

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Proteinnachweis und Lokalisation des nicht-selektiven
Kationenkanals TRPC6 am menschlichen Herzen**

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

2022

vorgelegt von Tobias Julius Jacobs
geboren am 10.01.1998 in Aurich

Tag der Promotion: 5. Mai 2022

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstattende: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Jun.-Prof. Dr. Bianca Schrul

„Was wir wissen, ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ein Ozean.“

– Isaac Newton –

Gewidmet
meinen Eltern
Irene und Michael

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Klinische Relevanz	1
1.2	Material und Methoden	2
1.3	Ergebnisse und Interpretation	3
1.4	Ausblick.....	3
2	Summary	5
3	Einleitung	6
3.1	Die TRP-Kanal-Superfamilie	6
3.2	Entdeckung der TRP-Kanäle	8
3.3	Proteinstruktur der TRP-Kanäle	8
3.4	TRPC-Kanäle.....	10
3.4.1	TRPC6.....	11
3.5	Aktivierung von TRPC- und TRPC6-Kanälen.....	11
3.6	Assoziierte Krankheiten mit TRPC6	13
3.7	Bedeutung von Calcium	15
3.8	Expression von TRPC6 im menschlichen Herzen.....	17
3.9	Fragestellungen.....	18

4	Material und Methoden	19
4.1	Eingesetzte Materialien	19
4.1.1	Antikörper	19
4.1.2	Chemikalien	19
4.1.3	Geräte	21
4.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	22
4.2	Methoden	23
4.2.1	Körperspende	23
4.2.2	Fixierung	23
4.2.3	Auswahl der Präparate und Entnahmestellen	24
4.2.4	Übersicht der Präparateherstellung	25
4.2.5	Entnahme der Gewebeproben und Fixierung.....	26
4.2.5.1	Besonderheiten der Probeentnahmen.....	27
4.2.6	Paraffineinbettung	32
4.2.7	Schnittanfertigung	33
4.2.8	HE-Färbung	34
4.2.8.1	Prinzip der HE-Färbung.....	34
4.2.8.2	Versuchsdurchführung der HE-Färbung.....	34
4.2.9	Immunhistochemische Färbung	36
4.2.9.1	Prinzip der Immunhistochemie	36
4.2.9.2	Überblick der Versuchsdurchführung der Immunhistochemie.....	37

4.2.9.3	Vorbereitung von Paraffinschnitten	38
4.2.9.4	Antigen-Antikörper-Reaktion	39
4.2.9.5	Enzymhistochemische DAB-Färbung.....	41
4.2.9.6	Nachbehandlung der Schnitte	41
4.2.9.7	Spezifitätskontrolle	42
4.2.10	Histologische Auswertung	43
4.2.10.1	Auswahl der Schnitte	43
4.2.10.2	Auswertungsparameter.....	44
4.2.10.3	Statistische Auswertung.....	45
5	Ergebnisse.....	46
5.1	Spezifitätskontrolle	46
5.2	Alle Entnahmestellen des Präparates Nr. 6.....	49
5.3	Restliche Präparate	56
5.4	Übersicht der Auswertung	67
6	Diskussion.....	71
6.1	Methodendiskussion	71
6.1.1	Aufbereitung der Proben für die Färbung	71
6.1.2	Verwendeter TRPC6-Antikörper	72
6.1.3	Immunhistochemische Färbung	74

6.2	Ergebnisdiskussion	75
6.2.1	Spezifitätskontrolle und Negativkontrolle.....	75
6.2.2	TRPC6-Proteinnachweis	76
6.2.3	Literaturbesprechung.....	77
6.2.4	Einflussfaktoren auf den TRPC6-Proteinnachweis.....	81
6.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	81
7	Abbildungsverzeichnis	86
8	Tabellenverzeichnis	90
9	Literaturverzeichnis.....	91
10	Publikationen	105
11	Danksagung.....	106
12	Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
cm	Zentimeter
CNS	central nervous system (Zentrales Nervensystem)
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
Fab-Fragment	Antigen-bindendes Antikörperfragment
Fc-Fragment	kristallisierbares Antikörperfragment
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
G	Gauge (Außendurchmesser von Kanülen)
ggf.	gegebenenfalls

GI	gastrointestinal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	horseradish peroxidase = Peroxidase aus Meerrettich (Enzym am Sekundärantikörper)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ -R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
La ³⁺	Lanthanion
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natriumion
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol (Fixierungslösung)
NGS	normal goat serum (Blockierlösung)
N-Terminus	Amino-Terminus
NYHA	New York Heart Association – Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz
o. ä.	oder Ähnliches
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Calcium-ATPase
Ref.	Referenznummer
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	receptor-operated channel (rezeptorregulierter Ionenkanal)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
SOC	store-operated channel (speicherregulierter Ionenkanal)
TRPA	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (A für ANKTM1)
TRPC	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (C für classical bzw. canonical)
TRP-Kanal	transient receptor potential channel (Ionenkanal)
TRPM	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (M für Melastatin)
TRPML	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (ML für Mucolipin)
TRPN	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (N für nompC = no mechanoreceptor potential C)
TRPP	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (PP für Polycystin)
TRPV	Ionenfamilie der TRP-Superfamilie (V für Vanilloid)
u. a.	unter anderem
V.	Vena
V. a.	Verdacht auf
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Zusammenfassung

