB-FESEM-Serien. Es ist anzunehmen, dass diese Strahlungsschäden mit der, im Vergleich zum Heidelberger Hobel-Ansatz, eher schwachen Kontrastierung zusammenhängen und so in zukünftigen Versuchen leicht zu beheben sind.

Während die Auflösung der ssTEM-Serie entlang der Schnitte besser ist als in allen anderen Ansätzen und die synaptischen Strukturen der Bipolarzellen in einem hohen Detailgrad abgebildet wurden, ist die relativ hohe Schnittdicke von 70 nm problematisch. Für Rekonstruktionen zur Morphologie der Zellen noch ausreichend, stößt die ssTEM-Methodik hier spätestens bei einer Quantifikation von synaptischen Kontakten an ihre Grenzen. Innerhalb der Schnittdicke können viele der feineren Strukturen (Synaptische Kappen = 12 bis 20 nm) verloren gehen.

Heidelberger Hobel und FIB-FESEM

Dieser Kombinations-Ansatz ließ eine problemlose Identifikation und Verfolgung derselben Zellen in beiden Datensätzen zu. Bei der gegebenen Voxelsize des Heidelberger Hobel-Scans (12 x 12 x 30 nm) konnten die rekonstruierten Bipolarzellen in einem mehr als ausreichenden Detailgrad rekonstruiert werden und Kontakte zu Amakrin- und Ganglionzellen eindeutig identifiziert werden. Es ist anhand der Rekonstruktion möglich den Bipolar-Typen (Koch 2011) der segmentierten Zellen zu identifizieren (siehe Kapitel 4.3.1).

Wie in Kapitel 3.2.3 ausgeführt ist der zeitliche Aufwand für einen Durchgang mit dem Heidelberger Hobel deutlich geringer bei gleichzeitiger Abbildung eines deutlich größeren Volumens.

Das Risiko eines Abbruchs von randständigem Probenmaterial durch zu hohe Kräfte beim Schneiden und zu hartem, und damit sprödem, Kunstharz, das bei physikalischen Schneidemethoden immer gegeben ist, besteht auch beim Heidelberger Hobel. Dies ist normalerweise unkritisch, da die ROI zentral in der Mesa liegt und somit durch derartige Abbruchereignisse nicht betroffen ist. Im Kombinationsansatz mit FIB-FESEM gibt es jedoch randständige Bereiche innerhalb der ROI die abbrechen könnten. Wenn ein Abbruch eintritt ist der gesamte Scan-Ansatz gefährdet, da für eine Kombination der beiden Datensätze gerade diese randständigen Bereiche essenziell sind. Um dies etwas unter Kontrolle zu bringen gibt es Ansätze, das Kunstharz mit Nanofasern zu verstärken (Domun et al. 2015).

Fazit

Der Heidelberger Hobel bietet im Vergleich zum ssTEM, bei vergleichbarer Auflösung entlang der X- und Y- Achse eine deutlich bessere Auflösung entlang der Z-Achse. Die Registrierung der Bilder aufeinander ist durch die volle Automatisierung der Registrierung annähernd fehlerlos und erlaubt dadurch einen hohen Detailgrad bei den Rekonstruktionen. Im Vergleich zum ssTEM-Verfahren (37,5

Tage für 100 Schnitte) können um das 10-fache längere Schnittserien in einem Viertel der Zeit (9 Tage für 1000 Schnitte) fertiggestellt werden. Auch Bedenken bezüglich der Verzerrung der Realität durch den Abbildungsprozess sind durch die wenigen Arbeitsschritte und geringen Nachbearbeitungsbedarf geringer als beim hier angewandten ssTEM-Verfahren.

Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten die eine Kombination von mehreren 3D-EM Methodiken an der selben Probe angewendet haben, um den Informationserhalt zu optimieren. In den meisten Fällen von Kombinationsuntersuchungen wurden zwar mehrere Verfahren eingesetzt, jedoch an unterschiedlichen Proben desselben Ursprungs.

Kombinierte Ansätze von unterschiedlichen 3D-Imaging-Verfahren an der selben Probe finden sich zwar mehrfach, jedoch handelt es sich hierbei entweder um CLEM (*correlated light and electron microscopy*), Kombinationen eines 3D-EM-Verfahrens als Folgemethodik auf ein LM-Verfahren wie Fluoreszenz-Mikroskopie (Tsang et al. 2018) oder 3D-LM wie *in-vivo* 2-Photonen-Mikroskopie (Blaquez-Llorca et al. 2015, Luckner et al. 2018).

Andere Beispiele für Methodenkombinationen mit 3D-EM-Verfahren finden sich in der Proteinforschung. Eine gängige Kombinations-Methodik ist hier die X-Ray Kristallographie (Kalko et al. 2000), um die 3D-Struktur von Proteinen zu untersuchen. In den Materialwissenschaften gibt es kombinierte Ansätze von X-Ray Tomographie und SBFS (Wijaya et al. 2017), sowie auch die Kombination FIB-FESEM und TEM (Ohkubo et al. 2014). In allen Fällen wurden die unterschiedlichen Methodiken jedoch an verschiedenen Proben angewandt.

In der Bakterienforschung gibt es ein Beispiel für einen kombinierten Ansatz einer 3D-EM- mit einer 2D-EM-Methodik an der selben Probe (Li et al. 2020). Hier wurden mit FIB-FESEM 3D-Datensätze geschaffen und dann mit dem FIB abgetragene Schnitte im TEM untersucht.

Insgesamt konnte nur eine publizierte Arbeit mit der Verwendung von zwei 3D-EM Methodiken an der selben Probe gefunden werden. Hierbei wurde für zellbiologische Fragen eine Probe mit einem Heidelberger Hobel geschnitten, bis eine gesuchte Struktur gefunden war. Diese wurde dann im hochauflösenden FIB-FESEM-Verfahren abgebildet (Guérin et al. 2019). Der Heidelberger Hobel wurde in diesem Fall nur für das Annäherungs-Schneiden verwendet.

Somit sind die in dieser Arbeit durchgeführten methodischen Versuche die ersten Beispiele für eine determinierte Kombination zweier 3D-EM-Methodiken mit unterschiedlichen Zielvolumen an derselben Probe, um die Vorteile beider Methodiken auszunutzen.

4.2.5 Methodenkritik

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden sind teils langwierig und teils mit der Möglichkeit behaftet, Artefakte in der Bildgebung einzuführen und so auf dem Weg von *in-vivo*-Strukturen zum digitalen Modell Fehler einzuführen. Dies betrifft (je nach Methode) Gewebepreparation, Fixierung, Kontrastierung, Einbettung, Trimmen, Schneiden, Fischen der Schnitte, Bilddatenakquise, digitale Korrekturen, Stitching, Registrierung, Labeling und Rendering.

Ein Aspekt, der insbesondere bei der Nachbearbeitung der ssTEM-Bilderserie in Betracht gezogen werden muss, ist also folgender: **Inwiefern bilden die 3D-Modelle, die man nach all den Arbeitsschritten erhält, noch die ursprüngliche Realität des Gewebes ab** beziehungsweise inwiefern findet eine Realitätsverzerrung statt?

Zwei Arten von Verzerrungen müssen unterschieden werden: Solche die die Gesamtprobe betreffen, also alles vor dem Prozess des Schneidens (zum Beispiel Schrumpfung bei chemischer Fixierung, mechanische Verletzung bei der Präparation). Und solche die auf einzelnen Schnitte einwirken und

jeden Schnitt individuell und unterschiedlich beeinflussen. Die erste Art der Verzerrungen ist während der weiteren Verarbeitung nicht festzustellen und erhöht auch nicht den Arbeitsaufwand. Sie verfälschen dennoch die Abbildung der Realität.

Neben den methodisch bedingten Veränderungen der Probe gibt es auch eine Reihe von korrektiven Arbeitsschritten die nötig sind, um die Veränderungen durch die Probenverarbeitung zu kompensieren, damit die Daten in einer 3D-Rekonstruktion verwendet werden können. Doch auch diese Schritte bringen eigene Veränderungen in die Bilddaten ein, die nicht zwingend dem ursprünglichen Zustand des untersuchten Gewebes entsprechen.

Idealerweise werden alle Schritte von derselben Entität (Person, Arbeitsgruppe) ausgeführt. So kann ein umfassender Überblick behalten werden, welche Veränderungen eingebracht wurden. Oft ist dies jedoch nicht möglich und es wird mit Materialien und Daten gearbeitet, die durch viele Hände gegangen sind. Selbst bei gewissenhafter Dokumentation sind dann nicht alle Einflüsse und Abwägungen, denen die Probe unterworfen, war bekannt.

Präparation

Präparationen werden grundsätzlich so vorsichtig und sorgfältig wie möglich ausgeführt. Trotzdem kommt es immer wieder zu Fehlschnitten, Quetschungen und anderen physikalischen Beschädigungen der Probe. Beispielsweise kommt es schnell zu Zerrungen des Probenmaterials, wenn Gewebeteile stärker als erwartet an anderen Oberflächen anhaften.

Dies gilt besonders für elektronenmikroskopische Proben. Diese sind meist nur mit Hilfe eines Mikroskops zu bearbeiten und zusammen mit der Tatsache, dass Präparationen immer Handarbeit sind und die Schneide- und Greifinstrumente nur bis zu einem gewissen Punkt miniaturisiert werden können, erhöht sich dadurch das Risiko die Proben zu beschädigen. Zudem sind die Regionen von Interesse oft sehr klein und in ihrer Zahl limitiert. Aus dem Auge einer adulten Sardelle können zum Beispiel nur etwa 8 Einzelproben aus der Area entnommen werden. Es gelingt dabei selten alle Probenstücke gleich gut zu verarbeiten. Da der Beschaffungsprozess aufwendig ist – hier spielen Zeit, Personalkosten und saisonale Verfügbarkeiten eine Rolle – ist man trotzdem dazu angehalten, alle Proben nach Möglichkeit zu verwenden.

Während der Präparation lässt sich meistens klar definieren, welche Präparate ungewollten Quetsch- und Scherkräften ausgesetzt waren. Basierend darauf werden die am ehesten unbelasteten Proben für die am meisten erfolgsversprechenden Methoden oder Durchgänge verwendet. Eventuell beschädigte Proben finden dafür in Testläufen Verwendung – mit der Chance bei erfolgreichen Tests doch noch nützliche Daten zu liefern. Wenn jedoch begrenzte Ressourcen die Wiederholung eines Vorgangs limitieren, sind unbelastete Proben zu bevorzugen. Dennoch haben sich oft präparationstechnisch vorbelastete Proben am Ende als, aus Sicht der Methodik, einwandfrei herausgestellt. Ebenso gibt es immer wieder vermeintlich perfekte Proben, die dann doch große Beschädigungen, wie Risse oder gequetschtes Gewebe, aufwiesen.

Fixierung

Bei der chemischen Fixierung kann es zu Schrumpfungen von 11 bis 20% (Doughty et al. 1997) kommen. Dies führt zur Unterschätzung bei Längenmessungen und noch mehr bei der Volumetrie. Ein Korrekturfaktor ist angebracht, wenn auch in der Regel nicht eindeutig zu quantifizieren. Dabei erscheinen Membranen im EM-Bild oft wellig anstatt glatt und die Zellen in der Rekonstruktion mit entsprechen unruhiger Oberfläche. Hier sollten Glättungsschritte während der 3D-Modellberechnung (siehe Kapitel 2.4.3) zu einem Bild führen, dass der Realität näher liegt. Eine Alternative zur chemischen Fixierung ist die, deutlich aufwendigere, Kryofixierung (Tsang et al. 2018).

Kontrastierung fokussiert immer auf Teilaspekte

Eine Kontrastierung in der Elektronenmikroskopie ist immer binär. Im Gegensatz zu lichtmikroskopischen Ansätzen können Informationen nur entlang der Grauwertskala aufgenommen werden. Andere Dimensionen wie verschiedene Farbkanäle stehen (bei der Standard-EM-Bildgebung) nicht zur Verfügung. Deswegen muss mit der Kontrastierung entschieden werden, welcher Aspekt des Gewebes den größten Informationsgehalt für die aktuelle Fragestellung gibt. Eine Kontrastierung auf mehrere Aspekte ist zwar technisch möglich, jedoch sind diese Aspekte dann in den resultierenden Bildern nicht mehr zu unterscheiden (schwarz neben schwarz). Man kann entweder auf generelle Aspekte wie Fette oder Skelettproteine kontrastieren, oder sehr spezifisch, mit Protein- oder RNA-Markern welche sekundär mit Schwermetallatome assoziiert werden, Proteine und Botenstoffe (z.B. Flouranogold, Takizawa et al. 2015) färben. Für strukturelle und zellmorphologische Fragestellungen werden meist Kontrastierungen für Fette gewählt. Alle anderen Merkmale des Gewebes werden damit allerdings weitgehend ignoriert.

Einbettung

Hier kann es bei den Entwässerungs-Reihen zu Gewebeschrumpfungen und dem Herauslösen von (Membran-)Lipiden durch Aceton kommen.

Schneiden

Dieser Aspekt ist in Kapitel 4.2.1.1 ausführlich beschrieben – relevant für ssTEM, nicht für SBFS-EM.

Bildgebung

Dieser Aspekt ist in Kapitel 4.2.2.2 ausführlich beschrieben – in dieser Form relevant für ssTEM, nicht für SBFS-EM.

Rekonstruktion

(1) Interpolation

Beim Interpolieren während der Segmentierung in Amira® wird der Zeitaufwand der Rekonstruktion durch Zuhilfenahme einfacher Algorithmen deutlich verkleinert. Anstatt jeden einzelnen Schnitt einer Bilderserie zu markieren, wird nur jeder 2te, 3te, 5te oder 10te usw. Schnitt gelabelt (siehe Kapitel 2.4.3). Das Programm kann mit einem einfachen Tastenbefehl beauftragt werden, die nicht gelabelten Schnitte dazwischen mit den wahrscheinlichsten Labelfields zu versehen. Hierbei werden von Seiten des Programms zwei manuell markierte Labelfields mehr oder weniger geradlinig verbunden. Deswegen müssen/muss:

- a) die so berechneten Labelfields nachkontrolliert und gegebenenfalls ausgebessert werden.
- b) der Abstand für die Interpolation zwischen den einzelnen markierten Schnitten passend zum Material gewählt werden. Lange, lineare Strukturen wie Axone erlauben einen größeren Abstand. Feine, verästelte Strukturen wie feine Dendriten-Äste, benötigen geringe Abstände von 2 bis 3 Schnitten. Verhältnismäßig große Strukturen, wie zum Beispiel Zellumrisse können auch mit über 50 freien Schnitten zwischen den rahmengebenden Labels interpoliert werden.

Es sprechen hauptsächlich 2 Punkte dafür den Vorgang der Interpolation anzuwenden:

- a) die Zeitersparnis: nicht jeden Schnitt für jedes Material einzeln labeln zu müssen ist vor allem bei großen Schnittserien mit über 1000 Schnitten eine große Zeitersparnis.
- b) den Rest-„Wobble“ aus dem Bilderstapel heraus zu bekommen. Selbst auf das Sorgfältigste registrierte Schnittserien zeigen ab einer gewissen Vergrößerung einen Versatz korrespondierender Strukturen zwischen den Schnitten. Pixel die eigentlich in der Schnittserie über-

einander liegen sollten, liegen 1 bis 3 Pixel daneben (Abbildung 52). Dies fällt bei der Betrachtung des Gesamtbildes oder sogar in einer mittleren Vergrößerung nicht ins Gewicht. Im Bereich der feinen Dendriten wird es jedoch offensichtlich. Der Detailgrad auf der XY-Ebene ist dabei nicht beeinträchtigt, lediglich die Z-Achse ist betroffen. Der Grund für diesen „Wobble“ ist die große

Menge an eingebrachten Verzerrungen und Korrekturen in die Bilder. Die vielen kleinen, und für jedes Bild individuellen, Veränderungen äußern sich im minimalen Versatz der Voxel. Um dies zu korrigieren müsste man die Bilder auch auf Pixelebene elastisch registrieren, was allein von der benötigten Rechenzeit her nicht zu bewerkstelligen ist. Durch die Interpolation kann der „Wobble“ im Labelfield, dass für die folgende Rekonstruktion die einzige Grundlage ist, signifikant gedämpft werden. Die Interpolation ist so einer der letzten Schritte um die, korrektiv eingebrachten, Verzerrung des Datenstapels zu kompensieren und sich wieder den realen Zuständen anzunähern.

