

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am proximalen Tubulus der Mäuseniere bei Eiweißspeicherung

RUTH MARX, ELISABETH MÖLBERT* und H. U. ZOLLINGER

Ludwig-Aschoff-Haus, Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. U. ZOLLINGER)

Eingegangen am 4. Oktober 1965

Die Vorgänge bei der Rückresorption von Protein aus dem Vorharn und seiner intracytoplasmatischen Verarbeitung in den Tubulusepithelien der Niere sind trotz zahlreicher licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen in den letzten Jahren noch nicht ganz geklärt. Durch lichtmikroskopische Beobachtungen war gesichert, daß vermehrt anflutendes Protein aus dem Vorharn von den Tubulusepithelien aufgenommen wird (RANDERATH, 1947) und in Form kleiner Tropfen zuerst im apikalen Teil der Zelle, dann aber auch basalwärts gelagert erscheint (ZOLLINGER, 1948). Solche cellulären Umwandlungen, die als „hyalintropfige Veränderung“ bezeichnet werden, ließen vermuten, daß die Mitochondrien an diesen Prozessen beteiligt seien (ASCHOFF und ANITSCHKOW, 1914), insbesondere war dies für die intracelluläre Eiweißspeicherung angenommen worden. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen konnten eine halbmondförmige Auftreibung der Mitochondrien aufzeigen, die als Mitochondrionkörper angesprochen wurde, daneben fanden sich auch andere intracelluläre Gebilde, die phasenkontrastmikroskopisch als glänzende Mikrogranula und als brillante Granula beschrieben wurden (ZOLLINGER, 1950).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Eiweißspeicherung wurden vor allem im Tierexperiment durchgeführt, aber auch Befunde aus der menschlichen Pathologie gaben wichtige Aufschlüsse zu diesem Problem.

Während nach früheren Untersuchungen angenommen wurde, daß das Protein die Zellmembran in diffuser Form passiert, ist nun eine Aufnahme durch Pinocytose allgemein anerkannt. Der Zusammenfluß der Pinocytosebläschen zu größeren Absorptionstropfen ist ebenfalls unbestritten (MILLER, 1959).

In früheren Arbeiten wurde z.T. eine Speicherung des Eiweißes in den Mitochondrien diskutiert (ZOLLINGER, 1948), da homogene dichte Körper, die während der Resorption des Proteins auftreten, in der Größenordnung von Mitochondrien liegen und nicht in allen Fällen eindeutig von diesen abgegrenzt werden können. Andere Autoren fanden lediglich eine Vermehrung der intramitochondrialen Granula oder eine geringgradige Schwellung der Mitochondrien (OKI u. Mitarb., 1965).

Eine Entstehung der Eiweißspeicherkörper („hyaline Tropfen“) aus Mitochondrien wird von den meisten Autoren nicht angenommen (ANDERSON und RECENT, 1962; MÖLBERT, 1960). Allerdings konnte eine Einbeziehung von Mitochondrien in Proteinabsorptionstropfen beobachtet werden (MILLER, 1959; NOVICKOFF, 1963). Die Aufnahme von Mitochondrien in Speicherkörper wurde von

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

ERICSSON (1964) als allgemeines Phänomen der Mitochondrienmauserung der Zelle wahrscheinlich gemacht. Mitochondriale Enzyme in den Speicherkörpern wurden jedoch bisher in der biochemischen Literatur nicht beschrieben. Lediglich konnten im lichtmikroskopisch-histochemischen Bild Substanzen in hyalinen Tropfen nachgewiesen werden, die sich wie Mitochondrien anfärben. Dagegen wurde sowohl in der Lysosomenfraktion (DE DUVE, 1963; NOVIKOFF, 1963) wie auch in den Proteinspeicherkörpern im elektronenmikroskopisch-histochemischen Enzymtest der Nachweis von saurer Phosphatase (MILLER und PALADE, 1964; MÖLBERT, 1960; NOVIKOFF, 1963), von Esterase und von Kathepsin erbracht (MILLER und PALADE, 1964; SABATINI u. Mitarb., 1962/63). Danach wurde ein Abbau des aufgenommenen Proteins in diesen sich morphologisch sehr variabel darstellenden Speicherkörpern (Lysosomen nach DE DUVE, Cytosomen nach LINDNER, 1957; Cytolysomen nach NOVIKOFF, 1959; Phagolysosomen nach STRAUS, 1963; Cytosegresomen nach ERICSSON u. Mitarb., 1965) angenommen. NOVIKOFF und ESSNER (1962) wie auch MILLER und PALADE (1964) fanden saure Phosphatase im Golgi-Feld. Nach NOVIKOFF (1963) stammen demnach die in den Speicherkörpern nachweisbaren lysosomalen Leitenzyme vom Golgi-Apparat; die enzymhaltigen Golgi-Bläschen gelangen zu den Speicherkörpern und verschmelzen mit diesen (NOVIKOFF, 1963).

Über das Schicksal der Restkörper liegen bisher keine Angaben vor. Lediglich MILLER (1960) und MILLER und PALADE (1964) fanden sowohl in der Zelle wie im Bürstensaum und im Lumen entsprechende Myelinfiguren, lassen jedoch die Frage nach der Richtung ihres Transportes offen.

Unsere Untersuchungen sollten einmal die Frage der Reaktion der Mitochondrien während der Eiweißspeicherung, zum anderen die Frage nach dem Schicksal der bei der Speicherung von Eiweiß in der Zelle vermehrt anfallenden Restkörper klären.

Material und Methode

Die Versuche wurden an adulten männlichen weißen Mäusen durchgeführt. Als Protein wurde natives Hühnereiweiß (2 ml je Tier) oder reines Ovalbumin (Serva, Heidelberg; 10 g pro kg Körpergewicht) in einmaliger Gabe intraperitoneal injiziert. Die Nieren wurden 10 min, 30 min, 90 min, 4 Std und 8 Std nach der Proteininjektion unter Äthernarkose entnommen, in Glutardialdehyd (6,5% in Puffer pH 7,2) und anschließend in 1%igem Osmiumtetroxyd oder in Kaliumbichromat-Osmiumtetroxyd (mit Kontrastierung in Phosphorwolframsäure und Uranylacetat) fixiert und in Epon eingebettet. Die Dünnschnitte wurden entweder mit Bleihydroxyd kontrastiert oder mit Silber imprägniert und mit dem Siemens Elmiskop I untersucht. Für die Auswahl geeigneter Stellen im Gewebe mit Hilfe des Lichtmikroskopes wurden semidünne Schnitte hergestellt und mit Azur II-Methylenblau nach RICHARDSON u. Mitarb. oder mit Silber gefärbt.

