

Aus dem Anatomischen Institut
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Immunhistochemischer Nachweis des nicht-selektiven
Kationenkanals TRPC6 im Skelettmuskelgewebe des Menschen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von Davide Servello
geboren am 10.11.1994 in Völklingen

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	4
II. Zusammenfassung	7
1. Abstract.....	9
2. Einleitung	11
1.2.1 TRPC-Kanäle im Überblick	11
1.2.2 Aufbau und Funktion des TRPC6-Kanals.....	14
1.2.3 Vorkommen und Bedeutung von TRPC6-Kanälen	20
1.2.4 Aufbau der Skelettmuskulatur.....	22
1.2.5 Physiologie der Muskelkontraktion	25
1.2.6 Ziele der Arbeit	27
III. Material und Methodik	28
3. Geräte und Material	28
1.3.1 Geräteliste	28
1.3.2 Verbrauchsmaterialien	29
1.3.3 Chemikalien und Lösungen.....	30
1.3.4 Antikörper.....	30
4. Probenmaterial.....	31
1.4.1 Ethikvotum	31
1.4.2 Allgemeiner Prozess der Probenverarbeitung.....	31
1.4.3 Körperspende am Universitätsklinikum Homburg	31
1.4.4 Übersicht der Spender.....	32
1.4.5 NEP-Fixierung	33
1.4.6 Formalinfixierung	34
1.4.7 Auswahl der Proben	35
5. Probenverarbeitung.....	36
1.5.1 Probengewinnung	36
1.5.2 Einbetten des Probenmaterials in Paraffin.....	37
1.5.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	39
6. Erstellung eines geeigneten Färbeprotokolls.....	42
1.6.1 Protokoll – HE-Färbung.....	42
1.6.2 Protokoll – IHC-Färbung	42
7. HE-Färbung.....	44
1.7.1 Protokoll	44
1.7.2 Aufbau	45
1.7.3 Durchführung	46
1.7.4 Färbeprinzip.....	48
1.7.5 Abbildungen	49
8. IHC-Färbung.....	51
1.8.1 Protokoll	51
1.8.2 Vorbereitung Tag 1	53
1.8.3 Vorbereitung Tag 2	55
1.8.4 Übersicht Verdünnungen und Lösungen	57
1.8.5 Durchführung	58
1.8.6 Färbeprinzip.....	60
1.8.7 Abbildungen	63
1.8.8 Peptidinkubation	66
9. Erfassung der Daten.....	69
IV. Ergebnisse.....	70

10.	Überblick	70
11.	Allgemeines zur Ergebnisinterpretation	71
12.	Ergebnisse in Abhängigkeit der Fixierung	72
1.12.1	Ergebnisse der Formalinspender	72
1.12.2	Ergebnisse der NEP-Spender	75
1.12.3	Ergebnisse der unfixierten Spender	78
1.12.4	Gesamtergebnis	80
13.	Ergebnisse in Abhängigkeit des Muskels	82
1.13.1	M. pectoralis major	82
1.13.2	M. deltoideus	83
1.13.3	M. trizeps brachii	84
1.13.4	M. rectus femoris	85
14.	Ergebnisse in Abhängigkeit des Geschlechts	86
15.	Ergebnis der Peptidinkubation	87
V.	<i>Diskussion</i>	88
16.	Einordnung des Ergebnisses	88
17.	Patientenkollektiv	90
1.17.1	Basischarakteristika	90
1.17.2	Postmortale Veränderungen der Skelettmuskulatur	90
1.17.3	Einfluss der Fixierung	91
18.	Methodenkritik	91
19.	Zusammenfassung und Perspektive	93
VI.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	94
VII.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	94
VIII.	<i>Diagrammverzeichnis</i>	95
IX.	<i>Literaturverzeichnis</i>	96
X.	<i>Publikationen</i>	103
XI.	<i>Danksagung</i>	104
XII.	<i>Lebenslauf</i>	106

I. Abkürzungsverzeichnis

18G	18 Gauge
Å	Ångström
A.	Arteria
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AR	Ankyrin Repeat
ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Calmodulin
CH1	C-terminale Helix 1
CH2	C-terminale Helix 2
CIRB	Calmodulin and IP3-receptor binding
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
Fab	antigen-binding fragment
F-Aktin	filamentäres Aktin
Fc	constant fragment
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
G-Aktin	globuläres Aktin
GPCR	G protein-coupled receptor
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HH	horizontal helix
HRP	horseradisch peroxidase
hTRPC6	human TRPC6
ICD	intracellular cytoplasmic domain
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP₃-R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor

IP₆	Inositol Hexaphosphat
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IZR	Intrazellularraum
JNR	Journalnummer
KP	Kontrollpeptid
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
KS	Kaninchenserum
LH	Linker helices
L-Tubuli	longitudinale Tubuli
m	männlich
M.	musculus
Mm.	musculi
mRNA	messenger RNA
nAChR	nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NCC	Nierenzell Karzinom
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NGS	Normal Goat Serum
NK	Negativkontrolle
P 1-2	Porenschleife 1-2
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLCβ	Phospholipase C Subtyp β
PM	Plasmamembran
ROCE	Rezeptor-operierter Calcium-Einstrom
RyR	Ryanodinrezeptor
s.o.	siehe oben
S1-6	Transmembransegment 1-6
SOCE	Speicher-operierter Calcium-Einstrom
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	stromal interaction molecule
TMD	transmembrane domain
TRP	transient receptor potential
TRPA	transient receptor potential ankyrin subtype

TRPC	transient receptor potential classical subtype
TRPC6	transient receptor potential classical subtype 6
TRPM	transient receptor potential melastatin subtype
TRPML	transient receptor potential mucolipin subtype
TRPN	transient receptor potential NOMPC subtype
TRPP	transient receptor potential polycystin subtype
TRPV	transient receptor potential vanilloid subtype
T-Tubuli	transversale Tubuli
VH	vertical helix
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Zusammenfassung

Hintergrund: Die im Plasmalemm bzw. Sarkolemm gelegenen TRPC6-Kanäle stellen nicht-selektive Kationenkanäle der TRP-Familie dar, die vor allem eine Permeabilität für das bivalente Calcium-Ion aufweisen. Ihr Vorkommen konnte bislang in tierischen, aber auch in menschlichen Geweben beschrieben werden. Insbesondere beim Menschen scheint TRPC6 eine Rolle bei der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls, sowie bei der Alzheimer Erkrankung zu spielen. Aber auch im Prozess der Kanzerogenese einiger Tumorentitäten scheinen sie beteiligt zu sein. Im renalen System wurde eine Assoziation zwischen einer Mutation des Kanals und der sogenannten Fokal-segmentalen Glomerulosklerose beschrieben, bei der es zum Defekt bis hin zum Untergang von Podozyten kommt. Ergebnisse aus tierischen Versuchsreihen zeigten seine wichtige Beteiligung im Prozess der malignen Hyperthermie. Auch im Sarkolemm von Skelettmuskelfasern der Maus konnte das Auftreten der Kanäle gezeigt und deren immense Bedeutung für den Kalziueinstrom und letztlich für die muskuläre Funktion aufgezeigt werden. Des Weiteren lieferten wissenschaftliche Arbeiten Nachweise bzgl. der Expression von TRPC6 in der glatten Muskulatur des Menschen und dessen wichtige physiologische Bedeutung hinsichtlich der Funktionalität. Basierend auf dieser Grundlage, scheint das Vorhandensein der Kanäle im menschlichen Skelettmuskelgewebe somit nicht unwahrscheinlich.

Zum Nachweis von TRPC6 in menschlichem Gewebe und insbesondere auch im menschlichen Skelettmuskelgewebe gibt es bislang kaum Daten. Daher war das Ziel dieser Arbeit, den immunhistochemischen Nachweis von TRPC6 in humanem Skelettmuskelgewebe zu erbringen.

Methoden: Zur Durchführung der Studie wurden acht (n=8) Körperspender eingeschlossen. Die Entnahme der Gewebeproben der fixierten (n=6) und teilweise unfixierten (n=2) Spender realisierte man mittels dermatologischer Stanze und Skalpell aus den Mm. deltoideus, pectoralis major, trizeps brachii und rectus femoris. Aus den gewonnenen Proben konnten letztlich nach mehreren Arbeitsschritten histologische Schnittpräparate angefertigt werden, die dann zunächst zur Beurteilung der Struktur mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt wurden. Zur Quantifizierung des Nachweises von TRPC6 im menschlichen Skelettmuskelgewebe wurde folglich die Immunhistochemie genutzt. Dabei kamen ein spezifischer Primärantikörper und ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper zur Anwendung. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin genutzt. Zur Spezifitätskontrolle wurde einmalig eine Peptidkontrolle durchgeführt, bei der der genutzte Primärantikörper mit einem Kontrollpeptid inkubiert wurde.

Ergebnisse: Der Nachweis von TRPC6 im Skelettmuskelgewebe des Menschen konnte durch die genannte Methodik bestätigt werden. Alle im Rahmen einer Kreuzauswertung untersuchten Proben zeigten in der Immunhistochemie ein positives Signal, wenngleich dieses von unterschiedlicher Intensität war. Die einmalig durchgeführte Peptidkontrolle untermauerte das Ergebnis zudem. Sie führte zu einer deutlich abgeschwächten Bindung des Primärantikörpers an TRPC6.

Schlussfolgerung: Der Nachweis von TRPC6 im humanem Skelettmuskelgewebe konnte mit dieser Arbeit erbracht werden. Das Wissen über das Vorhandensein der Kanäle im Gewebe der humanen Skelettmuskulatur bietet nun die Möglichkeit, die noch ungeklärte Funktion der nicht-selektiven Kationenkanäle hinsichtlich des Muskelstoffwechsels - gemeint ist der Stoffwechsel der humanen Skelettmuskulatur - weiter zu entschlüsseln. Aufgrund seiner allgemeinen Funktion scheint eine Beteiligung bei der Aufrechterhaltung der zellulären Calciumhomöostase nicht unwahrscheinlich. Ebenso könnte TRPC6 - neben seinem physiologischen Beitrag zur Funktionalität - im Rahmen pathophysiologischer Prozesse der Skelettmuskulatur eine bedeutende Rolle einnehmen, beachtet man beispielsweise Studien aus tierischen Versuchsreihen, bei denen dieser Zusammenhang gezeigt werden konnte. Damit könnte TRPC6 möglicherweise als Target pharmakologischer Substanzen dienen, die im Übrigen in anderen Geweben bereits Anwendung finden. Der Zusammenhang zwischen den nicht-selektiven Kationenkanälen TRPC6 und den zahlreichen Erkrankungen der Skelettmuskulatur bleiben zunächst ein unzureichend entschlüsseltes Konstrukt. Es bedarf weiterer wissenschaftlicher Arbeiten, um diese Komplexität zu entschlüsseln.

1. Abstract

Background: TRPC6 channels constitute non-selective cation channels that are localized in plasmalemma respectively sarcolemma and have a leading permeability for the bivalent calcium ion. Until now it was found in animal as well as in human tissues. In humans the channel seems to play an important role when it comes to the pathophysiology of cerebral ischemia or Alzheimer's disease. They seem also to be involved in cancerogenesis. With regard to renal system there are described associations between TRPC6 and the focal segmental glomerulosclerosis that leads to a deficiency or a destruction of podocytes. Furthermore, results of animal experiments could show an involvement of the transient receptor potential channel 6 in a condition known as malignant hyperthermia. In skeletal muscle fibers of mice the expression of TRPC6 in the sarcolemma could be shown. Their enormous importance for the influx of calcium into the muscle cell and thus for the muscular function could also be revealed. Furthermore, some research groups revealed the expression of TRPC6 in human smooth muscle cells and the important role for its function. Based on this foundation the presence of the transient receptor potential channel 6 in human skeletal muscle does not seem unlikely.

So far, there is hardly any data on the detection of TRPC6 in human tissue and, in particular, in human skeletal muscle tissue. Therefore, the aim of this work was to provide the immunohistochemical detection of TRPC6 in human skeletal muscle tissue.

Methods: For this study eight (n=8) human donors were included. The removal of the tissue was realized by a biopsy punch and a scalpel from the Mm. deltoideus, pectoralis major, triceps brachii and rectus femoris. The donors were in fixed (n=6) and partially unfixed (n=2) conditions. The samples obtained were processed into histological sections, which were then subjected to Hämatoxylin-Eosin staining. To quantify the detection of TRPC6 in human skeletal muscle tissue we used Immunohistochemistry. Therefore, a primary and an enzyme-linked secondary antibody were used. Diaminobenzidine was used as the chromogenic substrate. In order to specify the result, we processed a peptide incubation of the primary antibody once.

Result: The detection of TRPC6 in human skeletal muscle was confirmed by using Immunohistochemistry. All samples examined has shown a positive signal in the IHC, although this was of varying intensity. The peptide control also confirmed the result. The use of the control peptide resulted in a weakened or rather in an absent binding of the primary antibody on the TRPC6 protein.

Conclusion: With this research we were able to provide the expression of TRPC6 protein in human skeletal muscle the first time. Based on this foundation following researches may help to understand the unknown function of the non-selective cation channels for the human skeletal muscle metabolism. Its general function suggests that it may be involved in the maintenance of the intracellular calcium homeostasis. Furthermore, they could also be involved in pathophysiological processes as shown in

animal experiments. If associations between TRPC6 and muscle diseases could be established, the channels could also serve as a pharmacological target in the future.

In summary the association between the transient receptor potential channel 6 and the numerous muscle diseases remain elusive. There are more investigations needed for clarification.

2. Einleitung

Transient receptor potential channels (TRPC) stellen ein sehr umfassendes Gebiet dar, das auch heute noch zahlreiche wissenschaftliche Arbeitsgruppen beschäftigt. Vielfältige Erkenntnisse konnten über Jahrzehnte intensiver Forschung gewonnen werden, die damit einen wesentlichen Beitrag in Bezug auf das Vorkommen, die Bedeutung, aber auch die Funktionalität von TRPC-Kanälen leisteten. Doch trotz aller wissenschaftlicher Bemühungen sind viele Aspekte bzgl. der Ionenkanäle bis heute unzureichend oder gar nicht geklärt. So stellt beispielsweise der Nachweis des Subtyps C6 im menschlichen Skelettmuskelgewebe eines dieser ungeklärten Aspekte dar, wenngleich vieles auf dessen Vorhandensein hinweist. Im Folgenden sollen dezidiert wesentliche Grundlagen hinsichtlich der TRPC-Familie aufgegriffen und erläutert werden, wobei die TRPC6-Kanäle hierbei das zentrale Element einnehmen.

1.2.1 TRPC-Kanäle im Überblick

Um den Ursprung der TRPC-Kanäle auszumachen, muss man den Blick zunächst auf das Jahr 1969 richten. Dort entdeckten Wissenschaftler bei Versuchen mit einer spontanen Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dass deren Photorezeptoren lediglich mit einer transienten - also vorübergehenden - Änderung des Rezeptorpotentials auf einen hellen Lichtstimulus hin reagierten, während das Rezeptorpotential des Wildtyps für die gesamte Zeitdauer der Einwirkung des Stimulus verändert war (Cosens & Manning, 1969). Diese Ergebnisse quantifizierte man mittels Elektretinogramm (ERG). In der Folge prägten sechs Jahre später Minke, Wu und Pak den Begriff „transient receptor potential mutant (trp)“ und nahmen damit Bezug auf die Erkenntnisse von Cosens und Manning (Chen et al., 2020; Minke et al., 1975). Erst 14 Jahre später, im Jahr 1989, gelang dann schlussendlich die Klonierung des mutierten TRP-Gens, was zum Vorschein brachte, dass es sich bei TRP um ein membranständiges Protein handelte, das sequenziell Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten spannungsgesteuerten Na⁺- und Ca²⁺-Ionenkanälen aufwies (Montell & Rubin, 1989; Wong et al., 1989; X. Zhu et al., 1996). 1992 bestätigten letztlich Hardie und Minke diese Annahme, dass es sich bei den TRP-Proteinen um Ionenkanäle handelte, die insbesondere für die Vermittlung von Calciumstrom in die Zelle bedeutsam waren (Chen et al., 2020; Hardie & Minke, 1992). Heute stellt der *Drosophila* TRP-Kanal einen Überbegriff für eine umfassende Gruppe von Ionenkanälen dar. Dabei repräsentieren sieben Subfamilien die Superfamilie der TRP-Kanäle, deren Gemeinsamkeit einerseits in der Permeabilität für Kationen besteht, andererseits im Aufbau, der durch sechs Transmembransegmente gekennzeichnet ist (Venkatachalam & Montell, 2007). Der Unterschied, der die einzelnen Subgruppen voneinander differenziert, ist in der DNA-Sequenz der für die Kanäle codierenden Gene - und damit folglich auch in der Abfolge der Aminosäuren - begründet (Venkatachalam & Montell, 2007). **Tabelle 1** zeigt die Vertreter der TRP-Superfamilie.

TRP-Superfamilie
TRPC (canonical, classical)
TRPV (vanilloid)
TRPA (ankyrin)
TRPM (melastatin)
TRPN (NOMPC)
TRPP (polycystin)
TRPML (mucolipin)

Tabelle 1 - Subfamilien der TRP-Kanäle

Wie eingangs erwähnt, nimmt die TRPC-Subfamilie, insbesondere der Subtyp C6, für die zugrundeliegende Arbeit eine zentrale Rolle ein, weshalb die Aufmerksamkeit fortan ihr gilt. Diese weist von allen TRP-Vertretern die ausgeprägteste Sequenzhomologie in Bezug auf das Drosophila TRP-Gen auf, weshalb man sie auch als klassische (classical) TRP-Kanäle (TRPC) bezeichnet (Chen et al., 2020). Prinzipiell existieren in Säugern sieben verschiedene TRPC-Kanäle (TRPC 1-7), wobei auch diese nochmal in einzelne Gruppen gegliedert werden können. Dabei fußt deren Zuordnung zum einen auf der Abfolge der Aminosäuren, zum anderen auf den funktionellen Gesichtspunkten der Kanäle, sodass vier Gruppen entstehen - TRPC1, TRPC2, TRPC4/5, TRPC3/6/7 - (Venkatachalam & Montell, 2007; Wang et al., 2020). Während TRPC2 als Pseudogen vorliegt und damit nicht als Vorlage für die Synthese eines reifen Proteins dienen kann (X. Zhu et al., 1996), werden die anderen sechs TRPC-Proteine (TRPC1, TRPC4/5, TRPC3/6/7) im menschlichen Organismus exprimiert (Venkatachalam & Montell, 2007). Dabei ist ihnen allen gemein, dass deren Aktivierung rezeptorvermittelt über einen Phospholipase C (PLC) signalisierenden Weg erfolgt, was ihre enge Verwandtschaft zum Drosophila-TRP (Aminosäuren-Sequenzhomologie etwa 30-35%) nochmals unterstreicht (Wang et al., 2020). Die Expression der TRPC-Kanäle in tierischen, wie auch in menschlichen Zellen und Geweben ist umfassend und so vielfältig, wie deren Funktion für das jeweilige Gewebe (Wang et al., 2020), wengleich Großteile der Funktionen bis heute unklar sind. Diese Vielfalt zeigt sich beispielsweise am ubiquitären Vorkommen von TRPC1 im Menschen. So ist eine starke Expression im ZNS, im Herzen, in den Ovarien, aber auch in den Hoden beschrieben (Wes et al., 1995; X. Zhu et al., 1995).

TRPC2-Kanäle hingegen spielen beim Menschen keine Rolle - das entsprechende Gen ist ein Pseudogen - während Sie bei Nagetieren in verschiedenen Geweben verschiedene Funktionen übernehmen (Wang et al., 2020). Bei Mäusen sind die Kanäle hinsichtlich der Erythropoese von Bedeutung, bei der erythroide Zellen auf eine Stimulation durch Erythropoetin (EPO) mit einem Calciumeinstrom reagieren, der unter anderem durch TRPC2 vermittelt wird (Chu et al., 2004). Auch dessen Expression im vomeronasalen Organ - einem Bestandteil des olfaktorischen Systems - wurde beschrieben und dabei gezeigt, dass die Kanäle zum einen der Vermittlung von Pheromonen dienen, zum anderen Einfluss auf soziale Verhaltensweisen nehmen (Leypold et al., 2002; Liman et al., 1999). Die enorme Vielfalt, die die TRPC-Familie bietet, wird nicht zuletzt durch die nächsten Vertreter, die TRPC3-Kanäle,

demonstriert. Diese sind ebenso durch eine umfassende Beteiligung an physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen für den menschlichen Organismus gekennzeichnet (Wang et al., 2020). Ihre Expression erstreckt sich über zahlreiche Gewebe, wobei diese im Bereich des zentralen Nervensystems (ZNS) am ausgeprägtesten ist (X. Zhu et al., 1996). Dabei sind insbesondere die Hypophyse sowie die cerebellären Purkinje-Zellen starke Repräsentanten (Hartmann et al., 2008; Riccio et al., 2002). Schließlich ist ein Vorkommen von TRPC3 auch im Herzen von Hunden und Nagetieren beschrieben (Goel et al., 2007), ebenso in Lungen von Patienten mit idiopathischer pulmonalen arteriellen Hypertonie (IPAH) (Yu et al., 2004).

Die stärkste Ausprägung der TRPC4-Kanäle ist ebenfalls im ZNS zu beobachten, wobei auch Knochen- und Herzgewebe sowie die Prostata diese Kanäle exprimieren (Riccio et al., 2002). Ferner beherbergt auch das mesolimbische System von Nagetieren den Subtyp C4 (Fowler et al., 2007). Garcia et al. beschrieben zudem das Vorkommen in Nieren, Nebenniere, Lunge, Kleinhirn, Hoden und Eierstöcken von Ratten (Garcia & Schilling, 1997).

Die stärkste Expression der TRPC5-Kanäle im Menschen ist, ähnlich der bisher aufgelisteten Vertreter, im zentralen Nervensystem (ZNS) zu beobachten, wobei diese im Vergleich zur Expressionsrate im peripheren Gewebe etwa zehnfach höher liegt (Riccio et al., 2002). Die vielfältigen Funktionen, die dieser Kanal im Organismus einnimmt, äußert sich nochmals mehr in seinem umfassenden Auftreten im kardiozirkulatorischen System von Mäusen, wo er unter anderem als aortaler Sensor der Barorezeptoren fungiert (Lau et al., 2016), im renalen System, wo im tierischen Versuchsmodell gezeigt wurde, dass eine gesteigerte TRPC5-Aktivität einen negativen Einfluss auf fortschreitende Nierenerkrankungen nimmt (Zhou et al., 2017) und letztlich im Prozess der Angiogenese, die in Mäusen durch eine Aktivierung von TRPC5 induziert wird (Y. Zhu et al., 2019).

Im Menschen sind auch TRPC7-Kanäle, als letzter Vertreter der TRPC-Familie, weit verbreitet. Sie finden sich unter anderem in zahlreichen Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) - die Hypophyse stellt dabei eine dieser Regionen dar - sowie in der Niere (Riccio et al., 2002). In Mäusen ist das Auftreten etwas breiter gefächert. Gehäuft treten die Kanäle in Organen, wie dem Herz, der Lunge und dem Auge auf, wobei auch eine Expression in der Milz, dem Gehirn und den Hoden beschrieben ist, wenngleich die Dichte dort, im Vergleich zu den erstgenannten Organen, etwas geringer ist (Okada et al., 1999; Wang et al., 2020).

Der Überblick über die TRPC-Familie hat die extreme Vielseitigkeit hinsichtlich seines Auftretens und seiner Funktion, für Menschen und Tiere gleichermaßen, belichtet und aufgezeigt, dass dieses umfassende Feld noch viele Fragen aufwirft.

Ein Vertreter, der bislang nicht angesprochen wurde, ist der TRPC6-Kanal. Aufgrund seiner Wichtigkeit für die zentrale Fragestellung, sollen der Aufbau, seine Funktion, seine Bedeutung und letztlich sein Vorkommen in gesonderten Kapiteln ausführlich beschrieben werden.

1.2.2 Aufbau und Funktion des TRPC6-Kanals

Generell stellen TRPC6-Kanäle nicht-selektive Kationenkanäle dar, die im Plasma-/Sarkolemm gelegen sind und deren Aufbau dem der bisher gängigen und bekannten spannungsabhängigen Ionenkanälen - z.B. Ca^{2+} -Kanälen, Na^+ -Kanälen - sehr ähnelt (Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Dennoch weisen sie Charakteristika auf, die nicht zuletzt im Jahre 2018 auf Grundlage der Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) weiter entschlüsselt werden konnten - die Auflösung betrug hierbei $3,8\text{\AA}$ ($=10^{-10}\text{m}$) (Azumaya et al., 2018; Tang et al., 2018). Dabei erfolgte die Beurteilung im geschlossenen Zustand des Kanals.

Zunächst sind TRPC6-Kanäle in der Plasmamembran von Zellen gelegene und somit membranständige Proteine. Differenziert wird dabei eine Transmembrandomäne (transmembrane domain, TMD) von einer intrazellulären Zytoplasmadomäne (intracellular cytoplasmic domain, ICD), woraus ein zweischichtiger Aufbau resultiert (Azumaya et al., 2018; Tang et al., 2018). Beginnend bei der Transmembrandomäne (TMD), ist deren Grundlage ein tetrameres Konstrukt bestehend aus 4 Untereinheiten, die wiederum jeweils über sechs α -helikale Transmembransegmente (S1-S6) verfügen (Azumaya et al., 2018; Chen et al., 2020; Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). S1-S4 der einzelnen Untereinheiten repräsentieren jeweils eine Spannungssensordomäne, während S5+S6 und die dazwischenliegenden Porenschleifen (P1+P2) hochkonservierte Porendomänen darstellen. Diese Porendomänen lagern sich symmetrisch - entsprechend der vier Untereinheiten - zu einem zentral im Kanal gelegenen, tetrameren Komplex zusammen, der letztlich einen ionenleitenden Tunnel formt (**Abbildung 1**) (Wang et al., 2020). Ferner stellt die intensive Interaktion der die Porendomäne

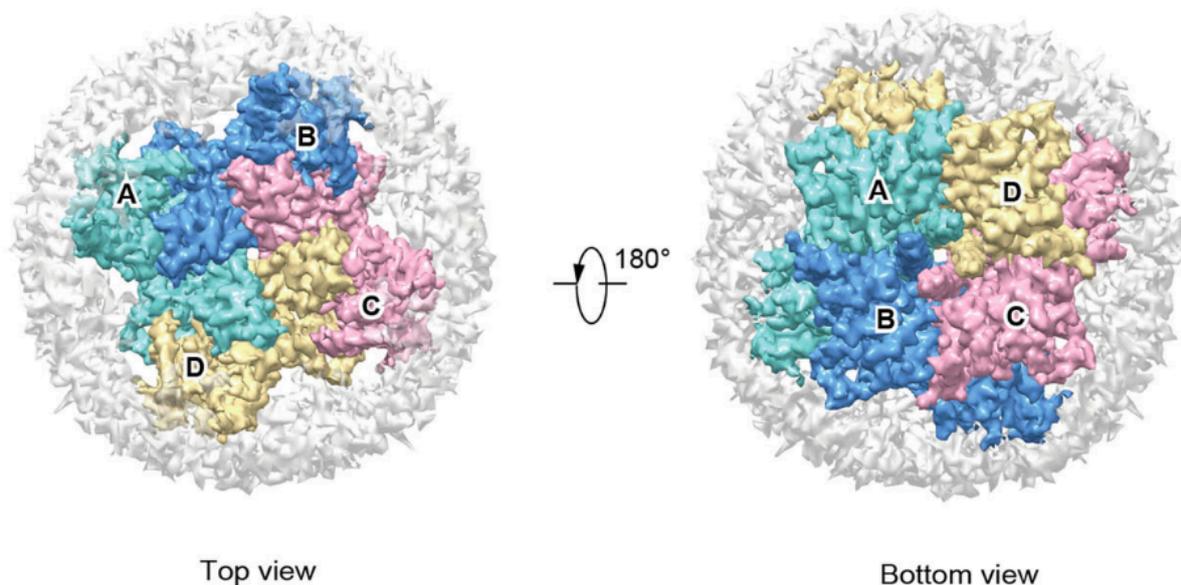


Abbildung 1 - Kryo-EM Map des humanen TRPC6-Kanals

Abbildung aus Tang et al., 2018. Die Abbildungen zeigen die einzelnen Untereinheiten des humanen TRPC6 (hTRPC6) - Kanals, die hier zum einen farblich codiert, zum anderen mit Buchstaben (A-D) gekennzeichnet sind. Links ist dabei die Aufsicht auf den Kanal dargestellt, während rechts die Ansicht von unten abgebildet ist. Zudem lässt sich anhand der farblichen Gestaltung die Interaktion der Untereinheiten miteinander erahnen, woraus der tetramere Kanal resultiert, der zentral ein Lumen aufweist. Hierbei handelt es sich um die ionenleitende Kanalpore.

definierenden Strukturen (S5+6, P1+P2) vermutlich die bauliche Voraussetzung für die Kopplung des Kanalgatings - also des Kanaltransports - und der Selektivitätsfilterung von TRPC6 dar (Tang et al., 2018). Auch der sogenannte Prä-S1-Komplex, dessen Bezeichnung seine Lage impliziert, ist mitunter Bestandteil der TMD. Der Komplex, der häufig auch als Prä-S1-Ellenbogen (Pre-S1-ellbow) und Prä-S1-Helix bezeichnet wird, ist etwa zur Hälfte in der Plasmamembran (PM) verankert und verkörpert ein Bindeglied zwischen S1 und den bereits zur ICD gehörenden Verbindungshelices (Linker helices, LH) (Wang et al., 2020).

Nachfolgend sollen die der ICD zugehörigen Strukturen beschrieben werden. Die gerade genannten, an den N-Terminus des Prä-S1-Komplexes anknüpfenden LH's, die wiederum durch Schleifen voneinander abgegrenzt werden, verlaufen in einer antiparallelen Richtung zueinander und treten untereinander in Interaktion, bevor distal der Ankyrin-Repeat-Komplex folgt (AR1-AR4) (Azumaya et al., 2018; Tang et al., 2018). Diese Strukturen gehören zum N-Terminus, während die sogenannte TRP-Helix (=TRP-Box), die C-terminale Helix1 (CH1) und die C-terminale Helix2 (CH2) dem C-Terminus zugerechnet werden. Das C-terminale Segment stellt dabei, im Vergleich zum N-Terminus, das kürzere Polypeptid dar und ist somit kleiner (Azumaya et al., 2018). Dem Segment S6 der TMD folgend findet sich die TRP-Helix (TRP-Box), von der angenommen wird, dass sie für das Kanalgating von Bedeutung ist (Wang et al., 2020). Zwischen TRP-Helix und CH1 befindet sich die TRP re-entrant Helix, die zum Teil durch die Plasmamembran zieht, die als Bindeglied zwischen den genannten Strukturen dient und letztlich funktionell bedeutsam ist, wenngleich Teile dieses Segments bislang unzureichend erforscht sind (Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Mutmaßlich befinden sich insbesondere im Abschnitt zwischen TRP re-entrant und CH1 Bindungsstellen für Inositol Hexaphosphat (IP₆) sowie für Calmodulin und den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP₃-R) (Kwon et al., 2007; Tang et al., 2018). Diese Region wird auch als CIRB (Calmodulin and IP₃-receptor binding) bezeichnet (Wang et al., 2020). Letztlich bleiben noch die helikalen Strukturen CH1 und CH2, die ihrerseits verbunden sind. Die Lage von CH1 wurde bereits beschrieben. Sie verläuft horizontal und damit parallel zur Plasmamembran, bevor ihr nach einem kurzen Verbindungsstück, das nahezu rechtwinklig von ihr abgeht, die C-terminale Helix 2 (CH2) folgt (Azumaya et al., 2018; Tang et al., 2018). Die CH2 ist damit vertikal zur Plasmamembran gerichtet, weshalb sie von manchen Autoren als vertikale Helix (vertical helix, VH) bezeichnet wird - dies gilt auch für die CH1, die gemäß ihres Verlaufs, auch als horizontale Helix (horizontal helix, HH) tituiert wird (Azumaya et al., 2018). Letztlich bleibt noch eine Anmerkung bzgl. der TMD, im Speziellen hinsichtlich ihres Transmembransegments S3. Dieses ist im Vergleich zu anderen TRPC's, mit Ausnahme von TRPC3, etwa vier Windungen länger und damit eine markante Struktur von TRPC6, aber auch TRPC3 (Wang et al., 2020).

Die bislang erläuterte Architektur des TRPC6-Kanals ist äußerst komplex und kann mit Hilfe von **Abbildung 2** nochmals rekapituliert werden, wobei die zugrundeliegende Deskription zum wesentlichen Verständnis der Graphik beitragen soll.

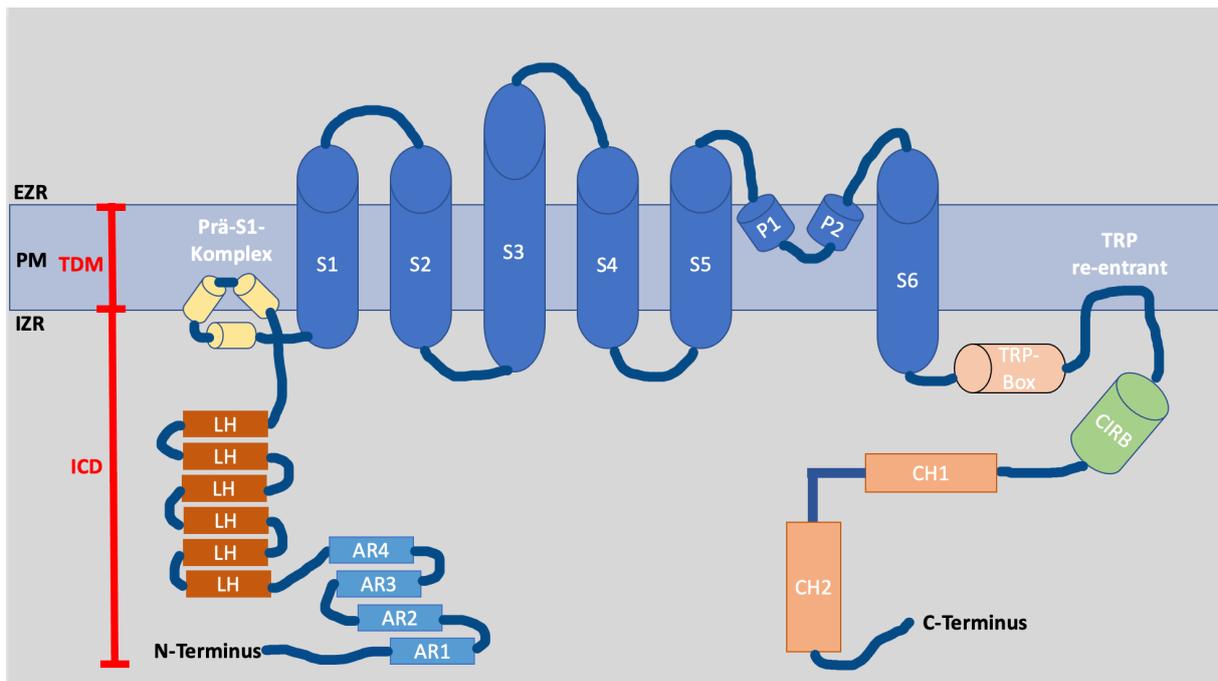


Abbildung 2 - Schematischer Aufbau einer Untereinheit des humanen TRPC6-Kanals

Erläuterungen zur Graphik sind der zugrundeliegenden Deskription zu entnehmen. EZR=Extrazellulärraum; PM=Plasmamembran; IZR=Intrazellulärraum; TDM=Transmembrandomäne; ICD=intrazelluläre zytoplasmatische Domäne; LH=Linkerhelix; AR 1-4=Ankyrin-Repeat 1-4; S 1-6=Transmembransegment 1-6; P 1-2=Porenschleife 1-2; CIRB=Calmodulin and IP₃-receptor binding; CH1=C-terminale Helix 1; CH2=C-terminale Helix 2

Diese Komplexität kommt nochmal zum Ausdruck, wenn man die Interaktion der vier Untereinheiten näher belichtet, die nicht nur für die Stabilität und Funktion des Kanals von immenser Bedeutung ist, sondern gleichzeitig auch die Bedingung darstellt, die erfüllt sein muss, um sich zum Tetramer anordnen zu können (Tang et al., 2018). Wesentlich für die Anordnung zum tetrameren Komplex ist insbesondere die Tatsache, dass die Aminosäuren des N-Terminus mit den LH's benachbarter Untereinheiten interagieren. Zudem treten die LH's mit benachbarten LH's in Interaktion (Tang et al., 2018). Des Weiteren ragt jede CH1 in einen Freiraum, der zwischen zwei Untereinheiten entsteht und sorgt hierbei, dass diese miteinander „verkleben“, was zur Stabilität beiträgt (Tang et al., 2018). Ebenso stabilisierend wirken die CH's 2, die sich zu einem vertikal gerichteten, „Vier-Helix-Bündel“ zusammenlagern (Tang et al., 2018; Wang et al., 2020). Diesen sind verstärkende, knotige Strukturen aufgelagert, die von den Verbindungsstücken der CH1- und CH2-Domänen gebildet werden (Wang et al., 2020). Letztlich besteht noch eine feste Verbindung zwischen TMD und ICD, die über die TRP-Box vermittelt wird. Diese weist eine zum Zytosol gewandte und eine zur Plasmamembran gewandte Seite auf. Die zytosolische Seite interagiert dabei mit den LH's des N-Terminus, wohingegen die der Membran zugewandte Seite mit S1, S4 und dem Verbindungsstück zwischen S4/5 der TMD in Interaktion tritt (zusammengefasst in (Tang et al., 2018)).

Damit wurden die wesentlichen strukturellen Aspekte, die zur Gewährleistung eines stabilen und funktionstüchtigen TRPC6-Kanals vonnöten sind, aufgegriffen und erläutert.