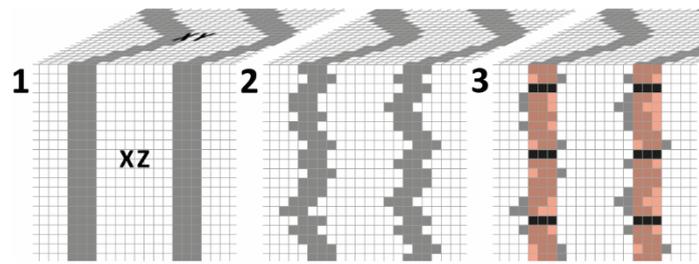


Abbildung 52: Mikro-Versätze der Bilderstapel entlang der Z-Achse und die Korrektur per Interpolation. **(1)** Zeigt den theoretischen Idealzustand und **(2)** den realen Zustand entlang der Z-Achse aufgrund minimaler Versätze der einzelnen Ebenen, dem „Wobble“. **(3)** Um diesen zu kompensieren wird jeder n-te Ebene markiert (**schwarze Kästen**) und dann interpoliert (**rote Kästen**).

Ergänzend sei erwähnt, dass die durch Interpolation entstehenden Ungenauigkeiten in der Berechnung der 3D-Modelle großteils wieder herausgerechnet werden (siehe unten „(3) Einflussnahme auf die 3D-Rekonstruktion“). Auch hier muss deswegen abgewogen werden, wieviel Vereinfachung wissenschaftlich vertretbar ist. Es bringt nichts fantastische, unglaublich detailgetreue Oberflächenmodelle zu haben, für deren Drehung im 3D-Programm der Computer eine halbe Stunde zur Berechnung braucht. Auch weil viele der vermeintlich wichtigen Details, in der makroskopischen Betrachtung, kaum Erkenntniszuwachs bringen.

(2) Personal Bias in der Rekonstruktion

Da automatisierte Segmentierungs-Programme mit den heterogenen Strukturen in elektronenmikroskopischen Bildern der Retina (noch) nicht zurechtkommen, erfolgte das Segmentieren ausschließlich von Hand. Mit der großen Anzahl von Schnitten und vielen Einzelstrukturen, die jede als eigenes Material gelabelt werden, kommt es dabei zu kalkulierten Vereinfachungen. So wird zum Beispiel für das Labeln von größeren Strukturen ein größerer „Pinsel“ verwendet. Damit geht das Segmentieren deutlich schneller, aber manches Oberflächendetail geht dabei verloren.

Zusätzlich kommt es bei der Rekonstruktion von sehr feinen Strukturen, die entweder an der Auflösungsgrenze der Bilder liegen, oder in Bereichen schwachen Kontrastes zu finden sind zu erfahrungsbasierten Annahmen. Dadurch können auch Strukturen weiterverfolgt werden, die mit automatisierten Systemen nicht verfolgbar sind. Dabei ist es sehr wichtig, die eigenen Annahmen zu hinterfragen und auch ein zweites Paar Augen hinzu zu ziehen, um sich abzusichern, dass man noch dieselbe Struktur zu verfolgt. Vor allem im Bereich der feinsten Dendriten und Synapsen ist dieser Ansatz jedoch notwendig. Auf diesem Auflösungslevel sind Schwankungen der Aufnahmequalität eher die Regel als die Ausnahme.

(3) Einflussnahme auf die 3D-Rekonstruktionen

Letztendlich ist das Ziel nicht nur 3D-Rekonstruktionen einzelner Komponenten zu betrachten, sondern zu beschreiben wie mehrere Materialien in Relation zueinander liegen und wie sie in Kontakt zueinander stehen (= Connectomics). Nun haben dreidimensionale Strukturen eine viel größere

Datenmenge als Zweidimensionale. Möchte man mehrere Modelle zusammen betrachten, und vielleicht sogar drehen und den Blickwinkel ändern, dürfen alle Modelle zusammen in ihrem Datenvolumen nicht die Rechenkapazitäten des verwendeten Computers überschreiten. Deswegen ist bei der 3D-Modell-Erstellung zum wiederholten Male eine Minimierung der Datengröße der Einzeldateien notwendig, ohne dabei zu viel an Strukturinformationen zu verlieren. Hierfür kann bei der Erstellung der 3D-Modelle an mehreren Stellen eingegriffen werden:

- a) Bevor das Modell berechnet wird, wird das Labelfield komprimiert. Hierfür werden jeweils 4 Pixel zu einem zusammengefasst. Dies geschieht meist nur mit den X-Y-Ebenen, da die Auflösung der Z-Achse in den meisten Fällen bereits größer ist als auf den anderen Raumachsen.
- b) Bei der Berechnung der Modelle werden Parameter eingestellt (Polygone-Seitenlängen, Berechnungs-Iterationen), die bestimmen wie präzise das Modell errechnet wird.
- c) Das fertige Modell besteht aus vielen einzelnen Polygonen, d.h. Dreiecken (im Fall von Amira®). Generell lässt sich sagen: je mehr Dreiecke, um so rechenaufwendiger ist es mit dem Modell zu arbeiten. Durch den hohen Detailgrad von biologischen Proben haben die Modelle immer eine hohe Polygonen-Zahl. Diese Anzahl muss reduziert werden, um mit den Modellen praktisch arbeiten zu können. Dies geschieht durch eine Reduktion der verwendeten Polygone um bis zu 90%. Die generelle Form und Eigenschaften der rekonstruierten Struktur werden dabei praktisch nicht verändert.

All diese Prozesse müssen an die abzubildenden Elemente der Probe angepasst werden. Jedes 3D-Modell wird individuell eingestellt und optimiert, mit Rücksicht auf die speziellen Anforderungen, die das bearbeitete Gewebe an die endgültige Darstellung stellt. Sollen sehr feine Details erhalten bleiben, kann es mehr Sinn machen nur den relevanten Ausschnitt zu segmentieren, um dieses Detail dann optimal in einem 3D-Modell darstellen zu können.

Der letzte Schritt vor dem fertigen Modell ist kein Bearbeitungsschritt, sondern ein Darstellungsfiler. Dieser muss nicht immer Anwendung finden und kann unter Umständen auch mehr verschleiern als helfen. Hierbei handelt es sich um den **SmoothSurface-Viewer** von Amira®. Dieses Werkzeug wird auf die bereits fertigen 3D-Modelle angewendet. Die Modelle sind, aufgrund der Darstellung mit Polygonen meistens sehr kantig und uneben. Mit dem Tool wird daraus eine glatte Oberfläche gerechnet, was die Ansichten wesentlich ansprechender machen kann.

Fazit

Die in den aufgeführten Punkten erläuterten Veränderungen der Probe beziehen sich in Relation zum ursprünglichen Zustand auf die absoluten Längen und Volumina innerhalb eines Gewebes. Bei manchen Verfahren können durch lokale, und zum Teil sehr unterschiedliche, Verzerrungen die Vergleichbarkeit von Strukturdichten innerhalb einer Probe erschwert sein. Diese eingebrachten Veränderungen, zum einen die methodisch bedingten und auf der anderen Seiten die nötigen Korrekturmaßnahmen, kommen nicht bei allen methodischen Ansätzen zum Tragen.

So fallen bei klassischen transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen alle Punkte, bei denen es um die Korrektur von eingebrachten Veränderungen geht, um eine Registrierung von Bildern zueinander zu ermöglichen, weg. Das bedeutet allerdings nicht, dass die zuvor methodisch eingebrachten Veränderungen nicht weiterhin auf die fertigen Bildern, und den daraus gewonnen Theorien, einwirken würden.

Das ssTEM-Verfahren ist das einzige Beispiel, bei dem der volle Umfang der Veränderung beachtet werden muss, um überhaupt einen verwendbaren Bilderstapel erhalten zu können. Der Großteil der diversen Arbeitsschritte basiert auf dem Bedarf der Korrektur von Stauchungen und Verzerrungen, die zuvor durch methodische Unvermeidbarkeiten eingebracht wurden.

Aber auch bei großteils automatisiertem SBFS-Ansätzen, wie FIB-FESEM (Henn et al. 2019) oder Heidelberger Hobel, bei denen einer der größten Faktoren für Stauchungen und Zerrungen der Probe beseitigt ist – das Schneiden – bleiben einige veränderungsträchtige Schritte relevant:

- Präparation
- Einbettung und Kontrastierung
- Segmentierung
- Berechnung 3D-Modelle

Und selbst die Faktoren, die durch die Optimierung der Schnitttechnik und Automatisierung des Registrierungsprozesses wegfallen, sollten mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden:

- Detektorbedingte Messverzerrungen
- Stitching der Bilder
- Landmark-Registrierung
- Individuelle elastische Registrierung
- Elastische automatisierte Registrierung

All diese Prozesse werden entweder gar nicht beachtet – innerhalb eines Scanvorgangs sind diese ja auch identisch – oder durch einen rigiden Algorithmus kompensiert. Dieser ist zwischen den verschiedenen Methodiken und Herstellern nicht identisch und wird an die individuell verwendete Hardware, und manchmal sogar an individuelle Proben angepasst. Damit sind Ergebnisse, die mit verschiedenen Gerätschaften oder unterschiedlichen Parametern erhalten werden, ähnlichen Vorbehalten unterworfen wie die der ssTEM.

Die zahlreichen Verzerrungen, Rückzerrungen, Vereinfachungen und Ungenauigkeiten – seien sie system-, personal-, zeit- oder ressourcenbedingt – beeinflussen die Vergleichbarkeit verschiedener Proben zueinander. Die Spanne der Aussagen die für Bilder, die mit elektronenmikroskopischen Verfahren gewonnen wurden, gemacht werden können ist damit begrenzt. Möglich sind:

- Aussagen über die generelle Form der rekonstruierten Strukturen
- Aussagen über die Interaktionen und Kontaktstellen von Strukturen innerhalb einer Probe
- Aussagen über die Volumina einzelner Strukturen innerhalb einer Probe und deren Verhältnisse zueinander
- Generelle beziehungsweise grobe Aussagen über die Lage und Volumina vergleichbarer Strukturen in verschiedenen Proben und deren relative Position zueinander.

Alles, was darüber hinausgeht, grenzt aufgrund der eingebrachten Veränderungen an Spekulation. Durch eine hohe Automatisierung unter identischen Parametern kann die Wiederholbarkeit der Probenbehandlung an das Identische angenähert werden. Grundsätzlich muss aber jede Bearbeitung einer Probe, die über eine optische Untersuchung eines Sachverhalts mit dem bloßen Auge hinausgeht als **verzerrte Abbildung der Realität** angenommen werden. Vor allem Proben, die mit unterschiedlichen Methoden, Geräten, Bearbeitungsprotokollen, Programmen und Programmierungen erlangt wurden, können nur unter den vier oben genannten Aspekten verglichen werden. Zu unterschiedlich sind die einflussnehmenden Faktoren auf die Verzerrungen der Proben.

Das Serial Block Face Scanning ist momentan die beste und eventuell einzige Methode – Automatisierung inklusive, um Daten in ausreichender Qualität zu erreichen. Der Schaffungsprozess und die damit einhergehenden Einflussnahmen auf die realen Zustände in der Probe sollten jedoch immer berücksichtigt werden. Trotz allem bilden die beiden kombinierten Datensätze dieser Arbeit mit den daraus rekonstruierten 3D-Modellen – mit all den angewandten Korrekturmaßnahmen – ein ziemlich gutes Abbild der Realität. Sie sind eines der besten Abbilder, die mit dem aktuellen Stand der Technik

zu erreichen sind und stellen damit einen großer Schritt hin zum Verständnis der retinalen Netzwerke des Polarisationssehens dar.

Datenmengen – was aufheben?

Bei arbeitsschrittintensiven Nachbearbeitungen wie beim ssTEM fallen einige Versionen der bearbeiteten Datenstapel an:

- Rohdaten – Einzelbilder
- Einzelbilder mit herausgerechneter Rotation
- Gestitchte Gesamtbilder
- Gesamtbilder mit geflickten Rissen
- Gesamtbilder – Landmark voraliginiert
- Gesamtbilder – elastisch registriert
- Gesamtbilder – zugeschnitten für AMIRA
- Amira®-Datenstapel (+ Labelfields)
- Surfaces (Ergebnis der 3D-Rekonstruktion)

So liegen, am Beispiel des ssTEM-Bilderstapels, am Ende des gesamten Prozesses 9 verschiedene Versionen vor. Die ursprüngliche Größe der Rohdaten war 11,5 GB, und am Ende des Prozesses lag eine Amira®-Datei mit einer Größe von 7,3 GB vor. Das ist im Vergleich zu den Bilderstapeln des Heidelberger Hobels (*SBFS 1*: 58 GB, *SBFS 2*: 49 GB und *SBFS 3*: 103 GB) noch wenig. Selbst mit der Tatsache, dass am Ende der meisten Arbeitsschritte die Datengrößen durch Zuschchnitt der Bilder verkleinert wurden, kommt die Gesamtheit der erzeugten Bildinformationen auf fast das 10-fache an benötigtem Speichervolumen (103,5 GB).

Hier zeigt sich auch ein Problem der zunehmend großen Datenmengen der 3D-EM-Methodik (siehe Tabelle „Datengrößen Imaging“, Seite 53), mit denen die (zur Zeit) zur Verfügung stehenden Bildbearbeitungs- und Rekonstruktionsprogramme (Photoshop® und Amira®) nicht zurechtkommen. Dadurch entsteht erst die Notwendigkeit, die Bilderstapel immer wieder zuzuschneiden und zu verkleinern, was zu realen Datenverlusten führt, oder zu unterteilen, um damit arbeiten zu können. Diese Zwischenschritte machen, zusammen mit dem jeweiligen Einladen und Speichern aller Bilder, einen signifikanten Teil des Zeitaufwandes beim Arbeiten mit großen 3D-EM Datensätzen aus. Es ist von etwa 5% bis 10% der insgesamt aufgewendeten Zeit auszugehen. Dazu kommt noch die Übertragung von Datensätzen zwischen verschiedenen Arbeitsstandorten. Hierbei hat sich neben dem physikalischen Weg (=Post) die Cloud-basierte Übertragung bewährt. Wobei bei Letzterem die teils sehr unterschiedlichen Online-Sicherheitsstandards der Institute zu Konflikten führen können.

Die Frage, die sich am Ende jedes Projektes stellt, ist: **was muss aufgehoben werden und was kann gelöscht werden?** Bei immer größer werdenden Rohdatensätzen und einer endlichen Speicherkapazität auf der einen Seite, und dem Anspruch der Nachverfolgbarkeit wissenschaftlicher Ergebnisse auf der anderen Seite ein wichtiger Punkt.

Vorausgesetzt man hat ein entsprechendes Speichervolumen zur Verfügung, sollten während des Projektverlaufs alle Zwischenschritte behalten werden, um bei auftretenden Problemen darauf zurückgreifen zu können und nicht alle Arbeitsschritte nochmals durchlaufen zu müssen. Das Minimale sollten die Rohdaten, inklusive eventueller Einzelbilder, und die fertig elastisch registrierten Gesamtbilder sein. Erstere, damit die gesamte Arbeit wiederholbar bleibt und letztere, um jederzeit wieder neue AMIRA-Datenstapel erstellen zu können. Zusätzlich sind beide Datensätze als Referenz für zusätzliche Details wichtig, denn beim Einladen eines Bilderstapels in Amira® wird die Auflösung automatisch heruntergerechnet, damit die Datensätze vom Programm bearbeitet werden können.