Ergebnisse

Aufnahme des Eiweißes

Die Aufnahme des Proteins, das über die Glomerula in das Tubuluslumen gelangt, erfolgt am Bürstensaum durch Pinocytose. Schon beim normalen Tier besteht eine lebhaftige Pinocytoseaktivität, die sich durch zahlreiche Bläschen in der Nähe des Bürstensaumes dokumentiert. 10 min nach der Proteingabe ist die Pinocytosetätigkeit bereits gesteigert, nach 90 min wird in unseren Versuchen anscheinend ein Maximum erreicht. In der folgenden Zeit von 4 und 8 Std stellt sich ein stationärer Zustand ein. Während der vermehrten Proteinaufnahme ist

der apikale Zellabschnitt mit den Pinocytosebläschen und den Absorptionstropfen besonders gut mit Silber imprägnierbar (Abb. 1). Nach Gabe von Ovalbumin ist die mit Silber imprägnierbare Substanz dagegen feiner im Cytoplasma verteilt. Der *Bürstensaum* selbst erscheint über lange Zeit intakt zu bleiben. Defekte oder ein Verlust des Bürstensaumes wurden nicht beobachtet (Abb. 2).

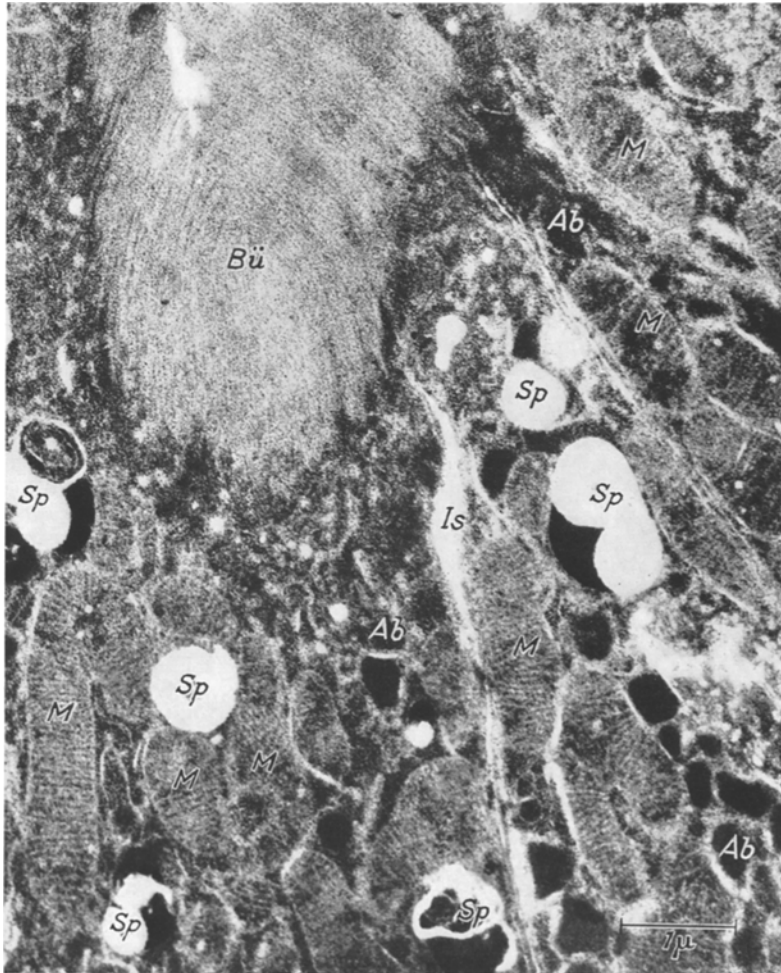


Abb. 1. Stark mit Silber kontrastierbarer apikaler Zellabschnitt einer Tubulusepithelzelle 90 min nach Gabe von nativem Hühnereiweiß. Bürstensaum (*Bü*) schwach kontrastiert. Stark kontrastierte Absorptionstropfen (*Ab*) und Speicherkörper (*Sp*), die Strukturen des Myelins werden nicht kontrastiert und erscheinen hell. Mitochondrien (*M*). Äußere Mitochondrienmembran nicht kontrastiert. Interzellularspalt (*Is*). Silberimprägnation. Vergr. 15 000 ×

Speicherkörper

Durch Konfluenz von Pinocytosevesikeln entstehen größere Absorptionstropfen, die ihrerseits wieder mit kleineren, weniger dichten Bläschen verschmelzen und zu Speicherkörpern werden. Form und Größe der Speicherkörper sind variabel, meist handelt es sich um rundliche bis ovale oder unregelmäßig ausgebildete Körper, die Substanzen verschiedener Dichte oder auch lamelläre Strukturen enthalten. In einem Teil dieser Körper finden sich kompakte oder fein-

lamelläre Strukturen, wie sie die sogenannten Myelin-Figuren aufweisen (Abb. 3 u. 4). Derartige Strukturen sind auch in den Microvilli des Bürstensaumes zu beobachten (Abb. 4), außerdem sind Myelinfiguren häufig im Tubuluslumen (Abb. 2)