Im Folgenden soll nun noch auf die Funktion des TRPC6-Kanals eingegangen werden. Wie eingangs erläutert handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, die durch den Second Messenger Diacylglycerin (DAG) aktiviert werden (Hofmann et al., 1999). Das DAG stellt dabei ein Zwischenprodukt einer Signalkaskade dar, die durch die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (G protein-coupled receptor, GPCR) - bei TRPC6 insbesondere durch die Subtypen G_{q11} - initiiert wird (Chen et al., 2020; Rassow et al., 2016). Nach Bindung eines Liganden an der extrazellulären Seite des G-Protein-gekoppelten Rezeptors kommt es zu einer Konformationsänderung, in deren Folge das intrazellulär an den Rezeptor gebundene G-Protein aktiviert wird. Dieses besteht seinerseits aus drei Untereinheiten (α , β und γ) - deshalb auch als heterotrimeres G-Protein bezeichnet - die ihrerseits unterschiedliche Effekte hinsichtlich der Signaltransduktion entfalten. Dabei aktiviert die α -Untereinheit die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), die das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die Second Messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet. DAG hat einen lipophilen Charakter, weshalb es in der Membran verbleibt, während IP₃ lipophob ist und somit gelöst im Zytosol vorliegt (Rassow et al., 2016). Hinsichtlich des TRPC6-Kanals führt das DAG zu seiner direkten Aktivierung, was vor allem einen Calciumeinstrom von extrazellulär zur Folge hat, ohne dass die ebenfalls durch DAG aktivierte Proteinkinase C (PKC) hierauf einen Einfluss zu nehmen scheint (Dietrich et al., 2005). Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wird nicht zuletzt auch durch die Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) herbeigeführt, die einen Calciumausstrom vom ER ins Zytosol bedingt (Rassow et al., 2016). Während unter den wissenschaftlichen Arbeitsgruppen Einigkeit darüber herrscht, dass bei allen TRPC-Kanälen - somit auch TRPC6 - ein sogenannter Rezeptor-operierter Calcium-Einstrom (ROCE) erfolgen kann, wie er bei der TRPC6-Aktivierung durch DAG gegeben ist (siehe **Abbildung 3**-grüner Kasten), ist die Rolle und die Bedeutung des Speicher-operierten Calciumeinstroms (SOCE, siehe **Abbildung 3**-blauer Kasten) nicht gänzlich aufgeklärt und kontrovers umstritten (Wang et al., 2020). SOCE meint dabei, dass infolge einer Erschöpfung des intrazellulären Calciumspeichers (endoplasmatisches Retikulum) - beispielsweise nach Bindung von IP₃ an den IP₃-Rezeptor - eine Aktivierung von Calciumkanälen in der PM mit konsekutivem Calciumeinstrom erfolgt (Parekh & Putney, 2005). In diesem Prozess fungieren STIM-Proteine (stromal interaction molecule, STIM) der ER-Membran als Calciumsensoren, wobei die Messung im ER-Lumen mittels sogenannter EF-Hände erfolgt, die einen N-terminalen Bestandteil der STIM's darstellen. Fällt die Calciumkonzentration im ER-Lumen nun unter ein bestimmtes Niveau ab, kommt es zur Oligomerisierung der dimeren STIM's und vermittelt durch den im Zytosol gelegenen C-Terminus zu einer Aktivierung von so bezeichneten Orai-Kanälen, die membranständig in der PM liegen und einen Calciumeinstrom ermöglichen (zusammengefasst in (Cahalan, 2009)). Nicht zuletzt die beschriebene Assoziation zwischen STIM1, Orai1- und TRPC-Kanälen hat die Debatte um einen möglichen Speicher-operierten Calciumeinstrom (SOCE) bei TRPC6 neu entfacht. So beschrieben beispielsweise El Boustany et al. in ihrer Arbeit eben eine dieser Assoziationen hinsichtlich TRPC6 und STIM1(El

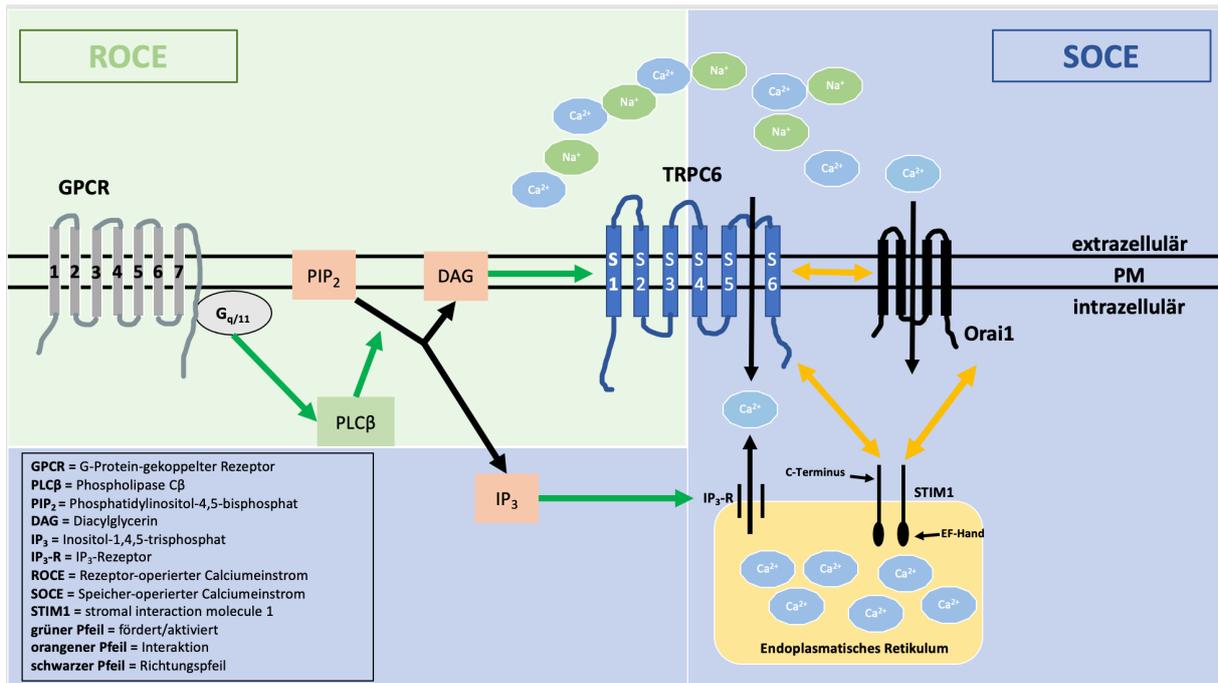


Abbildung 3 - ROCE & SOCE des TRPC6-Kanals

Die Abbildung liefert nochmal einen Überblick über funktionelle Aspekte. Weitere Beschreibung siehe Text

Boustany et al., 2008). Gestützt wurde diese Erkenntnis wenige Jahre später, als eine andere Arbeitsgruppe einen regulatorischen Effekt von STIM1 auf TRPC6 aufzeigte - dabei kam es zu einer Translokation der TRPC6-Kanäle von der PM zur ER-Membran (Albarrán et al., 2014). Diese führte zu einem reduzierten Calciumeinstrom von extrazellulär, allerdings zur vermehrten Freisetzung aus dem ER. Letztlich sind auch Assoziationen zwischen Orai1 und TRPC6 beschrieben worden (El Boustany et al., 2008; Liao et al., 2008), sodass die Annahme, dass TRPC6 nicht nur Rezeptor-operiert, sondern auch Speicher-operiert induziert werden kann, nicht ganz unbegründet erscheint. Wenngleich viele Hinweise hinsichtlich des SOCE's vorliegen, wie bereits dargelegt, so müssen künftige Arbeiten die genaue Funktion des Kanals weiter entschlüsseln und damit zum Verständnis beitragen.

Letztlich gibt es auch noch weitere Regulatoren, die die Funktion des TRPC6-Kanals beeinflussen.

Das bereits angeführte DAG fungiert beispielsweise als Aktivator, während die Inaktivierung davon unberührt bleibt (Itsuki et al., 2014). Diese wird vielmehr durch einen weiteren Regulator bedingt, dem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), dessen Abdissoziation von der Membran durch Spaltung durch die PLC dafür maßgeblich ist (Itsuki et al., 2014). Im Übrigen entfalten auch die PIP₂-Vorstufen, das Phosphatidylinositol (PI) sowie das Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP), eine hemmende Wirkung auf TRPC6 (Wang et al., 2020). Es ist allerdings zu beachten, dass PIP₂ neben seinen inhibierenden Effekten gewissermaßen - wenn auch indirekt - aktivierende Eigenschaften hat, betrachtet man die Tatsache, dass PIP₂ als Ausgangssubstrat für die DAG-Synthese unabdingbar ist (Wang et al., 2020). Ferner nehmen auch IP₃ sowie Calmodulin (CaM) regulatorischen Einfluss auf TRPC6. Dabei scheint Calmodulin wohl, vermittelt durch die Bindung an der CIRB im C-terminalen Segment, inhibierend auf den Kanal zu wirken. Allerdings wird diese Inhibierung durch IP₃ reguliert, das

seinerseits die TRPC6/CaM Interaktion stört, sodass eine Hemmung ausbleibt (Kwon et al., 2007). Letztlich beschrieben Shi et al. die komplexe und umfängliche Regulation der TRPC6-Kanäle durch Ca^{2+} , das sowohl hemmend, als auch potenzierend wirken kann (J. Shi et al., 2004).

1.2.3 Vorkommen und Bedeutung von TRPC6-Kanälen

Die im Plasmalemm bzw. Sarkolemm gelegenen TRPC6-Kanäle werden von zahlreichen menschlichen und tierischen Geweben exprimiert und sind dort an verschiedenen Prozessen beteiligt. Diese sind einerseits physiologischer Natur, andererseits sind auch Beteiligungen bei pathophysiologischen Prozessen beschrieben.

Zunächst sollen die unterschiedlichen Gewebe dargelegt werden, in denen eine Expression bislang beschrieben wurde. Diese ist in der Lunge, im Großhirn und im Ovar am ausgeprägtesten (Garcia & Schilling, 1997). Ähnliche Ergebnisse legte auch eine Arbeitsgruppe dar, die im Rahmen einer mRNA-basierten Untersuchung von menschlichem Gewebe, das stärkste Expressionsniveau ebenfalls in der Lunge detektierte, aber auch im ZNS sowie in der Plazenta (Riccio et al., 2002). Im ZNS treten die Kanäle nahezu ubiquitär auf - beispielsweise im Großhirn, Kleinhirn, Basalganglien, Hypophyse, Rückenmark, Medulla oblongata, etc. (Riccio et al., 2002; Sun et al., 2014). Zudem gelang der Nachweis im Herz, Niere, Leber, Magen, Dünndarm, Milz, Pankreas, Prostata, Knochen, Fettgewebe und glattem Muskelgewebe von Organen und Gefäßen (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Riccio et al., 2002). Neben seinem Vorkommen im Lungengewebe, wurde TRPC6 2010 auch in Alveolarmakrophagen beschrieben (Finney-Hayward et al., 2010).

Das vielfältige Auftreten impliziert auch vielfältige Funktionen, die bis heute nicht gänzlich geklärt sind. So sind TRPC6-Kanäle unter anderem im physiologischen Prozess der Kontraktion glatter Muskelzellen in Gefäßen und gleichermaßen auch in Organen beteiligt (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010). In pathophysiologischer Hinsicht sind Assoziationen mit der idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertonie (IPAH) beschrieben, wo die Kanäle durch vermehrten Calciumeinstrom wohl maßgeblich die Progression der tödlich verlaufenden Erkrankung triggern (Yamamura et al., 2020; Yu et al., 2004). Mutationen des Kanals in der Niere, speziell in den Glomeruli, sind mit der sogenannten Fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) vergesellschaftet, die durch Schädigung der Podozyten zur Proteinurie, Ödembildung und arterieller Hypertonie führt und letztlich im Nierenversagen gipfelt (Winn et al., 2005).

Auch in der Kanzerogenese nehmen TRPC6-Kanäle einen besonderen Stellenwert ein. So führt deren verstärkte Expression bei Hepatozellulärem Karzinom (HCC) zur beschleunigten Proliferation der entarteten Hepatozyten (El Boustany et al., 2008). Diese verstärkte Expression ist auch bei Patienten mit Brustkrebs (Guilbert et al., 2008) und Prostata-Karzinom (D. Yue et al., 2009) zu verzeichnen. Shi et al. konnten den starken Einfluss von TRPC6 hinsichtlich der Pathogenese des Ösophagus-Karzinoms aufzeigen und belegen, dass dessen Inhibition zur Suppression des Tumorwachstums führte (Y. Shi et al., 2009). Gleiches wurde für das hochaggressive Glioblastom dargelegt (Y. Shi et al., 2009). Das Nierenzell-Karzinom (NCC) stellt ebenso eine Entität dar, bei der es bedingt durch die TRPC6-Kanäle zu einer gesteigerten Proliferation kommt (Song et al., 2013). Auch hier konnte durch eine Hemmung der Kanäle eine deutliche Suppression der Proliferation erreicht werden.

Das Herz stellt einen weiteren Vertreter dar, in dem die nicht-selektiven Kationenkanäle vom Subtyp C6 an physiologischen aber auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt zu sein scheinen. Bei einem Versuch mit Mäusen konnte die entscheidende Rolle von TRPC6 bei Wundheilungsprozessen am Herzen, aber auch der Haut gezeigt werden. Grundlage hierfür war die durch TRPC6 getriggerte Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die für den Heilungsprozess obligat sind (Davis et al., 2012). Auch im Rahmen der Herzinsuffizienz weisen die Kanäle eine gewisse Beteiligung auf. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtete man, im Vergleich zum physiologischen Zustand, eine deutliche Hochregulation der Kanäle. Ebenso stellte man an Herzmuskelzellen von Ratten den Zusammenhang von TRPC6 und der Pathogenese der Herzhypertrophie dar (Z. Yue et al., 2015).

Die zerebrale Ischämie und der Morbus Alzheimer konnten ebenfalls mit TRPC6-Kanälen in Zusammenhang gebracht werden, wobei man bei beiden Entitäten ein Zuviel oder ein Zuwenig der Kanäle ausmachte (Prihodko et al., 2020).

Letztlich konnten auch hinsichtlich der Skelettmuskulatur Erkenntnisse gewonnen werden. Diese resultierten aus tierischen Versuchsreihen. So zeigte beispielsweise eine Arbeitsgruppe am Mausmodell, dass bei der malignen Hyperthermie, neben der Calcium-Freisetzung aus dem ER, bedingt durch eine Mutation des Ryanodinrezeptors (RyR), auch TRPC3- & 6-Kanäle maßgeblich an der enormen Steigerung der intrazellulären Calcium- und Natriumkonzentration beteiligt waren (Rafael Lopez et al., 2020). Ebenso wurde bei einer Untersuchung von Skelettmuskelfasern der Maus die Lage der TRPC6 Kanäle im Sarkolemm gezeigt und deren enorme Bedeutung für den Calciumeinstrom und damit für die muskuläre Funktion herausgearbeitet (Krüger et al., 2008).

1.2.4 Aufbau der Skelettmuskulatur

Als eines der größten Organe, stellt die humane Skelettmuskulatur die absolute Grundlage menschlichen Lebens dar, wobei die Bezeichnung daher rührt, dass diese Muskeln an skelettalen Elementen entspringen und/oder ansetzen - bis auf wenige Ausnahmen (Schiebler, 2005). Ohne das komplexe Zusammenspiel einzelner Muskeln oder gar Muskelgruppen wären für uns selbstverständliche Haltungen, wie das Sitzen, Stehen oder Gehen schlichtweg nicht möglich - ganz zu schweigen von feineren Bewegungen, wie beispielsweise dem Greifen nach Gegenständen. Auch die Aufrechterhaltung wesentlicher Lebensfunktionen, wie das Atmen wäre undenkbar, beachtet man, dass die zur Atmung notwendigen Muskeln, wie das Zwerchfell oder die Interkostalmuskulatur - nur um einige zu nennen - ebenso einen Teil der Skelettmuskulatur darstellen. Es bedarf also eines besonderen Aufbaus der Muskulatur, um diese mechanischen Leistungen erbringen zu können.

Den kleinsten Baustein eines jeden Skelettmuskels bilden die Myofilamente, die man in Aktin- und Myosinfilamente unterteilt. Aktin-Monomere sind globuläre Proteine (G-Aktin), die im Rahmen der Synthese zu großen Filamenten (F-Aktin) polymerisieren. Genauer gesagt, entstehen auf diese Weise zwei spiralförmig verlaufende, in sich verdrehte Stränge, in deren Zwischenräumen sich sogenannte Tropomyosin- und Troponinmoleküle einlagern. Das langgestreckte Tropomyosin verdeckt dabei auf gesamter Länge des Aktinfilamentes Bindungsstellen für das Myosin, sodass eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin verhindert wird, und verfügt in regelmäßigen Abständen über angelagerte Troponinkomplexe. Letztere treten mit Calciumionen in Interaktion und sind somit maßgeblich am Prozess der Muskelkontraktion beteiligt (siehe Kapitel 1.2.5 Physiologie der Muskelkontraktion). Insgesamt sind Aktinfilamente dünner als die wesentlich kräftigeren Myosinfilamente. Diese bestehen aus zahlreichen Myosinmolekülen, die ihrerseits aus einem stabförmigen Schaft, einem beweglichen Hals und einem rundförmigen Kopf gebildet werden. Die Schäfte der Moleküle winden sich helixartig zu kräftigen Bündeln zusammen, aus denen seitlich die flexiblen Hälse und die anknüpfenden Köpfe herausragen (**Abbildung 4**). Letztere verfügen über Bindungsstellen für Aktin, aber auch ATP (Schiebler, 2005; Zimmer et al., 2021).

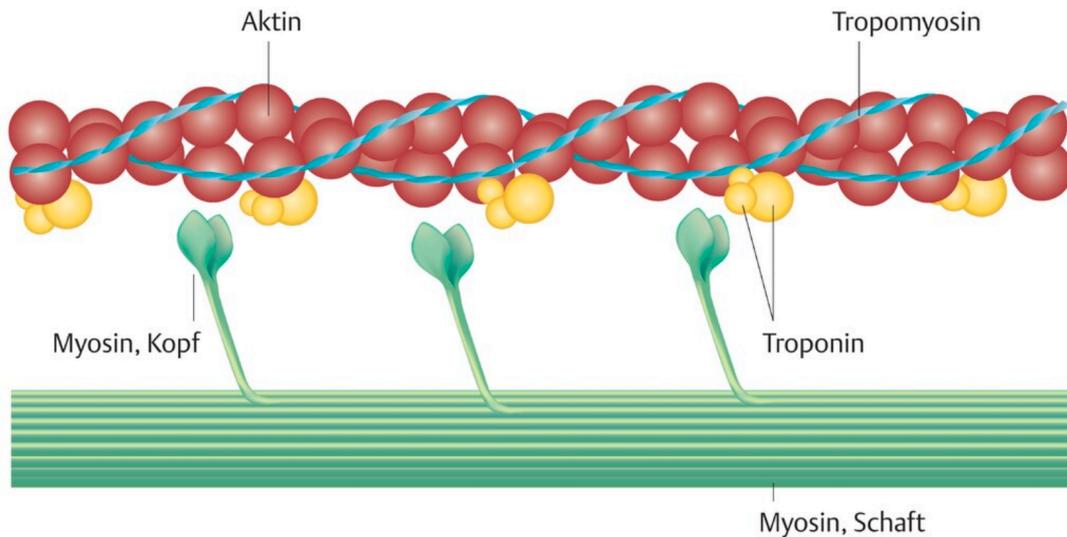


Abbildung 4 - Aufbau des Aktins und Myosins

Abbildung aus Aumüller et al., 2020 (Duale Reihe Anatomie). Dargestellt ist der Aufbau der Muskelfilamente Aktin und Myosin. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Im humanen Skelettmuskel weisen die Myofilamente eine charakteristische Anordnung auf, aus der auch das typische, quergestreifte Muster hervorgeht. Daher rührt auch die Zuordnung des Skelettmuskels zur Gruppe der quergestreiften Muskulatur. Betrachtet man das Gewebe unter dem Lichtmikroskop, so sind hellere Banden, als I-Banden bezeichnet, und dunklere Banden, als A-Banden bezeichnet, ersichtlich. Die I-Banden sind mittig nochmals durch die sogenannten Z-Streifen (Zwischenstreifen) geteilt. In ihm sind die parallelverlaufenden Aktinfilamente über verschiedene Proteine verankert. Die A-Bande weist in ihrer Mitte ebenfalls einen Streifen auf, den sogenannten M-Streifen. Auch dort findet eine Verankerung von Myofilamenten statt - in diesem Fall die der Myosinfilamente. Diese sind ebenfalls parallel angeordnet. In der Peripherie überlappen die kräftigen Myosin- und die dünnen Aktinfilamente und sind damit in der Lage miteinander zu interagieren. Das Ausmaß der Überlappung ist dabei abhängig vom Kontraktionszustand der Muskulatur. Weiterhin ist anzumerken, dass sich peripher insbesondere die beweglichen Hälse und Köpfe der Myosinfilamente befinden, während proximal lediglich die Schäfte zu finden sind. Die Bereiche der Myosinfilamente, die nicht durch die Aktinfilamente überlappt werden, werden der sogenannten H-Zone zugerechnet. Schließlich bildet der Bereich zwischen zwei Z-Streifen ein sogenanntes Sarkomer. Es misst etwa 2,5-3µm und stellt die kleinste funktionelle Einheit des Skelettmuskels dar (Aumüller et al., 2020; Schiebler, 2005; Zimmer et al., 2021).

Mehrere Myofilamente bzw. Sarkomere vereinigen sich zu größeren Myofibrillen, wobei mehrere Myofibrillen Großteile einer Muskelfaser ausfüllen. Die Begriffe Muskelfaser und Muskelzelle sind synonym zu verwenden. Eine Muskelzelle geht embryologisch gesehen aus der Fusion zahlreicher einkerniger Myoblasten hervor. Daher kann sie ca. 100 Zellkerne enthalten, eine Länge von 15-20 cm und einen Durchmesser von 10-100µm erreichen - man spricht in diesem Zusammenhang auch von vielkernigen Riesenzellen. Sie sind von einer Plasmamembran umgeben, die man im Bereich der

Muskulatur auch als Sarkolemm bezeichnet. Das Zytoplasma bezeichnet man entsprechend als Sarkoplasma, das endoplasmatische Retikulum (ER) als sarkoplasmatisches Retikulum (SR) und die Mitochondrien als Sarkosomen. Aufgrund der Masse an Myofibrillen werden die Zellkerne an den Rand der Muskelzelle gedrängt. An den Übergängen von I- zu A-Bande befinden sich sogenannte T-Tubuli (transversale Tubuli). Dabei handelt es sich um Einbuchtungen des Sarkolemm, die tief in die Muskelzelle ragen und für die Weiterleitung von Erregungen auf die Muskulatur bedeutsam sind. Davon abzugrenzen sind die longitudinal verlaufenden L-Tubuli, die das SR darstellen. Sie sind die Calciumspeicher der Muskelzelle und bilden ebenfalls im Bereich zwischen I- und A-Bande sogenannte Terminalzisternen. Damit wird jeder T-Tubulus von zwei Terminalzisternen begleitet, wodurch nach erfolgter Erregung relativ rasch eine Calciumfreisetzung erreicht werden kann. Diese ist für die Muskelkontraktion entscheidend. Die Anordnung von T-Tubulus und zwei angrenzenden Terminalzisternen wird auch als Triade bezeichnet (Aumüller et al., 2020; Schiebler, 2005; Zimmer et al., 2021). Die beschriebenen Sachverhalte können nochmals anhand von **Abbildung 5** rekapituliert werden.

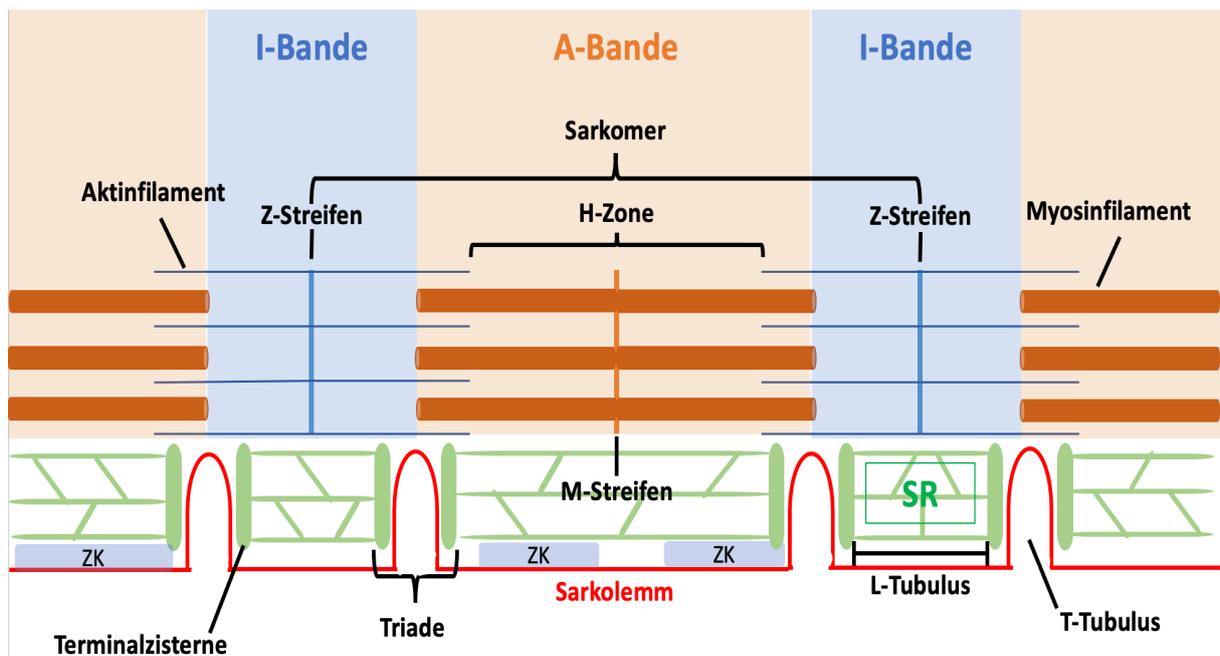


Abbildung 5 - Schematischer Teilausschnitt einer Skelettmuskelzelle

SR=sarkoplasmatisches Retikulum; ZK=Zellkern; Erläuterungen siehe Text

Muskelzellen bzw. Muskelfasern sind ihrerseits von einer Hüllschicht umgeben, dem Endomysium. Es enthält, wie alle folgenden Hüllschichten, Gefäße und Nerven zur Versorgung der Muskulatur. Mehrere Muskelfasern lagern sich zum Primärbündel zusammen, das vom Perimysium internum umgeben ist. Primärbündel wiederum lagern sich zu größeren Sekundärbündel zusammen, die ihrerseits vom Perimysium externum umgeben werden. Schließlich werden mehrere Sekundärbündel vom Epimysium, der äußersten Hüllschicht, umgeben, wodurch das Tertiärbündel entsteht. Das Epimysium ist Bestandteil der derben Muskelfaszie, die fast alle Skelettmuskeln umgibt (Aumüller et al., 2020).

1.2.5 Physiologie der Muskelkontraktion

Damit ein Skelettmuskel willkürlich kontrahieren kann, ist eine Erregung notwendig. Diese wird über das Nervensystem vermittelt, wobei Nervenzellen im Bereich der Großhirnrinde die Initiatoren darstellen. Man spricht dabei auch vom 1. Neuron, oder in diesem Zusammenhang vom 1. Motoneuron. Sie generieren ein Aktionspotential, das sie auf die 2. Motoneurone (=α-Motoneurone), welche im Hirnstamm und Rückenmark gelegen sind, übertragen. Diese wiederum leiten das ankommende Aktionspotential an die entsprechenden Muskeln, die kontrahieren sollen, weiter (Müller & Graeve, 2014). Dies gelingt über die endständigen Synapsen der Nerven, die direkt mit den Skelettmuskeln in Verbindung stehen und die sogenannte motorische Endplatte konstituieren. Dabei ist zu sagen, dass ein einzelnes α-Motoneuron über synaptische Verbindungen mehrere Muskelfasern versorgen und diese damit aktivieren kann. Das α-Motoneuron und die von ihm innervierten Muskelfasern werden auch als motorische Einheit zusammengefasst (Müller & Graeve, 2014). Erreicht nun ein ausreichend starkes Aktionspotential die motorische Endplatte, so kommt es infolge der Erregung zur Freisetzung von mit Acetylcholin (ACh) gefüllten Vesikeln aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt. Das ACh vermag nun an die nicotineren Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) der Postsynapse, also des Sarkolemms der Skelettmuskulatur, zu binden. Dabei handelt es sich um ligandenaktivierte Na⁺-Kanäle. Deren Aktivierung induziert einen Na⁺-Einstrom in die betroffene Muskelzelle und führt damit zur Depolarisation. Gleichzeitig führt die Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle des Sarkolemms, wodurch sich die Erregung rasch über die gesamte Membran ausbreiten kann (Müller & Graeve, 2014). Die Erregung erreicht auch die T-Tubuli, in denen vor allem membranständige Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) gelegen sind. Bei ihnen handelt es sich um spannungsgesteuerte L-Typ-Ca²⁺-Kanäle. Bedingt durch die Depolarisation des Sarkolemms kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoren, die einerseits einen Einstrom von Calcium bewirkt, andererseits eine direkte Protein-Protein-Interaktion ermöglicht. Diese erfolgt zwischen den DHPR und den in der Membran des SR ansässigen Ryanodinrezeptoren (RyR). In der Skelettmuskulatur ist der Subtyp 1 (RyR1) vorherrschend. Auch hierbei handelt es sich um Ca²⁺-Kanäle. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Interaktion mit dem DHPR, sodass es zu einem massiven Ca²⁺-Ausstrom vom SR ins Sarkoplasma der Skelettmuskelzelle kommt. Von anfänglich 10⁻⁷ mol/l Ca²⁺ steigt die Konzentration auf etwa 10⁻⁵ mol/l (Behrends et al., 2021; Rassow et al., 2016). Das Calcium, das nun in ausreichender Konzentration im Sarkoplasma vorliegt, bindet an die Troponinkomplexe der Aktinfilamente, speziell an die Untereinheit C (Troponin C), wobei pro Komplex bis zu 4 Calciumionen gebunden werden können. Nach erfolgter Bindung ändert sich auch in diesem Fall die Konformation des Troponinkomplexes, der durch seine Anheftung am Tropomyosin dieses zur Seite verlagert und damit die Bindungsstellen für Myosin freigibt (Rassow et al., 2016). Im Kopfteil des Myosins, der neben seiner Aktinbindungsstelle auch eine Bindungsstelle für ATP aufweist, kommt es zunächst zur Hydrolyse des ATP's zu ADP und Phosphat, mit der Konsequenz, dass sich die Myosinköpfechen in eine 90°-Stellung begeben. So sind sie nun in der Lage an die freigewordenen Bindungsstellen der Aktinfilamente zu binden - es entsteht das Aktomyosin.

Nun kommt es zur Freisetzung des durch die Hydrolyse entstandenen Phosphats, was dazu führt, dass das Myosinköpfchen von seiner 90°-Ausgangsstellung um etwa 40° abknickt - es kommt zum Kraftschlag. In der Folge wird auch das ADP freigesetzt, sodass die ATP-Bindungsstelle des Myosinkopfes nun freiliegt und zusätzlich um weitere 5° abkippt. Damit befindet sich das Myosinköpfchen nun in einer 45°-Stellung. Erst bei einer Bindung von ATP löst sich die feste Verbindung zwischen dem Aktin und Myosin, die im Rahmen dieses Prozesses entstanden ist. Hat dieses gebunden, kommt es nochmal zur Hydrolyse, sodass sich das Myosinköpfchen wieder in seine Ausgangsstellung begeben kann. Der Zyklus, der gerade beschrieben wurde, wird auch als Querbrückenzyklus bezeichnet. Er kann 10-100-mal pro Sekunde ablaufen, wobei eine ausreichende Calciumkonzentration vonnöten ist (s.o.). Ziel des Zyklus ist ein Entlangleiten des Aktins am Myosin und damit eine Verkürzung der Sarkomere bzw. schlussendlich auch des gesamten Muskels. Zu beachten ist dabei, dass die Filamente sich dabei nicht verkürzen (Behrends et al., 2021; Rassow et al., 2016).

Damit der Skelettmuskel nicht in einer Dauerkontraktion verbleibt, bedarf es Mechanismen, die diese terminieren. So ist eine Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration ein effektiver Mechanismus. Diese wird zum einen durch die sogenannte Ca^{2+} -ATPase erreicht, die in der Membran des SR gelegen ist und Calciumionen aus dem Sarkoplasma ins SR pumpt, zum anderen vom $3\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ -Antiporter des Sarkolems, der drei Na^{+} -Ionen in die Zelle schleust und dabei ein Ca^{2+} -Ion ausschleust (Rassow et al., 2016). Detailliertere Erklärungen sind einschlägigen Lehrbüchern zu entnehmen.

Am Prozess der Muskelkontraktion und Lösen der Kontraktion spielt, wie erläutert, das Calcium eine entscheidende Rolle. Es wäre denkbar, dass TRPC6 Kanäle an diesem Prozess beteiligt sind und möglicherweise durch ihre Lage im Sarkolemm, insbesondere im Bereich der T-Tubuli, einen Calciuminflux ermöglichen. Dieser Sachverhalt konnte noch nicht für menschliches Skelettmuskelgewebe, aber für Skelettmuskelgewebe der Maus gezeigt werden (Krüger et al., 2008).

1.2.6 Ziele der Arbeit

Das zentrale Ziel der Arbeit bestand darin, den immunhistochemischen Nachweis von TRPC6-Kanälen im humanen Skelettmuskelgewebe zu erbringen. Vor diesem Hintergrund wurde Muskelgewebe von zwei formalinfixierten, vier NEP-fixierten und zwei unfixierten Körperspendern, mit einem postmortalen Intervall von <72h, untersucht. Der Quantifizierung der Ergebnisse diente dabei der immunhistochemische Nachweis mittels Anti-TRPC6-Primärantikörper und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper. Zur Spezifizierung erfolgte zudem eine einmalige Kontrollpeptidinkubation des Primärantikörpers. Im Allgemeinen waren folgende Fragestellungen von Bedeutung:

1. Sind TRPC6-Kanäle im Skelettmuskelgewebe der formalinfixierten Körperspender (n=2) mittels Immunhistochemie (IHC) nachweisbar? Sind die Resultate innerhalb dieser Gruppe übereinstimmend?
2. Sind TRPC6-Kanäle im Skelettmuskelgewebe der NEP-fixierten Spender (n=4) mittels IHC nachweisbar? Sind die Resultate innerhalb dieser Gruppe übereinstimmend?
3. Sind TRPC6-Kanäle im Skelettmuskelgewebe der unfixierten Spender (n=2) mittels IHC nachweisbar? Sind die Resultate innerhalb dieser Gruppe übereinstimmend?
4. Stimmen die Resultate der einzelnen Gruppen miteinander überein bzw. sind diese miteinander in Einklang zu bringen?
5. Gibt es hinsichtlich der IHC Unterschiede zwischen den vier ausgewählten Muskeln?
6. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede im Hinblick auf die IHC?

III. Material und Methodik

3. Geräte und Material

Die zur Bearbeitung des Probenmaterials erforderlichen Materialien umfassten neben verschiedenen Geräten auch Chemikalien, Lösungen, Antikörper und letztlich sonstige Verbrauchsmaterialien. Im Folgenden sollen diese in eigenen Kapiteln aufgelistet werden. Deren Verwendung ist Gegenstand der darauffolgenden Kapitel.

1.3.1 Geräteliste

Geräte	Hersteller
Kühlanlage für Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Karussell Gewebereinbettter MTP	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin Ausgießstation MPS/P1	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlplatte MPS/C	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Dispenser	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2025	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
GFL Paraffinbad 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
VWR Heizplatte W10 für Histologie-Objekträger	Kunz Instruments, Sandelsgatan, Schweden
Digitaler VWR INCU-Line IL 56 Inkubator	VWR International, Pennsylvania, USA
Wärme-/Trockenschrank VT6025	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Labor-Abzugshaube Captair®Flex® M321	Erlab®group, Val-de-Reuil Cedex, Frankreich
UHP Einkanalpipette 20 – 200µl 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortexer-Vortex Mixer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Nikon ECLIPSE E200 LED Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Tabelle 2 - Übersicht der eingesetzten Geräte

1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Sterile Skalpellklingen Nr.22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Discofix® Drei-Wege-Hahn	Ref.: 4095111, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bovivet Einmalkanülen 14G 2,1x60mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark
ACU-Punch® Biopsie-Stanze 8/10mm	Acuderm inc., Fort Lauderdale, USA
Einbettkassetten Macro, weiß	Ref.: M512, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
PROLENE 1,0 Nahtmaterial	Ethicon US LLC, Cincinnati, USA
Einbettringe	Ref.: M460, Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Roti® -Plast Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen DB80	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Filterpapiere	Ref.: 534018, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Histologischer Kleber Roti-Histokitt©	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 22x22mm / 24x50mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DakoPen Fettstift	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Pipettenspitzen 20 – 200µl 100 – 1000µl	VWR International, Pennsylvania, USA
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR® Tubes 15ml Zentrifugenröhrchen 50ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 3 - Übersicht der eingesetzten Verbrauchsmaterialien

1.3.3 Chemikalien und Lösungen

Lösungen/Chemikalien	Hersteller
Formalinlösung nach Basler	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
NEP-Lösung nach Weigner	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 -3,7%	Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Roti®fair 10x PBS 7.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol 97%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Methylbenzoat 99%	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
Xylol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 0,1%	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
100x Citratpuffer pH6	Abcam (ab93678)
NGS-Blockierlösung	Merck KGaA, Deutschland
Kaninchenserum	Ref.: A10547; Life Technologies AG, Carlsbad, USA
TRPC6-Antigen Kontrollpeptid	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Wasserstoffperoxid 35%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT DAB EqV	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Bestellnummer: SK-4103)

Tabelle 4 - Übersicht der eingesetzten Chemikalien und Lösungen

1.3.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Primärantikörper: Anti-TRPC6-Antikörper	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper: HRP goat anti rabbit	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA

Tabelle 5 - Übersicht der eingesetzten Antikörper

4. Probenmaterial

Die humane Skelettmuskulatur stellte für die zugrundeliegende Arbeit das Probenmaterial dar. Dieses wurde teilweise von Körperspendern des hiesigen Anatomischen Institutes, teilweise im Rahmen von Sektionen von Patienten des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Homburg gewonnen. In diesem Kapitel sollen die einzelnen Arbeitsschritte dezidiert in chronologischer Reihenfolge aufgelistet und beschrieben werden.

1.4.1 Ethikvotum

Für die Durchführung dieser Studie wurde ein Ethik-Votum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes eingeholt. Für die Untersuchung von Ionenkanälen in Geweben von Körperspendern des Anatomischen Institutes lautet die Kenn-Nummer 163/20. Die Untersuchung von Ionenkanälen von Gewebeproben aus Sektionen des Pathologischen Institutes fußt auf dem Ethik-Votum mit der Kenn-Nummer 130/21.

1.4.2 Allgemeiner Prozess der Probenverarbeitung

In dieser Arbeit wurden histologische Schnittpräparate gefertigt. Deren Erstellung folgte dabei einem festen Schema, das *Abbildung 6* entnommen werden kann.

Alle Arbeitsschritte - Fixieren der Spender, Gewebeentnahme, Gewebe-Fixierung, Einbetten, Schneiden, Färben, Eindecken - wurden eigenständig durchgeführt. Lediglich die Gewebeentnahme, die Fixierung und das Einbetten der Gewebeproben aus den Sektionen des Pathologischen Institutes wurden nicht selbstständig durchgeführt. Ebenso das Schneiden dieser Proben, da hierfür ein bestimmtes Mikrotom vonnöten war.



Abbildung 6 - Prozesse der Probenverarbeitung

1.4.3 Körperspende am Universitätsklinikum Homburg

Jährlich erreichen etwa 100 Körperspenden die Prosektur des Anatomischen Institutes der Universitätsklinik Homburg. Sie haben sich allesamt zu Lebzeiten intensiv mit dem Gedanken befasst, sich nach dem Ableben der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen. Dazu muss zuvor eine Aufnahme der möglichen Körperspender auf die Spenderliste erfolgt sein, die meist weit vor dem Tod im Zustand geistigen Wohlbefindens stattfand. Die Aufnahme der Interessenten wird durch das Team rund um den Prosektor, Prof. Dr. Thomas Tschernig, realisiert. Nach Eintritt des Todes wird der Spender/die Spenderin durch ein Bestattungsunternehmen in die Räumlichkeiten der Prosektur verbracht und in

dafür vorgesehene Kühlanlagen umgelagert. Diese sind auf etwa -6°C temperiert und sollen dem Prozess der Verwesung entgegenwirken. Zudem schafft die Kühlung optimalere Bedingungen für eine mögliche Konservierung - auch Fixierung genannt. Bevor letztere eingeleitet werden kann, muss zwingend nochmal eine ärztliche Leichenschau erfolgen. Ergeben sich hierbei keine Auffälligkeiten, so kann der nächste Arbeitsschritt, die Fixierung, eingeleitet werden. Dazu ist es allerdings vonnöten zu differenzieren, für welche Zwecke der Spender/die Spenderin genutzt werden soll. Spender, die dem jährlich stattfindenden Präparationskurs im 3. Semester des Medizinstudiums dienen, müssen anders fixiert werden, als ein Spender der für einen Operationskurs genutzt wird. Generell finden in Homburg die Formalin- und die NEP-Fixierung regelhaft Anwendung. Näheres dazu wird in den Kapiteln 1.4.5 sowie 1.4.6 beschrieben.

Neben den Präparations- und Operationskursen, werden die Spender auch für wissenschaftliche Arbeiten genutzt. Bereits hier zeigt sich die enorme Bedeutung und Wichtigkeit der Körperspende für die medizinische Aus- und Weiterbildung, aber auch für die Forschung.