Nach Abschluss des Projektes – und wenn die Speicherkapazitäten es zulassen – ist es sinnvoll folgende Zwischenschritte / Stadien gespeichert zu lassen:

- EM Einzelbilder als Rohdaten
- Zusammengesetzte Gesamtbilder
- Fertig registrierte Gesamtbilder
- Amira®-Datenstapel plus die letzten Versionen der Labelfields
- 3D-Modelle der segmentierten Strukturen in Form von Amira® Surfaces

Ergänzend sind einige Beispiele für die durchgeführten Bearbeitungsschritte als Dokumentation der vorgenommenen Arbeitsschritte sinnvoll.

4.3 Ausblick

4.3.1 Segmentierung und Rekonstruktion

Für die Forschung am Konnektom der Retina von *E. encrasicolus* ist das nächste Ziel die Erstellung von raumerfüllenden Rekonstruktionen. Nicht nur für die äußere plexiforme Schicht mit ihrem komplexen telodentritischen Netzwerk, sondern für die gesamte Retina. Nur so können alle regelmäßigen und spezielleren (und damit selteneren) Verschaltungsereignisse identifiziert sowie dokumentiert werden. Insbesondere bei der noch (verhältnismäßig) unbekanntem Signalkaskade für das Polarisationssehen ist dies relevant. So konnten in den in der vorliegenden Arbeit angefertigten Rekonstruktionen auf Basis von 3D-EM keine interbipolaren Kontakte nachgewiesen werden. Diese siehe jedoch in der Fisch- (Haesendonck & Missotten 1983-b) und in der Sardellenretina (Koch 2011, Bipolarzelltypen B2, B7 und B9) zu finden.

Für wissenschaftlich stabile Aussagen über die Verschaltungsereignisse in der Retina braucht es zudem mehr als die Erkenntnisse von ein oder zwei Proben. Ebenso wie weitere Datenstapel zur Fovea sollten auch andere Bereiche der Retina, und die Retinae anderer Fische, in einem vergleichbaren Detailgrad untersucht werden, um Vergleichsmodelle zu erhalten. Bei den hier zu bearbeitenden Volumina (etwa $150 \times 75 \times 50 \mu\text{m}$) pro Datensatz kommt die händische Rekonstruktion der Zellen an ihre Grenzen. Für die annähernd vollständige Rekonstruktion eines Volumens von $16 \times 12 \times 10 \mu\text{m}$ mussten etwa 1500 Arbeitsstunden aufgewendet werden. Selbst mit der Annahme, dass die Rekonstruktion der Axone und Zellkörper der retinalen Neurone deutlich schneller zu bewerkstelligen ist als ein Dendritenbaum, ist eine vollständige Rekonstruktion aus zeitlichen Gründen nicht praktikabel.

Hier können (teil-)automatisierte **Segmentierungsprogramme** wie sie inzwischen für **Amira**[®] verfügbar sind (Thermo Fisher 2020) oder **Dragonfly**[™] (ehemals „ORS Visual SI“) (Eberle et al. 2015, ORS 2020) Anwendung finden, um (bestenfalls) die menschliche Arbeitszeit auf Korrekturmaßnahmen zu reduzieren (Jurrus et al. 2009). Hier kann sowohl der Ansatz der **Skelettbasierten** (Bas & Erdogmus 2011), als auch ein **Volumenbasierter** (Jain et al. 2010) Ansatz (entspricht der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Vorgehensweise) gewählt werden. Beim skelettbasierten Ansatz wird nur das Zentrum jedes Zellanschnittes markiert. Das Ergebnis ist ein Modell des „Skeletts“ der Zelle das alle Dendriten und Axone repräsentiert. Eine reine skelettale Zellmarkierung ist bis zu 50-mal schneller als eine Volumenmarkierung. Entweder kann die Skelettverfolgung automatisiert stattfinden oder händisch gemacht werden, wie beim **Knossos**-Ansatz (Helmstaedter et al. 2011) und dann die Volumen-Segmentierung (das Markieren der das Skelett umgebenden Zelle) automatisiert stattfinden wie bei **SegEM** (Berning et al. 2015).

Amira[®] und Dragonfly[™] bieten, neben anderen Programmen, inzwischen auch die Möglichkeit zu **KI-basierten Segmentierungen** (Kreshuk et al. 2011, Wickramasinghe et al. 2019) an. Hierbei werden den Programmen einige vorsegmentierte Beispiele für das zu rekonstruierende Gewebe gegeben, auf Basis derer das Programm das Segmentieren erlernt. Allerdings funktioniert dies derzeit nur an sehr dichten Neuropilen mit spezifischen Kontrastierungsparametern (Motta et al. 2019). Ein anderer Ansatz für die Erschließung von Verschaltungsereignissen ist **SynEM** (Staffler et al. 2017), ein Programm, das für die automatische Erkennung von Synapsen entwickelt wurde.

Für die Fischretina ist eine solche automatisierte Rekonstruktion für das Neuropil der inneren plexiformen Schicht denkbar. Die homogenen Zellanschnitte dieser Schicht entsprechen den Parametern, für die diese Programme entwickelt wurde, wie zum Beispiel für den Mäusekortex (Schmidt et al. 2017). Andere Bereiche der Retina sind mit aktuellen automatisierten Segmentierungs-Verfahren nicht gut erfassbar (Stand 2018), wie die innere nukleäre Schicht oder auf Höhe der Müllerbänder. Hier

könnten Skelett-Segmentierungen mit anschließender automatisierten Volumen-Segmentierung verwendet werden.

Einen komplett anderen Weg für die Rekonstruktion geht dabei **Webknossos** (Boergens et al. 2017). Hierbei handelt es sich um eine Multi-Benutzer Online-Anwendung, mit serverseitigen Rechenprozessen. Dies erlaubt viele gleichzeitige Rekonstruktionen, ohne dass auf Nutzer-Seite die, ansonsten nötigen leistungsstarken Computer vorhanden sein müssen. Die genaue Rekonstruktion der Strukturen wird durch mehrfaches Segmentieren durch mehrere unterschiedliche Nutzer gesichert.

4.3.2 Datenerfassung

Im Bereich 3D-EM-Erfassung ist eine größere Abbildungsfläche nicht nur sinnvoll, um mehr Zellen pro Probe untersuchen zu können, sondern auch um die großen Dendritenbäume von Amakrin- und Ganglienzellen komplett zu inkludieren. Eine Möglichkeit ist es, die Bildanzahl pro Scan beim Heidelberger Hobel zu erhöhen, jedoch erhöht sich damit proportional auch der Zeitaufwand für den Scan-Prozess. Auf der anderen Seite ist es mit dem klassischen ssTEM schwierig, lange verlust- und schadensfreie Serie zu erstellen. Da es im Feld der 3D-Elektronenmikroskopie in den letzten Jahren einige Entwicklungen für das *large-scale imaging* gegeben hat (Kubota et al. 2018-b), gibt es ein paar Optionen, um eine größere Abbildungsfläche umzusetzen.

3D-TEM

Das größte Problem des ssTEM, das sich in dieser Arbeit gezeigt hat, ist der Schneideprozess mit der hohen Wahrscheinlichkeit Stauchung, Schäden und Verluste zu produzieren. Ein Faktor der direkt proportional zur Schnittfläche zunimmt.

Es gibt ein paar Möglichkeiten, diesen Prozess zu optimieren. An erster Stelle sei die Verwendung eines **beheizten Diamantmessers** (Hayworth et al. 2015) oder eines **Vibratomessers** (Studer 2001) erwähnt, um die Stauchungen der Schnitte zu minimieren. Bei letzterem sind die Vorteile allerdings noch umstritten (Kubota et al. 2018-b). Eine andere Option ist die **SSET serial sectioning electron tomography** (Soto et al. 1994). Hierbei werden weniger und dafür etwas dickere Schnitte verwendet, um dieselbe Strecke abzubilden. Dabei werden mittels TEM-Tomografie auf der Basis von Kippserien virtuelle Schnitte der physikalischen Schnitte erstellt.

Das Aufbringen der Schnitte auf eine Trägeroberfläche kann mit **ATUM (automated tape-collection ultramicroscopy)** (z.B. von Boeckeler Instruments, Inc, Tucson) automatisiert werden. Die Ultradünnschnitte werden direkt nach dem Schneiden kontinuierlich auf Bändern aufgebracht (Hayworth et al. 2006). Dies sorgt für eine gleichbleibende Qualität der Schnitte und erleichtert das Handling. Praktische Erfahrungen der AG Heß zeigen hier, dass die Gefahr der irreversiblen Faltenbildung bei Schnitten noch recht hoch ist.

Um für ssTEM eine größere Abbildungsfläche ohne erhöhte Strahlenbelastung für die Schnitte zu erreichen, ist das **TEMCA (TEM camera array)** eine mögliche Lösung. Hierbei wird die gesamte ROI mit mehreren Kameras gleichzeitig abgebildet (zum Beispiel 4 Kameras mit 4 MB CCD Chips) (Bock et al. 2011). In Kombination mit einer automatisierten Proben—Stage (Bloss et al. 2018) lassen sich damit schnell große Flächen als *multi image array* abbilden. In einem kombinierten Ansatz von ATUM und TEMCA zusammen mit dem vollautomatisierten Ein- und Ausschleus-System für die Vakuumkammer **ATPS (automated transport and positioning system)** wurde das gesamte zentrale Nervensystem von *Drosophila sp.* (750 x 350 x 250 μm) mit einer Schnittdicke von 40 nm gescannt (Zheng et al. 2018). Dies ermöglichte die Verfolgung von Axonen durch das gesamte Fliegenhirn. Auch die umfangreiche Automatisierung konnte die Verlustrate von Schnitten nicht unter 3,5 % bringen, jedoch ist die Scanzeit pro Schnitt (Schnittwechsel) mit 7 Minuten beeindruckend und etwa 40-fach schneller als das konvent-

ionelle TEM-Verfahren. Eine angepasste Automatisierung vorausgesetzt hat der ssTEM-Ansatz das Potential noch viel zur Connectomics-Forschung beizutragen.

3D-SEM

Bei den SBFS-Methodiken (FIB-FESEM und Heidelberger Hobel) ist es mit *multi image arrays* möglich große Flächen abzubilden. Für beide Fälle ist das automatisierte Stitching inzwischen sehr stabil (Lichtmann & Helmstaedter 2014). Allerdings sind beide Systeme bauartbedingt in ihrer maximalen Aufnahmefläche begrenzt. Beim Heidelberger Hobel ist das Maximum 450 x 450 μm (Schmidt et al. 2017) und beim FIB-FESEM etwa 100 x 100 μm . Letztere konnte unter großem technischen Aufwand weiter vergrößert werden, allerdings nicht komplett ohne Gewebe-Verluste (Hayworth et al. 2015). Zudem kann es beim FIB-FESEM mit zunehmend langen Serien dazu kommen, dass der Ionenstrahl instabil wird, was zu Schnittfehlern führen kann (Kubota et al. 2018-b). Das begrenzt die mögliche Schnittzahl. Auf der anderen Seite ist die dünne Schnittdicke des FIB-FESEM mit (unter optimalen Bedingungen) 2 nm (Luckner & Wanner 2018) und die ansonsten schwer zu erlangende hochgradige 3D-Registrierung der SBFS-Methodik konkurrenzlos.

Das Problem, dass mehr Einzelbilder automatisch mehr Scanzeit, Arbeitsaufwand und Kosten sowie Probenbelastung bedeuten, könnte mit **MultiSEM** umgangen werden. Dieses sehr schnelle linseninterne Detektorsystem (Carl Zeiss GmbH) ermöglicht, mit seinen 61 parallel Strahlen, die Aufnahme einer hexagonalen Fläche mit einer Größe von 108 x 94 μm (Eberle et al. 2015). Allerdings ist die Pixelgröße und der Kontrast schlechter als beim normalen SEM, da bei MultiSEM nur die Sekundärelektronen detektiert werden. In Kombination mit ATUM (**ATUM-SEM**) ist es jedoch um 200-fach schneller als ein Einzelstrahl-SEM (Kubota et al. 2018-a). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige SBFS-Systeme, die mit MultiSEM ausgestattet ist.

Das größte Hindernis für die Nutzung all diese Methodiken ist derzeit noch die Verfügbarkeit und der Zugang zu etablierten und stabil laufenden Systemen. Hier bieten FIB-FESEM und Heidelberger Hobel im Moment noch die meisten Möglichkeiten. Jedoch lässt die rasche und stete Entwicklung der für die Connectomics-Forschung so zentralen Technik des Serial Block Face Scanning und der automatisierten und KI-gestützten Rekonstruktionen für die Zukunft der Connectomics an der Sardellenretina Großes hoffen. Auf diesem Weg bildet diese Arbeit einen weiteren wichtigen Schritt.

EINLEITUNG 1

MATERIAL
UND 2
METHODEN

ERGEBNISSE 3

DISKUSSION 4

LITERATUR 5

Literaturverzeichnis

A

Abbott L, Bock D, Callaway E & Denk W (2020)

The Mind of the Mouse.

Cell, **182(6)**, S. 1372-1376. doi:10.1016/j.cell.2020.08.010

Ahnelt P, Kolb H & Pflug R (1987)

Identification of a subtype of cone photoreceptor, likely to be blue sensitive, in the human retina

J Comp Neurol, **255(1)**, S. 18-34. doi:10.1002/cne.902550103

Ali M & Anctil M (1968)

Corrélation entre la structure rétinienne et l'habitat chez *Stizostedion vitreum vitreum* et *S. canadense*.

J Fish Res Board Can, **25**, S. 2001-2003.

Ali M & Ryder RA (1977)

Photoreceptors and visual pigments as related to behavioral responses and preferred habitats of Perches (*Perca spp.*) and Pikeperches (*Stizostedion spp.*)

J Fish Res Board Can, **34(10)**, S. 1475-1480. doi:10.1139/f77-212

Ali M, Anctil M & Mohideen H (1968)

Structure rétinienne et la vascularisation intraoculaire chez quelques poissons marins de la région de Gaspé.

Can J Zool, **46(4)**. doi:10.1139/z68-101

Amthor F, Takahashi E & Oyster C (1989)

Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields.

J Comp Neurol, **280**, S. 97-121.

Anderson D & Fisher S (1976)

The Photoreceptors of diurnal squirrels, outer segment structure, disc shedding, and protein renewal.

J Ultrastruct, **55**, S. 119-141.

Anderson J, Jones B, Yang J, Shaw M & Watt C (2009)

A Computational Framework for Ultrastructural Mapping of Neural Circuitry.

PLOS Biology, **7(3)**. doi:10.1371/journal.pbio.1000074

Archer S (1995)

Molecular biology of visual pigments.

In M. Djamgoz, S. Archer, & S. Vallerga, Neurobiology and clinical aspects of the outer retina (S. 79-104). London: Chapman & Hall

B

Bas E & Erdogmus D (2011)

Principal Curves as Skeletons of Tubular Objects.