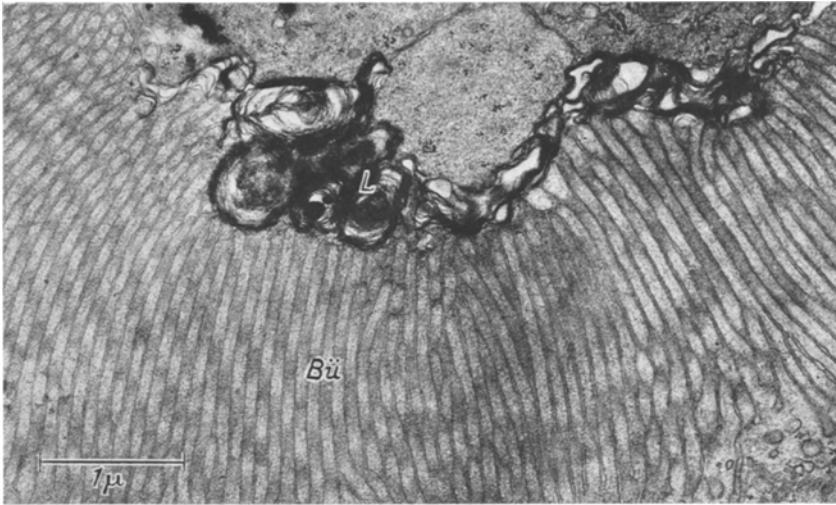


Abb. 2. Proximaler Tubulus bei Eiweißspeicherung. Bürstensaum (*Bü*) geschlossen. Im Lumen (*L*) Restkörper (Myelinfiguren). 10 min nach Gabe von Ovalbumin. Fix. und Kontrast. nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. Vergr. 19 000 ×

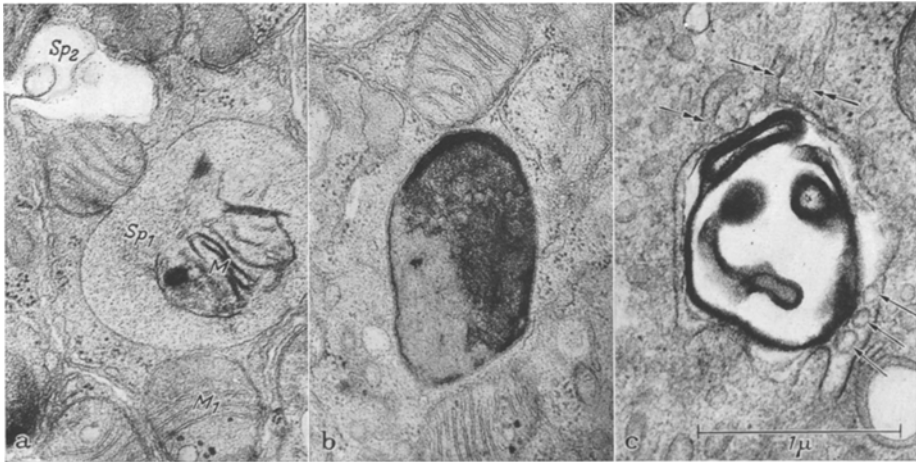


Abb. 3. a Speicherkörper (*Sp*₁), ein Mitochondrium (*M*) enthaltend. Vacuolär umgewandelter Speicherkörper (*Sp*₂). Bei *M*₁ Mitochondrium mit verschiedenen Granula. 90 min nach Gabe von Ovalbumin. Fix. und Kontrast. nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. b Speicherkörper, z.T. von dichten feinlamellären Strukturen erfüllt. 90 min nach Gabe von Ovalbumin. c Restkörper mit Myelinfiguren und kleinen Vesikeln \nearrow . Bei \nearrow tubuläre Strukturen, die mit dem Restkörper in Verbindung stehen. 10 min nach Gabe von Ovalbumin. Fix. und Kontrast, nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. Vergr. 27 000 ×

und in den Sammelrohren vorhanden, während sie im Glomerulum und besonders in den peritubulären Capillaren selten vorkommen.

Speicherkörper finden sich im unbehandelten Tier ebenso wie nach Eiweißgabe. Im Kontrolltier sind sie jedoch vorwiegend apikal gelegen, wie es auch nach kurzer Versuchszeit noch der Fall ist. Nach Eiweißgabe ist die Anzahl der

Speicherkörper stark vermehrt. Erst nach 4 und 8 Std sind im basalen Zellabschnitt Speicherkörper in erhöhter Anzahl anzutreffen. Dieser Befund kann an Hand der semidünnen Schnitte auch im Lichtmikroskop erhoben werden. Nach