Daher bin ich in den Körperspendern/ -spenderinnen und deren Familien zu großem Dank verpflichtet und zolle ihnen jeglichen Respekt dafür, dass Sie den Studentinnen und Studenten, den bereits praktizierenden Ärztinnen und Ärzten und letztlich auch mir, eine derartige Möglichkeit der Aus-, Weiter- und Fortbildung sowie wissenschaftlichen Arbeitens bieten.

1.4.4 Übersicht der Spender

In diesem Kapitel soll eine kurze Übersicht der genutzten Spender erfolgen. Dabei wird neben dem Geburtsjahr auch das Geschlecht, der Todeszeitpunkt, das Eintreffen in der Prosektur, der Zeitpunkt der Fixierung sowie das Fixationsmittel dargelegt (*Tabelle 6*).

Die Verstorbenen, die dem Pathologischen Institut zugeführt wurden, wurden zeitnah nach Eintritt des Todes obduziert, sodass beide genutzten Spender ein postmortales Intervall von kleiner als 72 Stunden aufwiesen. Genauere Informationen, beispielsweise hinsichtlich des Geschlechts, etc., konnten nicht eruiert werden. Insgesamt fiel lediglich ein Spender - Spender 3 - aus diesem Intervall heraus. Hier betrug die Zeit zwischen Todeseintritt und Fixierung mehr als 72 Stunden, wobei der Spender wenige Stunden nach dem Tod bereits bei -6°C in der Kühlanlage der Prosektur gelagert wurde.

Spender	Geburtsjahr	Tod	Ankunft	Fixierung	Fixierlösung	Geschlecht
Spender 1	1928	25.07.18	26.07.18	27.07.18	Formalin	weiblich
Spender 2	1949	05.08.18	07.08.18	07.08.18	Formalin	männlich
Spender 3	1944	25.02.21	25.02.21	01.03.21	NEP	weiblich
Spender 4	1945	04.03.21	05.03.21	06.03.21	NEP	männlich
Spender 5	1938	20.04.21	20.04.21	21.04.21	NEP	männlich
Spender 6	1937	27.04.21	27.04.21	28.04.21	NEP	weiblich
Spender 7	ub	ub	ub	keine	keine	ub
Spender 8	ub	ub	ub	keine	keine	ub

Tabelle 6 - Übersicht der genutzten Spender

ub=unbekannt

1.4.5 NEP-Fixierung

Eine im Gebiet der Konservierung von menschlichem und tierischem Gewebe inzwischen fest etablierte Methode ist die sogenannte NEP-Fixierung nach Weigner (Janczyk et al., 2011), die nicht nur eine sehr gute Alternative zur Formalinfixierung darstellt (Klopfleisch et al., 2012), sondern für manche Anwendungen sogar Vorteile bietet. NEP steht dabei für Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol, was die Hauptbestandteile der Lösung darlegt. Am hiesigen Anatomischen Institut werden NEP-konservierte Spender insbesondere für Operationskurse genutzt, da diese nach Fixierung einen sehr guten Erhalt der Organstrukturen und eine für die Kurse wichtige, weiche Konsistenz aufweisen, die der eines lebenden Menschen gleichkommt. Dadurch ergeben sich realitätsnahe Verhältnisse, die ein entsprechend realitätsnahes Ausbilden ermöglichen.

Die Konservierung von Körperspendern im Anatomischen Institut der Universitätsklinik Homburg läuft nach einem festen Protokoll ab, welches im Folgenden näher erläutert werden soll.

Nach vollständiger Entkleidung, die auch für die letzte Leichenschau obligat ist, werden die Spender gewogen und das Gewicht dokumentiert. Anschließend werden alle Gegenstände, die sich am Spender befinden (z.B. Pflaster, Schmuck, Verbände, etc.) oder in ihn hineinragen (z.B. Ernährungssonde) entfernt. Zudem erfolgt eine Rasur der Kopf- und Körperbehaarung bevor die Spender mit sogenannten Journalnummern (JNR) versehen werden. Dabei handelt es sich um eine vierstellige Zahlenkombination, die einen ständigen Rückschluss auf die Identität des vorliegenden Spenders ermöglicht. Die Journalnummern werden dabei jeweils an beiden Ohren, an beiden Zeigefingern und an beiden großen Zehen angebracht. Nach den vorbereitenden und kennzeichnenden Maßnahmen kann die eigentliche Fixierung begonnen werden. Dazu wird die rechtsseitige Arteria femoralis (A.femoralis) am medialen, mittleren Oberschenkel nach Eröffnung der Haut mittels Skalpell aufgesucht und freigelegt. Das Gefäß wird mit einer vertikal zur Laufrichtung gerichteten Inzision eröffnet und in der Folge mit zwei Venenverweilkanülen, die ein Knopfende aufweisen und über einen zwischengeschalteten Drei-Wege-Hahn einem Schlauchsystem aufgeschraubt sind, kanüliert. Die Kanülierung erfolgt dabei in anterograder und retrograder Richtung. Um ein Verrutschen der Verweilkanülen zu verhindern, werden diese mithilfe von Arterienklemmen fixiert. Das Schlauchsystem leitet dabei die Fixierlösung, die in einem Behältnis (Eimer oder Kanister) aufbewahrt wird. Dies wird durch eine in das Behältnis eingebrachte Pumpe ermöglicht. Die Pumpe generiert hierzu Drücke zwischen 1-2 bar, mit denen die NEP-Lösung ins Gefäßsystem gedrückt wird. Einige Gebiete können auf diese Art nicht bzw. nur unzureichend erreicht werden und müssen gesondert mittels 18G Einmalkanüle durch Injektion der entsprechenden Region nachfixiert werden. Hierzu wird das Gebiet mit der Kanüle punktiert und Fixierlösung ins Gewebe injiziert, wo es sich dann verteilen kann. Ferner handelt es sich bei diesen Regionen um die gesamten Extremitäten, die Regio nuchae, die Regio glutealis sowie die Finger- und Zehenbeeren. Auch im beschriebenen Fall ist die Kanüle über einen Drei-Wege-Hahn mit dem Schlauchsystem verbunden. Da bei diesem Prozess die Fixierlösung in den Spender injiziert wird, spricht man hierbei auch von der inneren Konservierung bzw. Perfusionsfixierung. Für diese werden

pro Spender etwa 10-15l Fixationslösung benötigt. Die infundierte Menge an Lösung ist ebenfalls zu dokumentieren.

Der inneren folgt die sogenannte äußere Konservierung - auch als Immersionsfixierung bezeichnet. Im Falle der NEP-Fixierung wird der Spender hierfür in eine Wanne eingelegt, die mit einem Gemisch aus 3%Formalin und NEP-Lösung besteht. Dort verbleibt er wenige Tage bis maximal drei Monate, bevor er dann den Kursen zur Verfügung gestellt werden kann. Nachdem dann alles dokumentiert und alle verwendeten Utensilien gereinigt wurden ist die NEP-Konservierung abgeschlossen.

Im Rahmen meiner Dissertation und auch unabhängig davon konnte ich, nach einer Einarbeitung durch eine erfahrene Kollegin, zahlreiche der beschriebenen Konservierungen eigenhändig und selbstständig durchführen. Das Ergebnis wurde immer wieder durch eine erfahrene Kollegin begutachtet.

1.4.6 Formalinfixierung

Ebenso weit verbreitet ist die Formalinfixierung. Diese eignet sich, um Spender über einen sehr langen Zeitraum haltbar zu machen. Derartig fixierte Spender finden insbesondere in den Präparationskursen der Studenten Anwendung. Im Vergleich zur NEP-Fixierung sind die Organsysteme hierbei verhärtet, die Morphologie und Farbe verändert, sodass ein dezenter Unterschied zum Normalzustand besteht.

Auch besteht ein Unterschied in der Vorgehensweise der Fixierung, wenngleich dieser minimal ist. Die beschriebene Konservierung wird ebenfalls nach Protokoll durchgeführt, welches in großen Teilen dem der NEP-Fixierung entspricht. Die Differenzen sollen im Folgenden erläutert werden.

Die vorbereitenden und kennzeichnenden Maßnahmen entsprechen denen des bereits beschriebenen Protokolls. Der erste Unterschied besteht in der genutzten Lösung, die über die A. femoralis infundiert wird. Hierbei dient die Basler Lösung nach Kurz als Fixationsmittel für die innere Konservierung. Für die äußere Konservierung in der Wanne, wird der Leichnam für mindestens 4 Monate lediglich in 3-5%iger Formalinlösung gelagert. Anschließend erfolgt die Aufbewahrung des Spenders in luft- und wasserdicht verschweißtem Pharopack-Sarg (Foliensarg) in der sogenannten Thalheimer Kühlung bei etwa 14°C. Die Lagerung ist hierbei über einen längeren Zeitraum möglich, wobei alle 3 Monate die Folien-Särge geöffnet und einer Begutachtung unterzogen werden. Dies dient dazu mögliche Fäulnisprozesse oder sonstige Veränderungen frühzeitig zu detektieren und entsprechend zu handeln.

Somit stellen die Nutzung anderer Lösungen bei der inneren und äußeren Konservierung, sowie die Lagerung bzw. Lagerungszeiten die wesentlichen Unterschiede in Bezug auf die NEP-Konservierung dar.

Wie bereits bei der NEP-Fixierung beschrieben, führte ich auch die Formalinfixierung eigenhändig und selbstständig durch. Vor Abschluss des Prozesses erfolgte immer wieder eine Begutachtung des Resultats durch eine erfahrene Kollegin.

1.4.7 Auswahl der Proben

Für die zugrundeliegende Dissertation wurden Gewebeproben der humanen Skelettmuskulatur genutzt, die vom Leichnam der einzelnen Spender entnommen werden konnten.

Zunächst erfolgte dazu eine Auswahl von Muskeln. Dabei fiel die Entscheidung auf die Mm. Trizeps brachii, deltoideus, pectoralis major et rectus femoris. Die vier genannten Muskeln boten den Vorteil, dass sie recht oberflächlich gelegen und damit gut zugänglich waren. Zudem wurde bei der Auswahl berücksichtigt, dass es sich um Muskeln handelt, die einerseits im alltäglichen Leben viel beansprucht werden, andererseits sollten Repräsentanten der oberen und unteren Extremität sowie des Rumpfes gegeben sein. Im Anschluss überlegte ich mir, bei welchem Muskel, welche Entnahmestelle gewählt werden sollte, um auch eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Als Entnahmestelle des M. trizeps brachii diente dabei das Caput longum, speziell sein mittleres Segment. Die Entnahme von Proben des M. deltoideus erfolgte zwei Querfinger unterhalb des lateralen Randes des Acromions. Beim M. pectoralis major wurde die Stelle drei Querfinger oberhalb der Mamille gewählt - bei weiblichen Spenderinnen entsprechend oberhalb der gedachten Mamillarlinie. Die Probenentnahme am M. rectus femoris wurde in seinem mittleren Segment durchgeführt.

Generell erfolgte die Entnahme stets auf der rechten Seite der Körperspenden.

Eine Zusammenfassung kann *Tabelle 7* entnommen werden.

Muskel	Entnahmeseite	Entnahmeort	Grund der Auswahl
M. trizeps brachii	rechtsseitig	▪ mittleres Segment des Caput longum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ oberflächliche Lage ▪ gute Zugänglichkeit ▪ starke Beanspruchung ▪ Repräsentanten verschiedener Körperregionen
M. deltoideus		▪ zwei Querfinger unterhalb des lateralen Randes des Acromions	
M. pectoralis major		▪ drei Querfinger oberhalb der Mamille	
M. rectus femoris		▪ mittleres Segment	

Tabelle 7 - Übersicht der Probenauswahl

Ferner wurden für die Studie acht Körperspenden (n=8) eingeschlossen, wobei zwei unfixiert, vier NEP-fixiert und zwei weitere formalinfixiert waren. Nachdem die Auswahl der Muskeln getroffen war und deren Entnahmestellen feststanden, konnte ich im nächsten Arbeitsschritt die Proben entnehmen.

Der Prozess der Probengewinnung ist Bestandteil des nächsten Kapitels und soll dort näher erläutert werden.

5. Probenverarbeitung

1.5.1 Probengewinnung

Die Probenentnahmen der bereits im vorangegangenen Kapitel aufgelisteten Skelettmuskeln erfolgte, mit Ausnahme der Entnahme an den beiden unfixierten Spendern, eigenständig.

Freundlicherweise führte Prof. Dr. Schulz-Schaeffer, Direktor des Neuropathologischen Instituts des Universitätsklinikums Homburg, im Rahmen zweier Sektionen Probeentnahmen an zwei unfixierten Leichnamen durch. Dazu trennte er mittels Skalpell Gewebestücke gemäß der beschriebenen Entnahmeorte (Kapitel 1.4.7) heraus und ließ diese durch das Labor des hiesigen Pathologischen Instituts in Paraffin einbetten. Somit standen mir pro Leichnam jeweils zwei Probenentnahmen des M. deltoideus und drei des M. pectoralis major zur Verfügung, die bereits zu Paraffin-Blöcken verarbeitet waren. Letztere wurden dann schließlich in folgenden Arbeitsschritten weiterverarbeitet.

Wie eingangs erwähnt, erfolgten die restlichen Probenentnahmen an den fixierten Spendern eigenständig. Dazu wurden die beschriebenen Areale mithilfe eines Skalpells eröffnet, die gewünschten Muskeln dargestellt und letztlich an den definierten Stellen Proben entnommen. Die Gewinnung der Proben wurde, je nach Größe des vorliegenden Muskels, mittels 8/10mm Biopsie-Skalpell bzw. herkömmlichen Skalpellen realisiert. Die Dicke dieser Proben variierte aufgrund der Tatsache, dass die Muskulatur bei den Spendern unterschiedlich ausgeprägt war. Pro Muskel entnahm ich auf diese Weise zwei Biopsien, wobei die zweite Biopsie vielmehr als Sicherheitsentnahme diente. Damit lagen mir pro Spender letztlich insgesamt acht Proben vor, wobei die Hälfte lediglich als Rückfallebene diente.

Die Proben wurden nach der Entnahme in bereits vorbereitete Einbettkassetten verbracht, die im Voraus beschriftet wurden. Die Beschriftung sollte es dabei ermöglichen jederzeit Rückschlüsse ziehen zu können, von welchem Spender die Probe stammt und um welche Muskelprobe es sich dabei handelte. Die Einbettkassetten mit den einliegenden Proben wurden wiederum in einen mit 3,5 – 3,7%iger Formalinlösung gefüllten Eimer überführt und dann in einen 4°C temperierten Kühlschrank verbracht. Dort verblieben sie über Nacht. Am Folgetag erfolgte schließlich eine Überführung der Kassetten in reine PBS-Lösung, in der sie, ebenso im Kühlschrank gelagert, für mindestens weitere 24 Stunden verblieben. Während die Formalinlösung dazu diente die Proben haltbar zu machen, diente das PBS dem Waschen.

Folglich wurden die Proben für den folgenden Prozess der Einbettung (siehe Kapitel 1.5.2) vorbereitet. Dazu verbrachte ich die Kassetten aus der PBS-Lösung in ein Gefäß, das für 3 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewässert wurde. Gefolgt wurde dieser Schritt von der Einlage der Kassetten in 70%ige 2-Propanol-Lösung für die Dauer von weiteren 3 Stunden, der sich dann letztlich die eigentliche Einbettung in Paraffin anschloss. Dieser Prozess ist Gegenstand des folgenden Kapitels und soll dort besprochen werden.

Nach erfolgter Entnahme wurden alle eröffneten Areale nochmals mittels Nahtmaterial durch mich verschlossen, die Tische, auf denen die Körperspenden verweilten, gereinigt, sodass die Spender in einem pietätvollen Zustand zurückgelassen werden konnten.

1.5.2 Einbetten des Probenmaterials in Paraffin

Nachdem die vorbereitenden Maßnahmen (siehe vorangegangene Kapitel) getroffen, die Kassetten für 3 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewässert und schließlich für weitere 3 Stunden in 70%ige 2-Propanol-Lösung eingelegt wurden, schloss sich der eigentliche Prozess der Einbettung in Paraffin an. Dieser fand am sogenannten Karussell Gewebeeinbeter statt. Dazu wurden die Einbettkassetten mit den nach wie vor darin einliegenden Proben von der 70%igen 2-Propanol-Lösung in einen Korb überführt. Der Korb verfügte über zwei Öffnungen, über die er im Automaten fest eingespannt werden konnte. Der Automat ermöglichte es, die Proben in verschiedene Lösungen zu befördern und über einen definierten Zeitraum darin zu belassen. Dieser Prozess lief voll automatisiert ab, es bedurfte lediglich der vorherigen Einstellung des richtigen Programms und dem Abwarten bis der Korb erfolgreich in die erste Station eingetaucht wurde.

Nachdem bereits im Voraus sichergestellt wurde, dass die genutzten Lösungen im Gewebeeinbeter nicht verunreinigt und noch nutzbar waren, wurden die Proben aus dem 70%igen 2-Propanol in den Korb überführt und dieser im Automaten eingespannt. Anschließend wurde Programm 01 ausgewählt und gestartet. Durch eine letzte Bestätigung, die von mir durch Knopfdruck am Gerät erfolgte, wurde der Korb abgesenkt und in die erste Station eingetaucht. Dabei handelte es sich nochmals um 70%ige 2-Propanol-Lösung, in der die Proben für 3 Stunden belassen wurden. Folglich wurden die Proben in die nächste Lösung, 80% 2-Propanol, überführt. Darin verweilten sie für 1,5 Stunden. Es schlossen sich 1,5 Stunden 90% 2-Propanol, 2x1,5 Stunden 100% 2-Propanol, 3x1,5 Stunden Methylbenzoat und letztlich 2x2 Stunden flüssiges Paraffin an. Dieser Prozess lief vollständig automatisiert ab, sodass ein äußeres Zutun meinerseits nicht erforderlich war. **Tabelle 8** gibt nochmal einen Überblick über die beschriebenen Prozesse.

Einbetten der Gewebeproben		
Station	Lösung	Verweildauer
1	70% 2-Propanol	3 h
2	80% 2-Propanol	1,5 h
3	90% 2-Propanol	1,5 h
4	100% 2-Propanol	1,5 h
5	100% 2-Propanol	1,5 h
6	Methylbenzoat	1,5 h
7	Methylbenzoat	1,5 h
8	Methylbenzoat	1,5 h
9	Paraffin	2 h
10	Paraffin	2 h

Tabelle 8 - Übersicht der Stationen im Gewebeeinbettautomaten

h=Stunde

Zu beachten war allerdings, dass nach Abschluss der Prozesse im Einbettautomaten nach 17 Stunden 30 Minuten, die Proben nicht zu lange im Automaten verweilten, sondern zeitnah weiterverarbeitet wurden. Dazu musste die für den nächsten Arbeitsschritt wichtige Paraffinguss Ausgießstation frühzeitig eingeschaltet werden, damit sich dessen Paraffinbehälter auf 57-63°C erhitzen konnte. Dies diente dazu, dass die einliegenden Paraffin-Pallets schmelzen und somit in einen flüssigen Zustand übergehen konnten (Schmelzpunkt bei 57°C). Zudem musste auch die Kälteplatte eingeschaltet werden, die eine Temperatur von etwa -3/-4°C erreichte. Letztlich musste auch die Wärmeplatte gesondert eingeschaltet werden, deren Temperatur sich um etwa 51,5°C einstellte. Der Paraffin-Dispenser wurde ebenfalls eingeschaltet. Darin lagerten Paraffin-Pallets, die durch Regulation auf etwa 60°C verflüssigt wurden. Nachdem diese Vorbereitungen getroffen waren, wurde der Korb mit den einliegenden Proben aus dem Einbettautomaten genommen und die Kassetten zum Schutz in den Dispenser, also in flüssiges Paraffin, eingelegt. Nach und nach wurden die Kassetten aus dem Paraffin geholt und die Probe mit einer Pinzette entnommen. Die Probe wurde zur weiteren Einbettung in Paraffinblöcke in dafür vorgesehene Ausgießförmchen verbracht. Dabei wurde der Boden dieser Form zunächst mit einer geringen Menge Paraffin bis zu seiner Bedeckung gefüllt. Anschließend wurde die Probe in der Form ausgerichtet, sukzessive Paraffin dazu gegossen und die Form immer wieder auf die Kälteplatte gestellt, damit das Paraffin aushärten und das Gewebe in seiner Position fixiert werden konnte. Nachdem das Gewebe einigermaßen in seiner Position fixiert war, wurde der Ausgießform ein Einbettring aufgesetzt, der zuvor beschriftet wurde und mir stets erlaubte Rückschlüsse über die Herkunft dieser eingebetteten Probe zu ziehen. Dazu vermerkte ich die Journalnummer sowie das vorliegende Gewebe. Die Einbettringe verfügten ihrerseits über zentrale, viereckige Öffnungen, über die immer wieder flüssiges Paraffin eingegossen werden konnte. Dabei erfolgten Härten und Gießen immer im Wechsel, bis die Probe vollständig in den Paraffinblock eingebettet war. Schließlich wurde das Ausgießförmchen mit dem darin

eingebetteten Gewebe auf die große Kälteplatte verbracht und dort zum weiteren Trocknen/Härten belassen. Nachdem die Blöcke vollständig getrocknet/ausgehärtet waren, konnten diese durch leichten Zug am Einbettring aus der Form genommen werden. Damit war der Prozess des Einbettens vollständig abgeschlossen. Als letztlich alle Proben in Paraffinblöcke eingebettet waren, verbrachte ich diese zur weiteren Lagerung in eine Kiste, die ich in einen 4°C temperierten Kühlschrank stellte. Das Kühlen diente dazu, die Bedingungen für den anschließenden Arbeitsschritt (siehe Kapitel 1.5.3) zu optimieren, denn zu warmes Paraffin neigt dazu, sich zusammen zu ziehen, was das Schneiden sichtlich erschwert. Auch dieser beschriebene Arbeitsschritt wurde vollends eigenständig durchgeführt.

1.5.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Dieser Arbeitsschritt fand am sogenannten Mikrotom statt. Dabei handelt es sich um eine Gerätschaft, die es erlaubt, die bereits beschriebenen Paraffinblöcke manuell in wenige µm-dicke Scheiben zu schneiden.

Bevor der eigentliche Prozess gestartet werden konnte, wurden zunächst sämtliche Vorbereitungen getroffen. So wurde erst einmal das Paraffinbad mit Wasser befüllt und eingeschaltet. Die Temperatur wurde auf 37°C eingestellt und mit einem einliegenden Thermometer überwacht. Ebenso erfolgte die Einschaltung der Heizplatte und des digitalen Inkubators, die ebenfalls auf eine Temperatur von 37°C eingestellt wurden. Im Anschluss überprüfte ich die Mikrotomklinge und wechselte diese bei zu starker Abnutzung oder zu häufigem Gebrauch. Zusätzlich legte ich eine weitere, etwas breitere Klinge bereit, die zum Entfernen überschüssigen Paraffins diente. Das Bereitstellen von zwei Pinseln und einem Becher mit Wasser diente dem späteren Lösen der Schnitte von der Klinge. Zudem wurden silanisierte Objektträger bereitgelegt und beschriftet. Dazu notierte ich mittels Bleistifts die Journalnummer und das entsprechende Gewebe.

Im Anschluss folgte dann die Anfertigung von Paraffinschnitten. Die im Kühlschrank bei 4°C gelagerten Blöcke wurden einzeln entnommen und von überschüssigem Paraffin befreit. Dazu wurde das Paraffin rund um das mittig im Block gelegene Gewebe mittels Klinge gelöst. Beachtet wurde hierzu, dass ein ausreichender Sicherheitsabstand zur Probe selbst gewählt wurde, um mögliche Beschädigungen zu vermeiden. Folglich konnte das bearbeitete Blöckchen nun im Mikrotom in eine dafür vorgesehene Vorrichtung eingespannt werden. Damit verwertbare Schnitte angefertigt werden konnten, musste zunächst die Position der Klinge zum Block optimiert werden. Bezüglich des Blocks gelang dies durch eine auf der linken Seite des Mikrotoms angebrachte Kurbel, durch dessen Betätigung der Block nach vorne oder hinten bewegt werden konnte. Auch die Klinge konnte durch Lösen einer Sperre nach vorne oder hinten bewegt werden, sodass schlussendlich beide Elemente so positioniert wurden, dass sie sich gerade so berührten. Überwacht wurde diese Justierung mithilfe einer Lupe. Die Betätigung einer weiteren Kurbel des Mikrotoms, die an der rechten Seite angebracht

war, führte dazu, dass der Block in Bezug auf die Klinge nach oben und unten bewegt werden konnte. Durch das wiederkehrende Auf und Ab entstanden somit letztlich Schnitte, die die voreingestellte Dicke aufwiesen. Zunächst stellte ich am Mikrotom eine Schnittdicke von etwa 9-10µm ein, bis in den Schnitten Gewebematerial zu sehen war. Ab diesem Zeitpunkt regulierte ich die Schnittdicke durch Drehen an einem Rädchen auf 5-7µm, bis optimale Schnitte gefertigt werden konnten. Durch Betätigung der rechtsseitigen Kurbel entstanden auf diese Art Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5-7µm. War ein Schnitt nun verwertbar, so wurde dieser durch mit Wasser befeuchtete Pinsel vorsichtig von der Klinge gelöst und mit der gewellten, unteren Seite langsam in das Paraffinbad überführt. Eine mögliche Fehlerquelle beim Anfertigen der Schnitte war, neben einer stumpfen Klinge, oftmals eine unzureichende Kühlung der Blöcke, wodurch sich die Schnitte, bedingt durch die Wärme, sofort zusammensogen und Falten schlugen. In diesem Zustand konnten sie meist nicht mehr vernünftig von der Klinge gelöst und in das Paraffinbad überführt werden. Letzteres diente dazu die überführten Schnitte zu strecken bzw. zu glätten, damit sich keine Falten im Gewebe bildeten. Pro Schnittserie fertigte ich zwischen sechs bis acht Schnitte an, wobei zwei für die HE-Färbung dienten und die restlichen der immunhistochemischen Färbung. Die zwischenzeitlich für wenige Minuten im Streckbad verbliebenen Schnitte konnten anschließend auf bereits vorbereitete und beschriftete Objektträger überführt werden. Dazu wurde der Objektträger senkrecht in das Wasserbad gestellt und die gewünschte Probe mittels Pinsel langsam in gewünschter Position auf ihn geschoben und platziert. Zu berücksichtigen war hierbei, dass die dem Wasser aufliegende Fläche des Schnitts auch die Fläche darstellte, die direkt auf dem Objektträger auflag. Durch vorsichtiges nach hinten Neigen und Anheben des Trägers konnte die Gewebeprobe so letztlich in der gewünschten Position fixiert und auf die Heizplatte gelegt werden. Auf dieser konnten die nun auf dem Objektträger aufgebrachten Gewebeproben bei 37°C für etwa 30 Minuten trocknen. Mithilfe eines Tupfers wurden Wassertropfen auf dem Träger grob abgetupft. Im Anschluss wurden die Schnitte in Küvetten verbracht und für mindestens 12 Stunden in den Inkubator gestellt. Dies diente dem Trocknen und letztlich auch dem Festigen der Proben auf dem Objektträger, sodass sich diese in späteren Arbeitsschritten nicht einfach lösen konnten.

Nachdem letztlich alle gefertigten Schnitte auf Objektträger überführt und getrocknet wurden, wurden diese bis zur weiteren Verarbeitung in dafür vorgesehenen Kästen gelagert. Dort wurde gewährleistet, dass sie vor Staub oder sonstigen Partikeln geschützt wurden.

Der gerade beschriebene Arbeitsschritt galt für das Muskelgewebe der fixierten Spender und wurde gänzlich eigenständig durchgeführt. Die Entnahme des Gewebes der unfixierten Spender und dessen weitere Verarbeitung wurde, wie bereits erwähnt, durch das Pathologische Institut realisiert. Da die Proben dabei derart in Paraffin eingebettet wurden, dass sie nicht mit dem zur Verfügung stehenden Mikrotom geschnitten werden konnten, musste hierfür Hilfe eingeholt werden. Diese Hilfe bot Frau Rabung, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Anatomischen Institut, an, die die entsprechenden

Schnitte mit einem speziellen Mikrotom fertigte und diese auf bereits von mir vorbereitete Objektträger verbrachte. Alle angefertigten Schnittpräparate wiesen eine Dicke von 5-7 μ m auf.

6. Erstellung eines geeigneten Färbeprotokolls

Nachdem die Probenentnahme erfolgt war, diese in Paraffinblöcke eingebettet und letztlich zu 5-7µm dicken Schnitten verarbeitet wurden, schloss sich der Prozess der Färbung an. Dabei wurde neben der sogenannten HE-Färbung, auch die immunhistochemische (IHC) Färbung durchgeführt. Die Erläuterung zur Erstellung eines geeigneten Protokolls beider Färbemechanismen ist Gegenstand dieses Kapitels.

1.6.1 Protokoll – HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist mitunter die häufigste und weitverbreitetste Methode der Übersichtsfärbungen eines Gewebes (Aumüller et al., 2020). Während das Hämatoxylin negativ geladene Strukturen blau färbt, färbt das Eosin positiv geladene Strukturen rot (Schiebler, 2005). Dadurch resultiert ein gefärbtes Präparat, anhand dessen makroskopisch aber insbesondere auch mikroskopisch ein Gewebe auf seine Intaktheit und Morphologie untersucht werden kann. Schlussendlich bietet dies die Grundlage und Voraussetzung für die anschließende IHC-Färbung. Für diese ist es wichtig, dass ein Gewebe nicht destruiert oder morphologisch - beispielsweise durch Artefakte - verändert ist, sondern die Gewebestruktur in weitestgehend gut erhaltenem Zustand vorliegt. Deshalb fertigte ich aus jeder Schnittserie jeweils eine HE-Färbung des Gewebes an, beurteilte die Struktur und führte erst dann das Gewebe der gleichen Schnittserie der IHC-Färbung zu.

In unserem Labor war zum Zeitpunkt meiner Laborarbeiten bereits ein Färbe-Protokoll etabliert, das ich auch in dieser Form übernehmen konnte. Hierbei ergaben sich im gesamten Verlauf keinerlei Probleme. Die dezidierte Beschreibung der einzelnen Schritte und des Mechanismus hinsichtlich der HE-Färbung wird in Kapitel 7 beschrieben.

1.6.2 Protokoll – IHC-Färbung

Die immunhistochemische Färbung (IHC-Färbung) ist ebenso eine etablierte Methode und dient zum Nachweis bestimmter Antigene. Ein Prinzip basiert dabei auf der Nutzung eines primären Antikörpers, der an der Zielstruktur (Antigen) bindet und einem sekundären Antikörper, der wiederum am primären Antikörper bindet. Infolge dieser Bindung kommt es, nach Zugabe eines chromogenen, also farberzeugenden Substrats, zur Aktivierung eines enzymatischen Prozesses, bei dem es zu einem sichtlichen Farbumschlag kommt (Ulfig †, 2019). Die Voraussetzung für diesen Prozess ist das Vorliegen des gesuchten Antigens. Das Antigen der zugrundeliegenden Dissertation stellte das TRPC6-Protein dar.

Die IHC-Färbung schloss sich an die HE-Färbung an. Ein Protokoll war ebenso zu Beginn meiner Laborarbeiten existent, allerdings noch nicht etabliert. Färbedurchgänge nach dem vorläufigen Protokoll blieben zunächst erfolglos. In der Folge wurden mögliche Fehlerquellen innerhalb der

Doktorandengruppe eruiert und nach und nach ausgemerzt. Dazu waren zahlreiche Färbegänge notwendig, bei denen die vermuteten Fehlerquellen behoben wurden. So wurden beispielsweise Chemikalien wie Xylol oder 2-Propanol (70%, 80%, 90% und 100%) erneuert. Die anfängliche Demaskierung wurde von 45 auf 60 Minuten erhöht. Zahlreiche Verdünnungen (z.B. Anti-TRPC6 Antikörper) wurden überdacht und deren Erstellung notiert, um auch hierbei die Fehleranfälligkeit zu minimieren. Nach einigen Versuchen stellte sich für das humane Skelettmuskelgewebe die 1:100 Verdünnung als ideal heraus, während die 1:500 Verdünnung zu schwach war. Als eine der Hauptfehlerquellen für das anfängliche Misslingen der IHC wurde die Verunreinigung des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) ausfindig gemacht. Es folgte ein Austausch dieser Lösung, wonach die IHC-Färbung dann schlussendlich auch gelang. Dieses Ergebnis wurde durch folgende IHC-Färbungen bestätigt, sodass nun das endgültige Färbeprotokoll etabliert werden konnte.

Die Beschreibung der einzelnen Schritte und des zugrundeliegenden Mechanismus wird in einem gesonderten Kapitel (Kapitel 8) beschrieben.

7. HE-Färbung

In Kapitel 1.6.1 wurden grobe Aspekte bzgl. der HE-Färbung bereits angesprochen. Dieses Kapitel soll nochmal dezidierter und detaillierter auf die Färbung eingehen.

1.7.1 Protokoll

Wie bereits erwähnt war das Protokoll der HE-Färbung bereits etabliert und konnte so übernommen werden. Anhand von *Abbildung 7* kann dieses nachvollzogen werden, wobei weitere Details den folgenden Kapiteln zu entnehmen sind.

Entparaffinieren (unter dem Abzug)	
Chemikalie/Lösung	Verweildauer
1. Xylol	} jeweils 5 Minuten
2. Xylol	
3. Xylol	
4. 2-Propanol (100%)	
5. 2-Propanol (100%)	
6. 2-Propanol (90%)	
7. 2-Propanol (80%)	
Färben	
8. gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich	➤ 8 Minuten
9. Spülen in destilliertem Wasser	➤ bis überschüssige Farbe entfernt ist
10. Bläuen in fließendem Leitungswasser	➤ 12 Minuten
11. Spülen in destilliertem Wasser	➤ 30 Sekunden
12. Eosin 0,1% + 2 Tropfen Eisessig	➤ 2 Minuten 30 Sekunden
13. kurzes Dippen in 2-Propanol (90%)	➤ bis Farbe Rot erreicht ist
14. 2-Propanol (100%)	➤ 5 Minuten
15. 2-Propanol (100%)	➤ 5 Minuten
16. Xylol	➤ 5 Minuten
17. Xylol	➤ 5 Minuten
18. Xylol	➤ 5 Minuten
Eindecken mit Roti-Histokitt-Kleber + Aushärten über Nacht (unter dem Abzug)	

Abbildung 7 - Protokoll der HE-Färbung

1.7.2 Aufbau

Für die Schritte 1-7 sowie 13-18 des Protokolls (Kapitel 1.7.1) stand unter dem Abzug eine Kiste bereit, in der sich zahlreiche Glasküvetten in entsprechender Anordnung befanden, welche mit verschiedenen Chemikalien befüllt waren - Xylol, 2-Propanol (70%, 80%, 90%, 100%). Dies konnte anhand der auf den Küvettendeckel aufgebrauchten Beschriftungen nachvollzogen werden. Zudem waren auf den Deckeln Pfeile angebracht, die die entsprechende Laufrichtung vorgaben und damit zur Prozesssicherheit beitrugen. Dieser Aufbau kann schematisch anhand von **Abbildung 8** nochmals rekapituliert werden. Die genutzten Chemikalien mussten nach zehn Durchgängen oder bei starker Verschmutzung gewechselt werden. Um die Anzahl der durchlaufenen Durchgänge nachvollziehen zu können, wurde unter dem Abzug eine Liste angebracht, auf der die entsprechenden Durchläufe notiert und mit Datum versehen wurden.

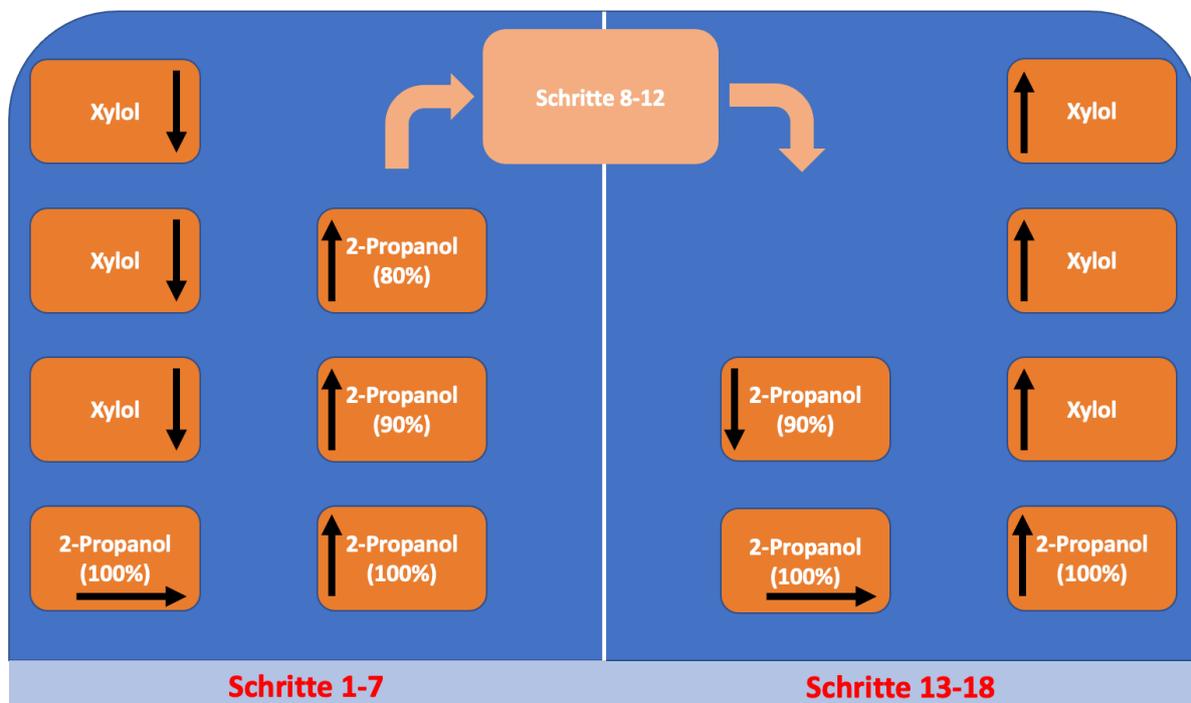


Abbildung 8 - Aufbau HE-Färbung Teil 1

Die Schritte 8-12 des Protokolls fanden hingegen außerhalb des Abzugs statt. Für den Aufbau dieser Station wurden fünf Küvetten inklusive Deckel benötigt, die allesamt beschriftet und in chronologischer Reihenfolge aufgestellt wurden. Zudem waren ein Trichter und entsprechendes Filterpapier notwendig. Die für diesen Schritt notwendigen Chemikalien oder Lösungen wurden immer frisch in die Gefäße eingefüllt. Ferner handelte es sich dabei, entsprechend der Chronologie, um gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich, destilliertes Wasser, Leitungswasser, destilliertes Wasser und gefiltertes Eosin 0,1% + zwei Tropfen Eisessig. Das Eosin wurde immer erst kurz vor der Nutzung gefiltert, die beiden Tropfen Eisessig mittels Einwegpipette erst zugeführt, wenn die Küvette mit den Objektträgern in der vorangehenden Lösung verharrete. Alles weitere wurde schon vor dem Beginn vorbereitet. Während das

destilliertes Wasser und Leitungswasser in die Gefäße gefüllt und diese mit dem Deckel verschlossen wurden, musste das Hämatoxylin zunächst gefiltert und das Gefäß anschließend mit einem Deckel verschlossen werden. Auch dieser beschriebene Sachverhalt kann anhand von *Abbildung 9* nachvollzogen werden.