Neuroinformatics, **9(2-3)**, S. 181-191. doi:10.1007/s12021-011-9105-2

- Behar-Cohen F, Omri S, Omri B, Savoldelli M, Jonet L, ... Crisanti-Lassiaz P (2010)**
The Outer Limiting Membrane: An Under Estimated Barrier.
Invest Ophthalmol Vis Sci, **51**(3801)
- Behrens C, Schubert T, Haverkamp S, Euler, T & Berens, P (2016)**
Connectivity Map of bipolar Cells and photoreceptors in the mouse retina
eLife **5**(e20041). doi:10.7554/eLife.e20041
- Berning M, Boergens K & Helmstaedter M (2015)**
SegEM: Efficient Image Analysis for High-Resolution Connectomics.
Neuron, **87**(6), S. 1193-1206. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.003
- Binohlan C (2020)**
FishBase - *Engraulis encrasicolus*. (FishBase)
Abgerufen am 04.11.2020 von <https://www.fishbase.se/summary/Engraulis-encrasicolus.html>
- Blazquez-Llorca L, Hummel E, Zimmerman H, Zou C, ... Rietdorf JH (2015)**
Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy.
J Microsc, **259**(2), S. 129-136. doi:10.1111/jmi.12231
- Bloss E, Cembrowskui M, Karsh S, Colonell J, Fetter R & Spruston N (2018)**
Single excitatory axons form clustered synapses onto CA1 pyramidal cell dendrites.
Nat Neurosci, **21**, S. 353-363. doi:10.1038/s41593-018-0084-6
- Bock D, Lee W, Kerlin A, Andermann M, Hood G, Wetzel A, ... Reid R (2011)**
Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons.
Nature, **471**, S. 177-182. doi:10.1038/nature09802
- Boergens K & Denk . (2013)**
Controlling FIB-SBEM slice thickness by monitoring the transmitted ion beam.
J Microsc, **252**(3). doi:10.1111/jmi.12086
- Boergens K, Berning M, Bocklisch T, Bräunlein D, ... Helmstaedter M (2017)**
WebKnossos: efficient online 3D data annotation for connectomics.
Nat Methods, **14**(7). doi:10.1038/nmeth.4331
- Boergens K, Kapfer C, Helmstaedter M & Denk W (2018)**
Full reconstruction of large lobula plate tangential cells in *Drosophila* form a 3D EM dataset.
PLoS One, **13**(11) e0207828. doi:10.1371/journal.pone.0207828
- Bowmaker J (1983)**
How colour is perceived: the visual pigments of human cones.
Trans Ophthalmol Soc U K, **4**, S. 373-379.
- Boycott B & Wässle H (1991)**
Morphological classification of bipolar cells of the primate retina.
Eur J Neurosci, **3**(11), S. 1069-1088. doi:10.1111/j.1460-9568.1991.tb00043.x
- Briggmann KL & Denk W (2011)**
Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina.
Nature, **417**(7337), S. 183-198. doi:10.1038/nature09818

Briggmann KL & Bock DD (2012)

Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction

Curr Opin Neurobiol, **22(11)**, S. 154-161. doi: 10.1016/j.conb.2011.10.022

C**Capitani G, Oleynikov P, Hovmöller S & Mellini M (2006)**

A practical method to detect and correct for lense distortion in the TEM.

Ultramicrosc, **106(2)**, S. 66-74. doi:10.1016/j.ultramic.2005.06.003

Cardona A, Saalfeld S, Preibisch S, Schmid B, Cheng A, ... Hartenstein V (2010)

An Integrated Micro- and Macroarchitectural Analysis of the *Drosophila* Brain by Computer-Assisted Serial Section Electron Microscopy.

PLoS Biol, **8 (10)(e1000502)**. doi:10.1371/journal.pbio.1000502

Chatterjee S & Callaway E (2003)

Parallel colour-opponent pathways to primary visual cortex.

Nature, **426(6967)**, S. 668-671. doi:10.1038/nature02167

Collin S & Pettigrew J (1988b-a)

Retinal topography in reef teleosts: I. Some species with well-developed areae but poorly-developed streaks.

Brain Behav Evol, **31(5)**, S. 269-282. doi:10.1159/000116594

Collin S & Pettigrew J (1988-b)

Retinal topography in reef teleosts: II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areae.

Brain Behav Evol, **31(5)**, S. 283-295. doi:10.1159/000116595

Collins B & MacNichol E (1979)

Triple cones found in retinas of 3 fish species.

Specialia, **35(1)**, S. 106-108. doi:10.1007/BF01917906

D**Davitz M & McKaye K (1978)**

Discrimination between horizontally and vertically polarised light by the cichlid fish

Pseudotropheus macropthalmus.

Copeia, **2**, S. 333-334.

Denk W & Horstmann H (2004)

Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure.

PLoS Biol, **2(11)**, S. 1900-1909. doi:10.1371/journal.pbio.0020329

Denk W, Briggmann KL, Helmstaedter M (2012)

Structural neurobiology: missing link to a mechanistic understanding of neural computation.

Nat Rev Neurosci, **13 (5)**, S. 351-358. doi: 0.1038/nrn3169

Denton E & Land M (1971)

Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods.
Proc Biol Sci, 175(1050), S. 43-61. doi:10.1098/rspb.1971.0051

Denton E & Nicol JAC (1965)

Studies on reflexion of light from silvery surfaces of fishes, with special reference to the bleak, *Alburnus alburnus*.
J Mar Biol Ass U K, 45(4), S. 683-703. doi:10.1017/S0025315400016520

Domun N, Hadavinia H, Zhang T, Sainsbury T, Liaghat GH, Vahid S (2015)

Improving the fracture toughness and the strength of epoxy using nanomaterials – a review of the current status
Nanoscale 7 (23), S. 10294-10329 doi: 10.1039/C5NR01354B

Doroquez D, Berciu C, Anderson J, Sengupta P & Nicastro D (2014)

A high-resolution morphological and ultrastructural map of anterior sensory cilia and glia in *Caenorhabditis elegans*.
elife(e01948). doi:10.7554/eLife.01948

Doughty M, Bergmanson J & Blocker Y (1997)

Shrinkage and distortion of the rabbit corneal endothelial cell mosaic caused by a high osmolality glutaraldehyde-formaldehyde fixative compared to glutaraldehyde.
Tissue and Cell, 29(5), S. 533-547. doi:10.1016/S0040-8166(97)80054-7

Dowling J & Boycott B (1966)

Organization of the primate retina: electron microscopy.
Proc Biol Sci, 166(1002), S. 80-111. doi:10.1098/rspb.1966.0086

Drobne D, Milani M, Leser V & Tatti, F (2007)

Surface damage induced by FIB milling and imaging of biological samples is controllable.
Microsc Res Tech, 70(10), S. 895-903. doi:10.1002/jemt.20494

E**Eberle A, Mikula S, Schalek R, Lichtmann J, Knothe Tate M & Zeidler D (2015)**

High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope.
J Microsc, 259, S. 114-120. doi:10.1111/jmi.12224

Engström K (1960)

Cone Types and Cone Arrangement in the Retina of Some Cyprinids.
Acta Zool, 41(3), S. 277-295. doi:10.1111/j.1463-6395.1960.tb00481.x

Engström K & Ahlbert I (1963)

Cone types and cone arrangement in the retina of some flatfishes.
Acta Zool, 44(1-2), S. 119-129. doi:10.1111/j.1463-6395.1963.tb00404.x

F

Fineran B & Nicol JAC (1976)

Novel cones in the retina of the anchovy (anchoa).

J Ultra Res, 54, S. 296-303.

Fineran B & Nicol JAC (1977)

Studies of the eyes of the anchovies *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulididae) with particular reference to the pigment epithelium.

Phil Trans R Soc B, 276(947), S. 321-350. doi:10.1098/rstb.1977.0002

Fineran B & Nicol JAC (1978)

Studies on the photoreceptors of *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones.

Phil Trans R Soc B, 283(994), S. 25-60. doi:10.1098/rstb.1978.0017

Frisch K (1949)

Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzchen der Bienen.

Experientia, 5, S. 142-148. doi:10.1007/BF02174424

G

Gnauck P, Hoffrogge P & Greiser J (2002)

New crossbeam inspection tool combining an ultrahigh-resolution field emission SEM and a high-resolution FIB.

Proc. SPIE 4689. 2002.

Goebel R, Muckli L & Kim D (2012)

Chapter 37 - Visual System.

In Academic Press The Human Nervous System (3 Ausg., S. 1301-1327). Elsevier.
doi:10.1016/B978-0-12-374236-0.10037-9

Gouras P (1968)

Identification of cone mechanisms in monkey ganglion cells.

J Physiol, 199(3), S. 533-547. doi:10.1113/jphysiol.1968.sp008667

Grubb DT (1974)

Radiation damage and electron microscopy of organic polymers

J Mat Sci, 9, S. 1715-1736

Guérin C, Kremer A, Borghgraef P, Sidh A & Lippens S (2019)

Chapter 5 - Combining serial block face and focused ion beam scanning electron microscopy for 3D studies of rare events.

Meth Cell Biol, 152, S. 87-101. doi:10.1016/bs.mcb.2019.03.014

H

Haesendonck E & Missotten L (1979)

Synaptic contacts of the horizontal cells in the retina of the marine teleost, *Callionymus lyra* L.

J Comp Neurol, 184(1), S. 167-192. doi:10.1002/cne.901840110

Haesendonck E & Missotten L (1983-a)

Stratification and square pattern arrangements in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L.

J Ultrast Res, 83, S. 296-302.

Haesendonck E & Missotten L (1983-b)

Interbipolar contacts in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L.

J Ultrast Res, 83, S. 303-311.

Haesendonck E & Missotten L (1984)

Synaptic contacts between bipolar and photoreceptor cells in the retina of *Callionymus lyra* L.

J Comp Neurol, 223(2), S. 387-399. doi:10.1002/cne.902230305

Haesendonck E & Missotten L (1987)

Displaced small amacrine cells in the retina of the marine teleost *Callionymus lyra* L.

Vision Res, 27(9), S. 1431-1443. doi:10.1016/0042-6989(87)90153-2

Hagmann PC, Gigandet X, Gerhard S, Grant P, Wedeen V ... Sporns O (2005)

MR connectomics: Principles and challenges.

J Neurosci Meth, 194(1), S. 34-45. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.01.014

Harris K, Perry E, Bourne J, Feinberg M, Ostroff L & Hurlburt J (2006)

Uniform Serial Sectioning for Transmission Electron Microscopy.

J Neurosci, 26(47), S. 12101-12103. doi:10.1523/JNEUROSCI.3994-06.2006

Hartline H (1938)

The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina.

Am J Physiol, 121, S. 400-415.

Hawrysyhn CA (1992)

Polarisation Vision in Fish.

Am Sci, 80, S. 164-175.

Hawrysyhn CA, Bowering E & Cole R (1990)

Spatial orientation of rainbow trout to plane-polarized light: the ontogeny of e-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics.

J Comp Physiol A, 166(4), S. 565-574. doi:10.1007/BF00192027

Hawrysyhn CA & McFarland W (1987)

Cone photoreceptor mechanisms and the detection of polarized light.

J Comp Physiol A, 160(4), S. 459-465. doi:10.1007/BF00615079

Hayworth K, Morgan J, Schalek R & Lichtmann J (2006)

Automating the collection of ultrathin serial sections for large volume TEM reconstructions.

Microsc Microanat, 13, S. 86-87. doi:10.1017/s1431927606066268

Hayworth K, Xu C, Lu Z, Knott G, Fetter R, Tapia J ... Hess H (2015)

Ultrastructurally-smooth thick partitioning and volume stitching for larger-scale connectomics.

Nat Methods, 12(4), S. 319-322. doi:10.1101/563239

Helmstaedter M (2017)

Konnektomik mit zellulärer Präzision.

Neuroforum, 22(3), S. 70-72. doi:10.1007/s12269-016-0049-1

Helmstaedter M, Briggmann K & Denk W (2011)

High-accuracy neurite reconstruction for high-throughput neuroanatomy.

Nat Neurosci, 14(8), S. 1081-1088. doi:10.1038/nn.2868

Helmstaedter M, Briggmann K & Denk W (2009)

3D structural imaging of the brain with photons and electrons.

Curr Opin Neurobiol, 18(6), S. 633-614. doi:10.1016/j.conb.2009.03.005

Henkind P, Hansen R & Szalay J (1979)

Ocular circulation.

In Physiology of the human eye and visual system (*Records, R.E. Ausg.*, S. 98-155).

New York: Harper & Row.

Henn I, Atkins A, Markus A, Shpun G, Barad H, Farah N & Mandel Y (2019)

SEM/FIB Imaging for Studying Neural Interfaces.

Devel Neurol (22707). doi:10.1002/dneu.22707

Heß M (2000)

Vergleichende feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulididae) und den Retinae anderer Clupeiformes.

München: Dissertation

Heß M (2009)

Triple cones in the retinae of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchovia macrolepidota* (Engraulididae, Teleostei).

Vision Res, 12, S. 1569-1582. doi:10.1016/j.visres.2009.03.016

Heß M, Melzer RR & Smola U (2002)

The Pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulididae, Clupeiformes).

J Submicrosc Cytol Pathol, 34(4), S. 335-365.

Heß M, Melzer RR & Smola U (2006)

The Structure of Anchovy Outer Retinae (Engraulididae, Clupeiformes) - A comparative Light- and Electron-Microscopic Study Using Museum-Stored Material

J Morphol, 261(11), S. 1356-1380. doi:10.1002/jmor.10482

Hoppe W (1981)

Three-Dimensional Electron Microscopy.

Ann Rev Biophys Bioeng, 10, S. 563-592. doi:10.1146/annurev.bb.10.060181.003023

Horváth G & Varjú D (1995)

Underwater refraction-polarization patterns of skylight perceived by aquatic animals through Snell's window of the flat water surface.

Vis Res, 35(12), S. 1651-1666. doi:10.1016/0042-6989(94)00254-J

Horváth G & Varjú D (2004)

Polarized light in animal vision.

Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-1-4614-7320-6_334-4

J**Jain V, Seung H & Turaga S (2010)**

Machines that learn to segment images: a crucial technology for connectomics.

Curr Opin Neurobiol, 20(5), S. 653-666. doi:10.1016/j.conb.2010.07.004

Jerlov N (1968)

Optical Oceanography

(Bd. 5). Amsterdam: Elsevier.

Jésior J (1986)

How to avoid compression. II. The influence of sectioning conditions.

J Ultrast Mol Struct Res, 95, S. 210-217. doi:10.1016/0889-1605(86)90042-x

Johnsen S (2012)

Polarization

In *The Optics of Life: A Biologist's Guide to Light in Nature* (S. 205-236). Princeton: Princeton University Press. doi:10.5860/choice.49-5660

Jurrus E, Hardy M, Tasdizen T, Fletcher T, Koshevoy P ... Whitaker R (2009)

Axon tracking in serial block-face scanning electron microscopy.

Med Image Anal, 13(1), S. 180-188. doi:10.1016/j.media.2008.05.002

K**Kalko S, Chagoyen M, Jiménez-Lozano N, Verdaguer N, Fita I & Carazo J (2000)**

The need for shared database infrastructure: combining X-ray crystallography and electron microscopy.

Eur Biophys, 29(6), S. 457-462. doi:10.1007/s002490000089

Kamermans M & Hawryshyn CA (2011)

Teleost polarization vision: how it works and what it might be good for.

Phil Trans R Soc B, 366(1565), S. 742-756. doi:10.1098/rstb.2010.0211

Kamermans M, Kraaij D & Spekrijse H (1998)

The cone/horizontal cell network: A possible site for color constancy.

Vis Neurosci, 15(5), S. 787-797. doi:10.1017/S0952523898154172

Kaneko A (1970)

Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina.

J Physiol, 207(3), S. 623-633. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009084

Kawaguchi Y, Karube F & Kubota Y (2006)

Dendritic Branch Typing and Spine Expression Patterns in Cortical Nonpyramidal Cells.

Cer Cor, 16(5), S. 696-711. doi:10.1093/cercor/bhj015

Kirschfeld K (2019)

Do Müller cells act as optical fibers in the primate retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci, 60(1), S. 345-348. doi:10.1167/iovs.18-25831

Kleinfeld D, Bharioke A, Blinder P, Bock D, Briggmann K ... Sakmann B (2011)

Large-Scale Automated Histology in the Pursuit of Connectomes.

J Neurosci, 31(45), S. 16125-16138. doi:10.1523/JNEUROSCI.4077-11.2011

Knott G, Marchman H, Wall D & Lich B (2008)

Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling.

J Neurosci, 28(12), S. 2959-2964. doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008

Knott G, Rosset S & Cantoni M (2011)

Focussed Ion Beam Milling and Scanning Electron Microscopy of Brain Tissue.

J Vis Exp, 6(53), S. e2588. doi:10.3791/2588

Koch P (2011)

Neuroanatomie der Sardellenretina - Ein Beitrag zum Verständnis des Polarisationssehens bei Wirbeltieren.

München: Dissertation

Koch P & Heß M (2011)

Topographic Mapping of Retinal Neurons in the European Anchovy by Nuclear Staining and Immunohistochemistry.