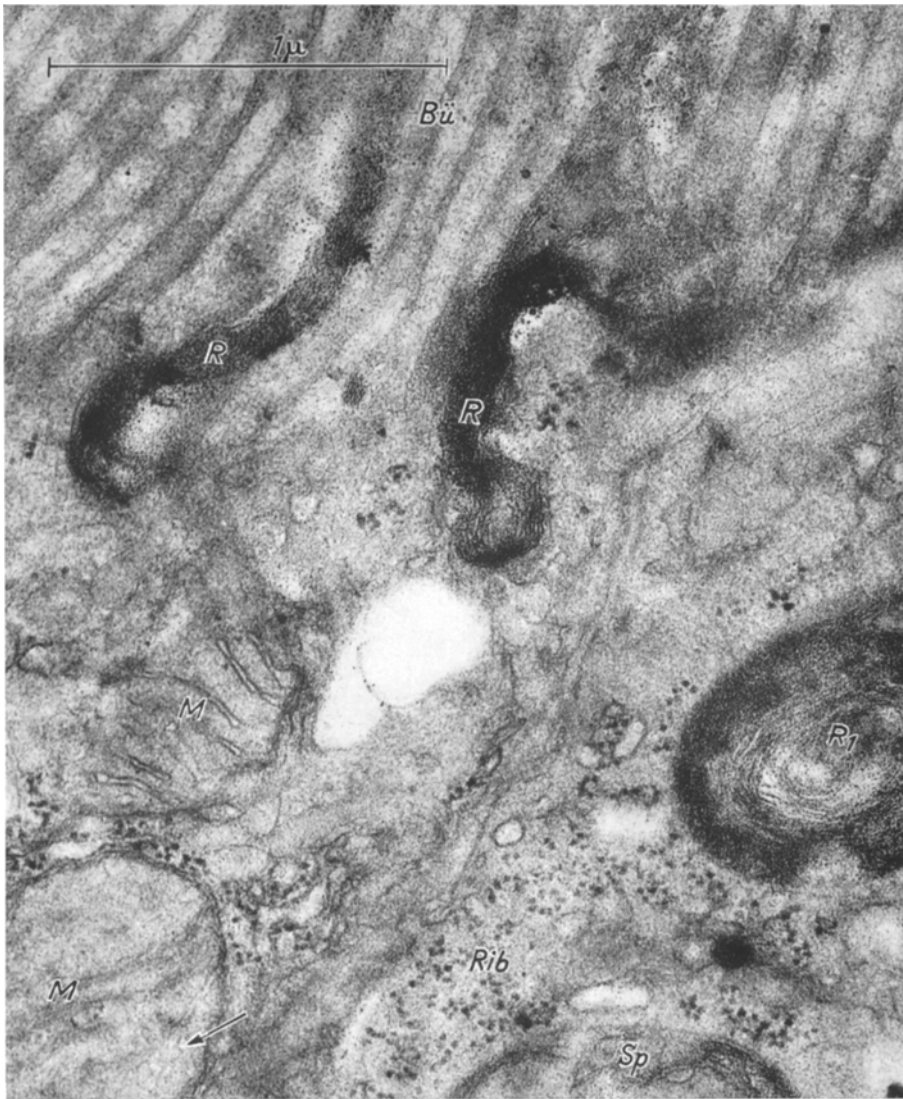


Abb. 4. Ausschleusung von Restkörpern (*R*) durch den Bürstensaum (*Bü*). Restkörper mit myelinartigen Strukturen (*R*₁). Speicherkörper (*Sp*), Mitochondrien (*M*), bei → beginnende bandartige Umwandlung der Cristae. Ribosomen (*Rib*). 30 min nach Ovalbumingabe. Fix. und Kontrast. nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. Vergr. 53 000 ×

Gabe von nativem Hühnereiweiß enthalten die Speicherkörper vermehrt dichtere lamelläre Strukturen als nach Gabe von reinem Ovalbumin. Außerdem treten nach Applikation von nativem Hühnereiweiß Körper geringerer Größe auf, die sich in Form von „Straßen“ vom mittleren zum basalen Zellbereich hinziehen und bei Bleifärbung wegen ihrer Dichte und Form nicht immer von Mitochondrien zu

unterscheiden sind. Nach Anfärbung mit Silber treten sie jedoch durch ihren stärkeren Kontrast gegenüber den Mitochondrien deutlich hervor. Diese Körper werden nach Gabe von reinem Ovalbumin kaum beobachtet, in diesem Fall bleibt die erhöhte Kontrastierbarkeit auf ein mehr diffus verteiltes Material zwischen den Mitochondrien beschränkt.



Abb. 5. Tubulusepithelzellen bei Eiweißspeicherung, 30 min nach Gabe von Ovalbumin. Kleine Restkörper (*R*) extracellulär gelegen. Basales Labyrinth (*BL*). Speicherkörper (*Sp*) mit teilweise abgebauten Inhaltsstoffen. Mitochondrien (*M*), endoplasmatisches Reticulum (*ER*), freie Ribosomen (\rightarrow). Fix. und Kontrast. nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. Vergr. 21 000 \times

Intercellularraum und basales Labyrinth

Im Intercellularraum zwischen zwei Zellen werden häufig dichte lamelläre Strukturen gefunden, die flachen Myelinfiguren ähneln und auch im basalen Labyrinth vorkommen (Abb. 5). Weiterhin werden kleine Granula, die mit Silber gut kontrastierbar sind, im Intercellularraum und im basalen Labyrinth beobachtet.

Nach längerer Versuchsdauer (4 und 8 Std) sind die Interzellularräume und das basale Labyrinth oft erheblich erweitert.

Endoplasmatisches Reticulum und Ribosomen

Eine besondere Vermehrung des endoplasmatischen Reticulums ist nicht festzustellen. Jedoch sind an einigen Stellen ribosomenfreie Membranen anzutreffen



Abb. 6. Ausschnitt aus einer proximalen Tubulusepithelzelle mit Golgi-Feld (G) und Golgi-Vesikeln, die sich an Eiweißabsorptionstropfen (Ab) anlagern und z.T. mit ihnen und mit Speicherkörpern (Sp) verschmelzen (→). Endoplasmatisches Reticulum (ER) und freie Ribosomen (Rib). Mitochondrien (M), 90 min nach Gabe von Ovalbumin. Fix. und Kontrast. nach WOHLFARTH-BOTTERMANN, außerdem Pb-Kontrastierung. Vergr. 40000 ×

(Abb. 6), die in eine örtlich begrenzte Vesikulation des endoplasmatischen Reticulums überleiten. Auffallend ist das Vorhandensein zahlreicher freier Ribosomen (Abb. 4). An einigen Stellen sind Ribosomen in großer Zahl zu beobachten, die aus dem Kern „auszufließen“ scheinen.

Der Zellkern zeigt häufig eine starke Kontrastierbarkeit des Nucleolus und von Substanzen, die der Kernmembran angelagert sind.

Golgi-Apparat

In den Kontrollen und in der ersten Zeit der Eiweißaufnahme liegen in der Nähe des Golgi-Apparates zahlreiche Vesikeln (Abb. 6), während nach längerer Versuchsdauer die Golgi-Strukturen zwar vermehrt sind, die Vesikelbildung aber nicht mehr so prominent erscheint.

Mitochondrien

Die Mitochondrien im glomerulumnahen Abschnitt der proximalen Hauptstücke zeigen die auffallendsten Veränderungen (Abb. 7). Dabei ist zu beobachten, daß die Mitochondrien vacuolisiert werden: die äußere Hüllmembran hebt sich ab (Abb. 7a), und die Vacuolen vergrößern sich durch Erweiterung des Spaltes zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran (Abb. 7b), die Cristae erscheinen desorientiert und lagern sich von innen an die Vacuolen an; es werden auch Membranen und Bläschen von außerhalb des Mitochondriums einbezogen (Abb. 7b, c, i). Die Vacuolisierung geht oft mit einer Zunahme des Volumens der Mitochondrien einher. Die Struktur der Mitochondrien wird weitgehend zerstört, und Myelinfiguren oder deren Restprodukte bleiben zurück (Abb. 7d, e, f). In einigen Fällen findet sich eine Einstülpung der äußeren mitochondrialen Hüllmembran in das Mitochondrium und eine Abschnürung derselben, oder die innere Mitochondrienmembran umschließt den gesamten von myelinartiger Struktur durchsetzten Bereich. Zum Teil gewinnen diese Strukturen nach Eröffnung der mitochondrialen Membran und nach Einbeziehung von Membranen aus ihrer Umgebung Anschluß an das basale Labyrinth (Abb. 7g, h). Weitere Mitochondrienveränderungen bestehen in einer bandartigen Umwandlung der Cristae (Abb. 4).