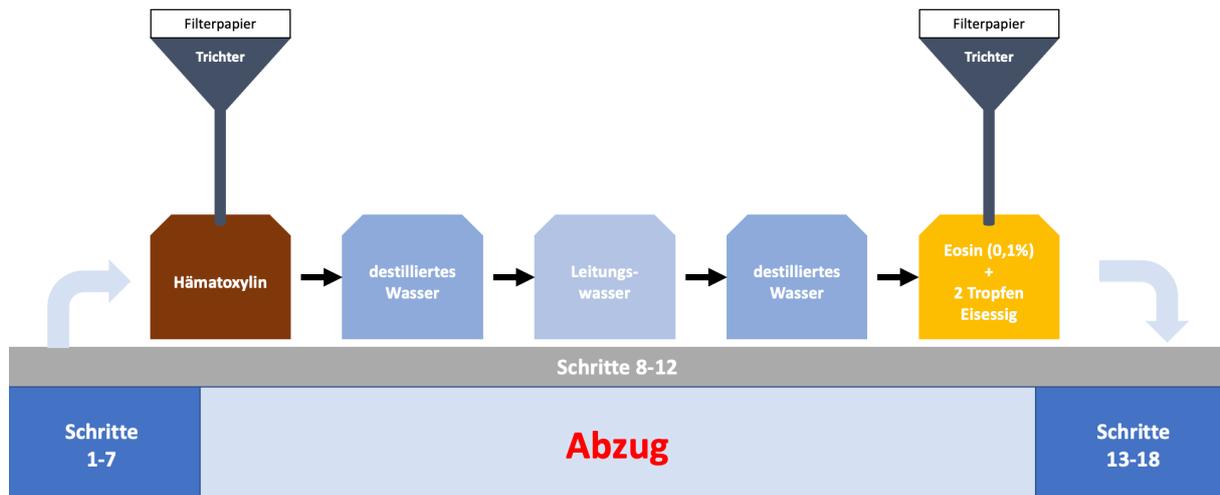


Abbildung 9 - Aufbau HE-Färbung Teil 2

Die Vorbereitungen für das Aufbringen der Deckgläser auf die Objektträger tätigte ich immer während die Küvette mit den entsprechenden Objektträgern die einzelnen Stationen durchlief. Für diesen Schritt waren neben Deckgläsern der Größe 24x50mm und 22x22mm (je nach Größe des Präparates) ein Kleber (Roti-Histokitt) notwendig. Außerdem legte ich eine Pinzette zum Entnehmen der Objektträger aus den Küvetten und Tupfer zum groben Abwischen der Flüssigkeit bereit. Zudem wurden Einwegpipetten und zwei Sondiersonden benötigt.

Bei den gesamten Vorbereitungen war das Tragen von Handschuhen im Sinne des Eigenschutzes obligat. Ebenso empfahl sich, aufgrund der Arbeit mit Chemikalien, auch das Tragen einer Schutzbrille.

1.7.3 Durchführung

Nachdem alle vorbereitenden Maßnahmen getroffen wurden, wurde der eigentliche Färbeprozess initiiert. Dazu wurden zehn Objektträger mit den darauf fixierten Paraffinschnitten in eine Küvette bzw. einen Objektträgerkorb verbracht. Diese wurde dann gemäß Protokoll für 5 Minuten in Xylol-Lösung gelagert. Es folgte ein Wechsel in ein weiteres Gefäß mit Xylol, in dem die Küvette nochmal 5 Minuten verblieb. Letztlich schloss sich dann der letzte Wechsel in Xylol für weitere 5 Minuten an. Nach Ablauf der Zeit wurden die Präparate schließlich in 100% 2-Propanol überführt. Auch hierbei betrug die Verweildauer 5 Minuten. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, bevor dann schließlich ein Wechsel in 90%ige 2-Propanol-Lösung erfolgte. Nachdem die Objektträger 5 Minuten darin verharrten, wurden diese für nochmals 5 Minuten in 80% 2-Propanol überführt. Dieser Prozess diente dem Entparaffinieren der Gewebeproben auf den Objektträgern und wurde gänzlich unter dem Abzug in der dafür

vorgesehenen Kiste (siehe Kapitel 1.7.2) durchlaufen. Der Wechsel von einer zur anderen Lösung erfolgte dabei eigenhändig durch Anheben der Küvette an einem zuvor angebrachten Griff unter Nutzung von Handschuhen.

Schließlich wurde die eigentliche Färbung durchgeführt. Nachdem die Proben für 5 Minuten in 80% 2-Propanol gelagert wurden (s.o.), wurden diese für 8 Minuten in ein Gefäß mit zuvor gefiltertem Hämatoxylin nach Ehrlich überführt. Anschließend erfolgte ein kurzes Dippen in destilliertem Wasser zum Entfernen überschüssiger Farbe, bevor dann das sogenannte Bläuen folgte. Dafür wurde die Küvette in ein Gefäß mit Leitungswasser verbracht und so für 12 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Währenddessen filterte ich das im Kühlschrank gelagerte Eosin 0,1%, das nach Protokoll erst kurz vor Nutzung gefiltert werden sollte und setzte dem Gefäß anschließend einen Deckel auf. Nach den 12 Minuten schloss sich dann eine 30 Sekunden andauernde Spülung in destilliertem Wasser an. Währenddessen wurden mittels Einwegpipette zwei Tropfen Eisessig in das Eosin gegeben und der Deckel nochmal geschlossen, damit dieses nicht verflog. Nach Ablauf der 30 Sekunden folgte dann schlussendlich die Überführung des Objektträgerkorbes vom destillierten Wasser in Eosin 0,1% mit zwei zugefügten Tropfen Eisessig. In dieser Lösung verblieben die Proben für 2,5 Minuten.

Von diesem Gefäß wurden die Proben dann wieder unter dem Abzug kurz in 90% 2-Propanol gedippt, bis eine Rotfärbung erkennbar war, gefolgt von der Überführung in 100% 2-Propanol für 5 Minuten. Auch im nachfolgenden Gefäß mit 100% 2-Propanol verblieb der Korb für weitere 5 Minuten. Die letzten drei Gefäße waren jeweils mit Xylol gefüllt. Hierbei betrug die Verweildauer ebenfalls je 5 Minuten.

Nach Ablauf der letzten 5 Minuten war der eigentliche Färbeprozess abgeschlossen. Ebenfalls unter dem Abzug stattfindend, wurde die Küvette im Xylol belassen und nach und nach mithilfe einer Pinzette die einzelnen Objektträger entnommen. Diese wurden dann sanft abgeklopft, grob rund um das Gewebe mit einem Tupfer trocken getupft und anschließend, nach Auswahl eines entsprechend großen Deckglases, dieses aufgeklebt. Dazu wurden mittels Einwegpipette 2-3 Tropfen eines speziellen histologischen Klebers (Roti-Histokitt) auf das Gewebe aufgebracht und schließlich das Deckglas aufgelegt. Dies erfolgte mithilfe von Sondierungssonden, die ein möglichst langsames Absenken des Deckglases gewährleisten sollten. Eine Sonde diente dabei als Widerlager und verhinderte ein Verrutschen, während mit der anderen Sonde als Führung, das Deckglas langsam bis zum Kontakt mit dem aufgetragenen Kleber abgelassen und schließlich losgelassen wurde. Folglich wurde der Objektträger in eine Mappe verbracht und dort über Nacht unter dem Abzug belassen, damit der Kleber trocknen konnte.

Am Folgetag konnten die HE-gefärbten Gewebeproben dann schließlich unter dem Mikroskop gesichtet und beurteilt werden. Dazu wurde darauf geachtet, ob Zellkerne sichtbar waren, ob das gesamte Gewebe intakt war, ob morphologische Veränderungen vorlagen oder ob Artefakte jeglicher Art zu sehen waren. Ergaben sich keine gravierenden Auffälligkeiten, so konnten die Gewebeschnitte der gleichen Schnittserie der IHC-Färbung unterzogen werden. Auch dieser Schritt wurde eigenständig durchgeführt.

1.7.4 Färbeprinzip

Die genauen Abläufe wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert. In diesem Abschnitt sollen wesentliche Prinzipien der hier genutzten HE-Färbung belichtet werden.

Zunächst ist es, wie im Protokoll beschrieben, vonnöten, das Paraffin, in dem die Gewebeproben eingebettet wurden, zu entfernen. Diesen Schritt bezeichnet man auch als Entparaffinieren. Erzielt wird die Entparaffinierung unter Nutzung von Xylol. Eine sich anschließende absteigende Alkoholreihe (2-Propanol 100%, 90%, 80%) gemäß HE-Protokoll dient dabei der Rehydrierung und ist notwendig, um das auf dem Objektträger fixierte Gewebe in eine wässrige Phase zu überführen, damit eine Interaktion mit den genutzten, ebenso wässrigen Farbstoffen - Hämatoxylin und Eosin - möglich gemacht wird (Aumüller et al., 2020).

Nachdem durch die Rehydrierung die optimalen Bedingungen geschaffen wurden, folgt die Behandlung des Gewebes mit der ersten Farblösung, dem Hämatoxylin. Dabei handelt es sich um eine basische Lösung, die negativ-geladene und damit saure Strukturen eines Gewebes (z.B. Zellkerne), auch als Basophile bezeichnet, zu binden vermag (Ulfig †, 2019). Das kurzzeitige Spülen in saurem destilliertem Wasser dient der Vermeidung von Farbniederschlägen und das anschließende Überführen in Leitungswasser letztlich dem Anheben des pH-Wertes, sodass der gebundene Farbstoff einerseits fixiert wird, da dieser im alkalischen Milieu schlecht löslich ist, andererseits in die für das Hämatoxylin charakteristische Blaufärbung übergeht (Lang, 2006). Daher rührt auch der Begriff des Bläuens.

Die Gegenfärbung erfolgt dann schließlich mithilfe des sauren 0,1 %igen Eosins. Diesem werden zwei Tropfen Eisessig zugeführt, um einen für die Lösung optimalen pH-Wert einzustellen und den Prozess des Bläuens zu beenden (*Hämatoxylin/Eosin-Färbung H & E*, n.d.; Lang, 2006). Der pH-Wert sollte dabei Werte zwischen pH 4-6 erreichen, da hierbei die Plasmaproteine eine positive Ladung aufweisen. Im Vergleich zum Hämatoxylin bindet das Eosin nämlich an diese positiv-geladenen Komponenten, die auch als Azidophile bezeichnet werden. Neben den Plasmaproteinen gehören auch weitere Zwischenzellbestandteile (z.B. Kollagenfasern, Bindegewebe) hierzu (Aumüller et al., 2020; Schiebler, 2005). Aus der Bindung der Farblösung an die beschriebenen Strukturen resultiert letztlich eine Rotfärbung.

Das kurze Dippen in 90% 2-Propanol-Lösung dient letztlich dem Auswaschen überschüssiger Farbe aus dem histologischen Schnittpräparat - auch Differenzierung genannt (Lang, 2006). Auch das sich anschließende Überführen in 100% 2-Propanol begünstigt diese Differenzierung. Insgesamt dient die aufsteigende Alkoholreihe, in diesem Fall aus 90% und 100%-Propanol bestehend, auch der Dehydratation, also dem Entwässern des Gewebes (Lang, 2006).

Die darauffolgende Behandlung mit dem Reagens Xylol dient letztlich dem Klären des Gewebes. Dabei wird der Alkohol im Gewebe nochmal verdrängt, wodurch dieses unter dem Mikroskop heller erscheint und damit wesentlich besser zu beurteilen ist. Dies liegt nicht zuletzt an dem durch Alkohol bedingten schlechten Brechungsindex, der das Gewebe ansonsten trüb erscheinen ließe.

Das Aufbringen des Eindeckmediums (Roti Histokitt) und des Deckglases schützen das Präparat schließlich vor äußeren Einflüssen, aber auch vor dem Ausbleichen.

1.7.5 Abbildungen

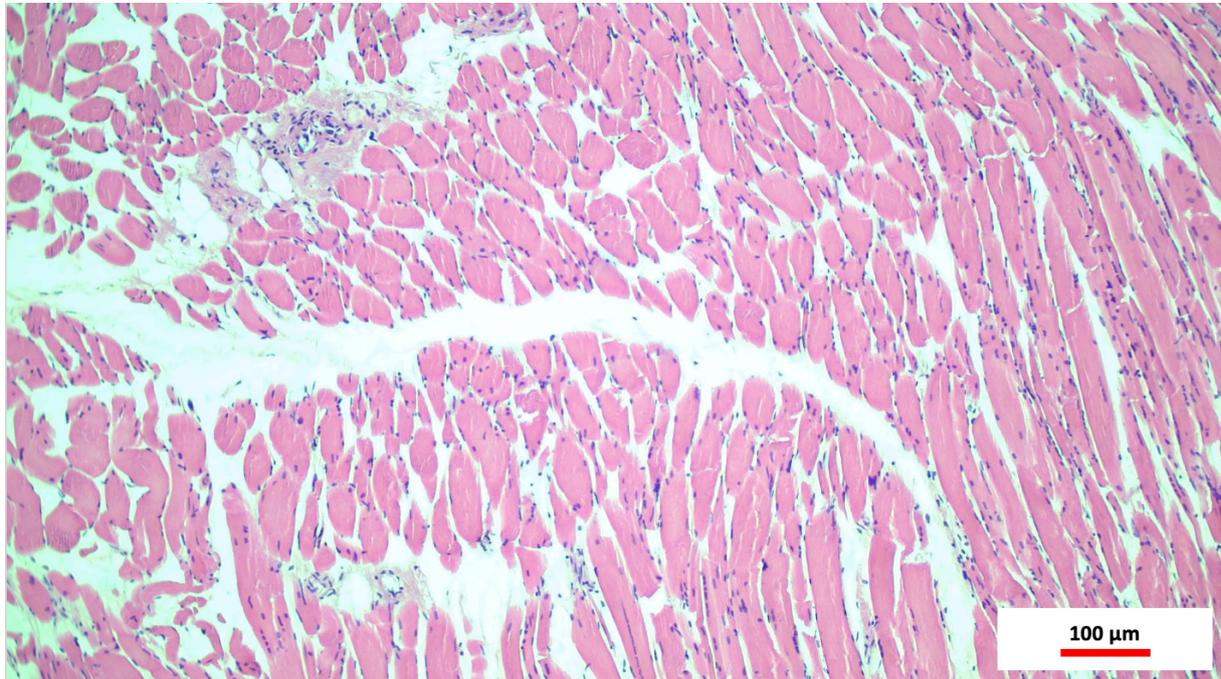


Abbildung 10 – HE-Färbung Spender 5 M. pectoralis major in 10x Vergrößerung

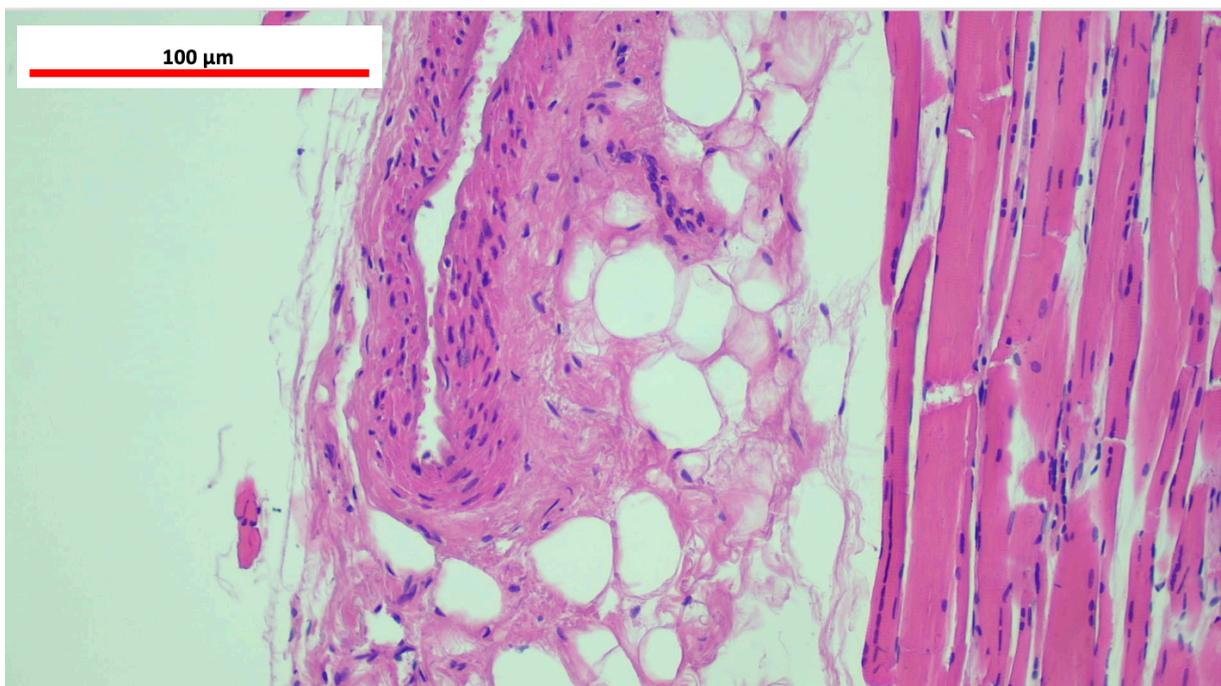


Abbildung 11 – HE-Färbung Spender 5 M. pectoralis major in 40x Vergrößerung

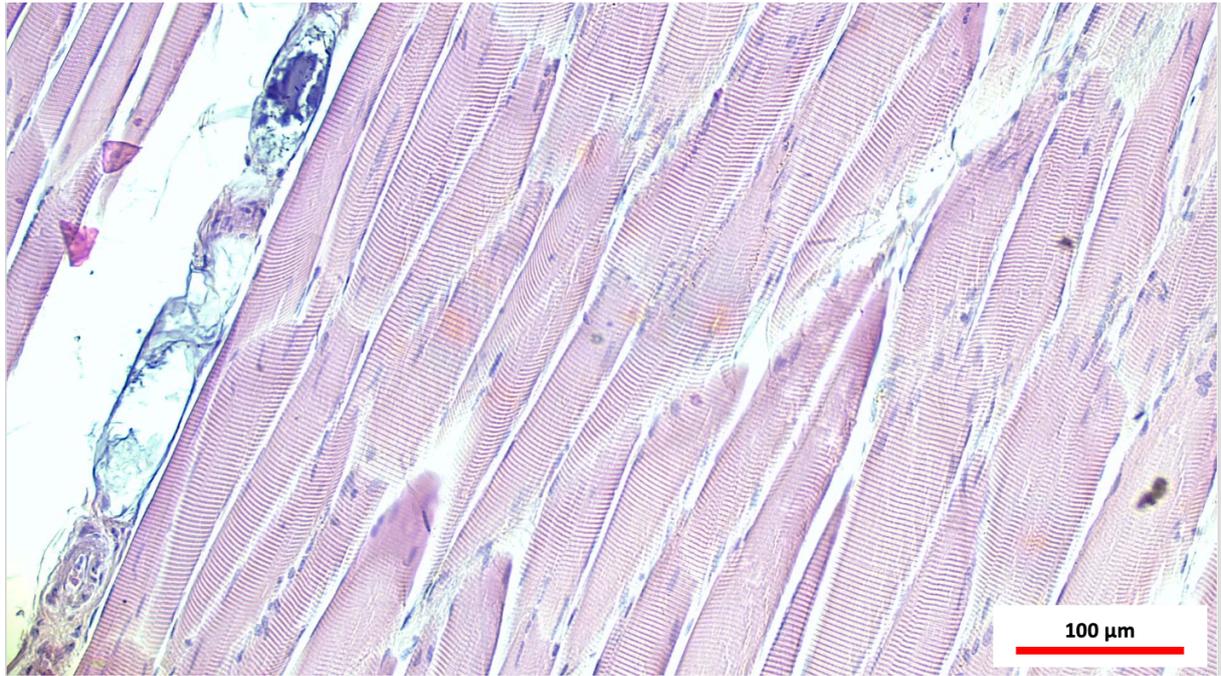


Abbildung 12 – HE-Färbung Spender 1 M. pectoralis major in 20x Vergrößerung

8. IHC-Färbung

In diesem Kapitel liegt der Schwerpunkt auf der immunhistochemischen Färbung (IHC). Wie im vorangegangenen Kapitel, sollen hier die wesentlichen und wichtigen Aspekte aufgegriffen werden.

1.8.1 Protokoll

Das endgültige und für die Arbeit genutzte Protokoll der IHC soll in diesem Kapitel nochmal übersichtlich dargestellt werden. Im Vergleich zur HE-Färbung, erstreckt sich die IHC über zwei Tage. Die Protokolle für Tag 1 und 2 sind den *Abbildungen 13 und 14* zu entnehmen. Genaueres zum Versuchsaufbau, zur Durchführung und zu den Prinzipien der IHC wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

Protokoll IHC – Tag 1	
Arbeitsschritt	Maßnahmen
1 - Vorbereitung	<ul style="list-style-type: none"> • Citratpuffer (frisch angesetzt) im Wärmeschrank (95°C) vorwärmen
2 - Entparaffinieren	<ul style="list-style-type: none"> • 3x 5 min Xylol • 2x 5 min 100% 2-Propanol • 1x 5 min 90% 2-Propanol • 1x 5 min 80% 2-Propanol • 1x 5 min 70% 2-Propanol • 1x 5 min destilliertes Wasser <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-left: 200px;">Unter dem Abzug!</div>
3 - Demaskierung	<ul style="list-style-type: none"> • 60 min in Citratpuffer bei 95°C im Wärmeschrank • Schnitte 30 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen • 1 min mit PBS waschen (in Küvette) • Umrandung des Gewebes mit DakoPen
4 - Blockieren	<ul style="list-style-type: none"> • 10% NGS in PBS auf Schnitte pipettieren (in Feuchtekammer) • 1 h Inkubation (in Feuchtekammer)
5 - Primärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> • 10%NGS in PBS vorsichtig von Schnitten abklopfen • Primärantikörper in gewünschter Verdünnung auf Positivkontrollen pipettieren (in Feuchtekammer) • Kaninchenserum in gewünschter Verdünnung auf Negativkontrolle pipettieren (in Feuchtekammer) • Einmalig Kontrollpeptid (einen Tag vorher ansetzen) auf entsprechende Probe pipettieren • Inkubation in Feuchtekammer über Nacht bei Raumtemperatur

Abbildung 13 - Protokoll der IHC Tag 1

Protokoll IHC – Tag 2

Arbeitsschritt	Maßnahmen
6 – Peroxidase-Inaktivierung	<ul style="list-style-type: none"> • Lösung von Objektträger abklopfen • 2x 2 min mit 1x PBS waschen (in Küvette) • 10 min 3% H₂O₂ in PBS (frisch angesetzt) auf Schnitte pipettieren (in Feuchtekammer) • Lösung von Objektträger abklopfen • 2x 2 min mit 1x PBS waschen (in Küvette)
7 - Sekundärantikörper	<ul style="list-style-type: none"> • HRP-konjugierter Sekundärantikörper auf Schnitte pipettieren (in Feuchtekammer) • 1 h Inkubation (in Feuchtekammer) • Lösung von Objektträger abklopfen • 2x 2 min mit 1x PBS waschen (in Küvette) • 1:1 verdünnte DAB-Lösung unter Mikroskop auf Schnitt pipettieren • Inkubation zwischen 2-15 min (Timer starten und bei ausreichender Braunfärbung stoppen) • Gestoppte Zeit für die gesamte Färbeserie beibehalten • Reaktion durch Eintauchen des Objektträgers in PBS stoppen (in Küvette)
8 - Gegenfärben	<ul style="list-style-type: none"> • 1 min destilliertes Wasser (in Küvette) • kurz in gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich (ca. 1 Sekunde) dippen (in Küvette) • kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser, bis überschüssige Farbe entfernt ist (in Küvette) • 5 min unter fließendem Leitungswasser bläuen (in Küvette) • 1x 5 min 70% 2-Propanol • 1x 5 min 80% 2-Propanol • 1x 5 min 90% 2-Propanol • 2x 5 min 100% 2-Propanol • 3x 5 min Xylol • Eindecken und Trocknen <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 400px;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Unter dem Abzug!</div> </div>

Abbildung 14 - Protokoll der IHC Tag 2

1.8.2 Vorbereitung Tag 1

Allgemein:

Wie auch bei der HE-Färbung, wurden zunächst zehn Objektträger mit den darauf fixierten Gewebeproben ausgewählt. Dabei war zu berücksichtigen, dass pro Färbung eine Gewebeprobe der Negativkontrolle diene, während die restlichen Proben als Positivkontrollen fungierten. Zur besseren Übersicht wurden die Objektträger dafür zusätzlich beschriftet. Neben der bereits dokumentierten Journalnummer und Gewebeprobe, wurde dabei ein “+“ und “Anti-TRPC6 1:100“ auf die Objektträger, die der Positivkontrolle dienten, geschrieben. Bei der Negativkontrolle erfolgte eine zusätzliche Beschriftung mit einem “-“, “NK“ (Negativkontrolle) und “KS 1:500“ (Kaninchenserum). Bei einem Durchgang wurde zudem ein Objektträger für die sogenannte Peptidinkubation genutzt. Näheres dazu ist Kapitel 1.8.8 zu entnehmen. **Abbildung 15** stellt nochmal exemplarisch die Beschriftung der Objektträger dar.

Nachdem die Auswahl erfolgt war, wurden die Gewebeproben in Objektträgerkörbe verbracht. Gemäß der Reihenfolge, in der die Objektträger in die Körbe eingeordnet wurden, vermerkte ich die verwendeten Proben auf dem IHC-Protokoll.

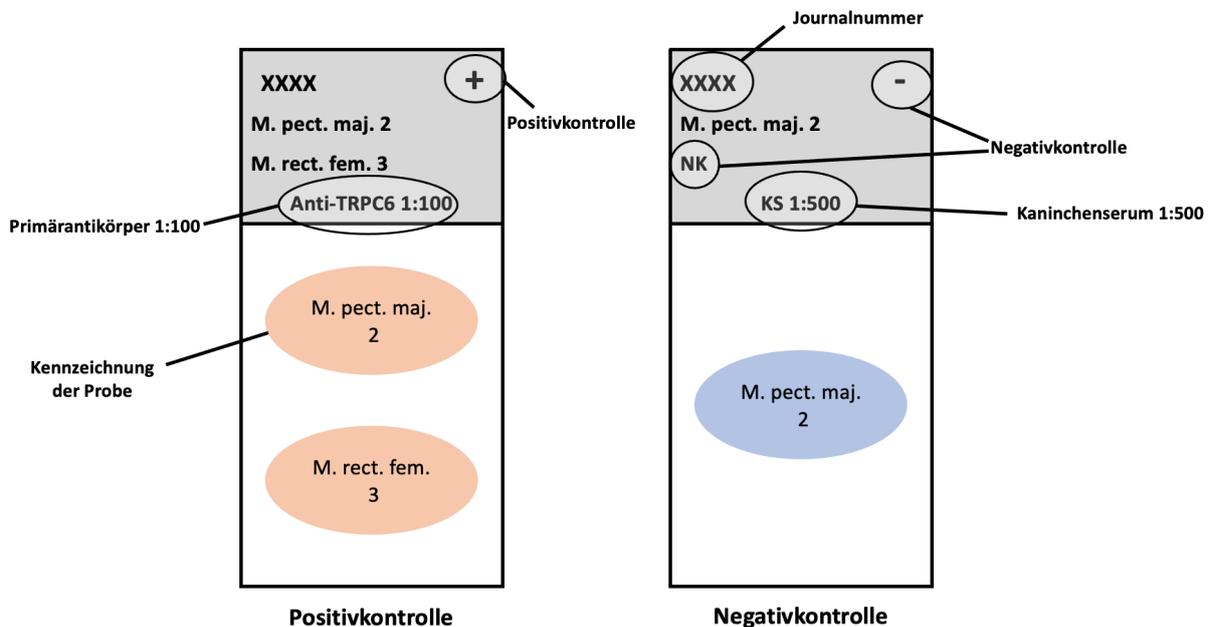


Abbildung 15 - Übersicht zur Beschriftung der Objektträger

Arbeitsschritt 1 - Vorbereitung:

Hierfür wurde 1%ige Citrat-Pufferlösung in einer Küvette frisch angesetzt und mit Deckel in einen auf 95°C vorgewärmten Wärme-/Trockenschrank verbracht. Zum Ansetzen der Lösung wurden 5ml Citratpuffer (Antigen Retrieval Buffer, pH6; Ref.: ab93678; Abcam AG, Cambridge, United Kingdom) aus dem Kühlschrank und 495ml destilliertes Wasser genutzt.

Arbeitsschritt 2 - Entparaffinieren:

Die zum Entparaffinieren notwendigen Lösungen, die in Küvetten in einer Kiste unter dem Abzug gelagert waren (siehe Kapitel 1.7.2), wurden meist einen Tag vor dem Färben überprüft und ggf. gewechselt. Am Tag der Färbung wurde trotzdem nochmal eine visuelle Kontrolle durchgeführt, um Unreinheiten vor Beginn zu erkennen und zu beheben. Auch die Anordnung der Küvetten in der Kiste unter dem Abzug wurde nochmals überprüft. Im Vergleich zur HE-Färbung kamen bei der IHC im ersten Abschnitt zusätzlich noch eine Küvette mit 70% und eine Küvette mit destilliertem Wasser hinzu. Auch diese Küvetten waren beschriftet und entsprechend mit Pfeilen markiert. Im zweiten Abschnitt wurden zudem ein Gefäß mit 70% 2-Propanol und ein weiteres Gefäß mit 80% 2-Propanol ergänzt.

Arbeitsschritt 3 - Demaskierung:

Neben dem bereits genannten Citrat-Puffer (s.o.), wurde auch der DakoPen (Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, US), ein Fettstift, bereitgelegt und eine Küvette mit PBS-Lösung befüllt und anschließend mit einem Deckel verschlossen.

Arbeitsschritt 4 - Blockieren:

Hierfür wurde eine Feuchtekammer (Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) vorbereitet. Dazu wurde ein Papiertuch zunächst unter fließendem Leitungswasser genässt und anschließend so gefaltet, dass es in der Kammer ausgelegt werden konnte. Letztere wurde danach verschlossen.

Die Überprüfung, ob ausreichend Blockierlösung zur Verfügung stand, fand ebenfalls einen Tag vor und nochmal zu Beginn der Färbung statt. Als Blockierlösung wurde 10%iges Normal Goat Serum (NGS) in PBS genutzt. Dieses war fertig angesetzt im Gefrierfach gelagert und wurde entnommen, als das Abkühlen bei Arbeitsschritt 3 begann (siehe Kapitel 1.8.1).

Arbeitsschritt 5 - Primärantikörper:

In diesem Arbeitsschritt erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für die Positivkontrollen und mit dem Kaninchenserum für die Negativkontrolle. Einmalig erfolgte bei diesem Schritt auch die Peptidinkubation (siehe Kapitel 1.8.8). Auch hierbei wurde tags zuvor das ausreichende Vorhandensein überprüft bzw. das Kontrollpeptid für die Peptidinkubation angesetzt.

Der genutzte Primärantikörper (Ref.: Acc-017AN4802; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) wurde in einer 1:50 Verdünnung in 200µl fassenden Mikroreaktionsgefäßen im Gefrierschrank gelagert. In den Gefäßen befanden sich jeweils ca. 150µl des Antikörpers. Um die in der Arbeit genutzte Verdünnung von 1:100 zu erreichen, wurden zunächst 600µl NGS-Lösung in ein 1,5ml fassendes Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Dazu kam die äquivalente Menge des 1:50 verdünnten Antikörpers (vier 200µl fassende Mikroreaktionsgefäße zu je 150µl Inhalt). Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 1200µl (=1,2ml), das nun die gewünschte Verdünnung von 1:100 aufwies. Das Gefäß wurde nun

verschlossen, sorgfältig mit "Anti-TRPC6 AK 1:100" beschriftet, im Vortexer gemischt und letztlich im Kühlschrank bis zur Nutzung zwischengelagert.

Das Kaninchenserum lag in einer mit PBS vorverdünnten Stocklösung vor, die eine Verdünnung von 1:50 aufwies und ebenfalls in Mikroreaktionsgefäßen im Gefrierschrank gelagert wurde. Pro Gefäß lag eine Menge von 50µl vor. Zur Herstellung der gewünschten 1:500 Verdünnung, wurden zunächst 24.950µl (=24,95ml) PBS in ein Gefäß überführt und 50µl des Kaninchenserums dazu gemischt. Auch dieses Gefäß wurde verschlossen, sorgfältig mit "Kaninchenserum 1:500" beschriftet, im Vortexer gemischt und bis zu seiner Verwendung im Kühlschrank zwischengelagert.

Die Herstellung der gerade beschriebenen Verdünnungen wurde nach Beginn von Arbeitsschritt 4 (siehe Kapitel 1.8.1) initiiert.

1.8.3 Vorbereitung Tag 2

Arbeitsschritt 6 - Peroxidase-Inaktivierung:

Zur Vorbereitung dieses Arbeitsschrittes wurden zunächst vier Küvetten mit PBS-Lösung befüllt, beschriftet und letztlich mit einem Deckel verschlossen. Außerdem wurde 3%iges H₂O₂ in PBS frisch angesetzt. Dazu wurde von der 35%igen Ausgangslösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) 8,57ml H₂O₂ mit 91,43ml PBS vermischt.

Arbeitsschritt 7 - Sekundärantikörper:

Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA) wurde ebenfalls im Gefrierschrank gelagert. Zunächst wurden 20µl des Sekundärantikörpers und 980µl NGS-Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und im Vortexer vermischt. Daraus ergab sich vorerst eine 1:50 Verdünnung des Antikörpers. Aus dieser 1:50 verdünnten Lösung wurden dann nochmal 100µl mit einer Pipette entnommen und in ein weiteres Gefäß mit 900µl NGS-Lösung überführt, sodass hierbei eine 1:10 Verdünnung entstanden war. Insgesamt betrachtet, resultierte dabei eine 1:500 verdünnte Lösung (1:50 x 1:10) des Sekundärantikörpers.

Zudem waren hier nochmal zwei mit PBS gefüllte Gefäße nötig.

Das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) (Ref.: 7411-49-6; Vector Laboratories Inc.; Burlingame, USA) wurde im Kühlschrank gelagert. Auch diese Lösung wurde erst kurz vor seiner Nutzung frisch angesetzt. Dazu wurden die beiden Reagenzien ImmPACT DAB Reagent 1 und 2 in äquivalenter Menge in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, sodass eine Gesamtmenge von 1 bis 1,5ml vorlag. Dies war von den Probengrößen abhängig und musste vorher abgeschätzt werden. Dabei war zu beachten, dass für jedes Reagens eine frische Pipettenspitze genutzt wurde, um Verunreinigungen zu vermeiden. Außerdem wurden jegliche Materialien, die mit dem Chromogen in Verbindung kamen (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Handschuhe, etc.) in einen gesonderten, verschließbaren Mülleimer entsorgt.

Arbeitsschritt 8 - Gegenfärben:

Letztlich mussten noch weitere Küvetten mit destilliertem Wasser (2 Stück), mit gefiltertem Hämatoxylin nach Ehrlich und mit Leitungswasser gefüllt und anschließend verschlossen werden.

Das Entwässern fand schließlich wieder in einer Kiste unter dem Abzug statt, deren Lösungen bereits zu Beginn überprüft wurden. Die Vorbereitungen zum Eindecken wurden bereits bei der HE-Färbung besprochen (Kapitel 1.7.3)

1.8.4 Übersicht Verdünnungen und Lösungen

Aufgrund der Umfänglichkeit sollen hier nochmal alle für die IHC genutzten Lösungen/Chemikalien und deren Verdünnungen zusammenfassend in **Tabelle 9** dargestellt werden.

Tag 1		
Arbeitsschritt	Lösung/Chemikalie	Ansatz
1	Citratpuffer pH6	5ml Citratpuffer + 495ml Aqua dest.
2	Xylol 100% 2-Propanol 90% 2-Propanol 80% 2-Propanol 70% 2-Propanol	reines Xylol reines 2-Propanol 90 ml 2-Propanol + 10 ml Aqua dest. 80 ml 2-Propanol + 20 ml Aqua dest. 70 ml 2-Propanol + 30 ml Aqua dest.
3	1x PBS	10xPBS-Beutel auf 1 Liter Aqua dest. <ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 ml 10xPBS + 900 ml Aqua dest = 1 Liter 1x PBS
4	10% NGS-Blockierlösung	fertig angesetzt in Gefrierfach, bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> ▪ NGS (Normal Goat Serum) ▪ 0,1% Triton ▪ PBS
5	Primärantikörper Kaninchenserum	1:50 vorverdünnter AK in Gefrierfach: <ul style="list-style-type: none"> ▪ für 1ml = 500 µl 1:50 AK + 500µl NGS = 1 ml 1:100 Primärantikörper Kaninchenserum (KS) in Gefrierfach: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 µl KS + 24.950 µl PBS = 25 ml KS 1:500
Tag 2		
6	3% H ₂ O ₂	8,57 ml 35% H ₂ O ₂ + 91,43 ml PBS
7	Sekundärantikörper DAB	20 µl Sekundärantikörper + 980 µl 10%NGS = 1 ml 1:50 Verdünnung 100 µl der 1:50 Verdünnung + 900 µl 10%NGS = 1 ml 1:500 Verdünnung Mischungsverhältnis 1:1 <ul style="list-style-type: none"> ▪ zur Herstellung von 1 ml = 500 µl Reagens 1 + 500 µl Reagens 2

Tabelle 9 - Übersicht der Verdünnungen und Lösungen der IHC

1.8.5 Durchführung

Tag 1:

Vergleichbar mit den anfänglichen Schritten der HE-Färbung, wurden die zehn in Küvetten verbrachten Objektträger zunächst der Entparaffinierung in der Kiste unter dem Abzug zugeführt (Arbeitsschritt 2). Dazu verweilten die Proben drei Mal in Folge für jeweils 5 Minuten in Xylol. Danach durchliefen sie eine absteigende Alkoholreihe zum Zweck der Rehydrierung des Gewebes, wobei die Objektträger zwei Mal 5 Minuten in 100% 2-Propanol und jeweils 5 Minuten in 90%, 80% und 70% 2-Propanol lagerten. Letztlich folgte die Überführung in destilliertes Wasser für weitere 5 Minuten.

Dem schloss sich dann Arbeitsschritt 3 an, die Demaskierung. Hierzu wurde der Objektträgerkorb vom destillierten Wasser in das bereits im Wärmeschrank bei 95°C vorgewärmte Citrat-Puffer überführt und für 60 Minuten darin belassen. Anschließend wurden die Proben zum 30-minütigen Abkühlen bei Raumtemperatur aus dem Wärmeschrank genommen, wobei diese hierfür ebenfalls im Citrat-Puffer verblieben. Der Deckel der Küvette wurde dazu abgenommen. Letztlich folgte das 1-minütige Waschen in PBS-Lösung, bevor dann die Objektträger einzeln entnommen und vorsichtig abgeklopft wurden. Nach dem Abklopfen wurde das Gewebe schließlich mit dem DakoPen vorsichtig umrandet und in die bereits vorbereitete Feuchtekammer verbracht.

In der Feuchtekammer wurde dann der nächste Arbeitsschritt eingeleitet, das Blockieren (Arbeitsschritt 4). Hierzu wurde mittels Pipette die bereits aufgetaute Blockierlösung (10% NGS in PBS) auf alle Proben aufgebracht und für 1 Stunde in geschlossener Feuchtekammer inkubiert. Je nach Größe des Gewebes, wurden hierbei pro Probe etwa 50-80µl Blockierlösung benötigt.

Im letzten Arbeitsschritt (Arbeitsschritt 5) des ersten Tages wurde dann schlussendlich der Primärantikörper bzw. das Kaninchenserum (KS) auf die Proben gebracht. Zunächst wurden die Objektträger einzeln aus der Feuchtekammer genommen, vorsichtig abgeklopft, um die Blockierlösung zu entfernen, und dann wieder in die Kammer zurückgelegt. Nachdem dies erfolgt war, wurde auf alle der Positivkontrolle dienenden Objektträger (“+“, “Anti-TRPC6 1:100“) der 1:100 verdünnte Primärantikörper pipettiert. Auf den als Negativkontrolle ausgewiesenen Objektträger (“-“, “NK“, “KS 1:500“) wurde entsprechend das 1:500 verdünnte Kaninchenserum aufgebracht. Für die einmalig durchgeführte Peptidinkubation wurde das Peptid an dieser Stelle ebenso auf den entsprechenden Objektträger verbracht (siehe Kapitel 1.8.8). Wie im vorangegangenen Schritt waren auch hier etwa 50-80µl je Gewebeprobe notwendig. Die Inkubation erfolgte schließlich über Nacht bei Raumtemperatur in der geschlossenen Feuchtekammer. Zu beachten war dabei, dass die Pipettenspitze stets gewechselt wurde, um Verschleppungen bzw. Verunreinigungen zu vermeiden.