J Neurosci Res, 89(8), S. 1316-1330. doi:10.1002/jnr.22651

Koch P, Seebacher C & Heß M (2010)

3D topography of cell nuclei in a vertebrate retina - A confocal and two-photon microscopic study.

J Neurosci Meth, 188(1), S. 127-140. doi:10.1016/J.neumeth.2010.01.030

Kolb H (1970)

Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of golgi-impregnated cells.

Phil Trans R Soc Lond B, 258(823), S. 261-283. doi:10.1098/rstb.1970.0036

Kolb H (1979)

The inner plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations.

J Neurocytol, 8(3), S. 295-329. doi:10.1007/BF01236124

Kolb H, Lindberg K & Fisher S (1992)

The neurons of the human retina: a Golgi study.
J Comp Neurol, **318**, S. 147-187.

Kondrashev S, Gnyubkina V & Zueva L (2012)

Structure and spectral sensitivity of photoreceptors of two anchovy species:
Engraulis japonicus and *Engraulis encrasicolus*.
Vision Res, **68**, S. 19-27. doi:10.1016/j.visres.2012.07.005

Kornfeld J (2017)

Connectomic Analyses in the Zebra Finch Brain.
Heidelberg: Dissertation

Kraft T & Burkhardt D (1986)

Telodendrites of cone photoreceptors: structure and probable function.
J Comp Neurol, **249(1)**, S. 13-27. doi:10.1002/cne.902490103

Kramer R & Davenport M (2015)

Lateral Inhibition in the Vertebrate Retina: The Case of the Missing Neurotransmitter.
PLoS Biology, **13(12)**, S. e1002322. doi:10.1371/journal.pbio.100232

Kreshuk A, Straehle C, Sommer C, Koethe U, Cantoni M ... Hamprecht F (2011)

Automated detection and segmentation of synaptic contacts in nearly isotropic serial
electron microscopy images.
PLoS One, **6(e24899)**. doi:10.1371/journal.pone.0024899

Kubota Y (2016)

New developments in electron microscopy for serial image acquisition of neuronal
profiles.
Microscopy, **64(1)**, S. 27-36. doi:10.1093/jmicro/dfu111

Kubota Y, Sohn J, Hatada S, Schurr M, Straehle J, Gour A ... Kawaguchi Y (2018-a)

A carbon nanotube tape for serial-section electron microscopy of brain
ultrastructure.
Nature Communications, **9 (Article 437)**. doi:10.1038/s41467-017-02768-7

Kubota Y, Sohn J & Kawaguchi Y (2018-b)

Large Volume Electron Microscopy and Neural Microcircuit Analysis.
Front Neural Circuits, **12(Article 98)**. doi:10.3389/fncir.2018.00098

L

Lagnado L (2003)

Ribbon Synapses.
Curr Biol, **13(16)**, S. PR631. doi:10.1016/S0960-9822(03)00566-9

Lamvik M (1991)

Radiation damage in dry and frozen hydrated organic material.
J Microsc, **161(1)**, S. 171-181. doi:10.1111/j.1365-2818.1991.tb03081.x

Land M (1991)

Polarizing the world of fish.

Nature, **353**(6340), S. 118-119. doi:10.1038/353118d0

Lebedev D & Marshak D (2007)

Amacrine cell contributions to red-green color opponency in central primate retina: a model study.

Vis Neurosci, **24**(4), S. 535-547. doi:10.1017/S0952523807070502

Lee W, Bonin V, Reed M, Graham B, Hood G, Glattfelder K & Reid R (2016)

Anatomy and function of an excitatory network in the visual cortex.

Nature, **532**, S. 370-374. doi:10.1038/nature17192

Lehmann T, Heß M, Wanner G & Melzer RR (2014)

Dissecting a neuron network: FIB-SEM-based 3D-reconstruction of the visual neuropils in the sea spider *Achelia langi* (Dohrn, 1881) (Pycnogonida).

BMC Biol, **12**(59). doi:10.1186/s12915-014-00

Leighton S (1981)

SEM images of block faces, cut by a miniature microtome within the SEM - a technical note.

Scan Electron Microsc(2), S. 73-76.

Li J, Liu Z, Du C & Li X (2020)

Revealing bioinorganic interface in microbiologically influenced corrosion with FIB-SEM/TEM.

Corr Sci, **173**(108763). doi:10.1016/j.corsci.2020.108763

Lichtman J & Helmstaedter M (2014)

Connectomics at the cutting edge: Challenges and opportunities in high-resolution brain mapping.

Science, **349**(6209), S. 651-651. doi:10.1126/science.346.6209.651-c

Lindemann A (2018)

Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie.

(S. Kühn, Hrsg.) Stuttgart: Eugen Ulmer KG. doi:978-3-8385-4864-7 (E-Book)

Loukashkin A & Grant N (1965)

Behavior and natural reactions of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard, under the influence of light of different wavelengths and intensities and total darkness.

Proc Cal Acad Sci, **31**(24), S. 631-692

Luckner M & Wanner G (2018)

Precise and economic FIB/SEM for CLEM: with 2 nm voxels through mitosis.

Histochem Cell Biol, **150**(2), S. 149-170. doi:10.1007/s00418-018-1681-x

Luckner M, Burgold S, Filser S, Scheungrab M, Niyaz Y ... Herms J (2018)

Label-free 3D-CLEM Using Endogenous Tissue Landmarks.

iScience, **6**, S. 92-101. doi:10.1016/j.isci.2018.07.012

Lyall A (1957)

Cone arrangements in teleost retina.

Q J Microsc Sci, **98**, S. 189-201.

M**Marchiafava P (1985)**

Cell Coupling in Double Cones of the Fish Retina.

Proc Roy Soc Lon B Biol, **226(1243)**, S. 211-215. doi:10.1098/rspb.1985.0091

Mariani A (1990)

Amacrine cells of the rhesus monkey retina.

J Comp Neurol, **301**, S. 382-400.

Mishchenko Y (2009)

Automation of 3D reconstruction of neural tissue from large volume of conventional serial section transmission electron micrographs.

J Neurosci Meth, **176(2)**, S. 276-289. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.09.006

Montero-Crespo M, Dominguez-Alvaro M ... Blazquez-Llorca L (2020)

Three-dimensional synaptic organization of the human hippocampal CA1 field.

eLife, **9(e57013)**. doi:10.7554/eLife.57013

Motta A, Schurr M, Staffler B & Helmstaedter M (2019)

Big data in nanoscale connectomics, and the greed for training labels.

Curr Opin Neurobiol, **55**, S. 180-187. doi:10.1016/j.conb.2019.03.012

Müller H (1952)

Bau und Wachstum der Netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*).

Zool Jahrb Abt f Zool Physiol, **63**, S. 275-322.

N**Nelson R (1977)**

Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat.

J Comp Neurol, **172(1)**, S. 109-135. doi:10.1002/cne.901720106

Nelson R, Lynn T, Dickinson-Nelson A & Kolb H (1985)

Spectral mechanisms in cat horizontal cells.

In A. Gallego, & P. Gouras, Neurocircuitry of the retina: a Cajal memorial (**Bd. 172**, S. 109-136).

Newman E (1988)

Electrophysiology of Retinal Glia Cells (Chapter 7).

Progress in Retinal Research, **8**, S. 153-171. doi:10.1016/0278-4327(88)90024-7

Nguyen H, Thai T, Wu B, Saitoh Y, Shimo S, Fujitani H ... Ohno N (2016)

Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging.

Sci Rep, **6(23721)**. doi:10.1038/srep23721

Nicol J, Arnott H & Best A (2011)

Tapeta lucida in bony fishes (Actinopterygii): A survey.
Can J Zool, 51(1), S. 69-81. doi:10.1139/z73-012

Noel N & Allison W (2018)

Connectivity of cone photoreceptor telodendria in the zebrafish retina.
J Comp Neurol, 526(4), S. 609-625. doi:10.1002/cne.24354

Novalles-Flamarique I & Hawryshyn CA (1997)

Is the use of underwater polarized light by fish restricted to crepuscular time periods?
Vision Res, 37(8), S. 975-989. doi:10.1016/S0042-6989(96)00236-2

Novalles-Flamarique I & Hawryshyn CA (1998)

Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization sensitivities of clupeid fishes.
J Comp Physiol A, 182(6), S. 793-803. doi:10.1007/s003590050224

O**O'Connell C (1963)**

The Structure of the Eye of *Sardinops caerulea*, *Engraulis mordax* and Four other Pelagic Marine Teleosts.
J Morphol, 113(2), S. 287-329. doi:10.1002/jmor.1051130214

Ohkubo T, Sepehri-Amin H, Sasaki T & Hono K (2014)

Multi-scale characterization by FIB-SEM/TEM/3DAP.
Microsc, 63(suppl_1), S. i6-i7. doi:10.1093/jmicro/dfu046

Ohtsuka T & Kawamata K (1990)

Telodendrial contact of HRP-filled photoreceptors in the turtle retina: pathways of photoreceptor coupling.
J Comp Neurol, 292(4), S. 599-613. doi:10.1002/cne.902920409

ORS (2020)

Dragonfly from ORS. (Object Research Systems)
 Abgerufen am 21. 12 2020 von <https://www.theobjects.com/dragonfly/>

P**Polyak S (1941)**

The retina.
 Chicago: University of Chicago Press.

Preibisch S, Saalfeld S & Tomancak P (2009)

Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions.
Bioinformatics, 25(11), S. 1463-1465. doi:10.1093/bioinformatics/btp184

R

Raviola E & Gilula N (1975)

Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits.

J Cell Biol, **65(1)**, S. 192-222. doi:10.1083/jcb.65.1.192

Reckel F, Melzer RR & Smola U (2001)

Outer retinal fine structure of the garfish *Belone belone* (L.) (Belonidae, Teleostei) during light and dark adaption - photoreceptors, cone patterns and densities.

Acta Zool, **82(2)**, S. 89-108. doi:10.1046/j.1463-6395.2001.00071.x

Remington L (2012-a)

Chapter 1 - Visual System.

In L. Remington, D. Goodwin, & Butterworth-Heinemann (Hrsg.), Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (**3 Ausg.**, S. 1-9). St. Louis: Elsevier.

doi:10.1016/B978-1-4377-1926-0.10001-3

Remington L (2012-b)

Chapter 4 - Retina.

In L. Remington, D. Goodwin, & Butterworth-Heinemann (Hrsg.), Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (**3 Ausg.**, S. 61-92). St. Louis: Elsevier.

doi:10.1016/B978-1-4377-1926-0.10004-9

Remington L (2012-c)

Chapter 13 - Visual Pathways.

In L. Remington, D. Goodwin, & Butterworth-Heinemann (Hrsg.), Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (**3 Ausg.**, S. 233-252). St. Louis: Elsevier.

doi:10.1016/B978-1-4377-1926-0.10013-X

Richardson K, Jarett L & Finke E (1960)

Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy.

Stain Tech, **35**, S. 313-323.

Ruthensteiner B (2008)

Soft part 3D visualization by serial sectioning and computer reconstruction.

Zoosymposia, **1**, S. 63-100.

Ruthensteiner B & Heß M (2008)

Embedding 3D Models of Biological Specimens in PDF Publications.

Micros Res Tech, **71(11)**, S. 778-786. doi:10.1002/jemt.20618

S

Santuy A, Rodriguez J, DeFelipe J & Merchan-Perez A (2018)

Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex.

Brain Struct Funct, **1**, S. 77-90. doi:10.1007/s00429-017-1470-7

- Scheffer L, Xu C, Januszewski M, Lu Z, Takemura S ... Maitlin-Shepard J (2020)**
A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain.
eLife, 9(e57443). doi:10.7554/eLife.57443
- Scheungrab M (2012)**
Histologie und 3D-Mikroanatomie des Gehirns von *Sardina pilchardus* (Clupeiformes, Teleostei).
München: Diplomarbeit
- Schmidt F, Kühbacher M, Gross U, Kyriakopoulos A, Schubert H & Zehbe R (2011)**
From 2D slices to 3D volumes: image based reconstruction and morphological characterization of hippocampal cells on charged and uncharged surfaces using FIB/SEM serial sectioning.
Ultramicrosc, 111(4), S. 259-266. doi:10.1016/j.ultramic.2010.12.017.
- Schmidt H, Gour A, Straehle J, Boergens K, Brecht M & Helmstaedter M (2017)**
Axonal synapse sorting in medial entorhinal cortex.
Nature, 549(7673), S. 469-475. doi:10.1038/nature24005
- Schneeweis D & Schnapf J (1995)**
Photovoltage of rods and cones in the macaque retina.
Science, 268(5213), S. 1053-1056. doi:10.1126/science.7754386
- Scholes J (1975)**
Colour receptors and their synaptic connections, in the retina of a cyprinid fish.
Phil Trans R Soc Lon B, 270(902), S. 61-118. doi:10.1098/rstb.1975.0004
- Shkolnik-Yarros E & Podugolnikova T (1978)**
Bipolar cells of the frog retina: A Golgi study.
Vision Res, 18(3), S. 301-310. doi:10.1016/0042-6989(78)90164-5
- Sieber M (2018)**
Das Gehirn der Europäischen Sardelle (*Engraulis encrasicolus*): 3D-Anatomie, Histologie und Aspekte der Larvenentwicklung.
München: Dissertation
- Sjöstrand F (1958)**
Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections.
J Ultra Res, 2(1), S. 122-170. doi:10.1016/S0022-5320(58)90050-9
- Smirnakis S, Berry M, Warland D, Bialek W & Meister M (1997)**
Adaption of retinal processing to image contrast and spatial scale.
Nature, 386(6620), S. 69-73. doi:10.1038/386069a0
- Soto G, Young S, Martone M, Deerinck T, Lamont S ... Ellisman M (1994)**
Serial Section Electron Tomography: A Method for Three-Dimensional Reconstruction of Large Structures.
NeuroImage, 1(3), S. 230-243. doi:10.1006/nimg.1994.1008

Staffler B, Berning M, Boergens K & Gour A (2017)

SynEM, automated synapse detection for connectomics.
eLife Sciences, e26414. doi:10.7554/eLife.26414

Stell W (1967)

The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina.
Dev Dynam, 121(2), S. 401-424. doi:10.1002/aja1001210213

Stell W (1975)

Horizontal cell axons and axon terminals in goldfish retina.
J Comp Neurol, 159(4), S. 503-520. doi:10.1002/cne.901590405

Stell W & Lightfoot D (1975)

Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish.
J Comp Neurol, 159(4), S. 473-502. doi:10.1002/cne.901590404

Stell W Kretz R & Lightfoot D (1982)

Horizontal cell connectivity in goldfish.
Prog Clin Biol Res, 1a3, S. 51-75.

Stevens J, Davis T, Friedman N & Sterling P (1980)

A systematic approach to reconstructing microcircuitry by electron microscopy of serial sections.
Brain Res, 2(3), S. 265-293. doi:10.1016/0165-0173(80)90010-7.

Studer G (2001)

Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife.
J Microsc, 197(1), S. 94-100. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00638.x

T

Takizawa T, Powell R, Hainfeld J & Robinson J (2015)

FluoroNanogold: an important probe for correlative microscopy.
J Chem Biol, 8(4), S. 129-142. doi:10.1007/s12154-015-0145-1

ThermoFisher (2020)

Amira von ThermoFisher Scientific.
Abgerufen am 21. 12 2020 von
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/electron-microscopy/electron-microscopy-instruments-workflow-solutions/3d-visualization-analysis-software/amira-life-sciences-biomedical.html>

Tomita T (1959)

Study on electrical activities in the retina with penetrating microelectrodes.
Proc XXI Int Cong Physiol (Symposium and Special Lectures), S. 245-248.