Die stark veränderten, z.T. vergrößerten Mitochondrien werden in vermehrter Anzahl nur in dem Material beobachtet, das 10 min nach Eiweißgabe entnommen worden war. Nach längerer Versuchsdauer sind derart veränderte und vor allem vergrößerte Mitochondrien relativ selten vorhanden. Zwar kommen auch dann noch Mitochondrien vor, die kleinere Vacuolen und Myelinfiguren aufweisen. Nach 8 Std findet man zahlreiche kleinere Mitochondrien. In Speicherkörper aufgenommene Mitochondrien sind besonders häufig nach 90 min zu sehen.

Die Mitochondrien enthalten *Granula*, die deutlich differenziert sind, z.T. besitzen sie einen hellen Kern, z.T. sind sie kompakt, oder sie sind aus Untereinheiten zusammengesetzt. Nach Eiweißgabe ist die Anzahl der Mitochondriengranula häufig erhöht (vgl. Abb. 3a).

Autolytische Veränderungen des Cytoplasmas

In einigen Tubulusepithelzellen können umschriebene autolytische Bezirke beobachtet werden, die in der Regel von Membranen begrenzt sind. Die Grundmatrix ist stark aufgehellet und enthält oft einen Golgi-Apparat und Mitochondrien. Auch Restkörper sind nachweisbar (Abb. 8). Bei der Versilberung werden diese Bezirke nur schwach kontrastiert und erscheinen als große Vacuolen.

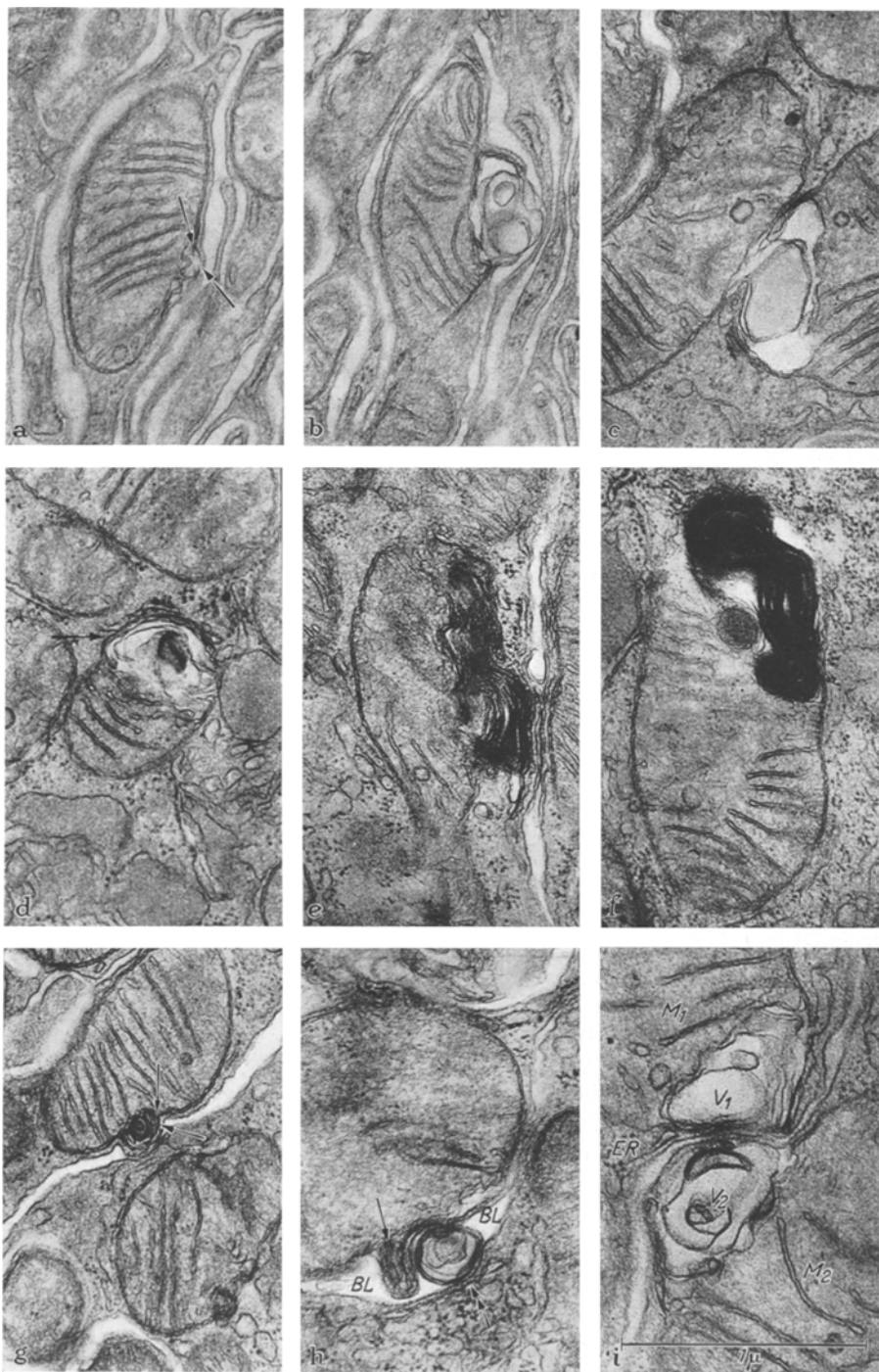


Abb. 7a—i. Myelinartige Degeneration der Mitochondrien. 10 min nach Gabe von Ovalbumin. Vergr. 33 000 \times . a Erweiterungen des Spaltes zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran \nearrow . b Vergrößerung der Vacuole. c Vacuolenbildung an zwei Mitochondrien. d Umschriebene Bildung dichter lamellärer Strukturen innerhalb eines Mitochondriums. Einbeziehung von Membranen aus der Umgebung \nearrow . e Ausgedehnte myelinartige Strukturen, ohne scharfe Begrenzung in das Innere des Mitochondriums übergehend. f Dichte Myelinfigur und größeres Granulum in einem Mitochondrium. g Kleinere Myelinfigur, umgeben von der inneren Mitochondrienmembran \nearrow . h Mitochondrium mit Myelinfigur \nearrow , die als Fortsatz in das basale Labyrinth (BL) hineinragt. Daneben eine bereits abgeschnürte Myelinfigur \nearrow . i Vacuolen (V_1 , V_2) in zwei Mitochondrien (M_1 , M_2), an der Berührungsstelle lamelläre Strukturen aus Membrananteilen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulums (ER)