Tag 2:

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst aus der Feuchtekammer genommen, abgeklopft und dann in einen Objektträgerkorb verbracht. Dieser wurde dann zwei Mal für jeweils 2 Minuten in PBS-Lösung überführt. Anschließend erfolgte nochmal die Entnahme der Objektträger aus dem Korb, gefolgt von einem Abklopfen und dem Verbringen in die Feuchtekammer, in die in der Zwischenzeit ein neues, genässtes Papiertuch ausgelegt wurde. Dort pipettierte ich dann das bereits vorbereitete 3%ige H_2O_2 in PBS auf alle Schnitte und ließ dies für 10 Minuten in geschlossener Feuchtekammer inkubieren (Arbeitsschritt 6). Nachfolgend überführte ich die Proben, nach Entnahme aus der Feuchtekammer und dem Abklopfen, nochmals in einen Korb und verbrachte diesen für weitere zwei Mal in PBS-Lösung. Die Verweildauer betrug dabei jeweils 2 Minuten.

Aus der PBS-Lösung wurden die Schnitte dann nach einem kurzen Abklopfen wieder in die Feuchtekammer gelegt, wo dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgte (Arbeitsschritt 7). Dieser HRP-konjugierte Antikörper, der nach Vorbereitung bereits 1:500 verdünnt war, wurde auf alle Schnitte pipettiert und diese dann für 60 Minuten in geschlossener Feuchtekammer belassen. Diesem Schritt folgte wiederum ein zweimaliges Waschen in PBS für jeweils 2 Minuten, wofür die Objektträger wieder in den entsprechenden Korb verbracht werden mussten.

Darauffolgend schloss sich die DAB-Färbung an. Ich nahm einen Objektträger aus der PBS-Lösung, klopfte diesen ab und verbrachte ihn letztlich unter ein vorbereitetes Mikroskop. Folglich brachte ich die bereits vorbereitete 1:1 verdünnte DAB-Lösung unter mikroskopischer Sicht auf die Gewebeprobe auf und startete einen Timer. Dabei beobachtete ich stets unter dem Mikroskop, ob farbliche Veränderungen im Sinne einer Braunfärbung eintraten. Nach ausreichender Färbung verbrachte ich die Probe dann nochmal zum Stoppen der Reaktion in PBS Lösung und hielt den Timer an. Die benötigte Zeit musste nun für alle folgenden Proben dieser Färbeserie eingehalten werden. Beim ersten Färbedurchgang betrug die Zeit der Inkubation mit DAB dabei 13 Minuten, beim zweiten Färbedurchgang 13,5 Minuten. Nachdem die gemäß der gestoppten Zeit durchgeführte Inkubation erfolgt war und die Proben zum Stoppen der Reaktion in PBS-Lösung verbracht wurden, schloss sich die Gegenfärbung (Arbeitsschritt 8) an.

Hierzu verbrachte ich den Objektträgerkorb zunächst für 1 Minute in destilliertes Wasser, gefolgt von einem einmaligen, kurzen Dippen in gefilterte Hämatoxylin nach Ehrlich Lösung. Es folgte eine weitere Minute in destilliertem Wasser, bevor die Proben dann zum Bläuen für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser verweilten. Von dort führte ich die Proben der aufsteigenden Alkoholreihe unter dem Abzug zu. Dafür verblieben die Proben für jeweils 5 Minuten in verschieden konzentrierten 2-Propanol Lösungen (70%, 80%, 90%, 2x 100%). Abgeschlossen wurde dieser Schritt mit drei Durchgängen zu jeweils 5 Minuten in Xylol.

Der letzte, ebenfalls unter dem Abzug stattfindende Arbeitsschritt, das Eindecken und Trocknen, ist identisch zu dem, der bereits bei der HE-Färbung (Kapitel 1.7.3) beschrieben wurde und kann dort entnommen werden.

1.8.6 Färbeprinzip

Der genaue Ablauf wurde bereits beschrieben. Details dazu können in den vorangegangenen Kapiteln nachgelesen werden. Dieses Kapitel widmet sich speziell den wesentlichen Prinzipien der in dieser Arbeit genutzten IHC. Dabei wird dezidiert auf die einzelnen Arbeitsschritte eingegangen.

Arbeitsschritt 1 - Vorbereitung:

Gemäß Protokoll fanden hierbei nur vorbereitende Maßnahmen statt.

Arbeitsschritt 2 - Entparaffinieren:

Damit der genutzte Primärantikörper überhaupt die Möglichkeit hat an das Antigen - TRPC6-Protein - zu binden, müssen die Gewebeproben zunächst entparaffiniert werden. Dieser Schritt erfolgt mithilfe des Xylols. Die sich anschließende Rehydrierung gelingt mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und letztlich durch destilliertes Wasser.

Arbeitsschritt 3 - Desmaskierung:

Im Rahmen der Probenverarbeitung, insbesondere durch die Fixierung des Gewebes, kommt es zu Vernetzungen von Proteinen und deren Denaturierung, die zu einem Verdecken der Antigene führen können. Man spricht dabei auch von der Maskierung des Antigens (Lang, 2006). Somit ist dieses nicht für den entsprechenden Antikörper zugänglich. Damit allerdings die Bindung des Primärantikörpers an das Epitop des Antigens - eine spezielle Stelle am Antigen - stattfinden kann, muss letzteres freigelegt bzw. demaskiert werden.

Die Demaskierung erfolgte in dieser Arbeit durch Einfluss von Hitze (95°C) für 60 Minuten im Wärmeschrank. Das Lagern in 1% Citrat-Puffer pH6 unterstützte dabei den Prozess der Rehydrierung, aber auch die Renaturierung der Proteine. Damit stellt die Vorbehandlung mit Pufferlösung mitunter eine Grundlage für die Primärantikörper-Behandlung dar.

Das Waschen mit PBS (phosphate-buffered-saline) dient letztlich der Schaffung eines optimalen Milieus für den Antikörper. Dieser ist seinerseits ein Protein und entsprechend abhängig vom Umgebungs-pH. Die Pufferlösung wird nicht nur zum Waschen genutzt, sondern auch zum Verdünnen (siehe Protokoll).

Arbeitsschritt 4 - Blockieren:

Damit der Sekundärantikörper nicht unspezifisch bindet, ist es erforderlich die Gewebeprobe mit einer Blockierlösung zu inkubieren. In diesem Fall erfolgte die Inkubation mit einem 10%igen Ziegen Serum (Normal Goat-Serum, 10% NGS), das bereits mit PBS verdünnt war.

Arbeitsschritt 5 - Primärantikörper:

Um die Inkubation mit dem Primärantikörper zu ermöglichen, ist das vorangegangene Prozedere notwendig, um optimale Voraussetzungen zu schaffen.

Bei dem in der Arbeit genutzten Primärantikörper (Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) handelt es sich um einen aus Kaninchen gewonnenen, polyklonalen IgG-Antikörper. Dieser ist gegen eine Sequenz, bestehend aus 15/16 Aminosäureresten, am intrazellulären N-Terminus des TRPC6-Proteins gerichtet (siehe Kapitel 1.2.2). Diese Sequenz bezeichnet man auch als Epitop.

Der Antikörper bindet mit seinem Fab-Teil (Fragment Antibody-binding) an das entsprechende Epitop (Lang, 2006). Sein Fc-Teil (Fragment constant) bleibt zunächst frei. Im weiteren Verlauf bindet hier der Sekundärantikörper.

Für die Inkubation der Negativkontrolle wurde nicht-immunes Kaninchenserum genutzt, das zu keiner Bindung am Gewebe führen sollte.

Arbeitsschritt 6 - Peroxidase-Inaktivierung:

Da eine Peroxidase an der Umsetzung des Chromogensubstrats DAB (Arbeitsschritt 7) beteiligt ist, ist es erforderlich die endogenen Peroxidasen zu inaktivieren. Eine fehlende Inaktivierung könnte zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. Zur Blockade der endogenen Peroxidasen wurde 3%iges H₂O₂ genutzt. Durch den Überschuss an Substrat - in diesem Fall H₂O₂ - kommt es zu einer kompetitiven Inhibierung der Enzyme (Lang, 2006).

Arbeitsschritt 7 - Sekundärantikörper:

In diesem Fall handelt es sich um einen aus Ziegen gewonnenen, polyklonalen IgG-Antikörper. Dieser ist zusätzlich mit einem Enzym namens horseradish peroxidase (HRP) - im Deutschen als Meerrettischperoxidase bezeichnet - konjugiert. Sein Ziel ist der Primärantikörper, der, wie bereits erwähnt, aus Kaninchen gewonnen wurde. Der Sekundärantikörper bindet hierzu mit seinem Fab-Teil an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Infolge dieser Bindung kommt es zur Aktivierung der HRP, die ihrerseits mithilfe von H₂O₂ das Chromogen DAB umsetzt und zu einem bräunlichen Farbumschlag führt. Dieser Farbumschlag charakterisiert das Vorhandensein von TRPC6, denn ohne die Bindung des primären Antikörpers an sein Antigen (TRPC6) und die darauffolgende Bindung des Sekundärantikörpers mit konsekutiver Aktivierung des Enzyms, könnte diese Reaktion nicht vonstatten gehen. Die beschriebene Reaktion ist in *Abbildung 16* graphisch dargestellt.

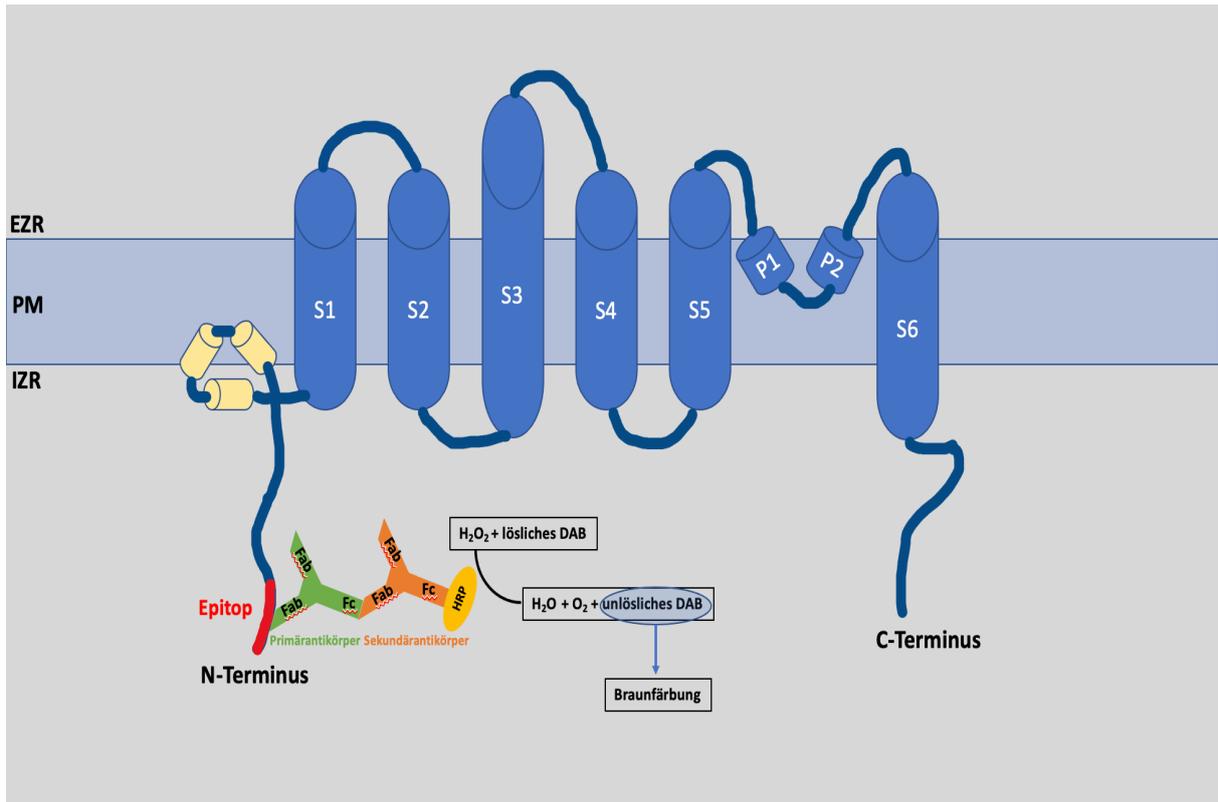


Abbildung 16 - Antikörperbindung und Katalyse der Farbreaktion

Einzelheiten sind der vorausgehenden Beschreibung zu entnehmen.

Arbeitsschritt 8 - Gegenfärben:

Die Gegenfärbung diente der Färbung der Strukturen, an die die Antikörper nicht gebunden haben, wie beispielsweise bei der Negativkontrolle. Dazu wurde Hämatoxylin verwendet, sodass die entsprechenden Strukturen blau gefärbt wurden. Die sich anschließende aufsteigende Alkoholreihe und das Xylol dienten wiederum, wie bereits bei der HE-Färbung beschrieben, dem Entwässern und letztlich dem Klären der Proben.

1.8.7 Abbildungen

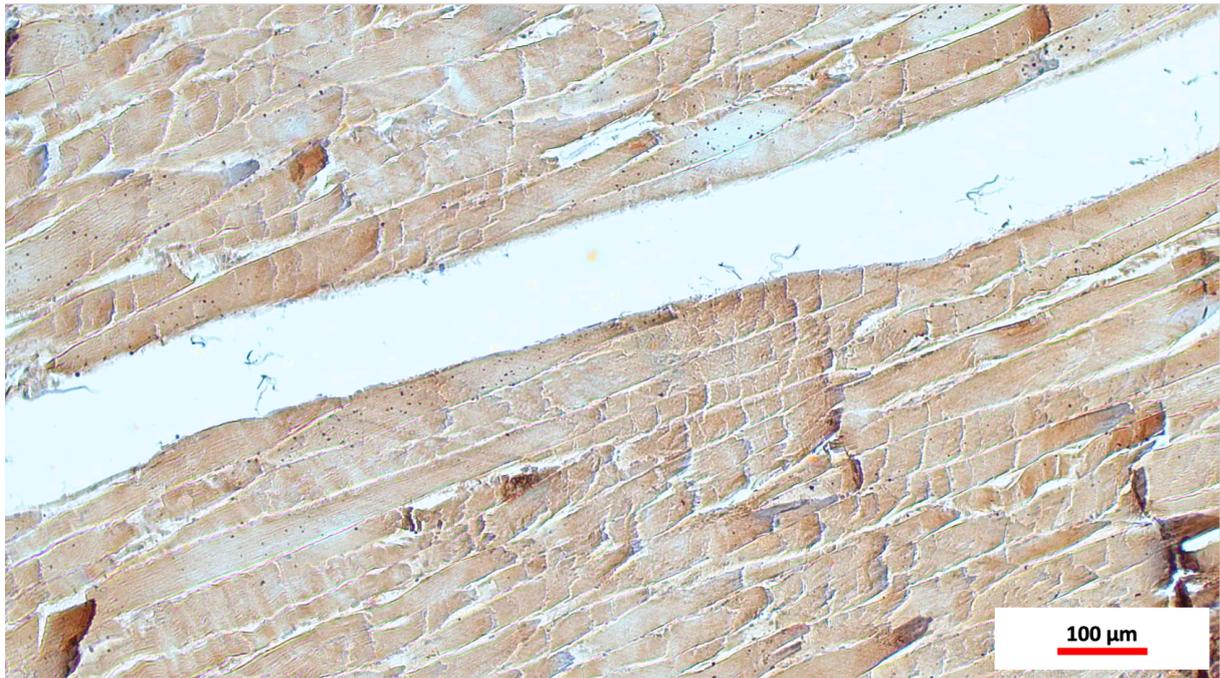


Abbildung 17 – Positivkontrolle Spender 1 M. trizeps brachii in 10x Vergrößerung

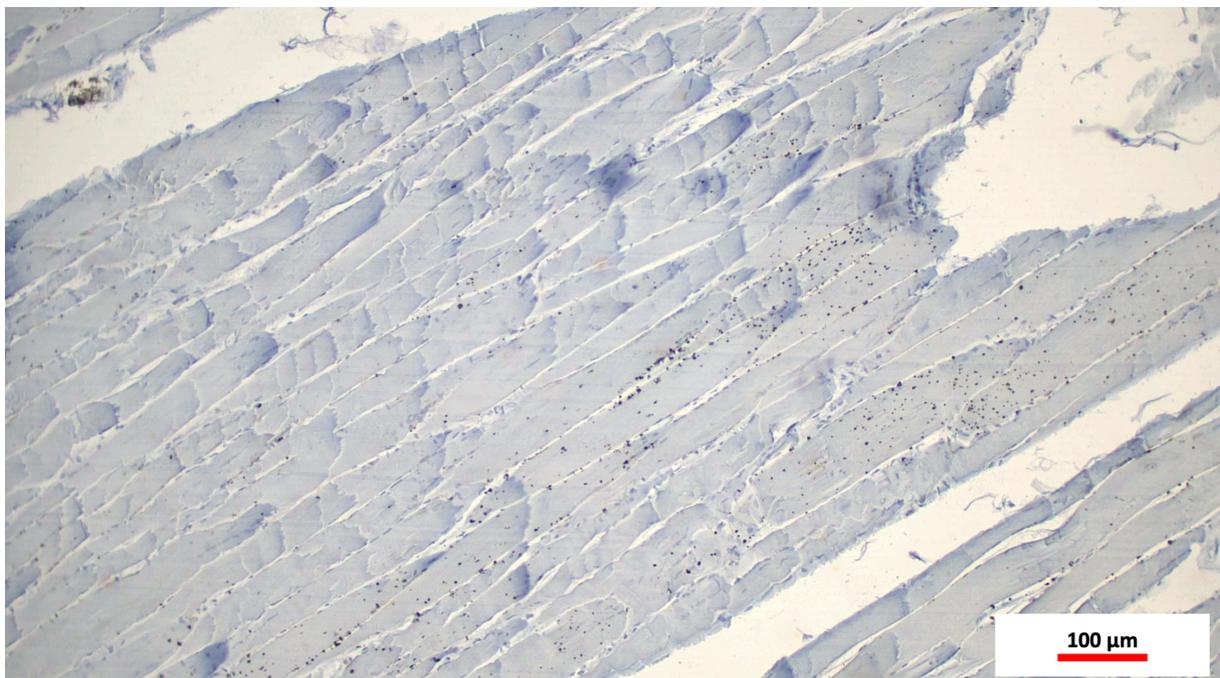


Abbildung 18 – Negativkontrolle Spender 1 M. trizeps brachii in 10x Vergrößerung

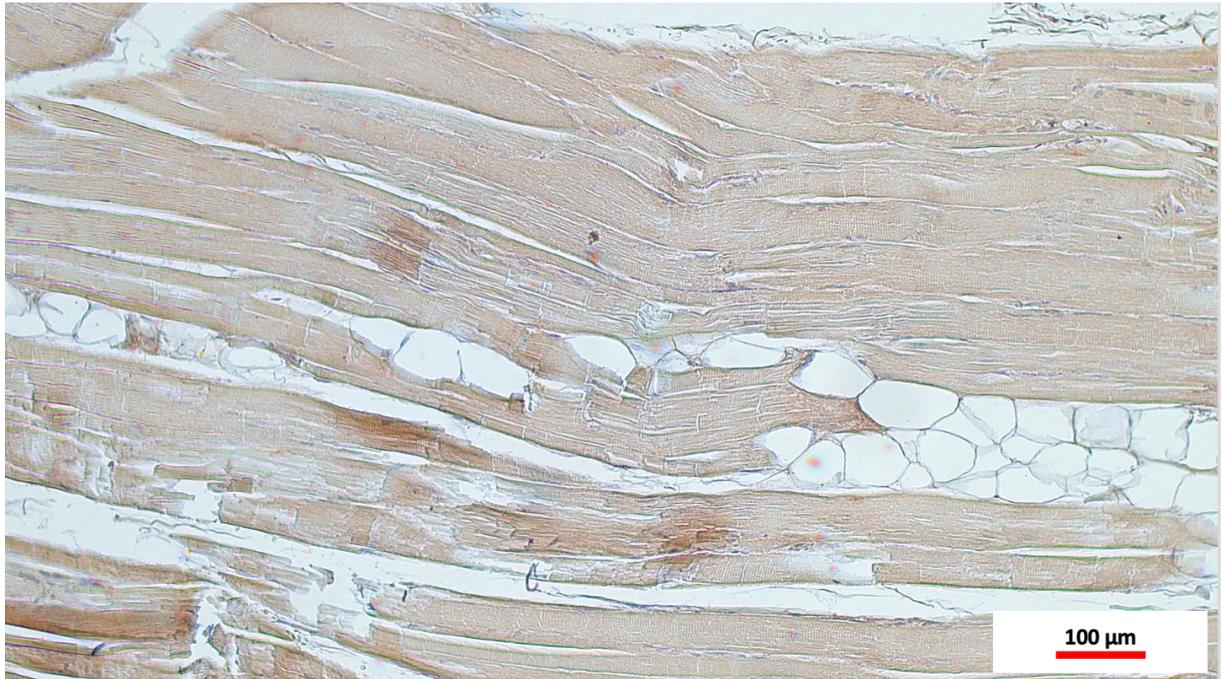


Abbildung 19 - Positivkontrolle Spender 7 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

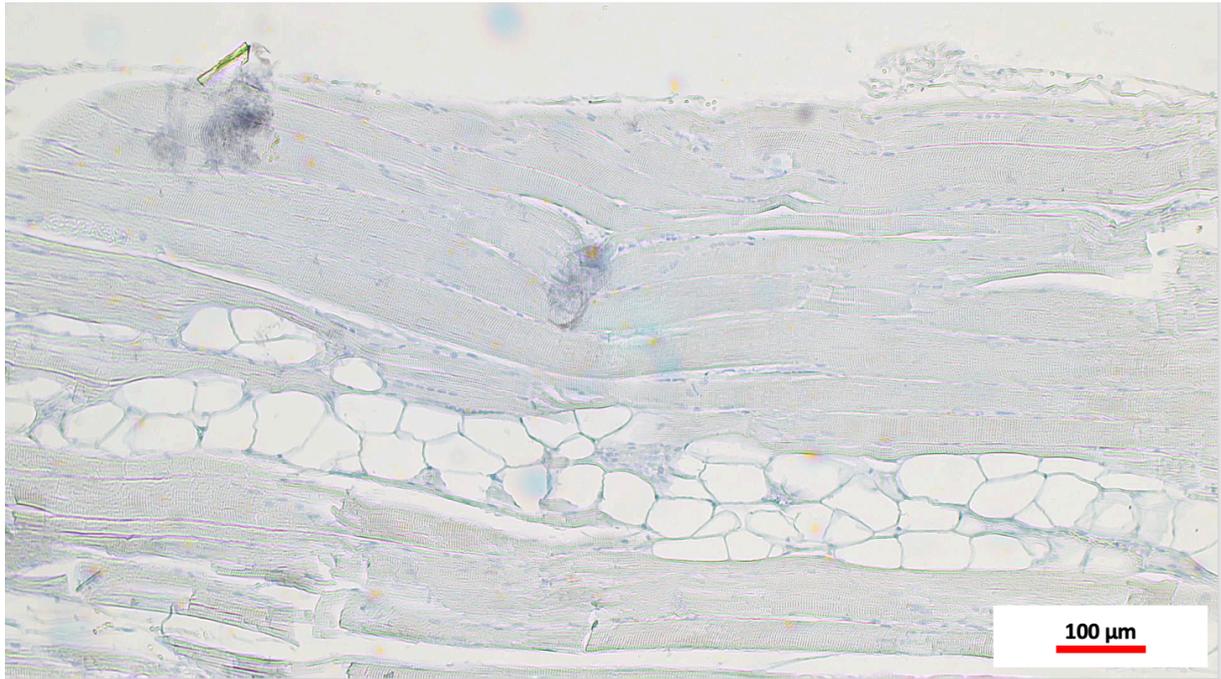


Abbildung 20 - Negativkontrolle Spender 7 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

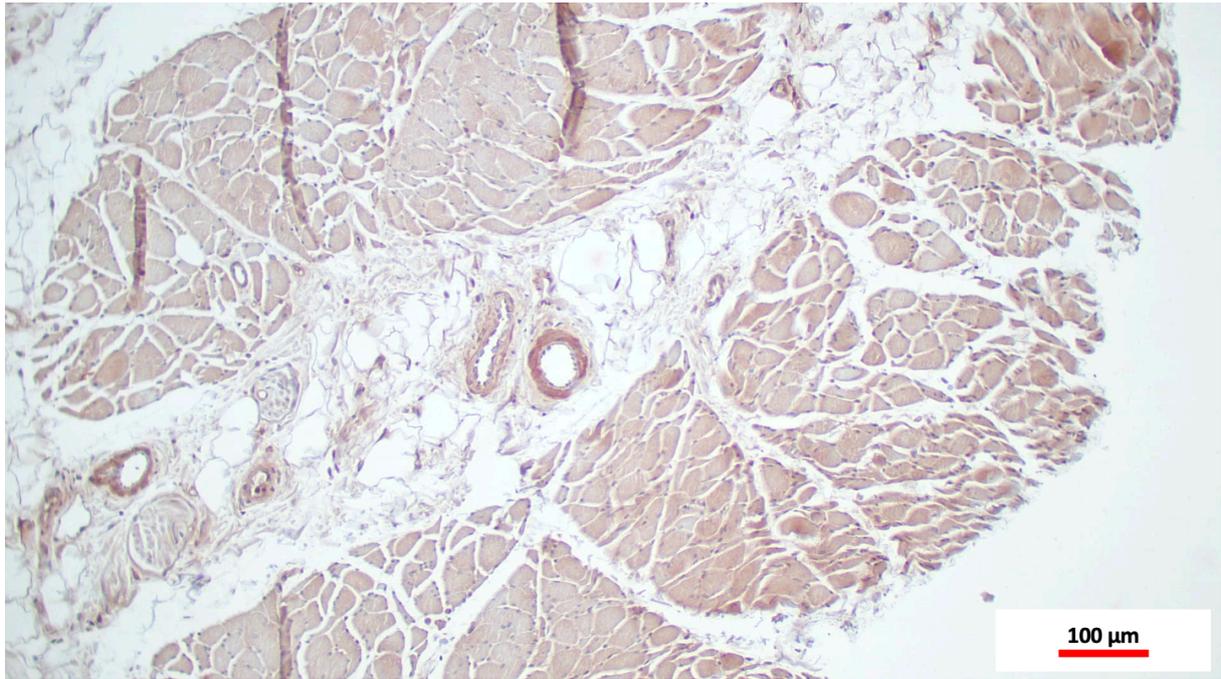


Abbildung 21 - Positivkontrolle Spender 8 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

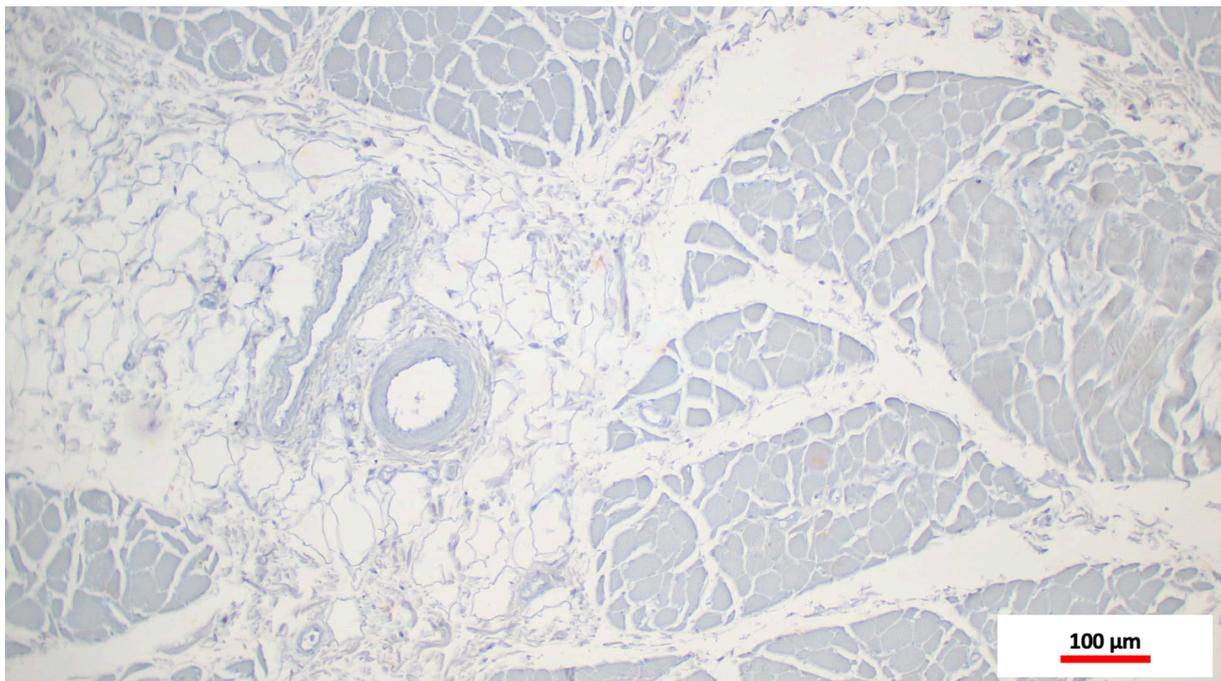


Abbildung 22 - Negativkontrolle Spender 8 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

1.8.8 Peptidinkubation

Im Sinne einer Spezifitätskontrolle und Qualitätssicherung der IHC, wurde einmalig eine Peptidinkubation des verwendeten TRPC6-Primärantikörpers mit einem Kontrollpeptid durchgeführt. Dazu wurde ein Tag vor Start der IHC das als Kristall gelieferte Kontrollpeptid (40µg) - Lagerung bei -20°C im Gefrierfach - mit 20µl PBS-Lösung über etwa 10 Minuten in einem Mikroreaktionsgefäß aufgelöst. Nach vollständigem Auflösen des Kristalls wurden 40µl des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 hinzu pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 60µl vorlag. Dieses reichte aus, um die für die Peptidinkubation genutzte Probe vollständig zu bedecken. Zu beachten war, dass für die Peptidinkubation dieselbe Verdünnung des Primärantikörpers gewählt wurde, wie für die IHC (1:100). Nachdem die Lösung - Kontrollpeptid in PBS + Primärantikörper - fertig angesetzt war, wurde das sorgfältig beschriftete Mikroreaktionsgefäß über Nacht im Kühlschrank gelagert. Dabei konnte es bis zu sieben Tage derart im Kühlschrank gelagert werden, wobei für meine Arbeit das Kontrollpeptid am darauffolgenden Tag genutzt wurde.

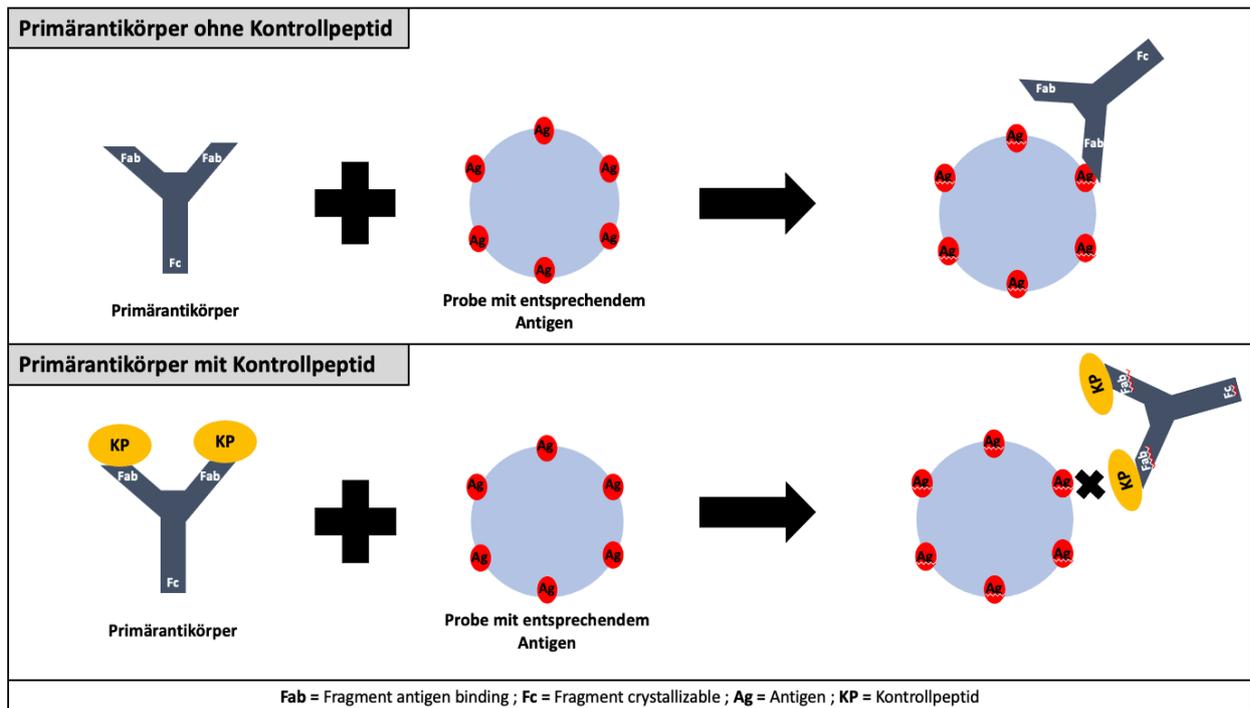


Abbildung 23 - Kontrollpeptidinkubation des Primärantikörpers

Die Abbildung zeigt oben den Primärantikörper ohne Inkubation mit einem Kontrollpeptid und die folgende Bindung an sein Antigen. Im unteren Abschnitt ist der Primärantikörper zunächst mit einem Kontrollpeptid inkubiert worden, sodass eine Bindung an sein Antigen nur erschwert oder gar nicht möglich ist.

Der peptidinkubierte Primärantikörper kam im Rahmen der IHC im fünften Arbeitsschritt (Kapitel 1.8.1) zur Anwendung und wurde dort auf eine zuvor ausgewählte Probe pipettiert. Der dazugehörige Objektträger wurde entsprechend beschriftet und damit gekennzeichnet. Neben Journalnummer und Ausweisung der entsprechenden Gewebeprobe wurde der Objektträger zusätzlich mit "Peptid" beschriftet.

Das Prinzip der Peptidinkubation basiert auf einer - durch Bindung des Primärantikörpers - abgeschwächten bzw. fehlenden Bindung des Primärantikörpers an das TRPC6-Protein. Insgesamt gilt die Peptidinkubation als erfolgreich, wenn die peptidinkubierte Probe schwächer gefärbt ist, als die Probe, die mit dem reinen Primärantikörper behandelt wurde oder eine entsprechende Färbung im Vergleich zur normal behandelten Probe ausbleibt. Dieser Sachverhalt kann nochmal anhand von **Abbildung 23** nachvollzogen werden.

Der Primärantikörper bindet im normalen Fall mit seinem Fab-Teil an das Antigen (TRPC6-Protein). Im Anschluss kann an seinem Fc-Teil der Sekundärantikörper binden, der dann einen Prozess in Gang setzt (siehe Kapitel 1.8.6). Wird der Fab-Teil des allerdings blockiert, etwa durch ein Kontrollpeptid, so kann eine Bindung des primären Antikörpers an sein Antigen nicht oder nur unzureichend realisiert werden. In der IHC zeigte sich dies durch eine abgeschwächte bzw. fehlende, charakteristische Braunfärbung der Probe.

Die **Abbildungen 24 und 25** zeigen die Positiv- und die korrespondierende Peptidkontrolle, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, **Abbildung 26** hingegen die korrespondierende Negativkontrolle.

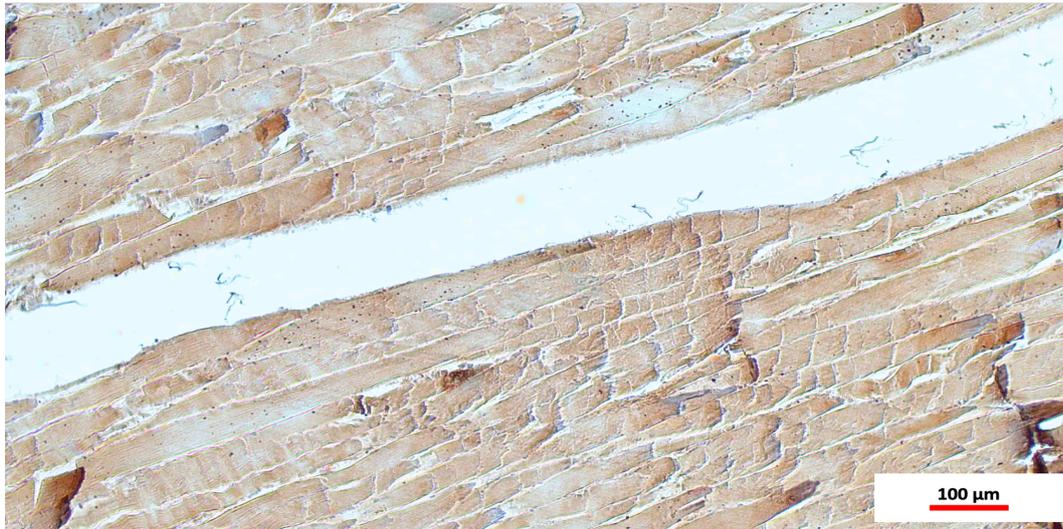


Abbildung 24 - Positivkontrolle Spender 1 M. triceps brachii in 10x Vergrößerung

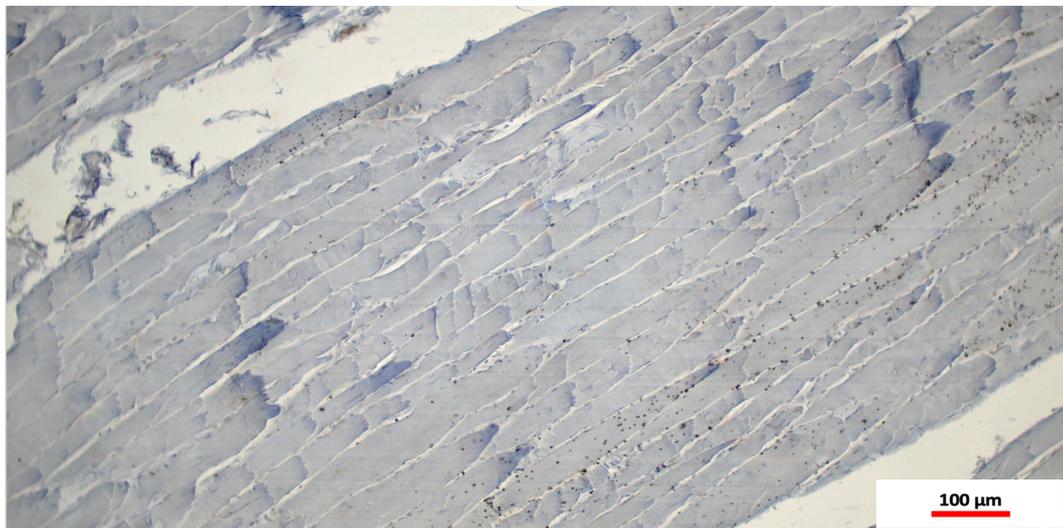


Abbildung 25 - Peptidkontrolle Spender 1 M. triceps brachii in 10x Vergrößerung

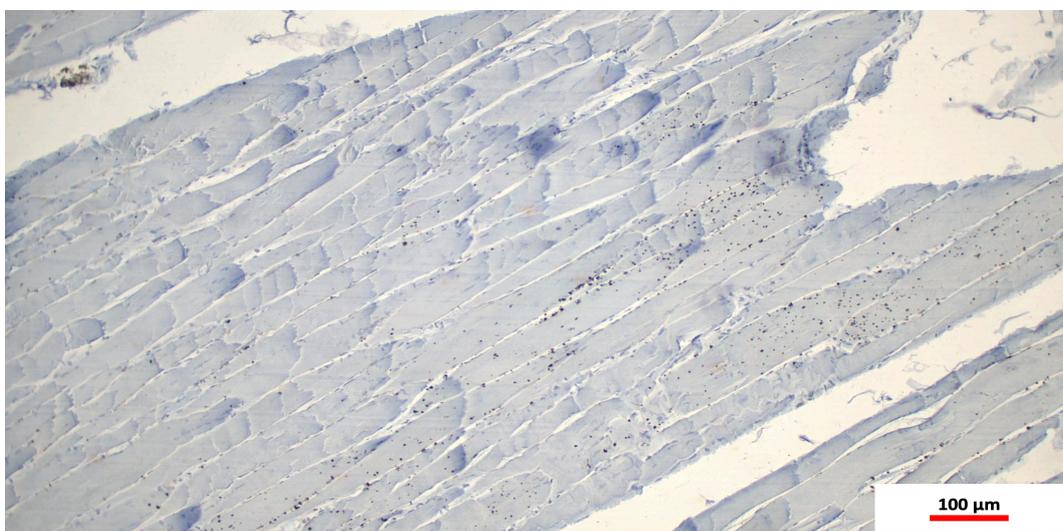


Abbildung 26 - Negativkontrolle Spender 1 M. triceps brachii in 10x Vergrößerung

9. Erfassung der Daten

Die Erfassung der Daten erfolgte mithilfe eines Mikroskops, wobei die erste Auswertung eigenständig durchgeführt wurde, während eine zweite, neutrale Beurteilung durch eine neutrale Person aus dem nicht-medizinischen Bereich realisiert wurde. Die Person wurde zunächst in das Bedienen des Mikroskops unterwiesen bevor dann die Proben gemäß des Auswertungsschemas (Kapitel 11) ausgewertet wurden. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind im folgenden Kapitel dargestellt.