Tomita T (1986)

Retrospective review of retinal circuitry.
Vis Res, 26(9), S. 1339-1350. doi:10.1016/0042-6989(86)90161-6

Tsang T, Bushong E, Boassa D, Hu J, Romoli B, Phan S ... Su CE (2018)

High-quality ultrastructural preservation.
eLife, 7(e35524). doi:10.7554/eLife.35524

Tschulakow A, Oltrup T, Bende T, Schmelze S & Schraermeyer U (2018)

The anatomy of the foveola reinvestigated.
PeerJ, 6(e4482). doi:10.7717/peerj.4482

W

Wagner H (1976)

The connectivity of cones and cone horizontal cells in a mosaic-type teleost retina.
Cell Tissue Res, 175(1), S. 85-100. doi:10.1007/BF00220825

Ware R & Lopresti V (1975)

Three-Dimensional Reconstruction from Serial Sections.
Int Rev Cytol, 40, S. 325-440. doi:10.1016/S0074-7696(08)60956-0

Wässle H & Boycott B (1991)

Functional Architecture of the Mammalian Retina.
Physiol Rev, 71(2), S. 447-480. doi:10.1152/physrev.1991.71.2.447

Wässle H, Peichl L & Boycott B (1981)

Morphology and topography of on- and off-alpha cells in the cat retina.
Proc R Soc Lond B Biol, 212, S. 157-175.

Waterman T (1954)

Polarization patterns in submarine illumination.
Science, 120(3127), S. 927-932. doi:10.1126/science.120.3127.927

Whitehead P, Nelson G & Wongratana T (1988)

Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei) An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2 - Engraulididae.
FAO Species Catalogue, 7(2), S. 305-579.

Wickramasinghe U, Knott G & Fua P (2019)

VM-Net: Mesh Modelling to Assist Segmentation in Volumetric Data.
ArXiv, S. abs/1912.03681.

Wijaya A, Eichinger B, Rosc J, Sartory B, Mischitz M & Brunner R (2017)

3D Microanalysis of Porous Copper Using FIB-Tomography in Combination with X-ray Computed Tomography.
Microsc Microanal, 23(S1), S. 254-255. doi:10.1017/S1431927617001957

Witkovsky P & Stell W (1973)

Retinal structure in the smooth dogfish *Mustelus canis*, electron microscopy of serially sectioned bipolar cell synaptic terminals.
J Comp Neurol, 150(2), S. 147-168. doi:10.1002/cne.901500204

X

Xu C, Pang S, Hayworth K & Hess H (2019)

Enabling FIB-SEM Systems for Large Volume Connectomics and Cell Biology.

bioRxiv. doi:10.1101/852863

Z

Zandbergen H (1997)

Electron Microscopy Techniques.

In D. Dorset, S. Hovmöller, & X. Zou, Electron Crystallography. *NATO ASI Series (Series E: Applied Sciences) (S. 41-54)*. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-015-8971-0_4

Zhang J, Petralia R, Wan Y & Diamond J (2016)

High-Resolution Quantitative Immunogold Analyses of Membrane Receptors at Retinal Ribbon Synapses.

J Vis Exp, 108(e53547). doi:10.3791/53547

Zheng Z, Lauritzen J, Perlmann E, Robinson C, Nichols M, Milkie D ... Bock D (2018)

A Complete Electron Microscopy Volume of the Brain of Adult *Drosophila Melanogaster*.

Cell, 174(3), S. 730-743.e22. doi:10.1016/j.cell.2018.06.019

Zueva L (1982)

Retinal cones of the Black Sea anchovy *Engraulis encrasicolus*--an analyzer of polarized light in vertebrates.

J Evol Biochem Physiol, 17, S. 420-425.

Zueva L & Govardovskii V (1991)

Photoreceptors and visual pigments in the retina of the Black Sea anchovy, *Engraulis encrasicolus*.

J Evol Biochem Physiol, 27, S. 384-389.

Danksagung

First and foremost **Prof. Dr. Martin Heß** für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit. Aber vor allem für die hervorragenden fachlichen Ratschläge sowie seine uneingeschränkte, und hochanstrengende, Faszination für die Biologie im Allgemeinen und der Fischretina im Speziellen.

Prof. Dr. Gerhard Haszprunar danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Logistik sowie das Dulden der vielen Fischköpfe in seinen Schneckenlaboren.

Danke auch an **Heidemarie Gensler**, ohne deren Erfahrung und Geduld die ssTEM-Serie so nicht möglich gewesen wäre. Ohne ihre unermüdliche und umfangreiche technische und emotionale Unterstützung wäre meine Zeit in der AG um einiges ärmer gewesen.

Ich danke meinen Kooperationspartner. **Prof. Dr. Gerhard Wanner** (LMU) für die Erstellung der FIB-FESEM-Serien, **Dr. Kevin Boergens** und **Anjali Gour** (MPI für Hirnforschung, Frankfurt) für die Einführung in und die zahlreichen Nachtschichten bei der Erstellung der Heidelberger Hobel-Serien sowie **Prof Dr. Moritz Helmstaedter** für die den Zugang zu seinen Geräten. **Prof Dr. Yoshiyuki Kubota** (NIPS, Okazaki) für den spontanen und (japanisch) herzlichen Empfang in Nagoya, sowie **Dr. Mohamed Alsayed** für die Testscans.

Ein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Steiger-Gebhardt**, deren eine Unterrichtsstunde über das menschliche Gehirn meinen Weg in den Naturwissenschaften angestoßen hat.

Danken muss ich auch den restlichen Mitglieder des **Haszi-Labs**. Kathi, Timea, Franzi, Katja und Stacy für die angenehme und lehrreiche Bürogemeinschaft und Andi für die langen Abende innerhalb und außerhalb des Universitätsgebäudes. Sowie Marc für seine Unterstützung in allen Sardellen-Belangen.

Sophie und **Eva** danke ich für das jagen meiner Rechtschreibfehler, das Aufspüren von Kommata und das Erlegen meiner Schlangensätze.

Meine Eltern danke ich für deren stete Unterstützung meiner wissenschaftlichen Ambition, auch wenn manchmal nicht ganz klar war was ich genau mache.

Mein größter Danke geht an **Susanne**, dafür dass sie immer an mich geglaubt hat.

Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

München, den 16.07.2021

Maximilian Willy Scheungrab

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

München, den 16.07.2021

Maximilian Willy Scheungrab

ANHANG

Tabellen

Jahr	Autor	Art	Methode(n)	Titel
1938	McEwan	<i>Engraulis encrasicolus</i>	LM, Chemie	A comparison of the retina of mormyrids with that of various other teleosts.
1958	Munz	<i>Anchoa compressa</i>	Spektroskopie	The photosensitive pigments of fishes from relatively turbid coastal waters.
1959	Loukashkin, A; Grant, N	<i>Sardinops caerulea</i>	Verhalten	Behavior and reactions of the pacific sardine, <i>Sardinops caerulea</i> (girard), under the influence of white and colored lights and darkness
1960	Borisov & Protasov	<i>E. encrasicolus</i>	Verhalten	Some aspects of light perception in fish and selective light sources.
1960	Protasov et al.	<i>E. encrasicolus</i>	Verhalten LM	Morphological and functional features of the transition from day vision to twilight vision in some Black Sea fish.
1963	O'Connell	<i>E. mordax</i> , <i>A. compressa</i> , <i>S. caerulea</i>	LM, Chemie	The structure of the eye of <i>Sardinops caerulea</i> , <i>Engraulis mordax</i> , and four other pelagic marine teleosts.
1965	Loukashkin & Grant	<i>E. mordax</i>	Verhalten	Behaviour and natural reactions of the northern anchovy, <i>Engraulis mordax</i> Girard, under the influence of light of different wavelengths and intensities and total darkness.
1972	Ali & Heumann	<i>A. compressa</i>	Spektren	Distribution of vitamins A1 and A2 in the retinas of some marine fishes from the Gulf of California II.
1973	Nicol et al.	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i>	TEM, Chemie	Tapeta lucida in bony fishes (Actinopterygii): a survey.
1973	Zyznar & Nicol	<i>A. mitchilli</i>	Spektren, Chemie	Reflecting materials in the eyes of three teleosts.
1975	Podugolnikova, TA; Maksimov, VV	<i>Clupeonella delicata</i> , <i>Clupeonella grimmi</i> , <i>Clupeonella engrauliformes</i> , <i>C. harengus</i> , <i>Alosa caspia</i>	LM	Morphological types of bipolar cells identified by regular grids of their axonal expansions in the inner plexiform layer of the herring retina
1976	Fineran & Nicol	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i>	TEM	Novel cones in the retina of the anchovy (<i>Anchoa</i>).
1977	Fineran & Nicol	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i>	TEM, Spektren	Studies on the eyes of anchovies <i>Anchoa mitchilli</i> and <i>A. hepsetus</i> (Engraulidae) with particular reference to the pigment epithelium.
1978	Fineran & Nicol	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i>	TEM	Studies on the photoreceptors of anchovies <i>Anchoa mitchilli</i> and <i>A. hepsetus</i> (Engraulidae) with particular reference to the cones.
1980	Zueva	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i>	TEM	Retinal cones of the black sea anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> – an analyser of polarized light in vertebrates.
1982	Hunter, JR; Dorr, H	<i>E. mordax</i>	Verhalten	Thresholds for filter feeding in northern anchovy, <i>Engraulis mordax</i>
1991	Zueva & Govardovskii	<i>E. encrasicolus</i>	LM, EM, Spektroskopie	Photoreceptors and visual pigments in the retina of the Black Sea anchovy, <i>Engraulis encrasicolus</i> .
1998	Heß et al.	<i>E. encrasicolus</i>	LM, Kartierung	Density map and patterns of cone photoreceptors in the retina of the European anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae, Clupeiformes).
1998	Novales Flamarique & Hawryshyn	<i>E. mordax</i>	TEM, Elektro- physiologie	Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization-sensitivities of clupeid fishes.
2000	Heß	11 Arten der Clupeoidei	LM, TEM, SEM	Vergleichende feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae) und den Retinae anderer Clupeiformes.

2001	Awaiwanont et al.	<i>E. japonicus</i>	TEM, SEM, Chemie	Grouped, stacked rods and tapeta lucida in the retina of Japanese anchovy <i>Engraulis japonicus</i> .
2001	Haacke et al.	<i>C. nasus</i>	LM, TEM	Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy <i>Coilia nasus</i> (Engraulidae, Clupeiformes).
2002	Novales Flamarique & Harosi	<i>A. mitchilli</i>	Mikrospektrophotometrie	Visual pigments and dichroism of anchovy cones: A model system for polarization detection.
2002	Heß et al.	<i>E. encrasicolus</i>	TEM, DiI	The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae, Clupeiformes).
2006	Heß et al.	16 Arten der Clupeoidei	LM, TEM	The structure of anchovy outer retinae (Engraulidae, Clupeiformes) – a comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material.
2007	Heß	<i>E. encrasicolus</i>	CLSM, Kartierung	Semi-automated mapping of cell nuclei in 3D-stacks from optical-sectioning microscopy.
2009	Heß	<i>Anchovia macrolepidota</i> , <i>C. mysticetus</i> , <i>E. encrasicolus</i>	LM, TEM, SEM	Triple cones in the retinae of three anchovy species: <i>Engraulis encrasicolus</i> , <i>Centengraulis mysticetus</i> and <i>Anchovia macrolepidota</i> (Engraulidae, Teleostei).
2010	Koch et al.	<i>E. encrasicolus</i>	CSLM, Kartierung	3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – a confocal and two-photon microscopic study.
2011	Koch & Heß	<i>E. encrasicolus</i>	ICH, CLSM, Kartierung	Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry.
2011	Novales Flamarique	<i>E. mordax</i>	ICH, TEM	Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination.
2011	Kondrashev et al.	<i>E. encrasicolus</i> , <i>E. japonicus</i>	TEM, Mikrospektrophotometrie	Retinal specialization for polarization and colour vision in two species of anchovies (Engraulidae, Clupeiformes).
2012	Kondrashev et al.	<i>E. japonicus</i> , <i>E. encrasicolus</i>	LM, Mikrospektrometrie,	Structure and spectral sensitivity of photoreceptors of two anchovy species: <i>Engraulis japonicus</i> and <i>Engraulis encrasicolus</i>
2013	Kondrashev et al.	<i>E. japonicus</i> , <i>E. encrasicolus</i>	Chromatographie, Mikrospektrometrie	Three cone opsin genes determine the properties of the visual spectra in the Japanese anchovy, <i>Engraulis japonicus</i> (Engraulidae, Teleostei)

Tabelle "Historie der Forschung an der clupeiformen Retina"

Reihenfolge	Grid #	Schnitt #	ROT	1713		Kommentar	Schnittgruppen	Elastische Registrierung ROT Grated Grid	Stitch	Riss	Umgedreht	Alignieren Landmarks	
				Anzahl Einzelbilder								Referenz	Plus
1	A1	1	-15	13				x	x	x	x		
2	A1	2	-30	14				x	x		x		
3	A1	3	-45	12				x	x	x			
4	A2	1	0	14				x	x	x	x		
5	A3	1	0	12				x	x	x	x		
6	A3	2	0	14				x	x	x	x		
7	A4	1	0	14				x	x	x	x		
8	A4	2	0	13				x	x	x	x		
9	A5	1	0	12	NE - Sehr dünn			x	x	x			
10	A5	2	0	12				x	x	x	x		
11	B1	1	0	14				x	x	x	x		
12	B1	2	0	13				x	x		x		
13	B2	1	0	12				x	x	x	x		
14	B3	1	-30	14				x	x	x			
15	B4	3	45	12				x	x	x	x		
16	B4	2	45	12				x	x	x			
17	B4	1	45	12				x	x	x	x		
18	B5	1	30	12				x	x	x	x		
19	C1	1	-15	13	NE			x	x	x			
20	C2	1	0	12				x	x	x			
21	C2	2	0	12				x	x				
22	C3	1	0	12	NE			x	x	x			
23	C4	1	15	12				x	x	x			
24	C5	1	15	12				x	x	x			
25	C5	2	15	12				x	x				
26	C5	3	0	12	Danach 1 Verlust			x	x	x	x		
27	-	-	0	-	D1-1			-	x	x	x		
28	D1	1	-15	14				x	x	x	x	auf 030	plus 032
29	D5	1	60	13	NE			x	x	x	x	auf 031	
30	D4	1	30	12				x	x	x	x	auf 031	
31	D4	2	60	13				x	x		x	auf 032	
32	D3	1	15	13				x	x	x	x	auf 034	plus 033
33	D3	2	15	0	D3-1 Auf Grid-Rand			-	x	x	x	auf 034	
34	D2	1	0	12				x	x	x		auf 035	
35	E1	1	0	12	NE - Halber Schnitt			x	x			auf 036	
36	E1	2	-15	12	Halber Schnitt			x	x	x		auf 037	
37	E1	3	-15	13				x	x			auf 038	
38	E3	1	15	12				x	x			auf 041	
39	E2	0	15	0	E3-1 Auf Grid-Rand			-	x			auf 041	
40	E2	0	15	0	E3-4 Auf Grid-Rand			-	x	x		auf 041	
41	E3	4	15	12				x	x	x		auf 043	
42	E3	5	15	12	E3-4			x	x	x		auf 043	
43	E3	6	15	12				x	x	x		auf 044	
44	E3	7	15	12				x	x	x		auf 045	
45	E3	8	15	12				x	x	x		auf 046	
46	E3	9	15	12				x	x	x		auf 047	
47	E3	10	15	12				x	x	x		auf 048	
48	E4	1	-15	14	NE			x	x		x	auf 049	
49	E4	2	-15	14				x	x		x	auf 050	
50	E4	3	-15	14				x	x		x	auf 051	