Abb. 8. Apikal gelegener autolytischer Zellbezirk einer proximalen Tubulusepithelzelle 90 min nach Gabe von Ovalbumin. Abgrenzung durch Membranen (λ), Mitochondrium mit myelinartiger Degeneration und Erweiterung der Cristae (M), Golgi-Feld (G), Myelinfiguren (My). Vergr. 30 000 \times

Diskussion

Bei dem von uns gewählten Versuchstier, der Maus, passieren Proteine schon unter physiologischen Bedingungen die Glomerula und werden von den proximalen Hauptstücken aus dem Vorharn rückresorbiert. Demnach müssen sich die charakteristischen cellulären Veränderungen der Eiweißspeicherung auch bei den Kontrolltieren finden, durch Proteingabe werden die Phänomene der Eiweißspeicherung lediglich verstärkt. Da demnach alle Stadien der cellulären Veränderungen gleichzeitig vorhanden sein können, läßt sich nur schwer beurteilen, wie die verschiedenen Stadien zeitlich aufeinanderfolgen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß auch der Funktionszustand der einzelnen Nephrone verschieden sein kann.

Wir verlegten den Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf die erste Phase nach der Applikation des Proteins (10 min bis 90 min). Tatsächlich fanden wir die auffallendsten Veränderungen, vor allem an den Mitochondrien, bereits nach 10 min. Nach der von RHODIN (1954) vorgenommenen Einteilung der cellulären Reaktionen bei der Eiweißspeicherung in drei Stadien (1: nach 2—7 Std Reduktion der Urinabgabe unter die Norm, 2: nach 18—20 Std Polyurie, 3: nach 36 Std beginnende Reduktion der Diurese) fallen unsere Untersuchungen vor und in die 1. Phase.

Bei dem unphysiologisch hohen Angebot an Protein in unseren Experimenten treten bei der Aufnahme und der intracellulären Verarbeitung des Eiweißes im Tubulusepithel Veränderungen auf, die über die in der Norm zu beobachtenden Phänomene hinausgehen und damit Rückschlüsse auf den Funktionscyclus bei der

intracellulären Eiweißverarbeitung ermöglichen. Schon in früheren phasenkontrastmikroskopischen Arbeiten konnten während der Eiweißspeicherung auftretende glänzende Granula, die im weiteren zeitlichen Verlauf in brillante Körper übergehen, gefunden und mit dem in die Zelle aufgenommenen Protein in Verbindung gebracht werden (ZOLLINGER, 1950). Diese Granula dürften den Absorptionstropfen und Speicherkörpern entsprechen.

Die Ausgliederung von pinocytierten Stoffen in Speicherkörper tritt einmal bei vermehrtem Stoffangebot an die Zelle auf, zum andern dann, wenn die Substanzen nicht direkt in den Stoffwechsel der Zelle aufgenommen werden können.

Bei erhöhter Speicherung dient nicht nur der apikale Zellabschnitt der Tubulusepithelien zur Aufnahme der Absorptionstropfen und der Speicherkörper, sondern auch der basale Zellteil wird einbezogen, und „Straßen“ von Speicherkörpern markieren den Transportweg. Dieses Phänomen ist auch bei anderen Speichervorgängen in der Tubuluszelle zu beobachten.

Durch bisherige Untersuchungen ist geklärt, daß in den Absorptionstropfen Enzyme der Zellmembran des Bürstensaumes noch aktiv sind und daß mit zunehmender Speicherdauer in diesen Körpern saure Phosphatase nachgewiesen werden kann; außerdem fanden sich unspezifische Esterasen und Kathepsin. Damit ist nachgewiesen, daß diese Speicherkörper während eines bestimmten Funktionscyclus den Lysosomen von DE DUVE entsprechen. Die Frage nach der Herkunft der in den Speicherkörpern vorkommenden Enzyme, die das Eiweiß abbauen, ist noch nicht eindeutig geklärt. NOVIKOFF (1963) nimmt eine Verschmelzung von Bläschen des Golgi-Apparates mit den Absorptionstropfen an. Unsere Befunde machen diese Möglichkeit wahrscheinlich, da wir eine Verschmelzung von Absorptionstropfen mit Bläschen beobachten konnten. Jedoch konnten wir, da wir keinen Enzymtest durchführten, die Herkunft dieser Bläschen nicht in jedem Falle dem stark hypertrophierten Golgi-Feld zuschreiben. Die Möglichkeit, daß sich auch ribosomenfreie Bläschen des endoplasmatischen Reticulums mit den Absorptionstropfen vereinigen können, muß diskutiert werden, vor allem, da saure Phosphatasen sowohl im endoplasmatischen Reticulum wie im Golgi-Feld aufgefunden wurden.

Beim Abbau der Inhaltsstoffe treten verschiedenartige Restprodukte auf. Im Falle der Hämoglobinspeicherung werden Eisenpartikel freigesetzt, außerdem bilden sich myelinartige Figuren. Bei Gabe von nativem Hühnereiweiß entstehen zahlreiche myelinartige Strukturen, die nach Gabe von hochgereinigtem Ovalbumin weniger häufig beobachtet werden. Da natives Hühnereiweiß neben Ovalbumin u. a. auch Ovoglobulin, Mucoide und Fette enthält, dürfte das vermehrte Auftreten der myelinartigen Strukturen auf die Begleitstoffe zurückzuführen sein. Jedoch enthalten die Speicherkörper auch zahlreiche Membranstrukturen, die von Pinocytosevesikeln und von sekundär aufgenommenen Bläschen (MOE u. Mitarb., 1965) sowie z. T. von Mitochondrien stammen und ebenfalls Abbauprozessen unterworfen werden.