IV. Ergebnisse

In Anlehnung an eingangs beschriebener Zielsetzung der Arbeit (Kapitel 1.2.6), sollen nun im Folgenden dezidiert die Ergebnisse dargestellt werden, bevor dann eine Präsentation des Gesamtergebnisses folgt.

10. Überblick

In der zugrundeliegenden Arbeit wurden insgesamt 21 Gewebeproben (nur Positivkontrollen) aus acht Spendern immunhistochemisch untersucht. Die Proben wurden in mehreren Färbeserien bearbeitet, wobei pro Färbeserie zusätzlich eine weitere Probe als Negativkontrolle herangezogen wurde. Zudem wurde in einem Färbegang die bereits beschriebene Peptidinkubation vollzogen.

Im Sinne einer Kreuzauswertung führte ich bei einem Spender die IHC an allen vier beschriebenen Muskeln durch. Zur Vergleichbarkeit wurden zudem alle Proben des M. pectoralis major der einzelnen Spender der IHC zugeführt. Letztlich wurde von jedem Spender stichprobenartig mindestens eine weitere Probe immunhistochemisch untersucht.

Das Kreuzschema kann anhand von **Tabelle 10** beispielhaft nachvollzogen werden.

	Spender 5	Spender 6	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 7	Spender 8
M. pectoralis major	Grün							
M. deltoideus	Grün							
M. trizeps brachii	Grün							
M. rectus femoris	Grün							

Tabelle 10 - Auswertungsschema der IHC

Erläuterungen zur Tabelle sind dem Text (s.o.) zu entnehmen. Grün ausgefüllte Kästchen bedeuten, dass die jeweilige Probe der IHC zugeführt wurde. Grau ausgefüllte Kästchen bedeuten entsprechend, dass die jeweilige Probe nicht der IHC zugeführt wurde.

Aus dem Auswertungsschema ergibt sich somit folgende Verteilung bzw. Repräsentation der genutzten Skelettmuskelproben:

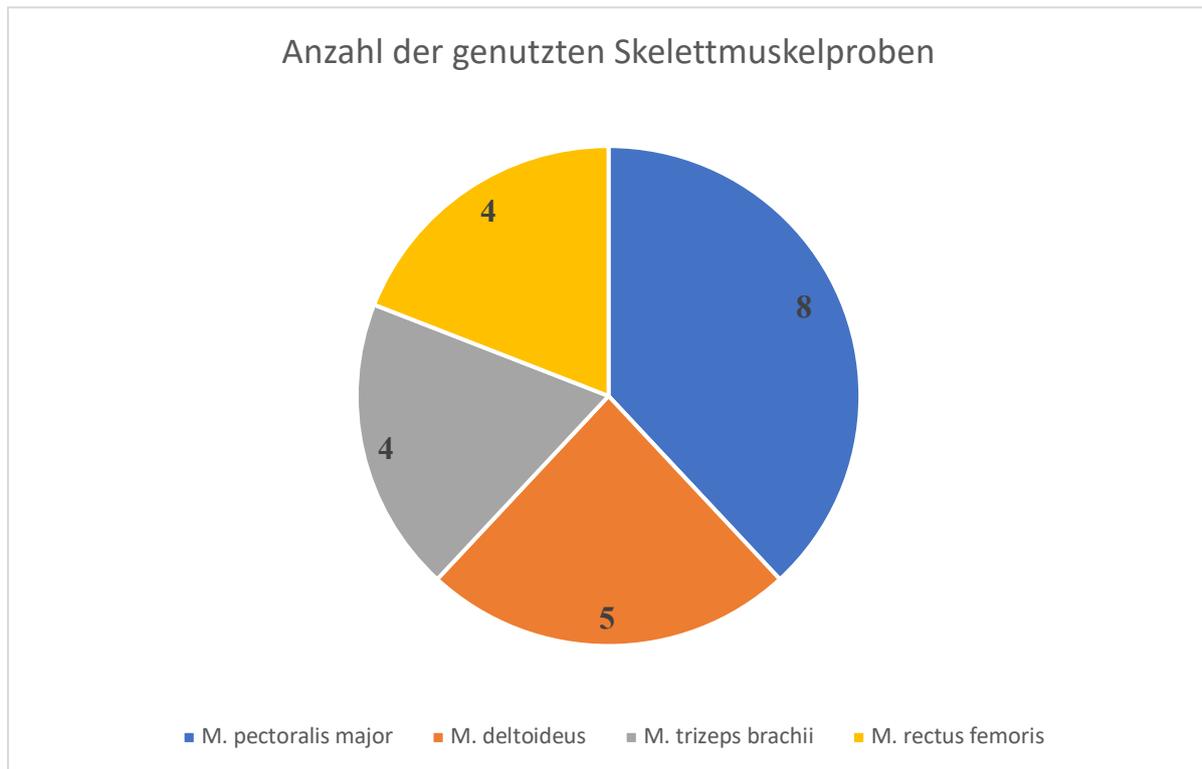


Diagramm 1 - Übersicht der eingeschlossenen Skelettmuskelproben

Dargestellt ist das Zustandekommen der insgesamt 21 genutzten Skelettmuskelproben, die für die Studie genutzt wurden. Acht der 21 Proben stammen vom *M. pectoralis major* (blau kodiert). Jeweils vier Proben stammen vom *M. trizeps brachii* (grau kodiert) und *M. rectus femoris* (gelb kodiert). Die verbleibenden fünf Proben stammen vom *M. deltoideus* (orange kodiert).

Bei allen 21 untersuchten Proben ergab sich in der IHC ein positives Signal, das jedoch von unterschiedlicher Intensität war.

11. Allgemeines zur Ergebnisinterpretation

Im Rahmen der mikroskopischen Auswertung wurden die Präparate von mir im Gesamten betrachtet und je nach Ergebnis der IHC, eine Zuordnung in starkes Signal, mittleres Signal, schwaches Signal und kein Signal vollzogen.

Ein starkes Signal definierte ich hierbei als homogene Braunfärbung des Gewebes mit keinen bzw. nur geringfügigen Aussparungen der Färbung bzw. kleineren blaugefärbten Arealen. Die Zuordnung zur Gruppe mittleres Signal erfolgte, wenn der Großteil (>50% des Gesamtpräparates) braungefärbt und entsprechend größere Areale des Präparates ungefärbt bzw. blaugefärbt waren. Ein schwaches Signal definierte ich als ein Überwiegen der ungefärbten bzw. blaugefärbten Areale (>50% des Gesamtpräparates), also wenn der braungefärbte Anteil weniger als die Hälfte des Gesamtpräparates einnahm. Letztlich zeigte kein Signal die fehlende Braunfärbung der entsprechenden Probe an. Dieses Schema ist nochmals in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Nach eigenständiger Auswertung wurde eine unabhängige Auswertung der Proben nach selbigem Schema im Rahmen einer Fremdauswertung getätigt.

Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind Teil der folgenden Kapitel und sollen dort näher erläutert werden.

Kategorie	Definition
starkes Signal	<ul style="list-style-type: none"> • homogene Braunfärbung der Probe • keine/geringfügige Aussparung der Braunfärbung, kleinere Blauanteile
mittleres Signal	<ul style="list-style-type: none"> • mehr als die Hälfte der Probe ist braungefärbt • einige, größere Areale un-/blaugefärbt
schwaches Signal	<ul style="list-style-type: none"> • weniger als die Hälfte der Probe ist braungefärbt • größtenteils Blaufärbung
kein Signal	<ul style="list-style-type: none"> • keine Braunfärbung ersichtlich

Tabelle 11 - Interpretationsschema der Probenauswertung

12. Ergebnisse in Abhängigkeit der Fixierung

Wie eingangs erläutert, wurden für diese Arbeit Spender genutzt, die einer Fixierung mit Formalin oder NEP bzw. keiner Fixierung unterzogen wurden. Diese Kapitel belichtet die Ergebnisse dieser einzelnen Gruppen und fasst diese am Ende zusammen.

1.12.1 Ergebnisse der Formalinspender

In der Arbeit wurden Muskelproben von zwei (n=2) formalinfixierten Spendern untersucht. Repräsentativ wurden dazu zwei Proben des M. pectoralis major, zwei Proben des M. trizeps brachii sowie eine Probe des M. deltoideus herangezogen.

Bei all diesen Gewebeproben zeigte sich in der IHC ein positives Signal, wenngleich dieses von unterschiedlicher Intensität war. Eine Probe (Spender 1 Pectoralis major) zeigte ein schwaches Signal. Der Großteil war hierbei blaugefärbt, wobei kleinere Areale eine Braunfärbung aufwiesen. Hinsichtlich der Eigen- und Fremdauswertung bestand dabei keine gravierende Diskrepanz. Die Ergebnisse sind nochmal in den folgenden Diagrammen zusammengefasst.

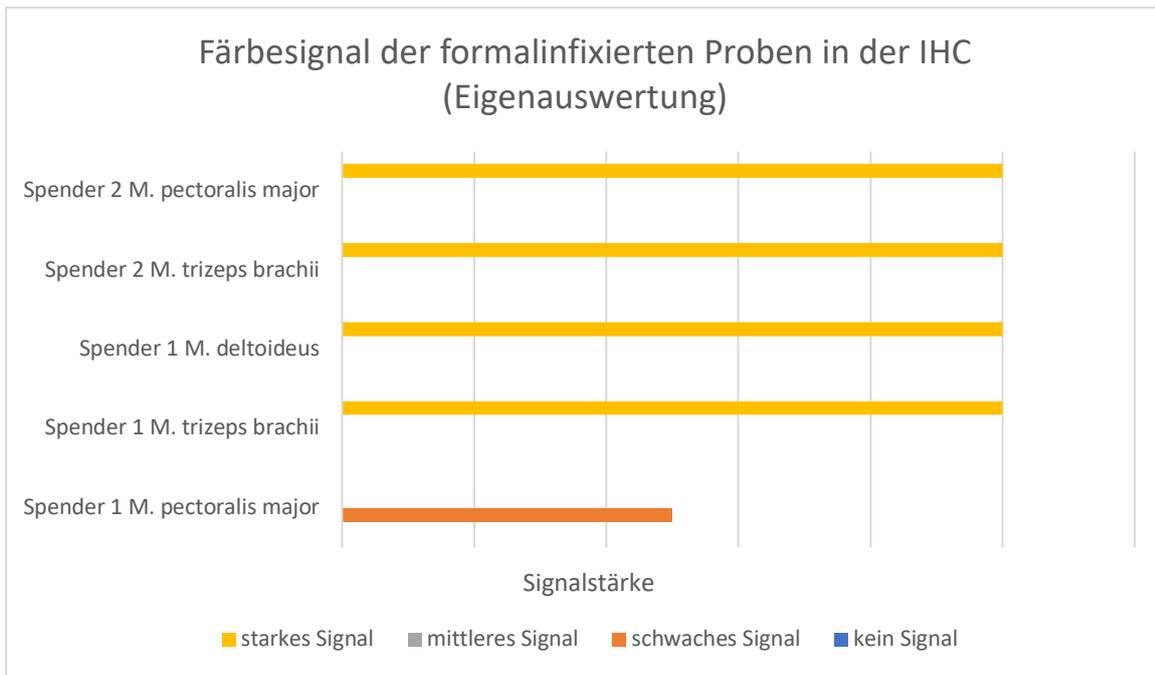


Diagramm 2 - Färbesignal formalinfixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten Formalinproben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeprobe, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

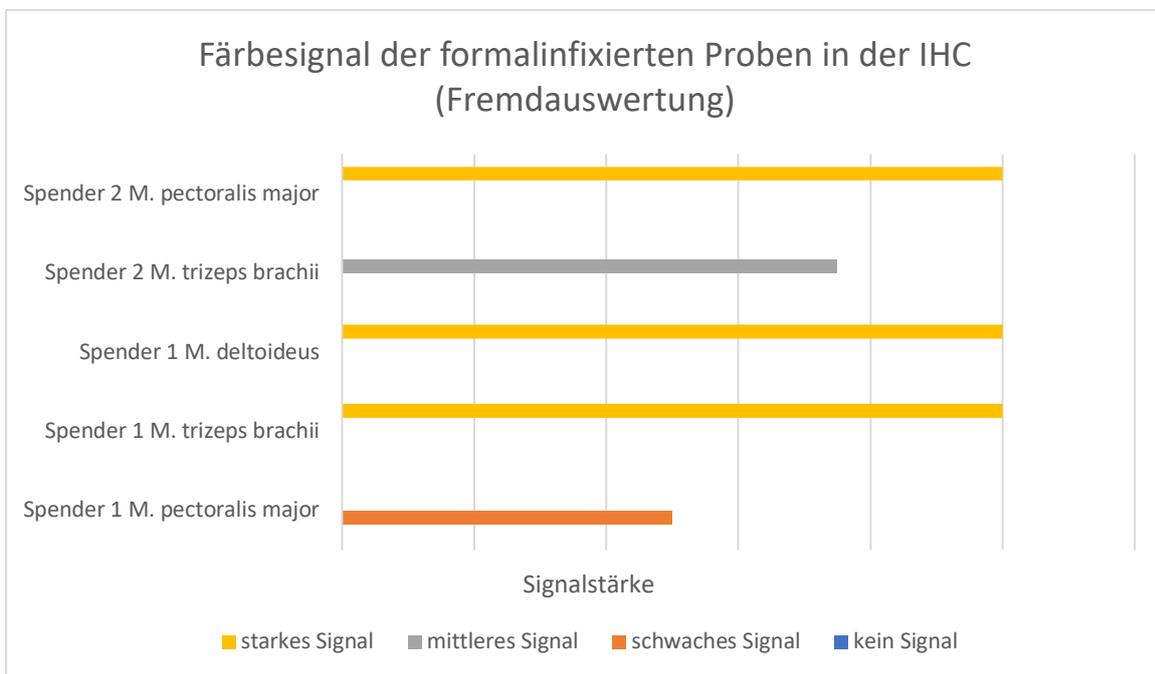


Diagramm 3 - Färbesignal formalinfixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten Formalinproben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeprobe, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

Bezugnehmend auf Punkt 1 der Zielsetzung (Kapitel 1.2.6) kann somit konstatiert werden, dass der Nachweis von TRPC6 im Skelettmuskelgewebe formalinfixierter Spender mittels IHC erbracht werden konnte und die erlangten Ergebnisse auch miteinander in Einklang zu bringen waren.

Die angefügten Bilder zeigen beispielhaft das Ergebnis der IHC am Skelettmuskelgewebe formalinfixierter Spender.

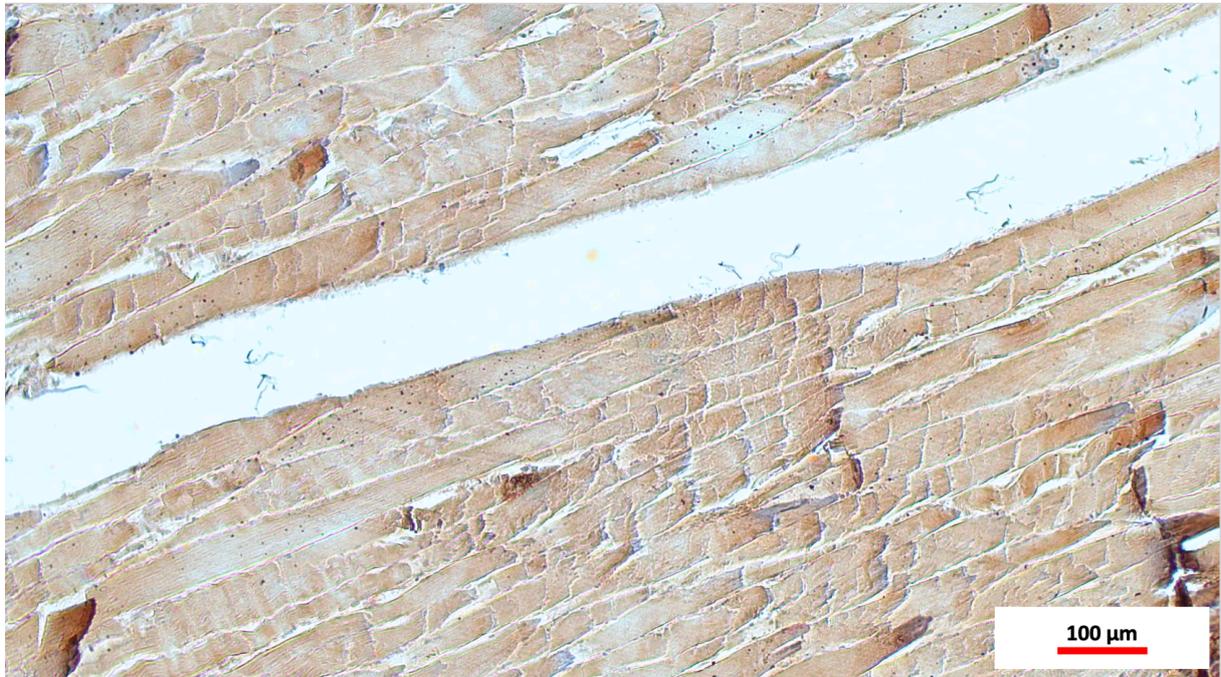


Abbildung 27 - Positivkontrolle Spender 1 M. trizeps brachii in 10x Vergrößerung

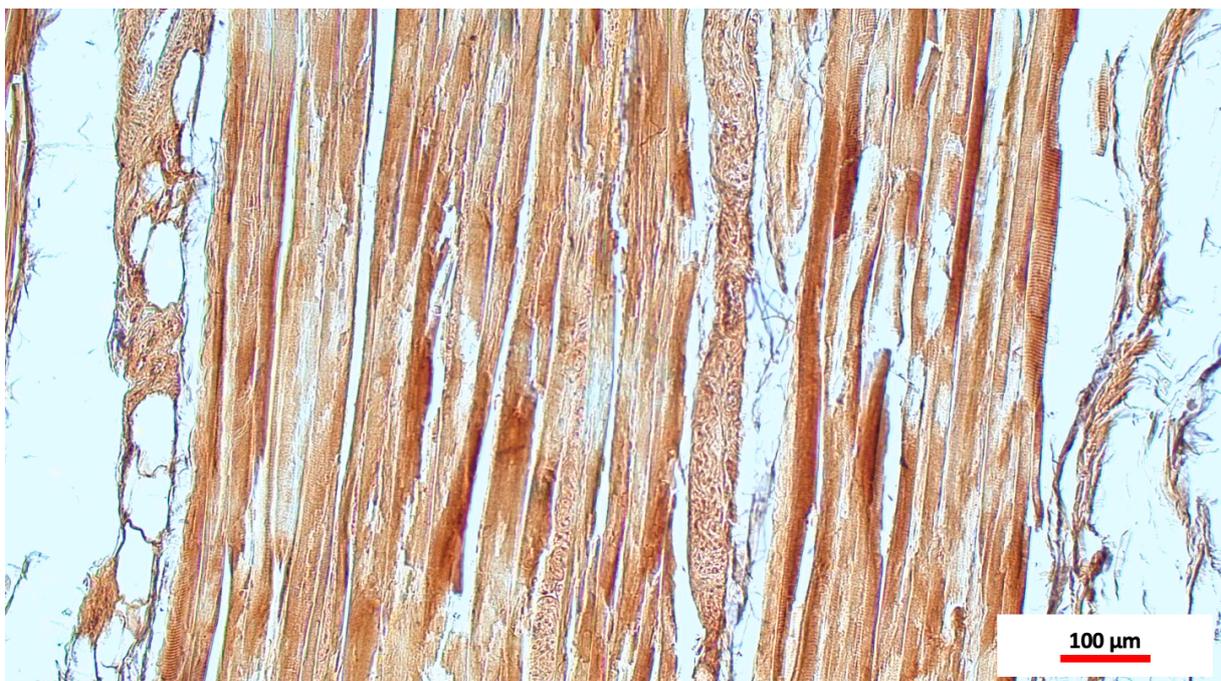


Abbildung 28 - Positivkontrolle Spender 1 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

1.12.2 Ergebnisse der NEP-Spender

Zusätzlich wurden Gewebeproben von vier (n=4) NEP-fixierten Spendern untersucht, von denen insgesamt vier Proben des M. pectoralis major, zwei Proben des M. trizeps brachii, zwei Proben des M. deltoideus sowie vier Proben des M. rectus femoris herangezogen wurden.

Auch bei den genannten Skelettmuskelproben zeigte sich in der IHC durchweg ein positives Signal. Unterschiede in der Intensität oder Aussparungen des Signals in kleineren Arealen der Proben waren auch hier zu beobachten. Im Wesentlichen bestanden auch in diesem Fall keine großartigen Diskrepanzen zwischen der eigenen und der Fremdauswertung.

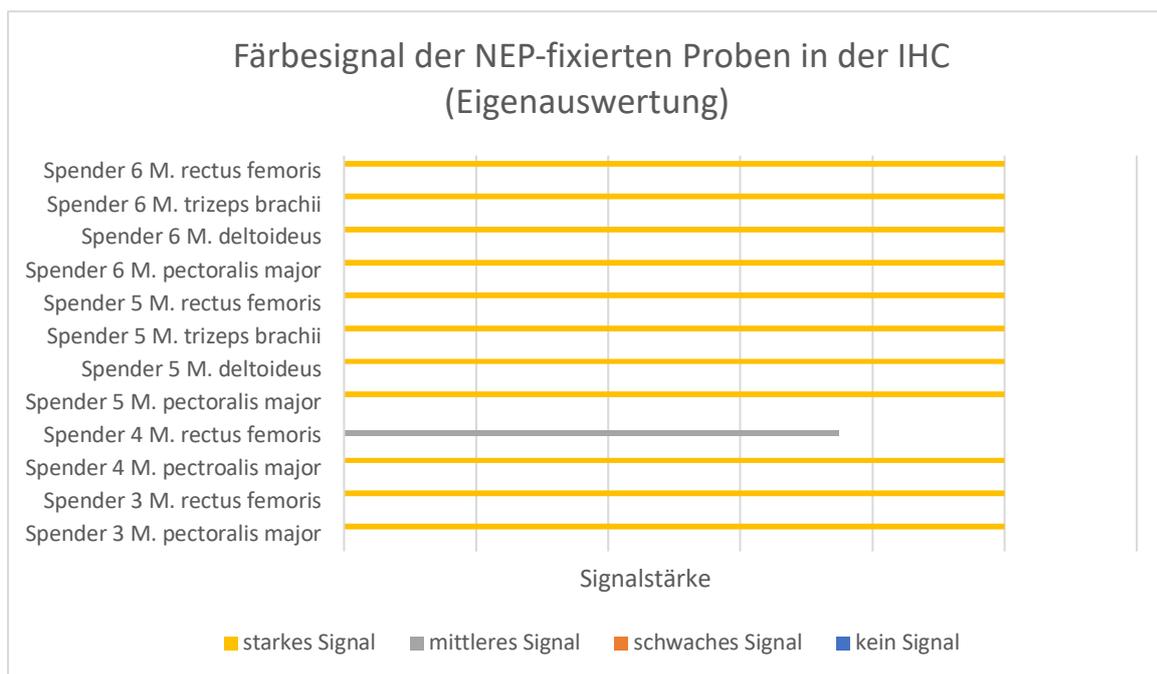


Diagramm 4 - Färbesignal NEP-fixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten NEP-Proben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

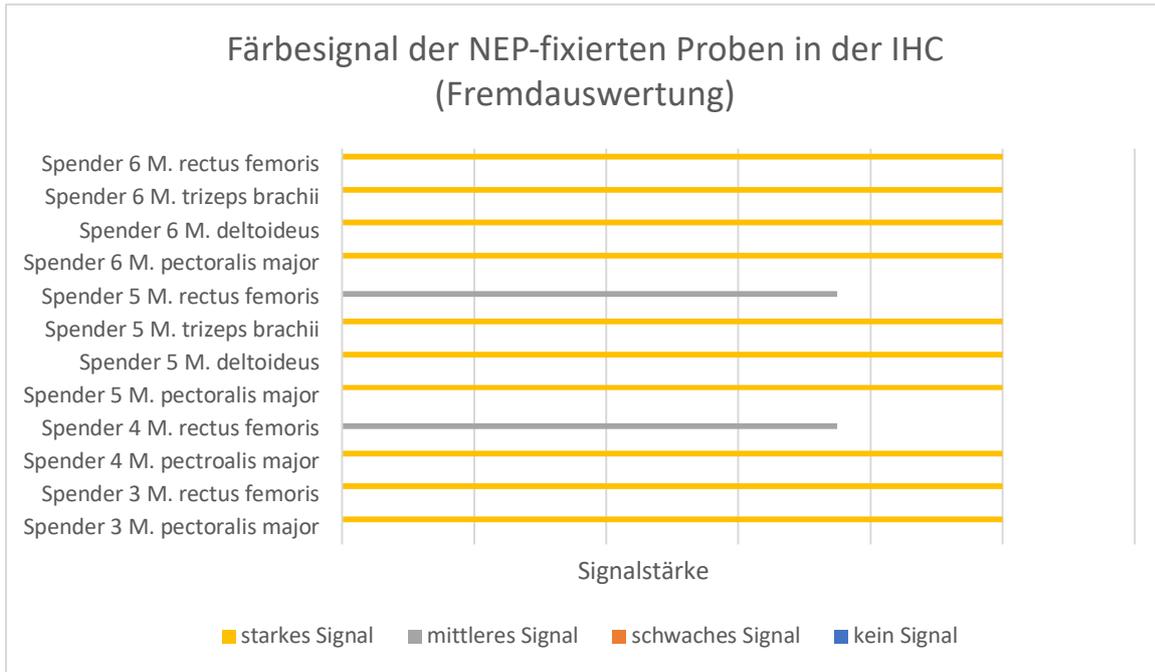


Diagramm 5 - Färbesignal NEP-fixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten NEP-Proben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeprobe, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

Damit ist auch der Nachweis von TRPC6 im Skelettmuskelgewebe NEP-fixierter Spender erbracht worden. Die Ergebnisse waren hierbei schlüssig und konnten ebenso miteinander in Einklang gebracht werden (siehe Punkt 2, Kapitel 1.2.6).

Einige ausgewählte Bilder zeigen beispielhaft das Ergebnis der stattgehabten IHC am Skelettmuskelgewebe NEP-fixierter Spender.

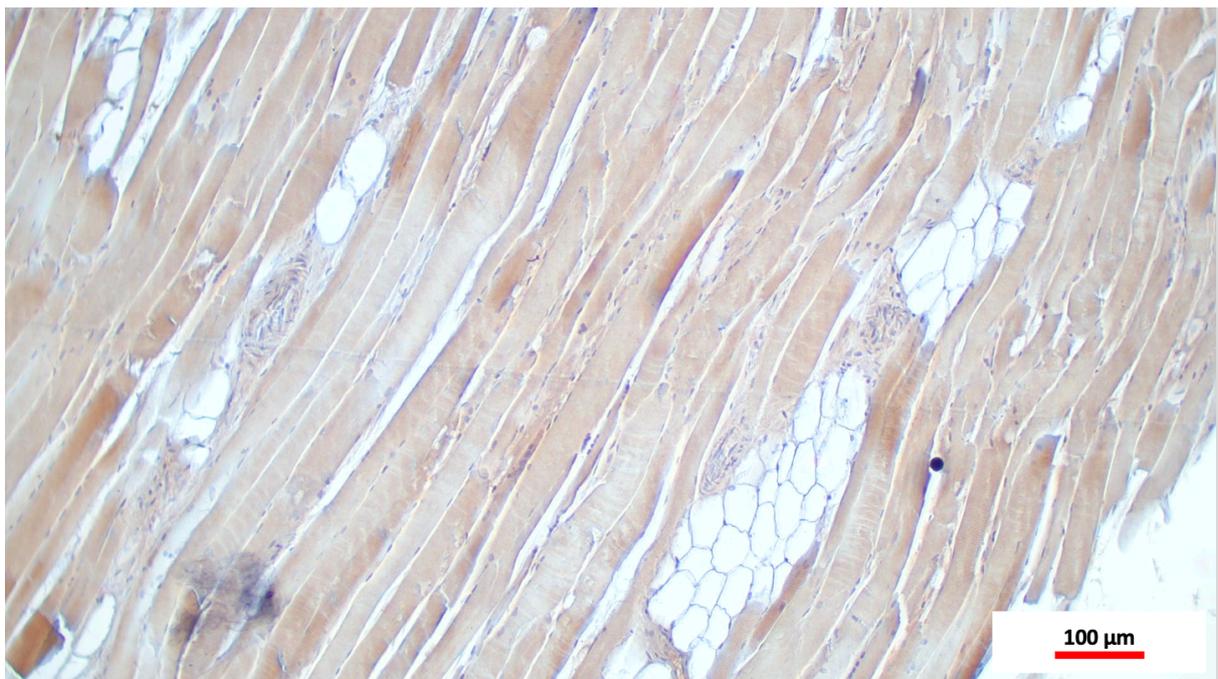


Abbildung 29 - Positivkontrolle Spender 3 M. pectoralis major in 10x Vergrößerung

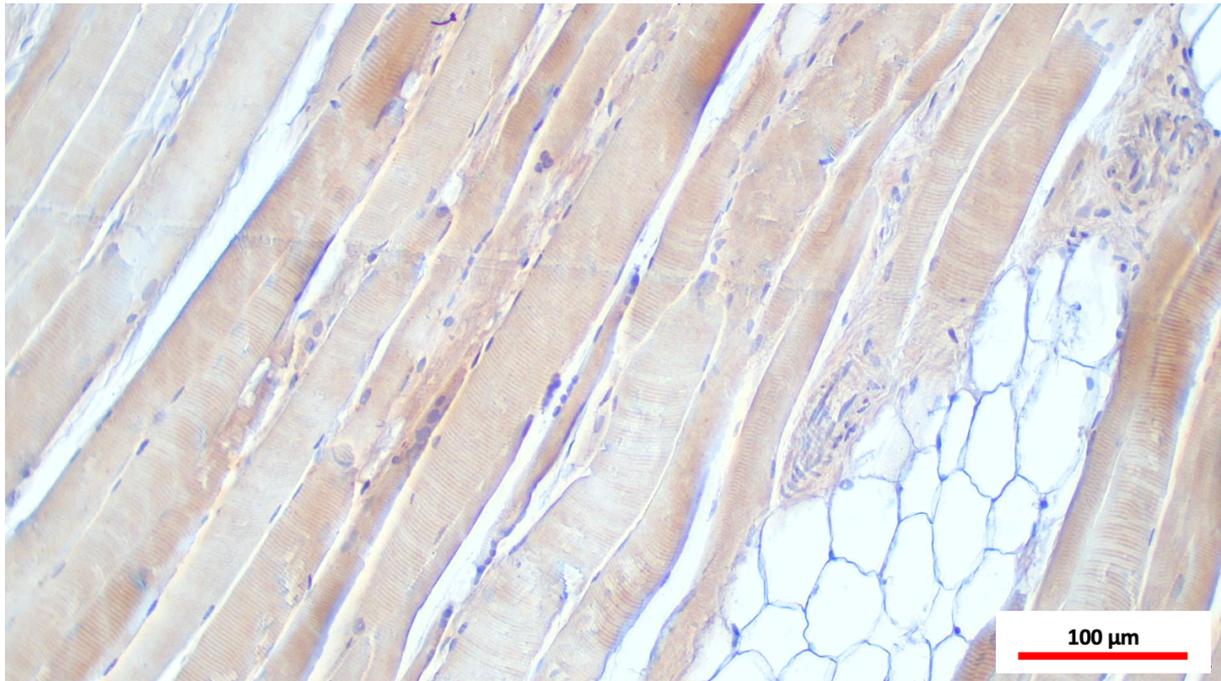


Abbildung 30 - Positivkontrolle Spender 3 M. pectoralis major in 20x Vergrößerung

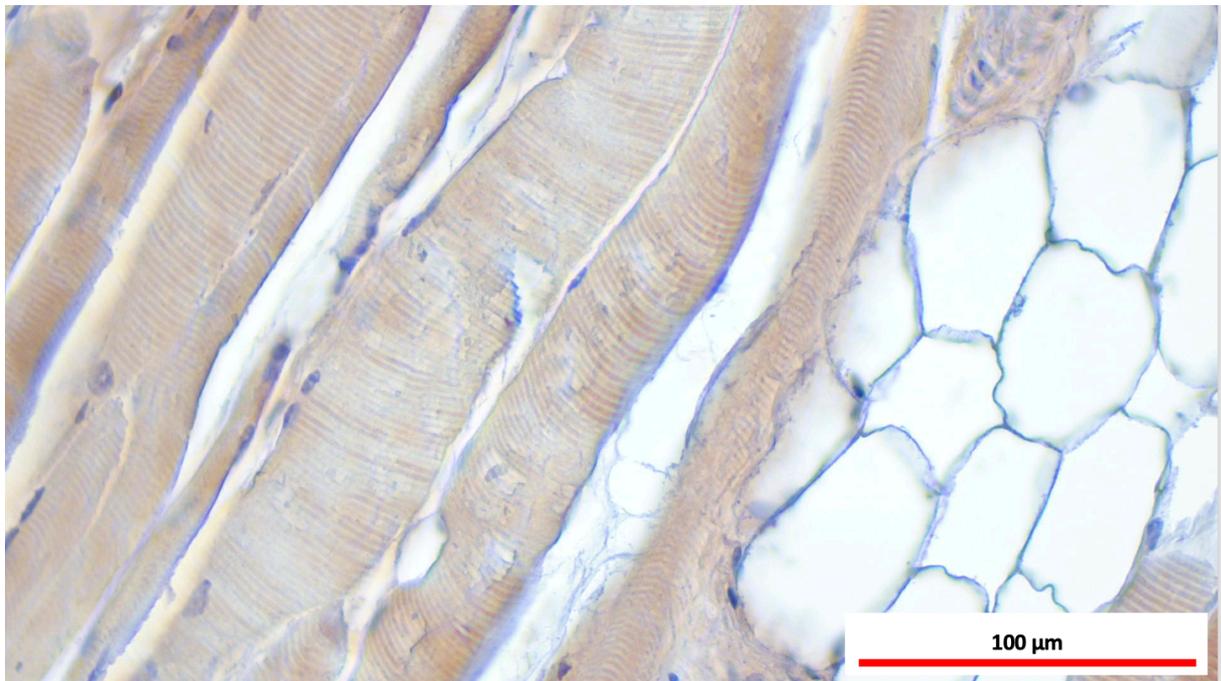


Abbildung 31 - Positivkontrolle Spender 3 M. pectoralis major in 40x Vergrößerung

1.12.3 Ergebnisse der unfixierten Spender

Als unfixierte Spender wurden zwei Präparate aus Sektionen des Pathologischen Institutes genutzt, von denen jeweils eine Probe aus dem M. pectoralis major sowie des M. deltoideus der IHC zugeführt wurden. Alle vier Skelettmuskelproben zeigten hierbei ebenfalls ein positives Signal. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Eigen- und Fremdauswertung in Diagrammen zusammengefasst, die im Übrigen übereinstimmend waren.

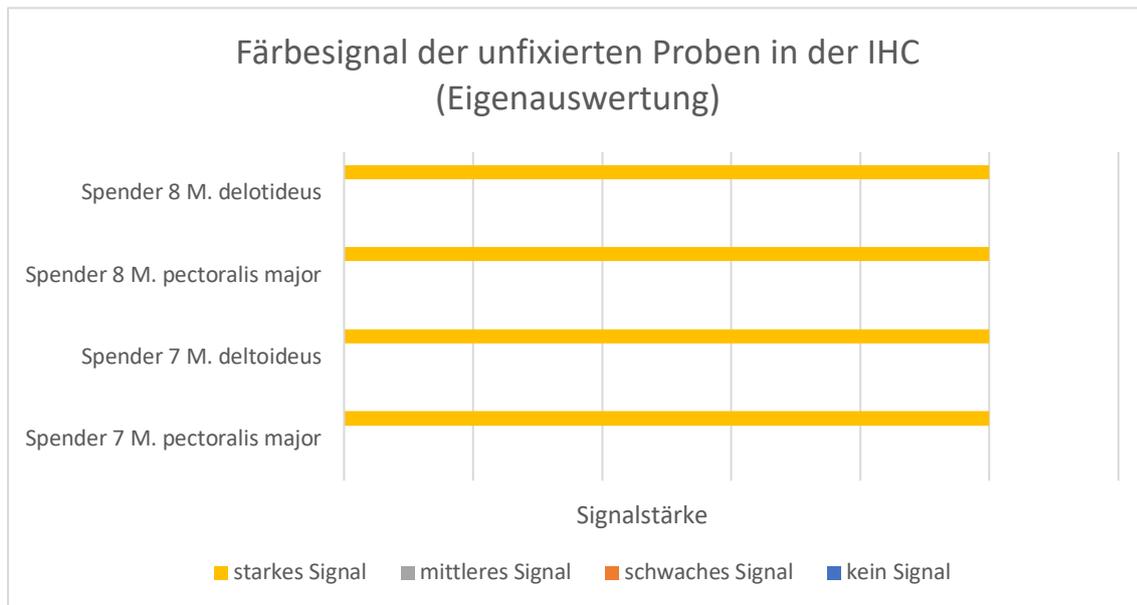


Diagramm 6 - Färbesignal aller unfixierten Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten unfixierten Proben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

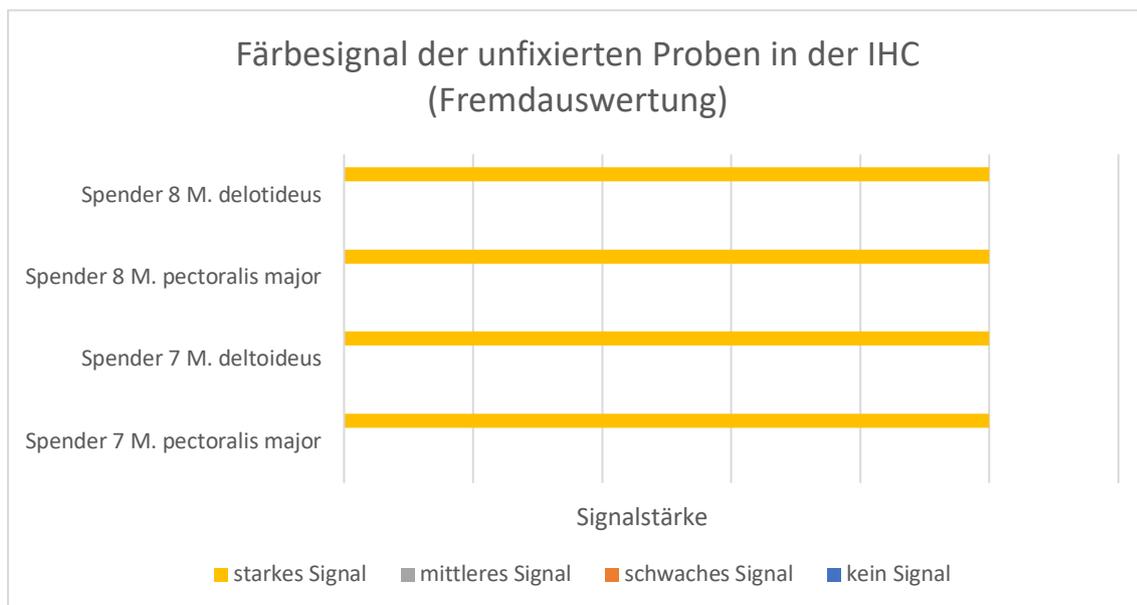


Diagramm 7 - Färbesignal aller unfixierten Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten unfixierten Proben in der IHC. Auf der y-Achse finden sich die Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

Somit konnte auch hier, in Anlehnung an Punkt 3 der Zielsetzung (Kapitel 1.2.6), der Nachweis von TRPC6 im Skelettmuskelgewebe unfixierter Spender erbracht und ein schlüssiges Ergebnis erlangt werden. Auch für die IHC der Proben der unfixierten Spender sind beispielhaft Bilder angefügt.