Reihenfolge	Grid #	Schnitt #	ROT	1713		Kommentar	Schnittgruppen	Elastische Registrierung ROT Grated Grid	Stitch	Riss	Umgedreht	Alignieren Landmarks	
				Anzahl Einzelbilder								Referenz	Plus
51	E4	4	-15	14				X	X	X	X	auf 052	
52	E4	5	-15	14				X	X		X	auf 053	
53	E5	1	30	12				X	X			auf 054	
54	E5	2	30	12				X	X			auf 055	
55	E5	3	30	12				X	X	X		auf 056	
56	E5	4	30	12				X	X			auf 057	
57	F1	1	0	13				X	X		X	auf 058	
58	F1	2	0	12				X	X		X	auf 059	
59	F1	3	0	14				X	X	X	X	auf 060	
60	F2	1	30	14				X	X		X	auf 061	
61	F3	1	-15	14				X	X	X	X	auf 063	
62	F3	2	-15	14				X	X	X	X	auf 064	
63	F4	1	15	12	NE			X	X	X		auf 064	
64	F4	2	15	12				X	X	X		auf 065	
65	F4	3	15	12				X	X	X		REFERENZBILD	
66	F4	4	15	12				X	X	X		auf 065	
67	F4	5	15	12				X	X	X		auf 066	
68	F4	6	15	12				X	X	X		auf 067	
69	F4	7	15	12				X	X	X		auf 068	
70	F4	8	15	12				X	X		X	auf 069	
71	F4	9	15	12				X	X	X	X	auf 069	
72	F4	10	15	14				X	X			auf 069	
73	F4	11	15	12				X	X	X		auf 072	
74	F5	1	-45	13				X	X	X	X	auf 073	
75	F5	2	45	12				X	X	X		auf 073	
76	F5	3	45	12				X	X	X		auf 075	
77	G1	1	0	12				X	X	X		auf 076	
78	G2	2	-30	14				X	X			auf 077	
79	G2	1	0	12				X	X	X		auf 077	
80	G3	1	-30	15				X	X	X		auf 079	
81	G4	1	30	13	NE			X	X	X	X	auf 080	
82	G5	2	0	14				X	X	X	X	auf 081	
83	H1	1	0	12				X	X		X	auf 081	
84	H1	2	0	13				X	X	X	X	auf 083	
85	G5	1	15	12				X	X	X		auf 083	
86	H2	1	0	12				X	X			auf 085	
87	H3	1	15	12	NE			X	X	X		auf 086	
88	H3	2	15	12				X	X			auf 086	
89	H4	1	15	12				X	X	X	X	auf 088	
90	H5	1	-30	15				X	X		X	auf 089	
91	J1	5	-30	14	NE			X	X	X	X	auf 090	
92	J1	6	-15	14				X	X		X	auf 091	
93	J1	1	-45	13				X	X	X		auf 092	plus 090
94	J1	2	30	12				X	X	X		auf 093	
95	J1	3	15	14				X	X	X		auf 094	
96	J1	4	30	12				X	X			auf 095	
97	J2	1	45	13				X	X		X	auf 096	
98	J4	1	15	12	NE			X	X		X	auf 097	
99	J4	2	15	12				X	X	X	X	auf 098	
100	J3	4	15	12				X	X			auf 099	

Reihenfolge	Grid #	Schnitt #	ROT	1713	Kommentar	Schnittgruppen	Elastische Registrierung ROT Grated Grid	Stitch	Riss	Umgedreht	Alignieren Landmarks	
				Anzahl Einzelbilder							Referenz	Plus
101	J3	5	15	15			x	x	x	x	auf 099	
102	J3	6	15	13			x	x			auf 101	
103	J3	7	15	13			x	x			auf 102	
104	J3	8	15	12			x	x			auf 103	
105	J3	1	15	12			x	x			auf 104	
106	J5	1	0	12	NE		x	x			auf 105	
107	K1	1	15	12			x	x			auf 105	
108	K2	1	-30	13			x	x	x		auf 107	
109	K3	1	45	12			x	x	x		auf 108	
110	K3	2	-30	15			x	x	x	x	auf 109	
111	K4	1	-15	14			x	x	x	x	auf 110	
112	K4	2	-45	12			x	x			auf 111	
113	K4	3	0	12			x	x		x	auf 112	
114	K5	1	0	12			x	x			auf 113	
115	L1	1	0	12			x	x	x		auf 114	
116	L2	1	-30	14	NE		x	x		x	auf 115	
117	L2	2	-15	13			x	x			auf 115	
118	L2	3	-15	13			x	x	x		auf 117	
119	L2	4	0	12			x	x		x	auf 118	
120	L2	5	30	12			x	x	x		auf 119	
121	L2	6	0	12			x	x			auf 120	
122	L2	7	0	12			x	x			auf 121	
123	L2	8	0	0	L2-7 Auf Grid-Rand		x	x			auf 121	
124	L3	1	15	12			x	x		x	auf 121	plus 122
125	L3	2	15	12			x	x		x	auf 124	
126	L4	1	0	12			x	x		x	auf 125	
127	L5	1	0	12			x	x			auf 126	
128	L5	2	0	12			x	x	x	x	auf 127	
129	M1	1	-15	14			x	x			auf 128	
130	M1	2	-15	14			x	x	x	x	auf 129	plus 128
131	M1	3	15	13			x	x		x	auf 130	
132	M2	1	-30	14			x	x			auf 131	
133	M2	2	30	12			x	x		x	auf 131	
134	M2	3	30	12			x	x		x	auf 133	
135	M2	4	-45	12			x	x		x	auf 134	
136	M2	5	-15	14			x	x	x		auf 135	
137	M2	6	0	14			x	x	x		auf 136	
138	M2	7	30	12			x	x		x		
139	M2	8	45	12			x	x	x			
140	M2	9	-30	15			x	x	x			

Tabelle "Schnittserie ssTEM". Übersicht aller Schnitte die im ssTEM-Verfahren entstanden sind. Angeben ist die Schnittreihenfolge, das Grid, die Position auf dem Grid, die Rotation des TEM bei der Aufnahme und die Schnittgruppe (Schnitte die in einer Session geschnitten wurden). Welche Bilder gespiegelt werden mussten („Umgedreht“) und welche Risse enthalten („Riss“). Außerdem ist das Referenzbild jedes Bildes bei der Landmark-Registrierung aufgeführt („Referenz“). Die am Ende für die Rekonstruktion verwendeten 100 Schnitte sind (gelb) markiert und das zentrale Referenzbild (grün).

Bezeichnung Art	SS13 03 A5			SS M02		
	<i>Engraulis encrasicolus</i>			<i>Engraulis encrasicolus</i>		
	Beginn	Ende	Dauer (h)	Beginn	Ende	Dauer (h)
Glutaraldehyd Cacodylatpuffer 0,1 M	Fixierung Transportpuffer			Fixierung Transportpuffer		
OsO₄ 1% in Cacodylatpuffer 0,1 M				11.11.2013 10:45	11.11.2013 13:00	1,25
OsO₄ 1% + K[Fe(CN)₆]₂ 1,5%	11.11.2013 10:30	11.11.2013 12:35	2,5	11.11.2013 13:00	11.11.2013 14:25	1,5
Cacodylatpuffer 0,1 M 2x waschen	11.11.2013 12:35	11.11.2013 12:50	0,25			
Thiocarbohydrazid 1% (50°C)	11.11.2013 12:50	11.11.2013 14:00	1			
Cacodylatpuffer 0,1 M 3x waschen	11.11.2013 14:00	11.11.2013 14:25	1,5			
OsO₄ 2%	11.11.2013 14:25	11.11.2013 15:25	1			
Cacodylatpuffer 0,1 M 3x waschen	11.11.2013 15:25	11.11.2013 15:40	0,25			
Cacodylatpuffer 0,1 M waschen/lagern				11.11.2013 14:25	11.11.2013 15:35	1
Uranylacetat 1%	11.11.2013 15:40	12.11.2013 9:40	18	11.11.2013 15:35	12.11.2013 9:40	18
H₂O dd 3x waschen/lagern	12.11.2013 9:40	12.11.2013 10:35	1	12.11.2013 9:40	12.11.2013 17:45	8
Pb(NO₃)₂ + Asparaginacetat	12.11.2013 10:35	12.11.2013 20:40	10			
H₂O dd 3x waschen	12.11.2013 20:40	12.11.2013 21:00	0,25			
Aceton 30%	12.11.2013 21:00	13.11.2013 9:30	12,5	12.11.2013 17:45	13.11.2013 9:30	16
Aceton 50%	13.11.2013 9:30	13.11.2013 10:00	0,5	13.11.2013 9:30	13.11.2013 10:00	0,5
Aceton 70%	13.11.2013 10:00	13.11.2013 11:00	1	13.11.2013 10:00	13.11.2013 11:00	1
Aceton 90%	13.11.2013 11:00	13.11.2013 11:30	0,5	13.11.2013 11:00	13.11.2013 11:30	0,5
Aceton 96%	13.11.2013 11:30	13.11.2013 12:00	0,5	13.11.2013 11:30	13.11.2013 12:00	0,5
Aceton 99%	13.11.2013 12:00	13.11.2013 12:30	0,5	13.11.2013 12:00	13.11.2013 12:30	0,5
Aceton 100% 3x 15 min/lagern	13.11.2013 12:30	14.11.2013 11:20	23			
Aceton 100% 4x 15 min/lagern				13.11.2013 12:30	14.11.2013 11:20	23
Aceton 100% + Epon (A:B = 3:4) 1:1	14.11.2013 11:20	14.11.2013 14:20	3	14.11.2013 11:20	14.11.2013 14:20	3
Epon (A:B = 3:4)	14.11.2013 14:20	15.11.2013 14:00	24	14.11.2013 14:20	15.11.2013 14:00	24
Aushärten bei 60 °C	15.11.2013 14:00	18.11.2013 10:00	68	15.11.2013 14:00	18.11.2013 10:00	68

Tabelle "Einbettungsprotokolle". Beispiel einer Standard-Einbettung (Probe SS M02) und einem OTO-Staining (Probe SS13 03 A5).

SS M02 I-I	FIB 703	FIB-FESEM	SS13 03 A5	FIB 1085_18	FIB-FESEM	SS13 03 A5	FIB 1085_19	FIB-FESEM
Einzelbilder	1332	#	Einzelbilder	409	#	Einzelbilder	1457	#
	12000 x	Magn.		12000 x	Magn.		12000 x	Magn.
	2048 x 1536	px		4350 x 2750	px		4350 x 2750	px
	4,02	GB		4,56	GB		16,2	GB
Voxelsize	8 x 8 x 8	nm	Voxelsize	8 x 8 x 8	nm	Voxelsize	8 x 8 x 8	nm
VOI	16 x 12 x 10	µm	VOI	33,3 x 20,4 x 3,27	µm	VOI	33,3 x 20,4 x 11,6	µm

SS M02 I-I	ssTEM	SS13 03 A5	SBFS 01	Heidelberger Hobel	
Einzelbilder	1713	#	Einzelbilder	24095	#
	5000 x	Magn.		12000 x	Magn.
	3840 x 2492	px		2048 x 1768	px
	15,6	GB		81,6	GB
MIA	100 (140)	#	MIA	1003	#
raw	10000 x 17000	px	raw	7168 x 14336	px
	15,6	GB		69,9	GB
cut	5500 x 13500	px	cut	4915 x 12716	px
	6,9	GB		58,4	GB
Voxelsize	9,8 x 9,8 x 80	nm	Voxelsize	12,28 x 12,28 x 30	nm
VOI	53,9 x 132,2 x 8	µm	VOI	60,4 x 156,2 x 30,1	µm

SS13 03 A5	SBFS 02-1	Heidelberger Hobel	SS13 03 A5	SBFS 02-2	Heidelberger Hobel	SS13 03 A5	SBFS 03	Heidelberger Hobel
Einzelbilder	1954 (336 - 2289)	#	Einzelbilder	14993 (2290 - 17282)	#	Einzelbilder	30720	#
	12000 x	Magn.		12000 x	Magn.		12000 x	Magn.
	2048 x 1768	px		2048 x 1768	px		2048 x 1768	px
	6,62	GB		50,8	GB		104	GB
MIA	93	#	MIA	714	#	MIA	1280	#
raw	7168 x 13312	px	raw	7168 x 13312	px	raw	7168 x 14336	px
	4,37	GB		43,8	GB		88,3	GB
cut	6532 x 12022	px	cut	6532 x 11267	px	cut	6278 x 13792	px
	6,8	GB		48,9	GB		103	GB
Voxelsize	11,24 x 11,24 x 30	nm	Voxelsize	11,24 x 11,24 x 32	nm	Voxelsize	11,24 x 11,24 x 32	nm
VOI	73,4 x 135 x 2,8	µm	VOI	73,4 x 126,6 x 22,8	µm	VOI	70,6 x 155,0 x 41,0	µm

Tabelle "Die Bilderstapel: Auflösungen, Dateigrößen, Voxelsize" Daten der dem Ergebnisteil zugrundeliegenden Bilderstapel. In der ersten Zeile ist die Probenbezeichnungen (zum Beispiel „SS M02 I-I“), der jeweilige Scanvorgang (zum Beispiel „FIB 703“) und das Verfahren („FIB-FESEM“, „ssTEM“, „Heidelberger Hobel“) angegeben. **VOI** = Volume of Interest = Scanvolumen, **MIA** = Multi Image Array (2-dimensional), **raw** = Rohdaten direkt nach der Aufnahme, **cut** = zugeschnittene und Kontrastoptimierte Bilder.

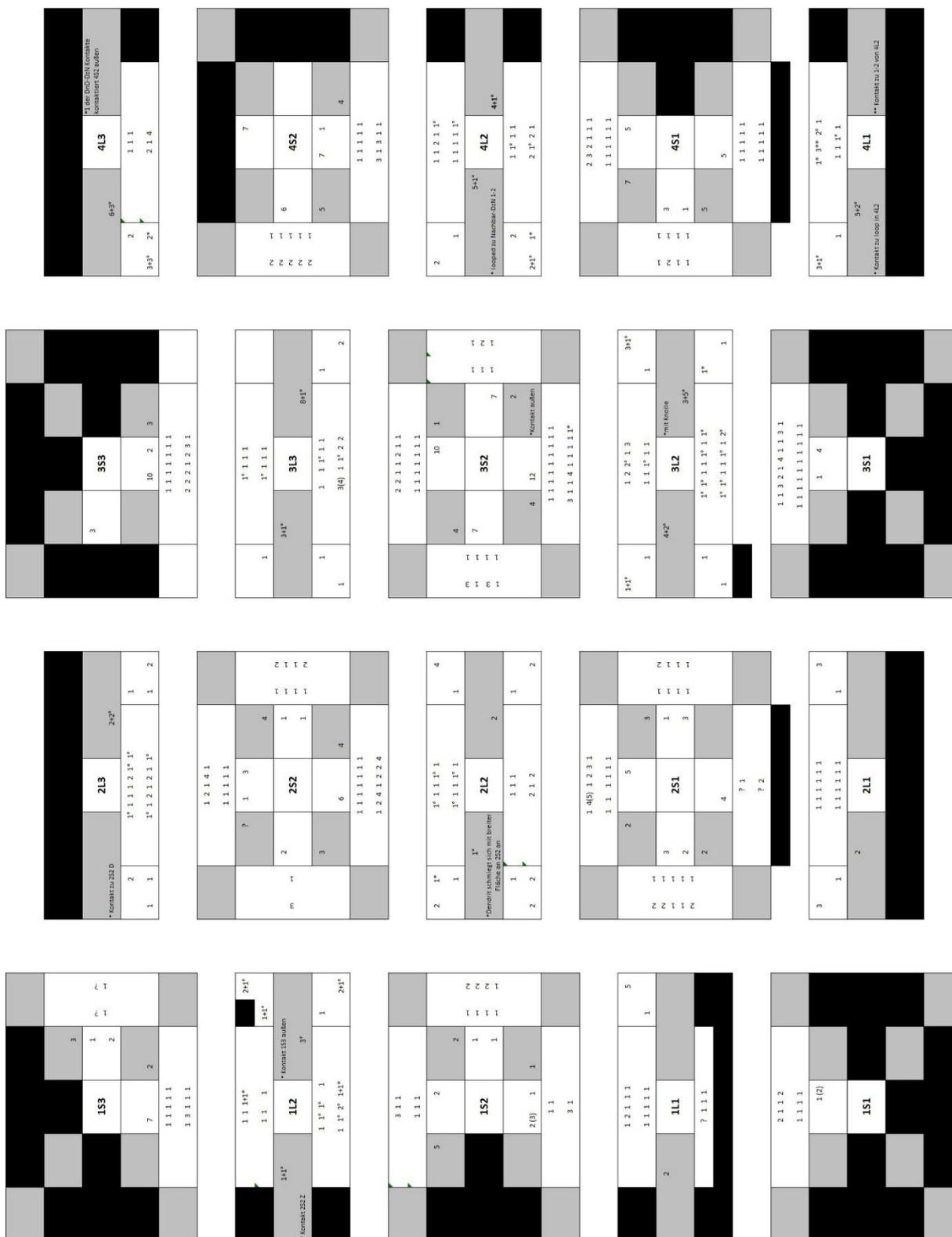


Tabelle "Dendriten der Terminalen im Interterminalen Netzwerk" Aufstellung aller Kontakte der Zapfen-Terminals von „FIB 703“ (Basis für Abbildung 40). **Graue gefüllte Kästen** zeigen Bereiche in den es keine Dendriten gibt. **Schwarz gefüllte Kästen** zeigen Bereiche an, die ganz oder teilweise außerhalb des beobachteten Volumens liegen. Der innere Ringe bei den kurzen Zapfen (**S**) beschreibt die Dendriten die nicht zum interterminalen Netzwerk gehören. Es wird hier zwischen großen und kleinen Dendriten unterschieden. Dabei sind in Richtung des Uhrzeigersinn immer zuerst die Zahl der großen, dann die Zahl der kleinen Dendriten angegeben. Bei den langen Zapfen (**L**) sind diese mit (*) markiert. Wenn es innerhalb eines Kastens eine innere und eine äußere Reihe gibt, so beschreibt die innere Reihe wie viele Telodendriten von der Terminalen ausgehen und die äußere Reihe, zu wie vielen Unterästen sich diese Dendriten verzweigen. Auffällige Ausnahmen in Form oder Kontaktmustern sind mit (*) gekennzeichnet (siehe 1L2).