Auf Grund der gesteigerten Bildung von Speicherkörpern läßt sich im Experiment das Schicksal der bei ihrem Abbau entstehenden Restkörper leichter verfolgen. Das „Alter“ eines Speicherkörpers läßt sich an seinem Gehalt an myelinartigen Strukturen ablesen: junge Speicherkörper enthalten keine lamellären Strukturen, diese treten erst während des Abbaues der Inhaltsstoffe auf.

Ein Teil der Speicherkörper wird so weit abgebaut, daß ihre Inhaltsstoffe elektronenmikroskopisch nicht mehr nachweisbar sind; es kann angenommen werden, daß die abgebauten Substanzen in den cellulären Stoffwechsel einbezogen werden.

Die verbleibenden Restkörper werden auf der Stufe der myelinartigen Strukturen aus der Zelle eliminiert. Die Ausschleusung in den Vorharn erfolgt nach unseren Befunden als Durchsetzung des geschlossenen Bürstensaumes. Die aus den Zellen ausgestoßenen Restkörper lassen sich in den Lumina der Nephronen bis in die Sammelrohre verfolgen. Daß diese Restkörper tatsächlich aus den Tubulusepithelien eliminiert werden, dokumentiert sich darin, daß erst im Bereich der Tubuli Restkörper in größerer Zahl im Vorharn auftreten, während sie im Bowmanschen Kapselraum und in den Capillaren nur selten beobachtet werden können. Ein Teil der Restkörper gewinnt Anschluß an den intercellulären Spalt und an das basale Labyrinth und ist von den Myelinstrukturen, die sich von Mitochondrien herleiten, nicht unterscheidbar. In welcher Zeit und in welchem Ausmaß die Speicherkörper abgebaut oder eliminiert werden, kann bei dem gewählten Versuchstier und der angewandten Methode nicht entschieden werden.

In Übereinstimmung mit früheren, mit dem Phasenkontrastmikroskop erhobenen Befunden, bei denen eine Mitochondrienveränderung im Sinne einer vacuolären Umwandlung in einen Mitochondrionkörper beschrieben wurde, fanden wir ebenfalls mitochondriale Veränderungen. Die Abhebung der Mitochondrienhüllmembran mit einer Spaltbildung zwischen äußeren und inneren Membranen läßt auf eine Alteration schließen, die das äußere Membransystem der Mitochondrien betrifft. In erster Linie ist hier an hydrolytische Enzyme zu denken, welche zum Zeitpunkt dieser Veränderungen in der Zelle auftreten. Durch biochemische Untersuchungen (TAPPEL u. Mitarb., 1963) konnte gezeigt werden, daß Mitochondrien wesentlich empfindlicher gegen lysosomale Enzyme sind und ungefähr dreimal so schnell abgebaut werden wie eine Zellkern- oder eine Mikrosomenfraktion. Da in diese Mitochondrienveränderung auch Membranstrukturen aus der Umgebung des Mitochondriums einbezogen werden, könnte daraus gefolgert werden, daß es sich hier um eine lokal begrenzte Autolyse von Strukturen durch hydrolytische Enzyme handelt. Für diese Annahme sprechen die mitunter zu beobachtende Ausgliederung der intramitochondrial liegenden, in myelinartige Strukturen umgewandelten Membranen, die Abschnürung dieses Bereiches von dem inneren Mitochondrienkörper und seine Elimination in das basale Labyrinth. Diese Veränderung möchten wir im Gegensatz zu der ebenfalls während der Eiweißspeicherung zu beobachtenden bandartigen Umwandlung der Mitochondrien (MÖLBERT, 1960) als *myelinartige Degeneration der Mitochondrien* bezeichnen.

Die örtliche myelinartige Degeneration der Mitochondrien scheint nicht in allen Fällen zu ihrem vollständigen Untergang zu führen, sondern wie die Abschnürung und Elimination von myelinartigen Strukturen erkennen läßt, ist ein teilweiser Defektverschluß möglich. Die Abgabe dieser kleinen Restkörper in den Extracellulärraum erklärt das häufige Vorkommen von flachen lamellären Körpern im basalen Labyrinth und in den intercellulären Spalten. In den peritubulären Capillaren konnten wir jedoch keine derartigen Strukturen beobachten, so daß eine Abgabe über das basale Labyrinth, die Basalmembran und die Intercellularspalten in das Tubuluslumen oder in die Lymphspalten diskutiert werden muß. Ähnliche

Mitochondrienveränderungen, bei denen aber nur eine Vacuolenbildung zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran beobachtet wurde, konnten an der Zona fasciculata der Nebennierenrinde beim Stress und nach ACTH-Gabe gefunden werden. Diese Vacuolenbildung dürfte aber auf anderen Ursachen als in unseren Experimenten beruhen. Eine Entstehung von myelinartigen Figuren wurde dabei nicht beobachtet. Eine Mitochondrien-Vacuolisierung konnte DAVID (1964) ebenfalls in der Rattenniere nach Dioxan-Gabe nachweisen.

Durch die von uns angewandten Kontrastierungsmethoden konnten schon in der Norm in einzelnen Mitochondrien verschieden große und verschieden kontrastierbare Mitochondriengranula beobachtet werden. Unter der Eiweißspeicherung nimmt ihre Zahl in einzelnen Mitochondrien zu, wie bereits RHODIN (1954) beschrieben hat. Über die funktionelle Bedeutung der Mitochondriengranula liegen bisher keine gesicherten Angaben vor; geklärt ist, daß eine bestimmte Mitochondrienpopulation (LEHNINGER, 1964) Kationen enthält und unter gewissen Bedingungen vermehrt in Granula speichern kann. Außerdem können in Mitochondrien bestimmte Stoffe aufgenommen oder synthetisiert werden. Aus den verschiedenen Veränderungen an den Mitochondrien ist zu folgern, daß sie einerseits einer erhöhten funktionellen Belastung durch die Eiweißspeicherung ausgesetzt sind, zum anderen aber sekundär in die in der Zelle in vermehrtem Maße ablaufenden Abbauvorgänge einbezogen werden können. Auch die örtlich begrenzte Autolyse des Cytoplasmas, welche oft in der Nähe eines Golgi-Apparates erfolgt oder ein Golgi-Feld einbezieht, kann auf die Einwirkung hydrolytischer Enzyme zurückgeführt werden.