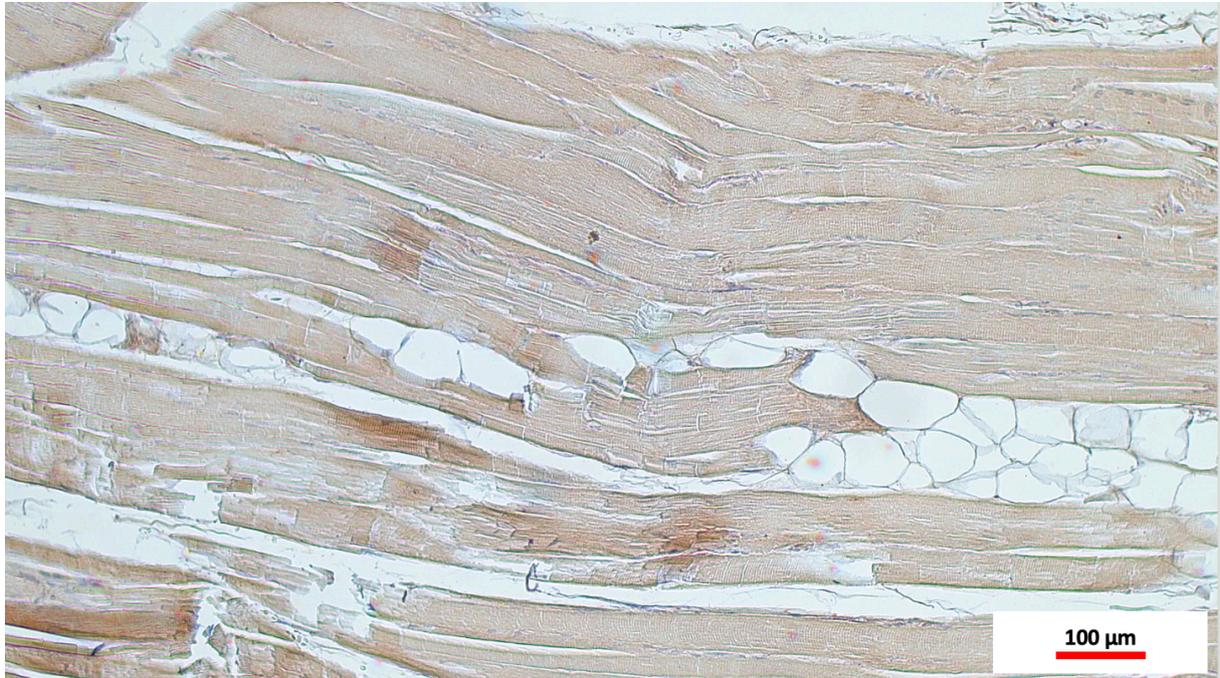


Abbildung 32 – Positivkontrolle Spender 7 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

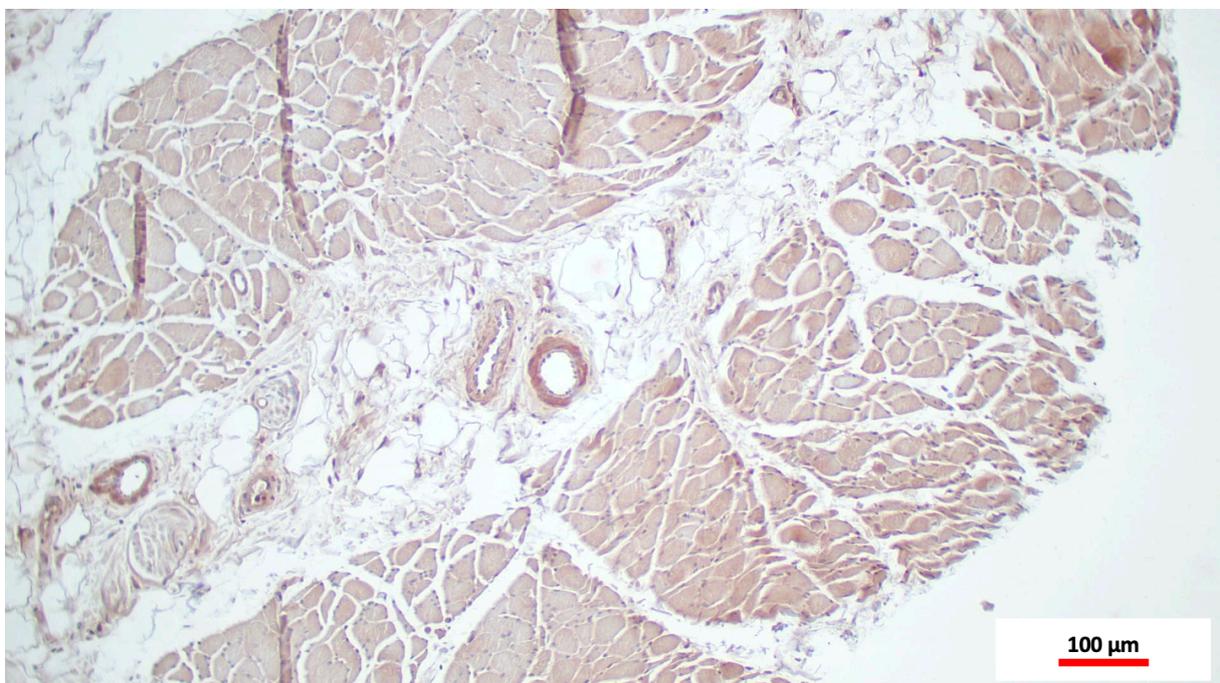


Abbildung 33 - Positivkontrolle Spender 8 M. deltoideus in 10x Vergrößerung

1.12.4 Gesamtergebnis

Hinsichtlich des vierten Punktes der Zielsetzung meiner Arbeit (Kapitel 1.2.6) lässt sich nun zusammenfassend sagen, dass die Skelettmuskelproben aller Gruppen - formalinfixiert, NEP-fixiert und unfixiert - in der IHC ein positives Signal lieferten. Daraus ließ sich ableiten, dass in den untersuchten Proben der immunhistochemische Nachweis von TRPC6 im humanen Skelettmuskelgewebe erbracht werden konnte. Sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen, als auch untereinander waren die Resultate schlüssig und miteinander in Einklang zu bringen, wenngleich manche Proben etwas schwächere Signale zeigten bzw. manche Areale ausgespart waren. Mögliche Ursachen hierfür sollen im Kapitel V aufgegriffen werden. Die gewonnene Erkenntnis wurden nochmal mehr durch eine neutrale Beurteilung im Sinne einer Fremdauswertung untermauert. Insgesamt betrachtet, ergab diese für alle ausgewerteten Proben ein positives Signal. Hinsichtlich der Klassifizierung der Signalstärke gab es keine gravierenden Abweichungen von der Eigenauswertung.

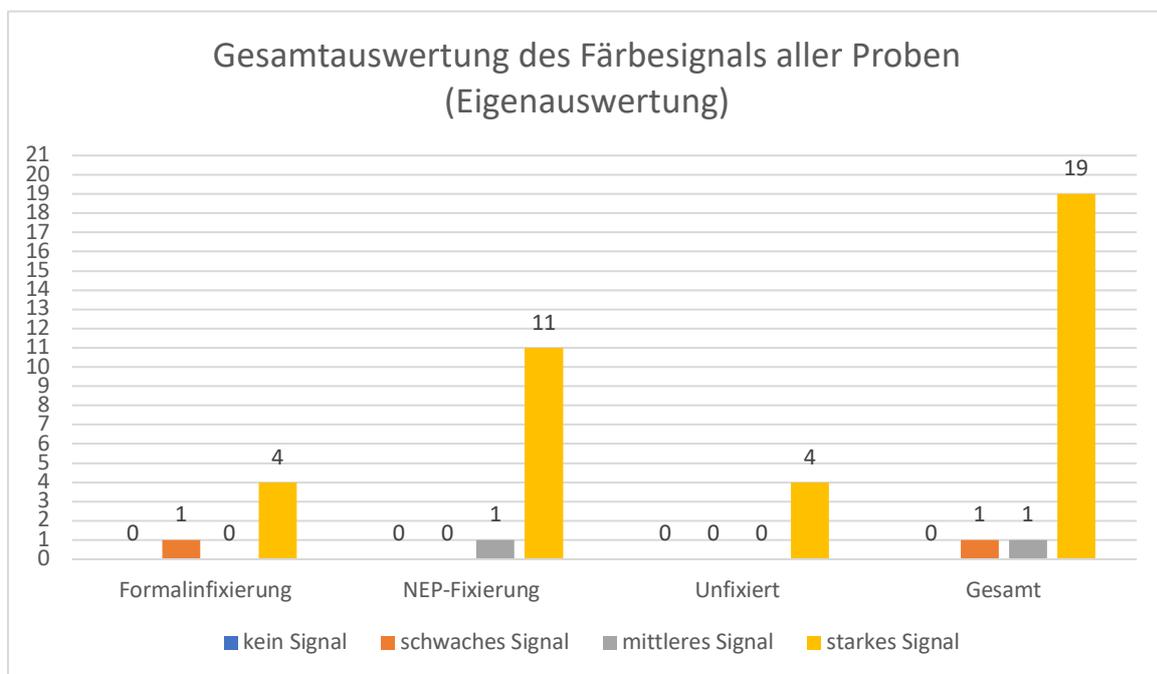


Diagramm 8 - Gesamtauswertung des Färbesignals aller Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)

Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten Skelettmuskelproben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Spender, während auf der x-Achse eine Aufteilung in Formalinfixierung, NEP-Fixierung, unfixiert und Gesamt vorgenommen wurde. Bei jeder dieser Kategorien wurde wiederum jeweils eine Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal vollzogen, welches durch die jeweils farblich kodierten Balken repräsentiert wird (siehe Legende).

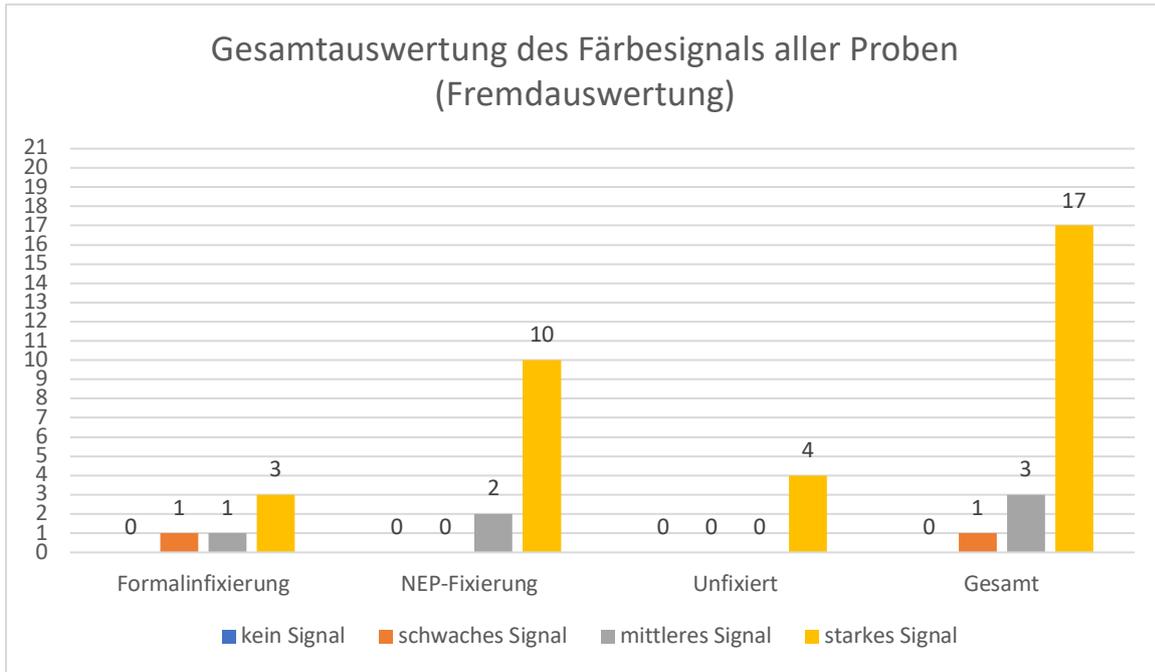


Diagramm 9 - Gesamtauswertung des Färbesignals aller Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)

Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten Skelettmuskelproben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Spender, während auf der x-Achse eine Aufteilung in Formqlinfixierung, NEP-Fixierung, unfixiert und Gesamt vorgenommen wurde. Bei jeder dieser Kategorien wurde wiederum jeweils eine Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal vollzogen, welches durch die jeweils farblich kodierten Balken repräsentiert wird (siehe Legende).

13. Ergebnisse in Abhängigkeit des Muskels

1.13.1 M. pectoralis major

Insgesamt waren acht Proben des M. pectoralis major in die Studie eingeschlossen. Bei deren Untersuchung zeigten sich in der IHC in sieben Fällen ein starkes Signal, während eine Gewebeprobe ein schwaches Signal bot - Spender 1 M. pectoralis major. Die Eigen- und Fremdauswertung zeigte dabei keine Unterschiede.

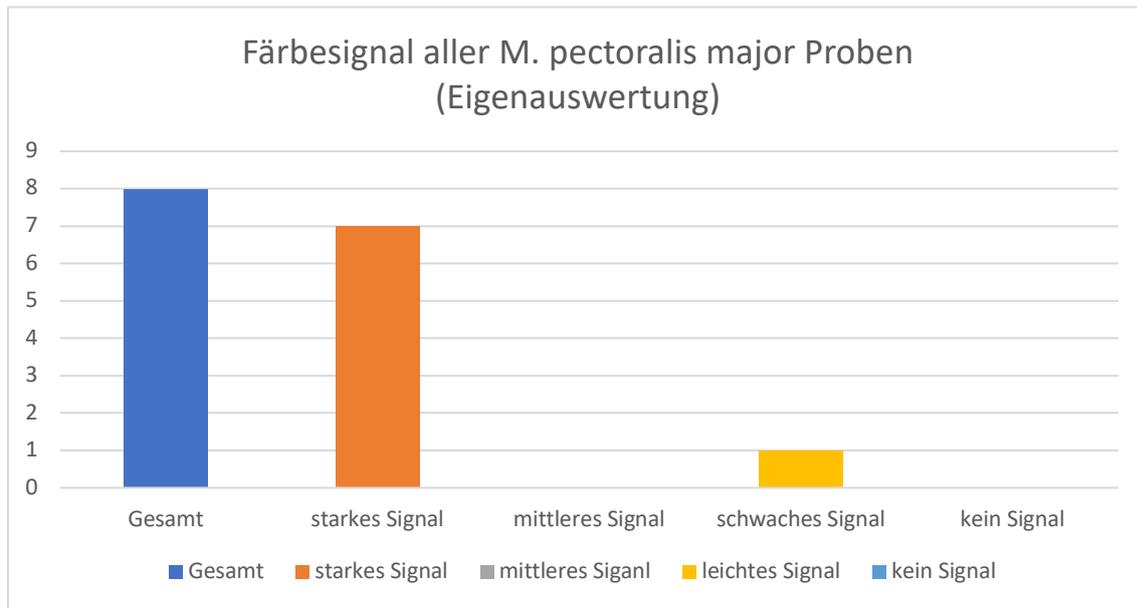


Diagramm 10 - Färbesignal aller M. pectoralis major Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten M. pectoralis major Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeprobe, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

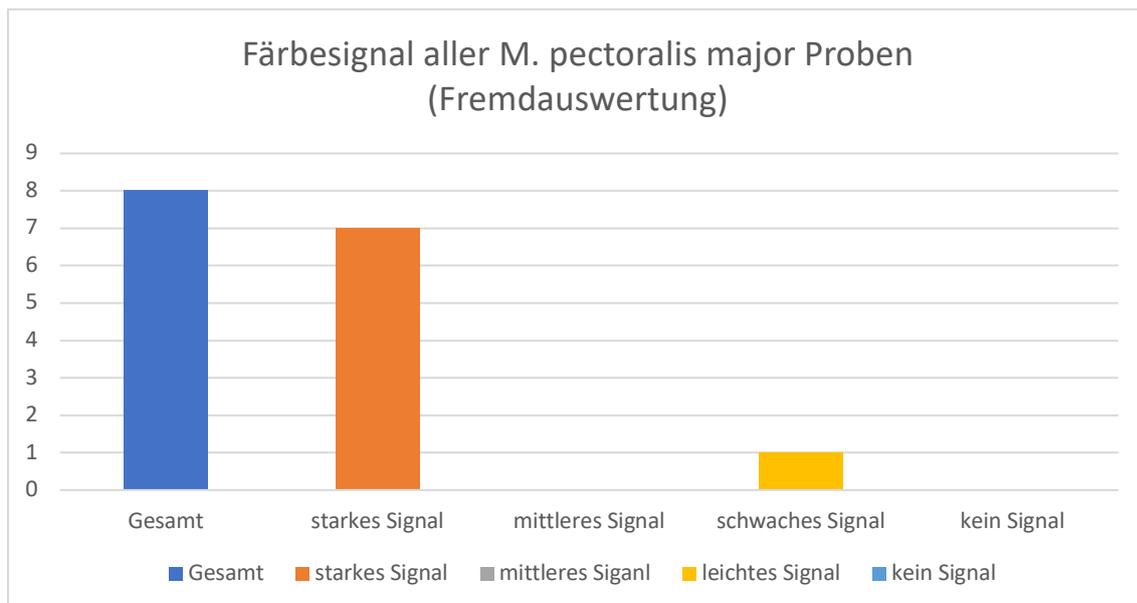


Diagramm 11 - Färbesignal aller M. pectoralis major Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten M. pectoralis major Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeprobe, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

1.13.2 M. deltoideus

Zur Untersuchung von Gewebeproben des M. deltoideus wurden insgesamt fünf Proben untersucht. Diese zeigten durchweg ein starkes Signal in der IHC. Auch in diesem Fall zeigte sich keine Diskrepanz zwischen der eigenen Auswertung und der Auswertung, die durch eine neutrale Person getätigt wurde.

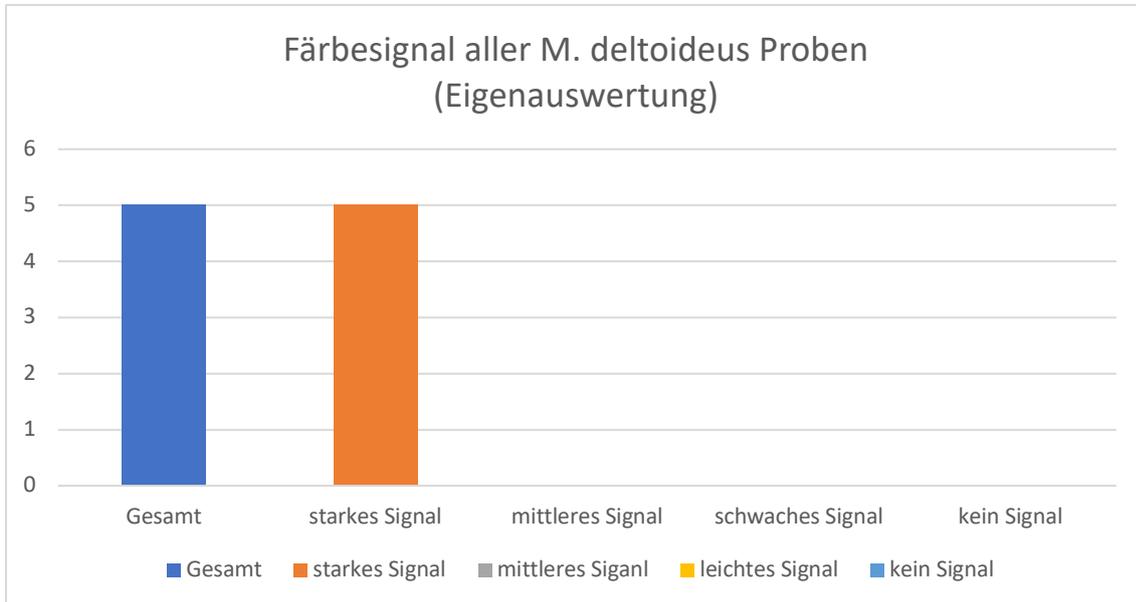


Diagramm 12 - Färbesignal aller M. deltoideus Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten M. deltoideus Proben in der IHC. Auf der y-Achse finde sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

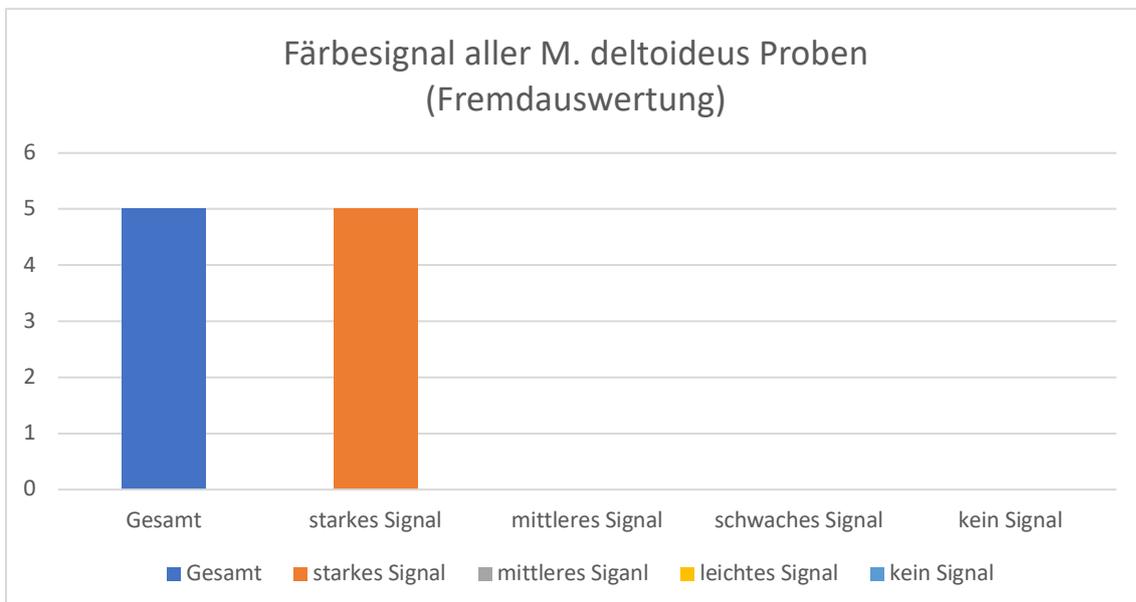


Diagramm 13 - Färbesignal aller M. deltoideus Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten M. deltoideus Proben in der IHC. Auf der y-Achse finde sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

1.13.3 M. trizeps brachii

Zur Untersuchung des M. trizeps brachii wurden vier Gewebeproben von vier verschiedenen Spendern herangezogen. Die Auswertung der IHC ergab dabei in allen Proben ein positives Signal, wobei drei der Proben sowohl in der Eigen- als auch in der Fremdauswertung mit einem starken Signal belegt wurden. Bei einer Probe wurde bei der Fremdauswertung ein mittleres Signal bescheinigt, während die Eigenauswertung ein starkes Signal ergab.

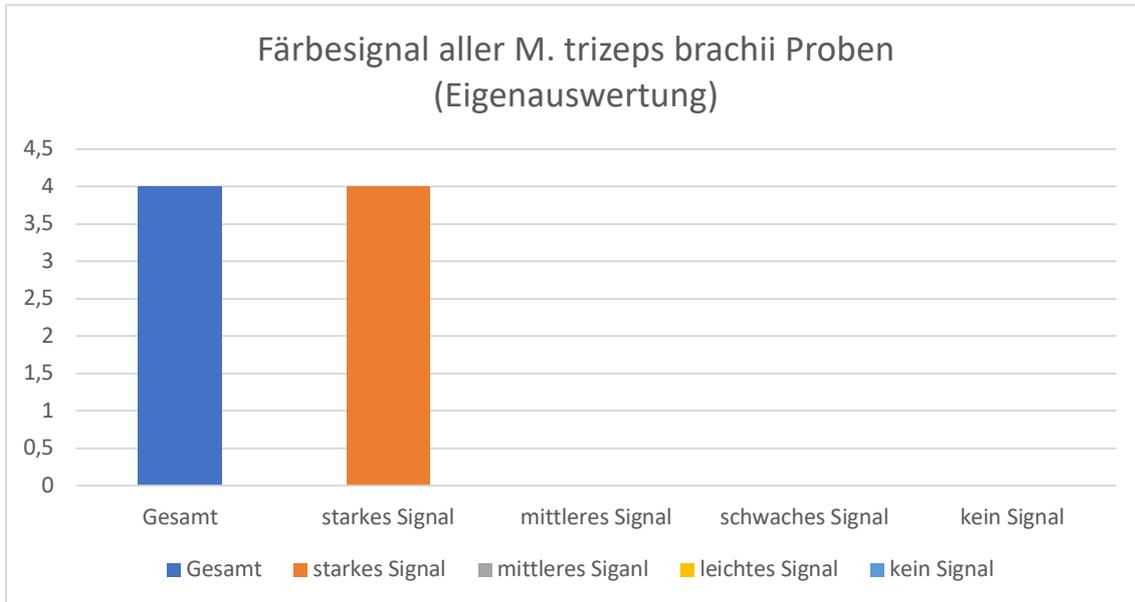


Diagramm 14 - Färbesignal aller M. trizeps brachii Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten M. trizeps brachii Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

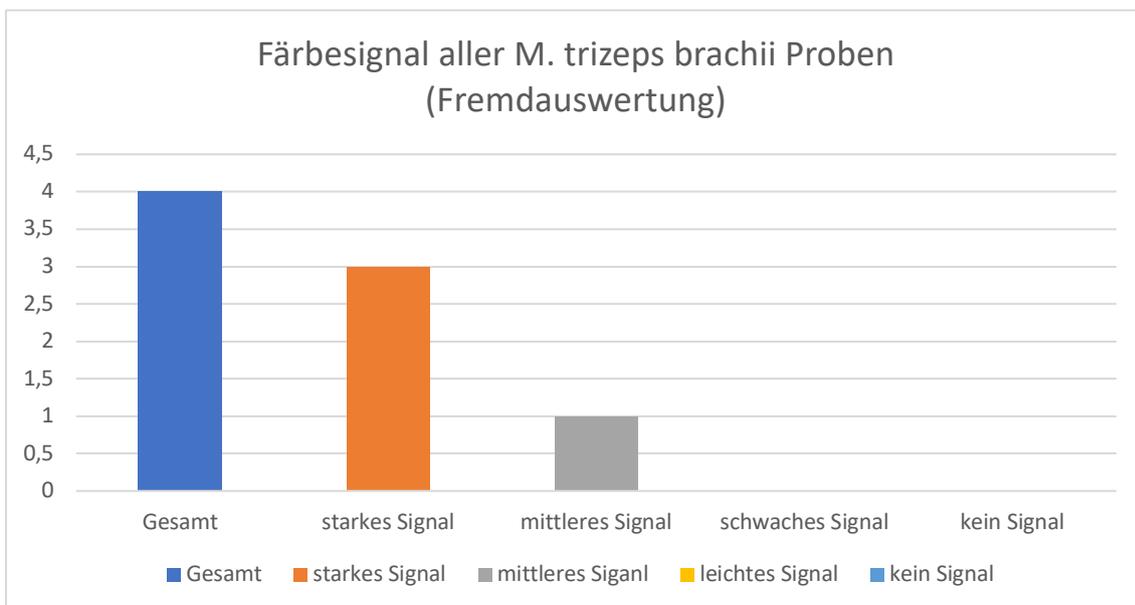


Diagramm 15 - Färbesignal aller M. trizeps brachii Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten M. trizeps brachii Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

1.13.4 M. rectus femoris

Letztlich wurden auch vier Gewebeproben des M. rectus femoris untersucht. In der IHC boten alle Proben ein positives Signal, was auch die Eigen- und Fremdauswertung übereinstimmend ergab. Lediglich bei einer Probe wurde im Rahmen der Fremdauswertung ein mittleres Signal bescheinigt, während die Eigenauswertung ein starkes Signal ergab.

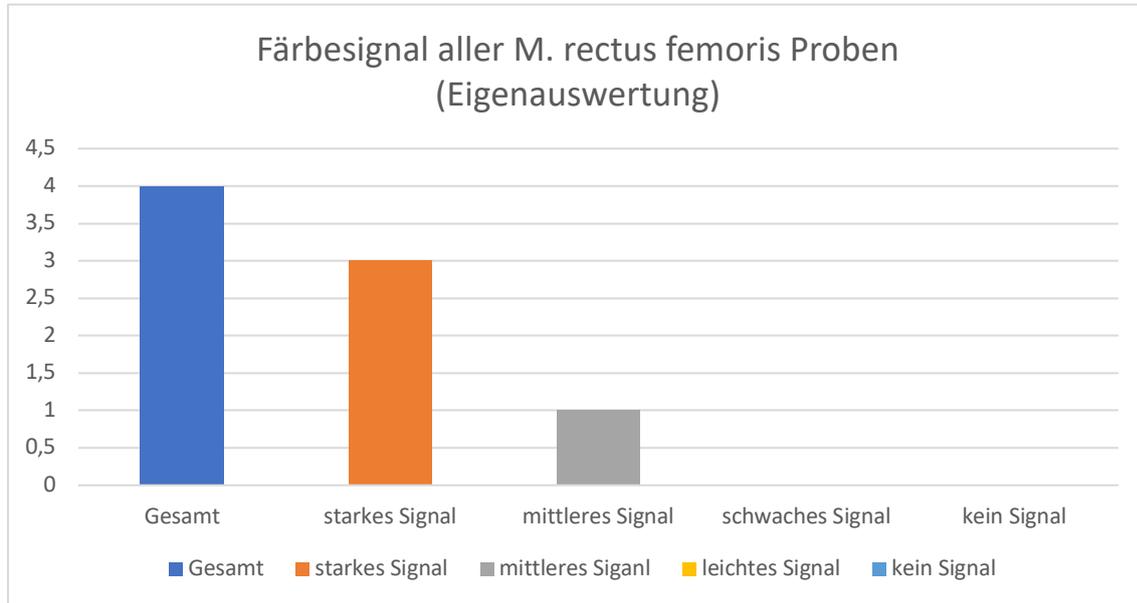


Diagramm 16 - Färbesignal aller M. rectus femoris Proben in der IHC (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung aller in der Studie genutzten M. rectus femoris Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

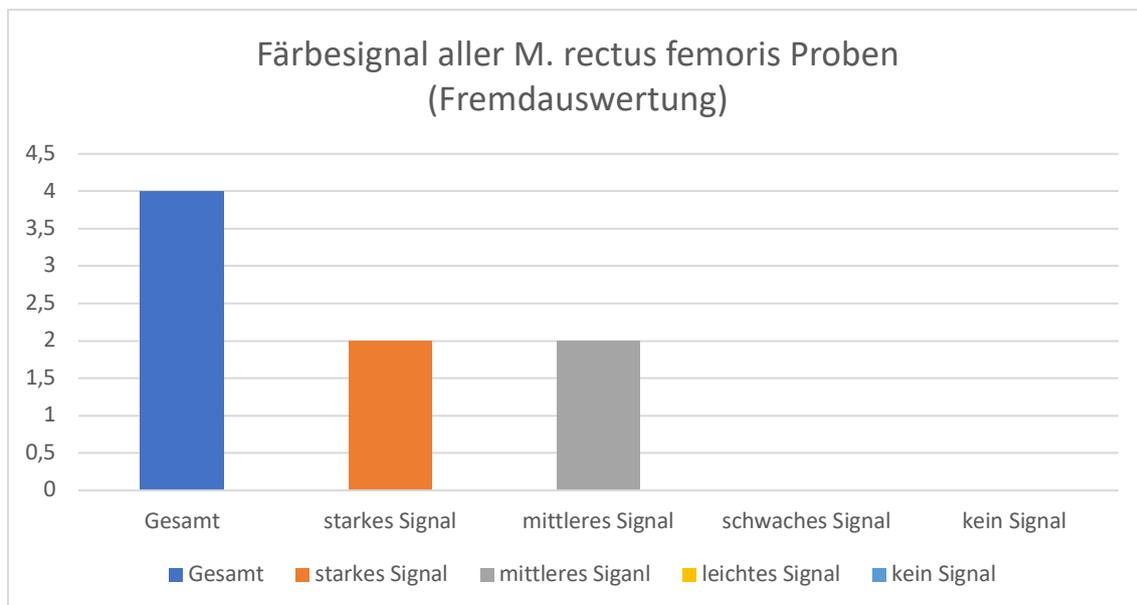


Diagramm 17 - Färbesignal aller M. rectus femoris Proben in der IHC (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung aller in der Studie genutzten M. rectus femoris Proben in der IHC. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Gewebeproben, während auf der x-Achse die Signalstärke repräsentiert ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende).

14. Ergebnisse in Abhängigkeit des Geschlechts

Zur Ergebnisbeurteilung in Abhängigkeit des Geschlechts wurden jeweils drei weibliche und männliche Spender untersucht. Bei zwei Spendern - unfixierte Spender des Pathologischen Instituts - war das Geschlecht nicht bekannt, sodass diese hier nicht miteingeschlossen wurden. Beide Gruppen, weiblich und männlich, enthielten jeweils eine formalinfixierte Spenderin/einen formalinfixierten Spender und zwei NEP-fixierte Spenderinnen/Spender. Des Weiteren lagen für die Auswertung der weiblichen Spenderinnen neun Gewebeproben vor, während die männliche Gruppe acht Gewebeproben bot. Somit war insgesamt eine Gleichverteilung gegeben.

Bei der Auswertung der weiblichen Gruppe zeigten sich in der IHC insgesamt nur positive Signale, wobei von neun beurteilten Proben, acht ein starkes Signal und eine Probe ein schwaches Signal boten. Die acht Gewebeproben der männlichen Spender wiesen in der IHC allesamt ebenfalls ein positives Signal auf. Eine Probe wies ein mittleres Signal auf, während die restlichen Proben ein starkes Signal boten. Diskrepanz zwischen Eigen- und Fremdauswertung bestand bei der männlichen Gruppe, wo von acht Proben fünf mit einem starken Signal und drei mit einem mittleren Signal belegt wurden – zum Vergleich sieben Mal starkes Signal und einmal mittleres Signal in der Eigenauswertung.

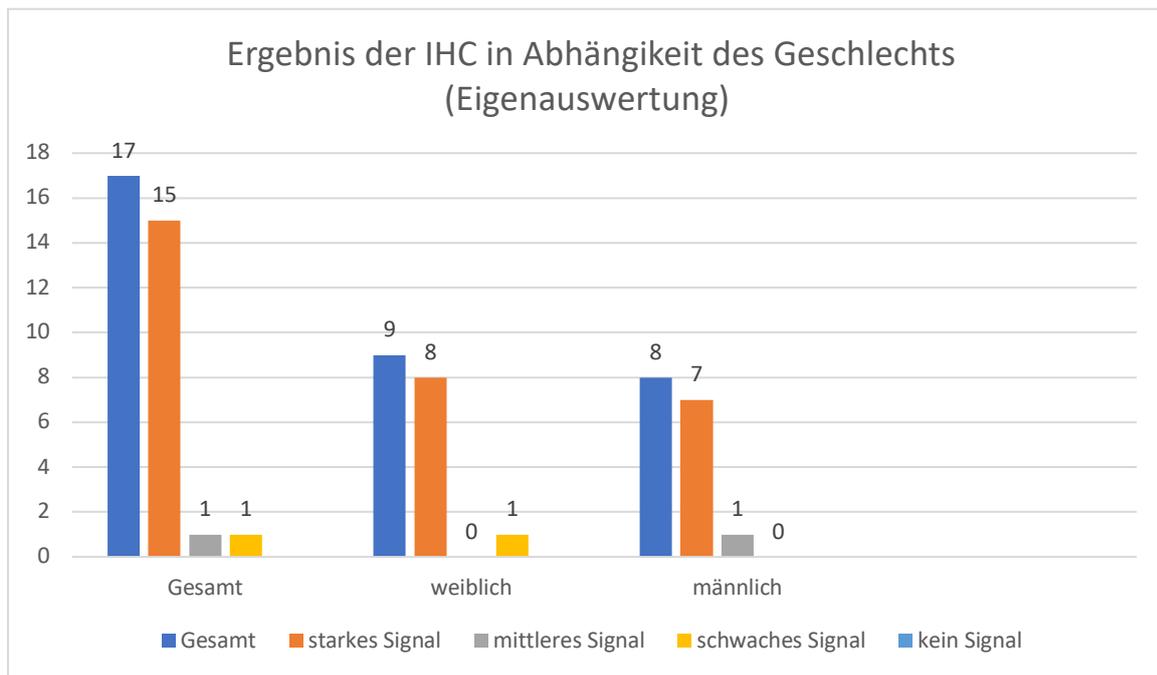


Diagramm 18 - Ergebnis der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts (Eigenauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Eigenauswertung der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Spender, während auf der x-Achse eine Aufteilung in Gesamt, weiblich und männlich dargestellt ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende) und als Balken repräsentiert.