Erstellung von dreidimensionalen Papier-Modellen

Vielfachzapfenterminalen

Auf Basis der in Kapitel 2.4.4 erstellten Grafiken wurde zuerst eine kurzzapfige Terminale und eines langzapfige Terminale in Adobe Illustrator[®] aus einfachen Kästen erstellt. Der Maßstab wurde so gewählt, dass 1 μm etwa 15 mm entspricht. Die so erstellten Vektorgrafiken wurden in .svg-Format umgewandelt und mit einem Silhouette[®] Cameo 4 2D-Schneideplotter aus 200g/m² Aquarellpapier ausgeschnitten. Die Modellteile wurden entsprechend der modellierten Falzlinien in Form gefaltet und mit Holzleim verbunden. Mit diesen 3D-Skizzen wurde die Passform für die Reihenanordnung der Terminalen-Modelle überprüft und die Form über mehrere Iteration angepasst. Alle Anpassungen wurden erst direkt am Papiermodell ausgeführt und dann, wenn eine geeignete Form gefunden wurde, direkt in das Vektormodell in Adobe Illustrator[®] übertragen (Abbildung 53). Dann wurden noch halbierte Versionen der Papiermodelle für die randständigen Terminalen erstellt.



Abbildung 53: Erstellung der Papiermodelle für die Vielfachzapfenterminalen. **(1)** Erste Iteration der Vektordateien mit den ersten Papiermodellen **(2)** Erste (hinten) und Dritte (vorne) Iteration der Papiermodelle. Deutlich erkennt man die, im Vergleich zur kastenförmigen ersten Version komplexer geformten Modelle – mit dem Ziel, das diese in allen Achsen gut aneinanderpassen. **(3)** Geschnittene Einzelelemente der beiden Basismodelle, zum Teil schon in Form gefaltet. **(4)** Endgültige Vektorgrafik für die Modelle der Terminalen der kurzzapfigen (**grün**) und der langzapfigen (**gelb**) Photorezeptoren.

Zusätzlich wurde eine Bodenplatte aus Papier hergestellt, damit die Terminalen-Modelle für die Bearbeitung und zur besseren Visualisierung steckbar gestaltet werden können.

Dann wurden die 20 Papiermodelle mit einem 2D-Schneideplotter von Silhouette[®] geschnitten und mit Holzleim zusammengeklebt und für das Gesamtmodell der Terminalen-Verbindungen auf der Bodenplatte platziert.

Zusätzliche wurden Einzelmodelle der Zapfenterminalen erstellt. Dafür wurde auf Basis von TEM Querschnittsaufnahme durch die Photorezeptoren (Heß 2000) die Modelle bis in die äußere nukleäre Schicht hinein nachgebaut (Abbildung 54).

Für die Telodendriten wurden schmale Streifen (Breite 1,5 mm) in großer Anzahl und mit den in der Grafik verwendeten Endgabelungen mit dem 2D-Schneideplotter ausgeschnitten und einzeln an die jeweilige Stelle der Zapfenterminalen-Papiermodelle geklebt.

Ganze Photorezeptoren

Auf Basis der zuvor erstellten Zapfenterminalen-Papiermodelle wurde unter Zuhilfenahme von, auf der skleral-vitreale genau zugeordneter transversale TEM-Bilder durch die Photorezeptoren, die dreidimensionale äußere Morphologie der kurzzapfigen und der langzapfigen Photorezeptoren ermittelt.

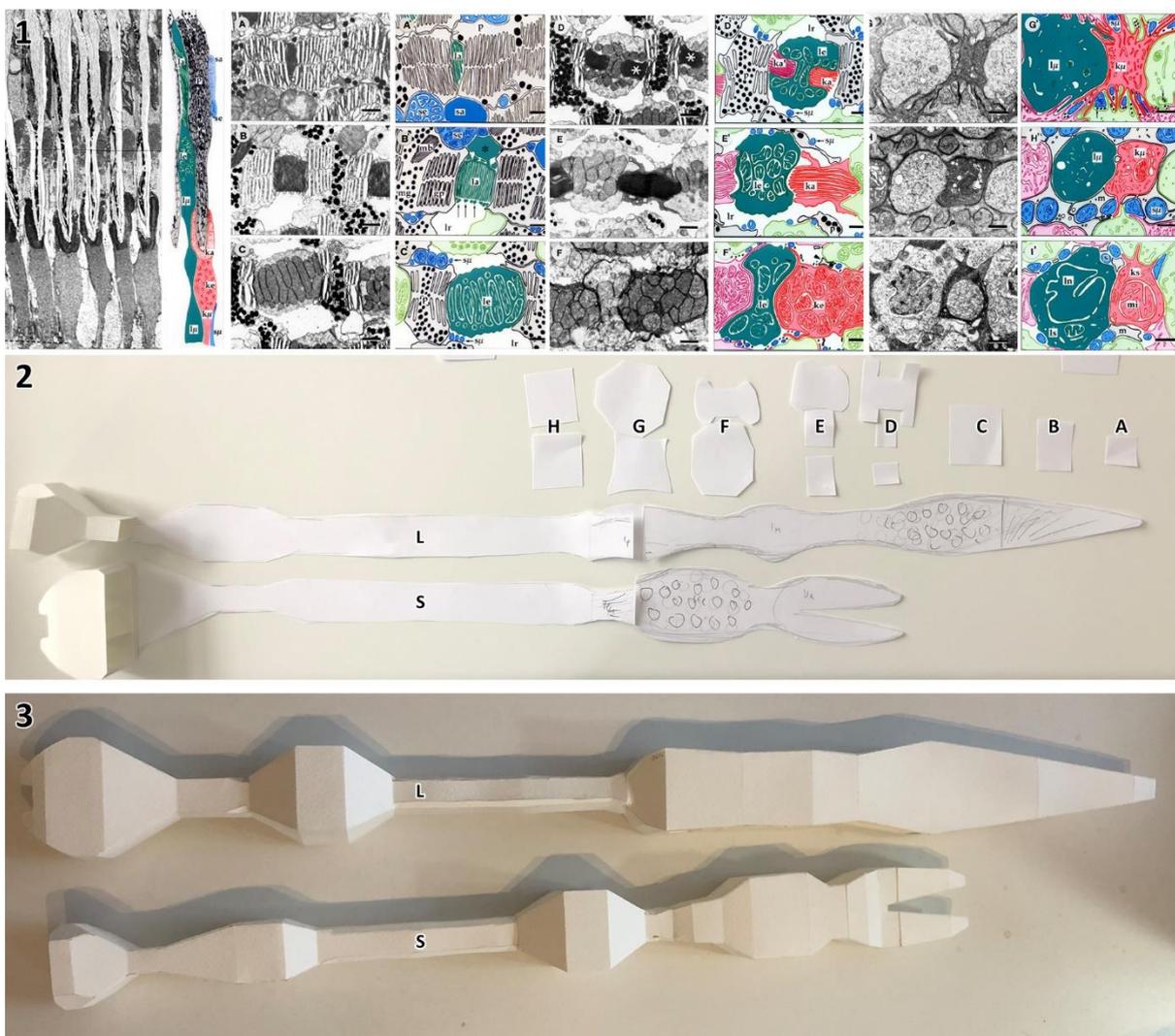


Abbildung 54: Erstellung der 3D-Papiermodelle der Photorezeptoren. Ausgehend von TEM-Bildern (aus Heß 2000) **(1)** zur Skizze für die Modelle **(2)** eines kurzzapfigen Photorezeptor **(S)** und eines langzapfigen Photorezeptoren **(L)**. Die Buchstaben **(A bis H)** entsprechen denen der TEM-Bilder. Links sieht man die auf 50% verkleinerten Pedicle Modelle (Maßstab 7,5 mm = 1 µm). **(3)** fertige Papiermodelle der kompletten Photorezeptoren der Vielfachzapfenreihe.

Als Maßstab für die Photorezeptor-Modelle wurde 50% der Terminalen-Modelle gewählt, sodass 1 µm etwa 7,5 mm entspricht. Der Bereich von den Terminalen bis zur Äußeren Grenzmembran konnte direkt in 2D in Adobe Illustrator® als Vektorgrafik erstellt werden. Der Bereich von der Outer Limiting Membrane bis zu den Außensegmenten musste in einem 3D-Modellierungsprogramm erstellt werden. Die enge Verschränkung der Ellipsoide und Außensegmente der beiden Photorezeptortypen miteinander und der Außensegmente der beiden Photorezeptoren mit den keilförmigen Zellen des Pigmentepithels konnte so schnell und präzise dargestellt werden.

Hierfür wurde in der Freeware Blender® von der Blender Foundation die Photorezeptor-Modelle und der Pigmentepithel-Keil zuerst aus einfachen Würfeln modelliert. Dann wurden zuerst die Modelle der Zapfen wie sie in der Vielfachzapfenreihe stehen platziert und das Modell des Short Cones mit 105% Größe vom Modell des kurzen Zapfens subtrahiert. Anschließend wurde der Pigmentkeil auf Basis von TEM-Bildern platziert und mit 105% Größe von den Modellen der Photorezeptoren subtrahiert (Abbildung 55). Die entstandenen 3D-Modelle wurden als Papiermodelle (.svg) exportiert. Die so entstandenen 2D-Vektordaten wurden in Adobe Illustrator® in mehrere Einzelteile unterteilt, da die Gesamtmodelle größer als die Arbeitsfläche des 2D-Schneideplotters sind, sowie die Falzlinien und Klebefalze optimiert. Die fertigen Modelle wurden dann mit dem 2D-Schneideplotter von Silhouette® ausgeschnitten und mit Holzleim zusammengebaut.

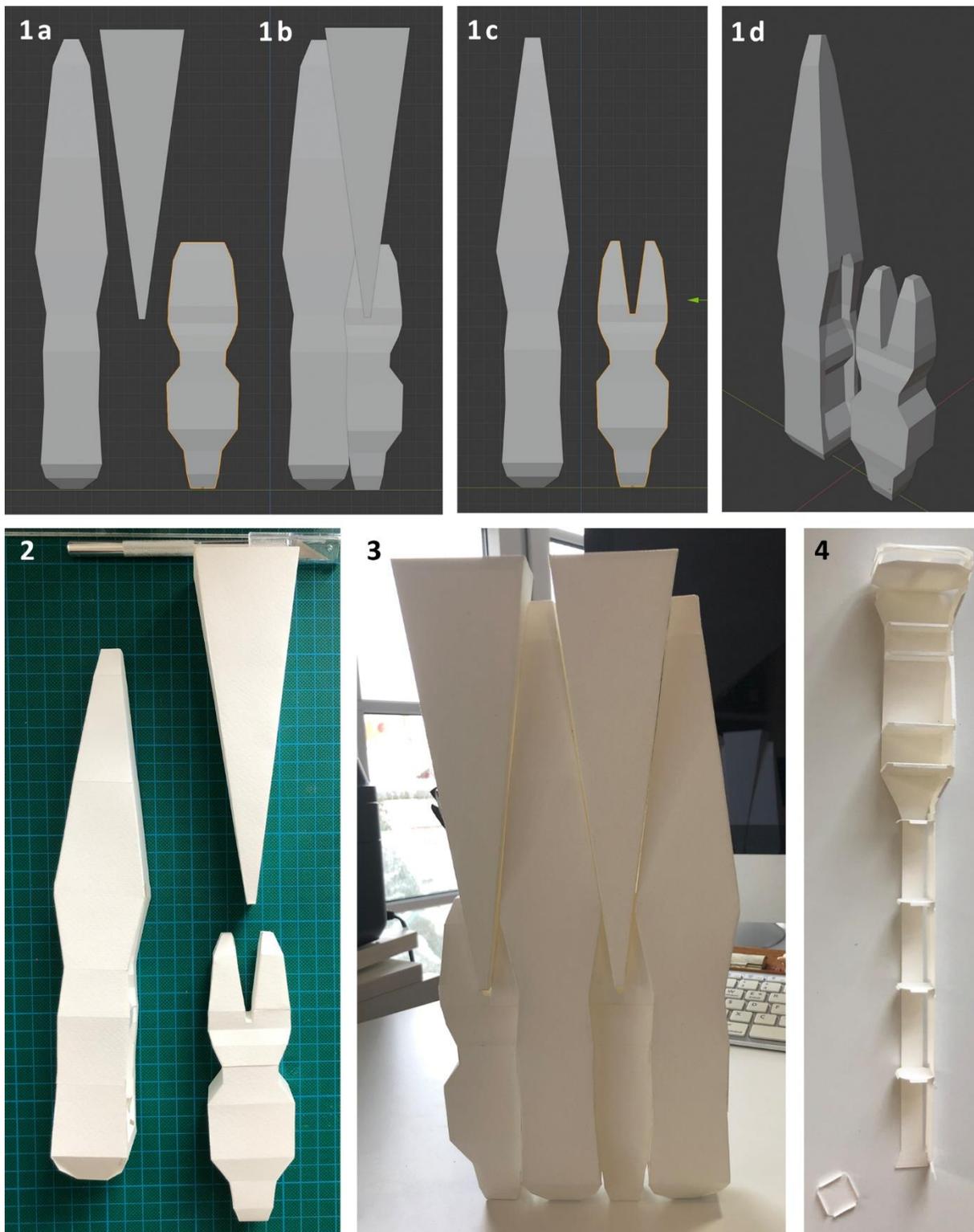


Abbildung 55: Erstellung von 3D-Papiermodellen der Photorezeptoren. Von Blender® zum fertigen Modell. **(1)** zeigt die wesentlichen Arbeitsschritte in Blender **(1a)** Erstellung der Grundformen und **(1b)** deren Orientierung zueinander. **(1c)** zeigt die fertigen Modelle nach den Subtraktionsschritten in der Seitenansicht und in einer Schrägansicht **(1d)**. Die fertigen Papiermodelle der äußeren Segmente der Photorezeptoren einzeln **(2)** und in der Vielfachzapfenreihen-Anordnung **(3)**. **(4)** zeigt das Modell eines inneren Segments eines kurzzapfigen Photorezeptors mit der stabilisierenden internen Struktur.

Papiermodelle der keilförmigen Zellen des Pigmentepithels wurde auf eine Bodenplatte geklebt. Dies ermöglicht es, die Photorezeptor-Modelle abnehmbar zu gestalten.