Zusammenfassung

Nach intraperitonealer Gabe von nativem Hühnereiweiß oder von Ovalbumin zeigen die Epithelien des proximalen Tubulus der Maus eine gesteigerte Eiweißspeicherung, die sich besonders in einer Vermehrung der Speicherkörper und in Veränderungen der Mitochondrien äußert.

Die Speicherkörper werden in der Zelle abgebaut und hinterlassen z. T. Restkörper, die als myelinartige Strukturen in das Tubululumen eliminiert werden können.

An den Mitochondrien treten während der ersten Phase der Proteinspeicherung Veränderungen auf, die wir als myelinartige Degeneration der Mitochondrien bezeichnen; die dabei entstehenden kleinen Restkörper, die ebenfalls myelinartige Strukturen darstellen, werden zum größten Teil in den Interzellularraum und in das basale Labyrinth ausgeschieden.

Die Ergebnisse werden mit früheren Befunden verglichen, die mit dem Phasenkontrastmikroskop erhoben worden waren.

Electron-Microscopic Studies of the Proximal Tubule of the Mouse Kidney in Protein Reabsorption

Summary

After native egg albumin or purified ovalbumin are administered intraperitoneally to the mouse, the epithelial cells of the proximal renal tubule show an increased uptake of albumin, manifested especially by a multiplication of "Speicher-

körper" (phagosomes), and by changes in the mitochondria. The "Speicher-körper" are reduced by cellular digestion leaving residual bodies behind which can be eliminated as myelin-like structures into the tubular lumen. During the first phase of protein reabsorption the mitochondria develop changes which we refer to as "myelin-like degeneration". The resultant, small residual bodies which develop likewise represent myelin-like structures and are discharged usually into the inter-cellular spaces and into the labyrinth of the basal cell membrane. The results here are compared with previous studies we carried out with phase-contrast microscopy.

Literatur¹

- ANDERSON, M. S., and L. RECANT: Fine structural alterations in the rat kidney following intraperitoneal bovine albumin. *Amer. J. Path.* **40**, 555 (1962).
- DE DUVE, C.: The lysosome concept. In: *Lysosomes*. London: J. & A. Churchill, Ltd. Ciba Found. Symp. 1963.
- ERICSSON, J. L. E.: The localization of acid phosphatase in relation to absorbed protein in renal proximal tubular cells. *Proc. Europ. Reg. Conf. Electron Micr. Prag 1964*, Vol. 2, p. 251.
- , B. F. TRUMP, and J. WEIBEL: Electron microscopic studies of the proximal tubule of the rat kidney. II. Cytosegresomes and cytosomes: their relationship to each other and to the lysosome concept. *Lab. Invest.* **14**, 1341 (1965).
- GOLDFISHER, S., E. ESSNER, and A. B. NOVIKOFF: The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 72 (1964).
- LEHNINGER, A. L.: The mitochondrion. Molecular basis of structure and function. New York and Amsterdam: W. & A. Benjamin Inc. 1964.
- MILLER, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**, 261 (1959).
- Hemoglobin absorption by the cells of the proximal convoluted tubule in mouse kidney. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 689 (1960).
- , and G. E. PALADE: Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell. Biol.* **23**, 519 (1964).
- MOE, H., J. ROSTGAARD, and O. BEHNKE: On the morphology and origin of virgin lysosomes in the intestinal epithelium of the rat. *J. Ultrastruct. Res.* **12**, 396 (1965).
- MÖLBERT, E.: Die Orthologie und Pathologie der Parenchymzelle im elektronenmikroskopischen Bild. *Habil.-Schr. Universität Freiburg* 1960.
- , O. v. DEIMLING u. F. DUSPIVA: Enzymnachweis an Parenchymzellen im elektronenmikroskopischen Bild. *Proc. Europ. Reg. Conf. Electr. Micr. Delft 1960*, Vol. 2, p. 635.
- NOVIKOFF, A. B.: The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J. biochem. Cytol.* **6**, 136 (1959).
- Lysosomes in the physiology and pathology of cells: contributions of staining methods. In: *Lysosomes*. London: Ciba Found. Symp. 1963.
- , and E. ESSNER: Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J. cell Biol.* **15**, 140 (1962).
- OKI, K., S. YOSHIOKA, K. HAYASHI, and M. MASUDA: Mitochondrial changes induced by iron absorption in the duodenal absorptive cells of rats. *J. Cell Biol.* **24**, 328 (1965).
- RANDERATH, E.: In: E. BECHER, *Nierenkrankheiten*, Bd. II. Jena: Gustav Fischer 1947.
- RHODIN, J.: Ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thesis Stockholm 1954.
- SABATINI, D. D., K. BENSCH, and R. J. BARNETT: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* **17**, 19 (1963).

¹ Auf Wunsch der Redaktion wurde das Literaturverzeichnis stark gekürzt. Ausführliche Literaturangabe kann bei den Verfassern angefordert werden.

- STRAUS, W.: Comparative observations on lysosomes and phagosomes in kidney and liver of rats after administration of horseradish peroxidase. In: Lysosomes. London: Ciba Found. Symp. 1963.
- TAPPEL, A. L., P. L. SAWANT, and S. SHIBKO: Lysosomes: distribution in animals, hydrolytic capacity and other properties. In: Lysosomes. London: Ciba Found. Symp. 1963.
- TRUMP, B. F., P. J. GOLDBLATT, and R. E. STOWELL: Studies on necrosis of mouse in vitro. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. Lab. Invest. **14**, 343 (1965).
- ZOLLINGER, H. U.: Trübe Schwellung und Mitochondrien. Schweiz. Z. Path. **11**, 617 (1948).
— Über hyalin-tropfige Veränderungen der Nierenhauptstücke als Ausdruck von Eiweißspeicherung. Phasenmikroskopische Beobachtungen über Mitochondrienfunktionen II. Schweiz. Z. Path. **13**, 146 (1950).

Prof. Dr. H. U. ZOLLINGER
Pathologisches Institut der Universität
78 Freiburg, Albertstr. 19