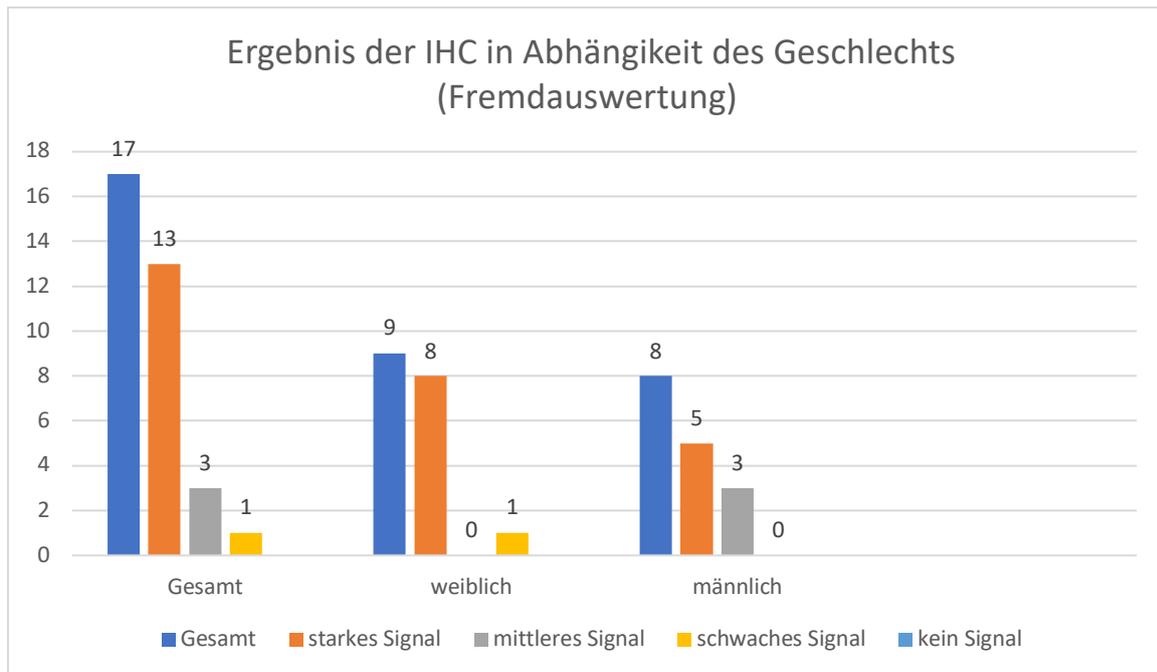


Diagramm 19 - Ergebnis der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts (Fremdauswertung)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Fremdauswertung der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts. Auf der y-Achse findet sich die Anzahl der Spender, während auf der x-Achse eine Aufteilung in Gesamt, weiblich und männlich dargestellt ist. Die Einteilung in starkes, mittleres, schwaches und kein Signal ist jeweils farblich kodiert (siehe Legende) und als Balken repräsentiert.

Somit kann resümierend gesagt werden, dass in Anlehnung an Punkt sechs der Zielsetzung (Kapitel 1.2.6), keine groben, geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der IHC auszumachen waren.

15. Ergebnis der Peptidinkubation

Im Sinne einer Spezifitätskontrolle wurde, wie bereits beschrieben, einmalig eine Kontrollpeptidinkubation des Primärantikörpers vollzogen, der dann im Rahmen einer Färbeserie auf eine Skelettmuskelprobe gegeben wurde. Hierbei zeigte sich, im Vergleich zur Positivkontrolle am gleichen Gewebe, kein positives Signal, sodass von einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers an TRPC6 ausgegangen werden konnte. Dies stützte wiederum die bis dahin gewonnene Erkenntnis. Näheres zur Peptidkontrolle und entsprechende Bilder sind dem Kapitel 1.8.8 Peptidinkubation zu entnehmen.

V. Diskussion

TRPC6-Kanäle wurden bisher in den verschiedensten tierischen und menschlichen Geweben nachgewiesen. Das Vorkommen im menschlichen Skelettmuskelgewebe war bislang unzureichend geklärt. Daher wurde diese Fragestellung in der zugrundeliegenden Arbeit untersucht. Diese Untersuchung unterlag jedoch hinsichtlich der Methodik gewissen Limitationen. Die Einordnung des gewonnenen Ergebnisses, die Limitationen, die Besonderheiten des untersuchten Kollektivs sowie eine Perspektive sollen im Folgenden dargelegt werden.

16. Einordnung des Ergebnisses

Wie bereits erläutert wurden TRPC6 Kanäle bislang in verschiedensten tierischen und menschlichen Geweben nachgewiesen. So untersuchten Garcia und Kollegen 1997 mittels Real-time PCR Rattengewebe auf die Expression von TRPC6 und fanden dabei ausgeprägte Expressionsniveaus in den Lungen, dem Großhirn sowie den Ovarien (Garcia & Schilling, 1997).

Eine Untersuchung aus dem Jahr 2002 an menschlichen Geweben und Zellen lieferte ähnliche Ergebnisse. Dabei wurde ZNS-Gewebe sowie peripheres Gewebe mithilfe von Real-time PCR auf die mRNA-Distribution untersucht. Auch hier zeigten sich die größten Expressionsniveaus unter anderem in der Lunge sowie dem ZNS. Zudem war eine Expression auch in Herz, Pankreas, Fettgewebe, Gastrointestinaltrakt, Muskulatur und Placenta detektierbar. Interessanterweise zeigte auch das zum Großteil aus Muskelgewebe bestehende Herz eine Expression von TRPC6, die im Vergleich zur Skelettmuskulatur etwas stärker ausgeprägt war. Die TRPC6 mRNA Expression in der menschlichen Skelettmuskulatur wies bei der Untersuchung eine ähnliche Stärke wie die des Cerebellums auf. Dennoch räumten Riccio und Kollegen ein, dass es weiterer, spezifischer Untersuchungen mittels Antikörper bedarf, um die Ergebnisse zu sichern, da die Bestimmung der TRPC6 mRNA Expression keine Rückschlüsse auf das tatsächliche Proteinlevel von TRPC6 zulässt (zusammengefasst in Riccio et al., 2002). Die genannte Arbeit stellt damit die einzige Arbeit dar, die für das humane Skelettmuskelgewebe jemals TRPC6 Kanäle nachgewiesen hat. Dieser Nachweis bezog sich jedoch lediglich auf die Genexpression, nicht aber auf den Nachweis des Proteins als solches, denn dieser wurde für das menschliche Skelettmuskelgewebe bisher nicht erbracht.

Mit der zugrundeliegenden Arbeit konnte erstmals der antikörperbasierte, immunhistochemische Nachweis von TRPC6 im humanen Skelettmuskelgewebe erbracht werden. Die Anzahl der ausgewerteten Proben aus acht Spendern/Spenderinnen war mit 21 überschaubar, dennoch war das Ergebnis eindeutig. Die Anzahl der genutzten Spender entsprach in etwa der Anzahl, die bei anderen Arbeiten genutzt wurde. Arbeiten, die bereits das Vorkommen der Kanäle in der glatten Muskulatur von menschlichen Blutgefäßen und Organen sowie deren physiologische Bedeutung beschrieben (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Riccio et al., 2002), boten den Grund zur Annahme, dass TRPC6 möglicherweise auch im humanen Skelettmuskelgewebe vorkommen und dort eine besondere Stellung

hinsichtlich Calciuminflux bzw. -homöostase einnehmen könnte. Diese Annahme wurde nicht zuletzt durch eine weitere Arbeit gestützt, bei der eine Arbeitsgruppe Dystrophin-defiziente Skelettmuskulatur von Mäusen hinsichtlich der Calciumregulation untersuchte und dabei in der Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörper unter anderem TRPC6-Kanäle im Sarkolemm sowie, in deutlich geringerem Ausmaß, auch im Zytoplasma ausfindig machte. Dies galt auch für das Kontrollgewebe. Krüger und Kollegen nahmen daher an, dass die Kanäle damit einen Beitrag zum Calciumeinstrom leisten könnten (zusammengefasst in Krüger et al., 2008). Dass TRPC6 beim Menschen auch bei pathophysiologischen Prozessen involviert ist, zeigt die Idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie (IPAH), für die gezeigt wurde, dass die Kanäle mitunter zu einem vermehrten Calciumeinstrom in die glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße und dadurch zur Progression der Erkrankung führen (Yamamura et al., 2020; Yu et al., 2004). Auch im kardiovaskulären System scheint TRPC6 Einfluss auf verschiedene pathophysiologische Prozesse zu nehmen. So wiesen Patienten mit bestehender Herzinsuffizienz eine Hochregulation der Kanäle auf (Kuwahara et al., 2006; Z. Yue et al., 2015). Bei transgenen Mäusen beobachtete man, dass eine mittelmäßige Überexpression der Kanäle mit Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie vergesellschaftet war, während eine starke Überexpression sogar zum Tod der Mäuse infolge einer Kardiomyopathie führte (Kuwahara et al., 2006; Z. Yue et al., 2015). Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern und TRPC6. Zumindest zeigte eine Arbeitsgruppe an Kaninchenherzen, bei denen dehnungsinduziert Vorhofflimmern auftrat, dass selbiges durch die Gabe eines nicht-selektiven Kationenkanalblockers, der auch TRPC6 Kanäle inhibieren kann, terminiert wurde (Bode et al., 2001). Als dehnungsaktivierter, nicht-selektiver Kationenkanal (Spassova et al., 2006) scheint TRPC6 somit eine Rolle beim dehnungsinduzierten Vorhofflimmern zu spielen, nicht zuletzt aufgrund seiner ausgeprägten Dehnungsempfindlichkeit und Bedeutung für die Calcium-Regulation in Endothelzellen des Vorhofs (Nikolova-Krstevski et al., 2013).

Letztlich ließ auch die Tatsache, dass Menschen zur Gattung der Säugetiere gehören, das Auftreten von TRPC6 im Skelettmuskel nicht unwahrscheinlich erscheinen, bedenkt man, dass viele Untersuchungen an Säugetieren, und hierbei insbesondere an Nagetieren, erfolgten.

Während der immunhistochemische Nachweis mittels Antikörper im humanen Skelettmuskelgewebe mit dieser Arbeit erbracht wurde und künftig möglicherweise durch weitere Arbeiten gestützt werden könnte, so muss der funktionelle Aspekt der Kanäle für die menschliche Skelettmuskelfunktion noch weiter erforscht werden. Ebenso bleibt unklar, ob und inwiefern die Kanäle mit muskulären Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang stehen könnten. Zwar konnte an tierischen Modellen die Beteiligung der Kanäle am pathophysiologischen Prozess der malignen Hyperthermie gezeigt werden (Rafael Lopez et al., 2020), für den Menschen gibt es nach aktuellem Stand jedoch noch keine Arbeiten, bei dem Assoziationen zwischen TRPC6 und Erkrankungen der Skelettmuskulatur beschrieben wurden. Dennoch erscheinen diese denkbar, gerade in Anbetracht der obengenannten

Zusammenhänge zwischen TRPC6 und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, bei denen insbesondere glatte bzw. Herzmuskelzellen eine wichtige Rolle spielen.

17. Patientenkollektiv

1.17.1 Basischarakteristika

Insgesamt wurden acht Spender in diese Studie eingeschlossen, wobei von zwei Spendern kein Geschlecht, als auch kein Geburtsjahr bekannt war. Die Geburtsjahre der restlichen sechs Spenderinnen und Spender lagen im Intervall von 1928 bis 1949. Das mittlere Geburtsjahr lag bei 1940. Hinsichtlich des Geschlechts bestand eine Gleichverteilung - drei männliche Spender und drei weibliche Spenderinnen. Informationen zur Patientenvorgeschichte lagen nicht vor, jedoch wiesen die genutzten Proben in der Übersichtsfärbung keine gravierenden Veränderungen hinsichtlich der Morphologie auf.

1.17.2 Postmortale Veränderungen der Skelettmuskulatur

Nach Eintritt des Todes erlebt die menschliche Skelettmuskulatur gewisse Änderungen. So kommt es beispielsweise unmittelbar nach dem Ableben zum Einsetzen der Totenstarre, bedingt durch den Energiemangel, der vorherrscht. Diese löst sich im Verlauf. Eine schon etwas ältere Arbeit konnte so beispielsweise aufzeigen, dass sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Änderungen der humanen Muskelmorphologie im Zustand der Totenstarre, aber auch nach deren Brechung, vorlagen (Peschel et al., 1989). Diese Änderungen könnten durchaus Einfluss auf die Bindung des in der Arbeit genutzten Primärantikörpers an das intrazellulär gelegene Epitop des TRPC6 Kanals nehmen.

Auch nicht außer Acht gelassen werden darf der Transport der Spender und Spenderinnen vom Sterbeort ins Anatomische Institut. Hier wären lagerungsbedingte, makroskopisch sichtbare Traumata der menschlichen Skelettmuskulatur denkbar, die dann folglich auch mit großer Sicherheit lichtmikroskopisch in der Übersichtsfärbung zu detektieren wären, aber eben auch Mikroläsionen, die mit den in der Arbeit genutzten Lichtmikroskopen wahrscheinlich nicht auffindig zu machen wären. Insbesondere letztere würden im ungünstigsten Fall die Antikörperbindung negativ beeinflussen.

Außerdem dürften Denaturierungsprozesse einsetzen, die die Proteinstruktur und damit einhergehend auch die Grundmorphologie der menschlichen Skelettmuskulatur nachhaltig verändern könnten. Eine Arbeit, die den postmortalen Proteinabbau am Skelettmuskel von drei männlichen Schweinen in einem bestimmten Zeitintervall untersuchte, bestätigte diese Annahme, in dem sie den Abbau zahlreicher Strukturproteine der Skelettmuskulatur zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchte (Pittner et al., 2015). Wenngleich die Untersuchung an porcinem Muskelgewebe durchgeführt wurde, dürfte der postmortale Abbau der menschlichen Skelettmuskelproteine, in Anbetracht der vorliegenden Daten, in ähnlicher, wenn nicht sogar in identischer Weise ablaufen (Pittner et al., 2016). Dies untermauert eine Untersuchung, bei der der postmortale Muskelproteinabbau des Menschen mit dem von Schweinen und Mäusen verglichen wurde (Ehrenfellner et al., 2017).

Die aufgeführten Punkte könnten durchaus eine Erklärung für die in der Arbeit teilweise beobachtete, fehlende oder abgeschwächte Färbung in manchen kleineren Arealen der ausgewerteten Proben sein. Auch, dass manche Gewebsproben stärker oder schwächer braun erschienen als andere, könnte im Zusammenhang mit den postmortalen Veränderungen der menschlichen Skelettmuskulatur stehen.

1.17.3 Einfluss der Fixierung

In dieser Arbeit wurde unter anderem fixiertes Probenmaterial genutzt. Dies wurde in vorangegangenen Kapiteln bereits umfangreich erläutert. Fixiermittel wie Formalin und NEP, die beide in dieser Arbeit Anwendung fanden, nehmen gewissermaßen Einfluss auf das Gewebe bzw. die Gewebestruktur, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dies auch den Prozess der IHC, bei dem, wie bereits erläutert, Antikörper genutzt werden, negativ beeinflussen kann. Insbesondere bei der Formaldehyd basierten Fixierung kann es zu Quervernetzungen zwischen einzelnen Proteinen kommen, wodurch das Epitop - in dieser Arbeit das TRPC6 Protein - maskiert werden kann (Ramos-Vara, 2005; Werner et al., 2000). Folglich wäre eine Bindung des Antikörpers an das Zielprotein erschwert oder gar nicht möglich. Jedoch scheint dies nicht die Hauptlimitation der IHC an formalinfixiertem Gewebe zu sein, zumindest dann nicht, wenn bereits gut etablierte Protokolle - wie auch in dieser Arbeit genutzt - eingehalten werden. Vielmehr scheint das Gelingen davon abhängig zu sein, welches Zielprotein gesucht wird, welche Antikörper verwendet werden und welche Methode zur Antigendemaskierung genutzt wird (Webster et al., 2009).

NEP-basierte Gewebefixierung führt nicht zu Quervernetzungen von Proteinen und scheint daher hinsichtlich der IHC besser geeignet zu sein (Ramos-Vara, 2005; Werner et al., 2000).

Damit muss unter dem Einfluss der Fixierung, insbesondere unter dem Einfluss der Formalinfixierung, davon ausgegangen werden, dass auch diese zu einer abgeschwächten oder fehlenden Färbung in nicht ausreichend demaskierten Arealen führen kann.

18. Methodenkritik

Für die zugrundeliegende Arbeit wurden insgesamt 21 Proben ausgewertet, die aus acht Spenderinnen/Spender stammten. In Anbetracht der geringen Probenanzahl ist das Ergebnis nochmal etwas differenzierter zu betrachten. Zudem waren lediglich vier Muskel repräsentiert - M. pectoralis major, M. trizeps brachii, M. deltoideus und M. rectus femoris. Somit konnte über das Auftreten von TRPC6 in anderen Skelettmuskeln des Menschen keine Aussage getroffen werden. Vorerkrankungen, die sich in irgendeiner Art und Weise nachteilig auf die Skelettmuskulatur auswirken, konnten leider nicht eruiert werden, was die Aussagekraft des Ergebnisses ebenfalls einschränkt, wenngleich in der Übersichtsfärbung keine morphologischen Veränderungen festzustellen waren. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die menschliche Skelettmuskulatur postmortale Veränderungen hinsichtlich der Struktur

aufweisen dürfte. Sei es durch den Rigor mortis oder Denaturierungsprozesse, die postmortem einsetzen. Dadurch könnte es auch zu morphologischen Veränderungen des gesuchten Zielproteins kommen, wodurch der Primärantikörper nicht mehr adäquat binden könnte. Auch das Alter der Spenderinnen und Spender ist zu berücksichtigen. In dieser Arbeit wurden lediglich Proben von Hochbetagten eingeschlossen, woraus sich nicht zwingend eine Aussage über das Vorkommen von TRPC6 im Skelettmuskelgewebe junger Menschen ableiten ließ.

Der Prozess der Probengewinnung, -vorbereitung und -verarbeitung, der letztlich für die Immunhistochemie notwendig war, stellt ebenso ein fehleranfälliges Konstrukt dar. Unsauberes Arbeiten oder Momente der Unachtsamkeit können das Ergebnis nachteilig beeinflussen. So könnte beispielsweise eine nicht ausreichende thermische und chemische Renaturierung des Skelettmuskelgewebes dazu führen, dass die TRPC6 Kanäle nicht ausreichend zugänglich gemacht werden und der Primärantikörper somit nicht binden kann. Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die teils reduzierte Signalstärke in manchen Arealen der ausgewerteten Proben sein und für die Intensität mit der sich die Braunfärbung präsentierte. Ebenso könnten Verunreinigungen der zahlreich angewendeten Chemikalien und Lösungen, falsche Verdünnungen oder falsch gelagerte Antikörper fatale Auswirkungen haben.

Denkbar wäre auch, dass die verwendeten Antikörper unspezifisch binden und somit ein falsch-positives Ergebnis resultiert.

In Anbetracht der aufgeführten Punkte ist zu beachten, dass die Aussagekraft des Ergebnisses aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren, die nicht vollumfänglich kontrollierbar sind, limitiert ist und differenziert zu betrachten ist.

19. Zusammenfassung und Perspektive

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, unter Berücksichtigung der methodischen Limitationen, der Nachweis des TRPC6 im menschlichen Skelettmuskelgewebe gezeigt werden konnte. Dabei deckte sich das Ergebnis auch mit dem aus anderen Arbeiten, bei denen beispielsweise an Skelettmuskelfasern der Maus der Nachweis der Kanäle im Sarkolemm erbracht wurde (Krüger et al., 2008). Jedoch bedarf es weiterer wissenschaftlicher Arbeiten, möglicherweise mit größerer Probenanzahl, um das Ergebnis weiter zu bestärken. Ebenso ist es notwendig im Verlauf die möglichen physiologischen aber auch pathophysiologischen Bedeutungen der TRPC6 Kanäle für die humane Skelettmuskulatur weiter zu untersuchen. Es ist naheliegend, dass die Kanäle hier eine besondere Rolle einnehmen könnten, betrachtet man Untersuchungen von tierischer Skelettmuskulatur, bei denen die enorme Bedeutung von TRPC6 für den Kalziumeinstrom und somit auch die muskuläre Funktion aufgezeigt werden konnten (Krüger et al., 2008). Dennoch sind auch in diesem Fall weitere wissenschaftliche Aufarbeitungen notwendig, um diesen Sachverhalt weiter aufklären zu können. Sollten im Rahmen der weiteren wissenschaftlichen Aufarbeitung Zusammenhänge zwischen Muskelerkrankungen und TRPC6 zum Vorschein kommen, so könnte dies weitere Arbeiten mit Bezug zur Therapie mit Pharmaka, die die TRPC6 Funktion beeinflussen, nach sich ziehen. Von diesen sind bislang Modulatoren, Inhibitoren und agonistisch wirksame Substanzen bekannt.

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Kryo-EM Map des humanen TRPC6-Kanals.....	14
Abbildung 2 - Schematischer Aufbau einer Untereinheit des humanen TRPC6-Kanals	16
Abbildung 3 - ROCE & SOCE des TRPC6-Kanals Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 4 - Aufbau des Aktins und Myosins	23
Abbildung 5 - Schematischer Teilausschnitt einer Skelettmuskelzelle	24
Abbildung 6 - Prozesse der Probenverarbeitung.....	31
Abbildung 7 - Protokoll der HE-Färbung	44
Abbildung 8 - Aufbau HE-Färbung Teil 1	45
Abbildung 9 - Aufbau HE-Färbung Teil 2	46
Abbildung 10 – HE-Färbung Spender 5 Pectoralis major in 10x Vergrößerung	49
Abbildung 11 – HE-Färbung Spender 5 Pectoralis major in 40x Vergrößerung.....	49
Abbildung 12 – HE-Färbung Spender 1 Pectoralis major in 20x Vergrößerung.....	50
Abbildung 13 - Protokoll der IHC Tag 1.....	51
Abbildung 14 - Protokoll der IHC Tag 2.....	52
Abbildung 15 - Übersicht zur Beschriftung der Objektträger	53
Abbildung 16 - Antikörperbindung und Katalyse der Farbreaktion	62
Abbildung 17 – Positivkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung.....	63
Abbildung 18 – Negativkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung	63
Abbildung 19 - Positivkontrolle Spender 7 Deltoideus in 10x Vergrößerung	64
Abbildung 20 - Negativkontrolle Spender 7 Deltoideus in 10x Vergrößerung.....	64
Abbildung 21 - Positivkontrolle Spender 8 Deltoideus in 10x Vergrößerung	65
Abbildung 22 - Negativkontrolle Spender 8 Deltoideus in 10x Vergrößerung.....	65
Abbildung 23 - Kontrollpeptidinkubation des Primärantikörpers Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abbildung 24 - Positivkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung	68
Abbildung 25 - Peptidkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung.....	68
Abbildung 26 - Negativkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung	68
Abbildung 27 - Positivkontrolle Spender 1 Trizeps in 10x Vergrößerung	74
Abbildung 28 - Positivkontrolle Spender 1 Deltoideus in 10x Vergrößerung	74
Abbildung 29 - Positivkontrolle Spender 3 Pectoralis major in 10x Vergrößerung	76
Abbildung 30 - Positivkontrolle Spender 3 Pectoralis major in 20x Vergrößerung	77
Abbildung 31 - Positivkontrolle Spender 3 Pectoralis major in 40x Vergrößerung	77
Abbildung 32 – Positivkontrolle Spender 7 Deltoideus in 10x Vergrößerung.....	79
Abbildung 33 - Positivkontrolle Spender 8 Deltoideus in 10x Vergrößerung	79

VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Subfamilien der TRP-Kanäle	12
Tabelle 2 - Übersicht der eingesetzten Geräte.....	28
Tabelle 3 - Übersicht der eingesetzten Verbrauchsmaterialien.....	29
Tabelle 4 - Übersicht der eingesetzten Chemikalien und Lösungen.....	30
Tabelle 5 - Übersicht der eingesetzten Antikörper	30
Tabelle 6 - Übersicht der genutzten Spender	32
Tabelle 7 - Übersicht der Probenauswahl.....	35
Tabelle 8 - Übersicht der Stationen im Gewebeeinbettautomaten	38
Tabelle 9 - Übersicht der Verdünnungen und Lösungen der IHC.....	57

Tabelle 10 - Auswertungsschema der IHC	70
Tabelle 11 - Interpretationsschema der Probenauswertung	72

VIII. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 - Übersicht der eingeschlossenen Skelettmuskelproben	71
Diagramm 2 - Färbesignal formalinfixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)	73
Diagramm 3 - Färbesignal formalinfixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)	73
Diagramm 4 - Färbesignal NEP-fixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)	75
Diagramm 5 - Färbesignal NEP-fixierter Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)	76
Diagramm 6 - Färbesignal aller unfixierten Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)	78
Diagramm 7 - Färbesignal aller unfixierten Skelettmuskelproben in der IHC (Fremdauswertung)	78
Diagramm 8 - Gesamtauswertung des Färbesignals aller Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)	80
Diagramm 9 - Gesamtauswertung des Färbesignals aller Skelettmuskelproben in der IHC (Eigenauswertung)	81
Diagramm 10 - Färbesignal aller M. pectoralis major Proben in der IHC (Eigenauswertung)	82
Diagramm 11 - Färbesignal aller M. pectoralis major Proben in der IHC (Fremdauswertung)	82
Diagramm 12 - Färbesignal aller M. deltoideus Proben in der IHC (Eigenauswertung)	83
Diagramm 13 - Färbesignal aller M. deltoideus Proben in der IHC (Eigenauswertung)	83
Diagramm 14 - Färbesignal aller M. trizeps brachii Proben in der IHC (Eigenauswertung)	84
Diagramm 15 - Färbesignal aller M. trizeps brachii Proben in der IHC (Fremdauswertung)	84
Diagramm 16 - Färbesignal aller M. rectus femoris Proben in der IHC (Eigenauswertung)	85
Diagramm 17 - Färbesignal aller M. rectus femoris Proben in der IHC (Fremdauswertung)	85
Diagramm 18 - Ergebnis der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts (Eigenauswertung)	86
Diagramm 19 - Ergebnis der IHC in Abhängigkeit des Geschlechts (Fremdauswertung)	87

IX. Literaturverzeichnis

1. Albarrán, L., Dionisio, N., Lopez, E., Salido, G. M., Redondo, P. C., & Rosado, J. A. (2014). STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochemical Journal*, 463(3), 373–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20140523>
2. Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurzinger, L. J., & Zilch, H.-G. (2020). Duale Reihe Anatomie. In *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-007-170976>
3. Azumaya, C. M., Sierra-Valdez, F., Cordero-Morales, J. F., & Nakagawa, T. (2018). Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *Journal of Biological Chemistry*, 293(26), 10381–10391. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003183>
4. Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., & Wischmeyer, E. (2021). Duale Reihe Physiologie. In *Duale Reihe Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b000000462>
5. Bode, F., Sachs, F., & Franz, M. R. (2001). Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature 2001 409:6816*, 409(6816), 35–36. <https://doi.org/10.1038/35051165>
6. Cahalan, M. D. (2009). *STIMulating store-operated Ca²⁺ entry*. <https://doi.org/10.1038/ncb0609-669>
7. Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. In *Cells* (Vol. 9, Issue 9). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9091983>
8. Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Wozney, J., Conrad, K., Mazack, V., Zhang, W., Stahl, R., Barber, D. L., & Miller, B. A. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in Erythropoietin Modulation of Calcium Influx. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10514–10522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308478200>
9. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant [30]. In *Nature* (Vol. 224, Issue 5216, pp. 285–287). Nature. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
10. Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L., & Molkentin, J. D. (2012). A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo. *Developmental Cell*, 23(4), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.017>
11. Dietrich, A., Kalwa, H., Rost, B. R., & Gudermann, T. (2005). The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: Functional characterization and physiological relevance. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 451, Issue 1, pp. 72–80). Pflügers Arch. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1460-0>
12. Ehrenfellner, B., Zissler, A., Steinbacher, P., Monticelli, F. C., & Pittner, S. (2017). *Are*

animal models predictive for human postmortem muscle protein degradation?

<https://doi.org/10.1007/s00414-017-1643-1>

13. El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., & Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*, *47*(6), 2068–2077. <https://doi.org/10.1002/hep.22263>
14. Finney-Hayward, T. K., Popa, M. O., Bahra, P., Li, S., Poll, C. T., Gosling, M., Nicholson, A. G., Russell, R. E. K., Kon, O. M., Jarai, G., Westwick, J., Barnes, P. J., & Donnelly, L. E. (2010). Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *43*(3), 296–304. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0373OC>
15. Fowler, M. A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E. D., Phillips, C. W., & Cooper, D. C. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS ONE*, *2*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000573>
16. Garcia, R. L., & Schilling, W. P. (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *239*(1), 279–283. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7458>
17. Goel, M., Zuo, C. Di, Sinkins, W. G., & Schilling, W. P. (2007). TRPC3 channels colocalize with Na⁻/Ca²⁺ exchanger and Na⁺ pump in axial component of transverse-axial tubular system of rat ventricle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *292*(2). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00785.2006>
18. Gonzalez-Cobos, J. C., & Trebak, M. (2010). TRPC channels in smooth muscle cells. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 15, Issue 3, pp. 1023–1039). Front Biosci (Landmark Ed). <https://doi.org/10.2741/3660>
19. Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Hiani, Y. E. L., Haren, N., Khorsi, H., Sevestre, H., Ahidouch, A., & Ouadid-Ahidouch, H. (2008). Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-125>
20. *Hämatoxylin/Eosin-Färbung H & E*. (n.d.). Retrieved May 17, 2021, from www.carlroth.com
21. Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, *8*(4), 643–651. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-S](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-S)
22. Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H. A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., & Konnerth, A. (2008). TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron*, *59*(3), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.009>
23. Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*,

- 397(6716), 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>
24. Itsuki, K., Imai, Y., Hase, H., Okamura, Y., Inoue, R., & Mori, M. X. (2014). PLC-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *Journal of General Physiology*, *143*(2), 183–201. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311033>
 25. Janczyk, P., J. W., A. L.-B., S. K., & J. P. (2011). Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy--A study based on histo- and microbiological analyses. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, *193*(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/J.AANAT.2010.08.003>
 26. Klopffleisch, R., Von Deetzen, M., Weiss, A. T., Weigner, J., Weigner, F., Plendl, J., & Gruber, A. D. (2012). *Histotechnology Weigners Fixative-An Alternative to Formalin Fixation for Histology With Improved Preservation of Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1177/0300985812441031>
 27. Krüger, J., Kunert-Keil, C., Bisping, F., & Brinkmeier, H. (2008). Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscular Disorders*, *18*(6), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.04.003>
 28. Kuwahara, K., Wang, Y., Mcanally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*. <https://doi.org/10.1172/JCI27702>
 29. Kwon, Y., Hofmann, T., & Montell, C. (2007). Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular Cell*, *25*(4), 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.021>
 30. Lang, G. (2006). Histotechnik. In *Histotechnik*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/3-211-33142-5>
 31. Lau, O. C., Shen, B., Wong, C. O., Tjong, Y. W., Lo, C. Y., Wang, H. C., Huang, Y., Yung, W. H., Chen, Y. C., Fung, M. L., Rudd, J. A., & Yao, X. (2016). TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11947>
 32. Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., & Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(9), 6376–6381. <https://doi.org/10.1073/pnas.082127599>
 33. Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L., & Birnbaumer, L. (2008). Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 2895–2900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712288105>
 34. Liman, E. R., Corey, D. P., & Dulac, C. (1999). TRP2: A candidate transduction channel for

- mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5791–5796. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5791>
35. Minke, B., Wu, C. F., & Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*, 258(5530), 84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>
 36. Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)
 37. Müller, H. ·, & Graeve, ·. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*.
 38. Nikolova-Krstevski, V., Wagner, S., Friedrich, O., & Fatkin, D. (2013). Abstract 044: Transient Receptor Potential Channel 6 (TRPC6) Is An Important Mediator Of Mechanical Stretch Responses In The Atrial Endocardial Endothelium. *Circulation Research*, 113(suppl_1). https://doi.org/10.1161/RES.113.SUPPL_1.A044
 39. Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., & Mori, Y. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of g protein- coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27359–27370. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27359>
 40. Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
 41. Peschel et al. (1989). *BEITRÄGE ZUR GERICHTLICHEN MEDIZIN*. 31–42.
 42. Pittner, S., Ehrenfellner, B., Monticelli, F. C., Zissler, A., Sängler, A. M., Stoiber, W., & Steinbacher, P. (2016). Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation. *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1349-9>
 43. Pittner, S., Monticelli, F. C., Pfisterer, A., Zissler, A., Sängler, A. M., Stoiber, W., & Steinbacher, P. (2015). *Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death*. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1210-6>
 44. Prikhodko, V., Chernyuk, D., Sysoev, Y., Zernov, N., Okovityi, S., & Popugaeva, E. (2020). Potential Drug Candidates to Treat TRPC6 Channel Deficiencies in the Pathophysiology of Alzheimer’s Disease and Brain Ischemia. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9112351>
 45. Rafael Lopez, J., Kaura, V., Hopkins, P., Liu, X., Uryach, A., Adams, J., & Allen, P. D. (2020). Transient receptor potential cation channels and calcium dyshomeostasis in a mouse model relevant to malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, 133(2), 364–376. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003387>
 46. Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405–

47. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (Eds.). (2016). *Biochemie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-003-129341>
48. Riccio, A., Medhurst, A. D., Mattei, C., Kelsell, R. E., Calver, A. R., Randall, A. D., Benham, C. D., & Pangalos, M. N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, *109*(1–2), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00527-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00527-2)
49. Schiebler, T. H. (Ed.). (2005). *Anatomie*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/b137747>
50. Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., & Inoue, R. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *Journal of Physiology*, *561*(2), 415–432. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.075051>
51. Shi, Y., Ding, X., He, Z. H., Zhou, K. C., Wang, Q., & Wang, Y. Z. (2009). Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. *Gut*, *58*(11), 1443–1450. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.181735>
52. Song, J., Wang, Y., Li, X., Shen, Y., Yin, M., Guo, Y., Diao, L., Liu, Y., & Yue, D. (2013). Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma. *Molecular Biology Reports*, *40*(8), 5115–5122. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2613-4>
53. Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., & Gill, D. L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(44), 16586–16591. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0606894103>
54. Sun, Y., Sukumaran, P., Bandyopadhyay, B., & Singh, B. (2014). Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons. *Cells*, *3*(2), 455–475. <https://doi.org/10.3390/cells3020455>
55. Tang, Q., Guo, W., Zheng, L., Wu, J. X., Liu, M., Zhou, X., Zhang, X., & Chen, L. (2018). Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research*, *28*(7), 746–755. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0038-2>
56. Ulfing †, N. (2019). Kurzlehrbuch Histologie. In *Kurzlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-166358>
57. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). *TRP Channels*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
58. Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., & Zhu, M. X. (2020). TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 209). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107497>
59. Webster, J. D., Miller, M. A., Dusold, D., & Ramos-Vara, J. (2009). Effects of Prolonged

- Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(8), 753–761. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953877>
60. Werner, M., A, C., A, F., & H, B. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(7), 1016–1019. <https://doi.org/10.1097/00000478-200007000-00014>
 61. Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., & Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9652–9656. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9652>
 62. Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L., Pericak-Vance, M. A., Howell, D. N., Vance, J. M., & Rosenberg, P. B. (2005). Medicine: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801–1804. <https://doi.org/10.1126/science.1106215>
 63. Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D., & Shao, D. (1989). Proper function of the drosophila trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron*, 3(1), 81–94. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90117-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90117-7)
 64. Yamamura, H., Suzuki, Y., & Yamamura, A. (2020). Pathophysiological roles of trpc6 channels in pulmonary arterial hypertension. *Folia Pharmacologica Japonica*, 155(4), 230–235. <https://doi.org/10.1254/fpj20001>
 65. Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., & Yuan, J. X. J. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38), 13861–13866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405908101>
 66. Yue, D., Wang, Y., Xiao, J. Y., Wang, P., & Ren, C. S. (2009). Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues. *Asian Journal of Andrology*, 11(5), 541–547. <https://doi.org/10.1038/aja.2009.53>
 67. Yue, Z., Xie, J., Yu, A. S., Stock, J., Du, J., & Yue, L. (2015). Role of trp channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 308(3), H157–H182. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00457.2014>
 68. Zhou, Y., Castonguay, P., Sidhom, E. H., Clark, A. R., Dvela-Levitt, M., Kim, S., Sieber, J., Wieder, N., Jung, J. Y., Andreeva, S., Reichardt, J., Dubois, F., Hoffmann, S. C., Basgen, J. M., Montesinos, M. S., Weins, A., Johnson, A. C., Lander, E. S., Garrett, M. R., ... Greka, A. (2017). A small-molecule inhibitor of TRPC5 ion channels suppresses progressive kidney

- disease in animal models. *Science*, 358(6368), 1332–1336.
<https://doi.org/10.1126/science.aal4178>
69. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., & Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Letters*, 373(3), 193–198.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01038-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01038-G)
70. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*, 85(5), 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81233-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81233-7)
71. Zhu, Y., Gao, M., Zhou, T., Xie, M., Mao, A., Feng, L., Yao, X., Wong, W. T., & Ma, X. (2019). The TRPC5 channel regulates angiogenesis and promotes recovery from ischemic injury in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 294(1), 28–37.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005392>
72. Zimmer, P., Appell, H.-J., Zimmer, P., & Appell, H.-J. (2021). Funktionelle Anatomie des Bewegungsapparates. In *Funktionelle Anatomie* (pp. 27–104). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-61482-2_3

X. Publikationen

2022

Abdinghoff, J., **Servello, D.**, Jacobs, T., Beckmann, A., & Tschernig, T. (2022). Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. *Biomedical Reports*, *16*(5). <https://doi.org/10.3892/BR.2022.1525>

Servello, D., Abdinghoff, J., Grissmer, A., & Tschernig, T. (2022). Transient receptor potential channel 6 in human skeletal muscle fibers: Investigation in fresh and conserved tissue samples. *Biomedical Reports*, *17*(1), 1–6. <https://doi.org/10.3892/BR.2022.1543>

XI. Danksagung

Alle in der Arbeit beschriebenen Prozesse und Arbeitsschritte sowie letztlich das Anfertigen der Schrift wurde gänzlich eigenständig durchgeführt. Zum Gelingen haben jedoch einige Menschen ihren Beitrag geleistet, sodass ich Ihnen an dieser Stelle nochmal gesondert danken möchte.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Tschernig, Prosektor des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes, danken, der es mir erst möglich machte zu promovieren. Ich danke ihm für die Festlegung des Themas meiner Doktorarbeit sowie für die Möglichkeit seine Laboratorien und Materialien zu nutzen. Ebenso danke ich ihm für sein enormes Engagement, die stetige Unterstützung, die wertvollen Ratschläge und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge. Ebenfalls möchte ich ihm für das Privileg danken, mit Körperspenden arbeiten zu dürfen. Diese Arbeit hat mich sehr geprägt. Letztlich danke ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, die Räumlichkeiten des Anatomischen Instituts jederzeit für meine Arbeiten nutzen zu können.

Auch Prof. Dr. Walter J. Schulz-Schaeffer, Direktor des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, möchte ich für die Bereitstellung von unfixierten, humanen Skelettmuskelproben aus Sektionen danken. Diese wurden freundlicherweise von ihm entnommen und zur weiteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet.

Größter Dank gebührt auch Frau Irina Scheck, Sektionsassistentin der Prosektur, die mich in die ersten Schritte der Laborarbeiten einwies und mich stets dabei unterstützte. Ich danke ihr für ihren unermüdlichen Einsatz, für ihre Unterstützung bei der Beschaffung von Labormaterialien, für ihre empathische und ruhige Art, ihren Humor sowie ihren Optimismus, von dem ich stets getrieben war. Ihre Ratschläge hinsichtlich der Fixierung von Körperspenden sowie ihr würdevoller Umgang mit den Spenden, werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Ebenfalls danke ich Aline Zöhler für ihr entgegengebrachtes Verständnis, ihre unnachahmliche Geduld und Unterstützung. Ich danke ihr für das Korrekturlesen meiner Arbeit neben ihrem eigenen, zeitaufwendigen Studium. Ihre aufbauenden, motivierenden Worte, sowie ihr Optimismus, stellten mitunter den Schlüssel zum Erfolg dar.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, Rosa und Nicola Servello, sowie meiner Schwester, Vanessa Servello, denen ich diese Arbeit widme, meinen Dank zum Ausdruck bringen. Zum einen danke ich ihnen für die Möglichkeit, das Studium der Humanmedizin ableisten zu dürfen, zum anderen danke ich ihnen für ihre unnachahmliche Unterstützung, bei der sie ihre eigenen Interessen oftmals zurückstellen

mussten. Ich danke ihnen von ganzem Herzen für ihre unermessliche Fürsorge, ihren Optimismus und dafür, dass sie mich dahin gebracht haben, wo ich heute stehe.

XII. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Disputation: 19.05.2022

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Tschernig

Prof. Dr. Adolfo Cavalié