1.1 Klinische Relevanz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen aufgrund der immer älter werdenden Gesellschaft in Industrieländern eine zunehmend größere Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der zellmembranständige, nicht-selektive TRPC6-Ionenkanal bei der Pathogenese von Herzerkrankungen von Bedeutung ist. Er ist unter anderem für das Calciumion permeabel, welches eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion und Relaxation des Herzens einnimmt. Untersuchungen über den Ionenkanal werden insbesondere an Tiermodellen durchgeführt. Der TRPC6-Ionenkanal ist ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt bei kardiovaskulären Erkrankungen. Ein tiefgreifendes Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Rolle sowie der Lokalisation von TRPC6 im humanen Herzgewebe ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente.

Wenngleich der TRPC6-Kanal in Tierversuchen und auch auf mRNA-Level beim Menschen nachgewiesen wurde, gibt es keine systematischen Untersuchungen zum TRPC6-Proteinnachweis am humanen Herzen.

Ziel dieser Forschungsarbeit war der immunhistochemische Proteinnachweis des TRPC6-Ionenkanals im humanen Herzgewebe und die systematische Auswertung nach verschiedenen Lokalisationen, Strukturen und histologischen Schichten.

1.2 Material und Methoden

Humane Gewebeproben des Herzens von insgesamt zwölf Körperspendern wurden jeweils aus dem rechten und linken Atrium, dem rechten und linken Ventrikel und dem Septum interventriculare entnommen. Die Körperspender stammen aus der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Zehn der Körperspender waren NEP- (Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol) fixiert und von zweien wurden die Proben unfixiert bei einem postmortalen Intervall von unter 24 Stunden entnommen. Mithilfe einer Rippenschere, eines Skalpells, verschiedener Pinzetten und anderer Instrumente konnte der Thorax eröffnet und das Herz herausgenommen werden. Von den eröffneten Atrien und Ventrikeln wurden mit einer Biopsiestanze standardisiert große Gewebeproben gewonnen. Die Biopsien wurden sofort nach der Entnahme mittels Formaldehyd-Lösung bzw. Paraformaldehyd immersionsfixiert.

Für eine anschließende histologische Untersuchung wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet, liegend eingeblockt, standardisiert 5 µm dicke Schnitte angefertigt und sowohl HE- als auch immunhistochemisch gefärbt.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte von ausgewählten Gewebeproben durch einen indirekten Nachweis mittels primärem, Knockout-validiertem TRPC6-Antikörper in der Verdünnung 1:100, einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:500 und dem Chromogen DAB. Positivkontrollen entfielen im Sinne einer internen Kontrolle und Negativkontrollen wurden bei jedem Färbedurchgang mitgeführt. Einmalig wurde eine Spezifitätskontrolle mit einem TRPC6-Blocking-Peptid durchgeführt.

Die histologischen Präparate wurden anhand des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von TRPC6 nach Lokalisation (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel, Septum interventriculare), histologischen Schichten (Epikard, Myokard, Endokard) und Strukturen (z. B. Kardiomyozyten, Bindegewebe, Gefäße) ausgewertet.

1.3 Ergebnisse und Interpretation

Die Spezifität des Antikörpers konnte durch die Spezifitätskontrolle und durch stets negativ gefärbte Negativkontrollen gezeigt werden.

Die Kardiomyozyten wiesen in jeder Lokalisation TRPC6 auf und grenzten sich von stets negativ gefärbtem Bindegewebe im Myokard ab. Die epikardialen und endokardialen Färbungen zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Im Epikard wurde kein TRPC6 nachgewiesen und das Endokard wies insbesondere in der Lamina propria in einigen Präparaten TRPC6 auf, in anderen nicht. Die intramuskulären Arteriolen färbten sich zum überwiegenden Anteil positiv an, wohingegen die intramuskulären Venolen meist kein TRPC6 aufwiesen.

TRPC6 konnte unabhängig vom Geschlecht, der Fixierungsart und der Todesursache nachgewiesen werden.

1.4 Ausblick

Erstmalig wurde in dieser Arbeit das Protein des TRPC6-Ionenkanals im humanen Herzgewebe (außer am Herzohr) histologisch in verschiedenen Strukturen, Lokalisationen und histologischen Schichten - insbesondere in den Kardiomyozyten

und den intramuskulären Arteriolen - immunhistochemisch nachgewiesen, so wie die TRPC6-Expression bereits von anderen Forschungsgruppen am Tiermodell am Herzen gezeigt werden konnte. Dieses deutet im Sinne des translationalen Konzeptes auf eine mögliche Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen vom Tiermodell auf den Menschen hin. Dieses Ergebnis muss als Grundlage für weiterführende Untersuchungen angesehen werden. Aufgrund der steigenden Relevanz von kardiovaskulären Erkrankungen und TRPC6 als möglichem Angriffspunkt für eine medikamentöse Therapie im klinischen Alltag sollten die Forschungserkenntnisse durch weiterführende Studien ergänzt werden.

2 Summary

Protein detection and localisation of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart

Due to longer lifespans in societies in industrialized countries, cardiovascular diseases are becoming increasingly important for medical research. It has already been shown that the cell membrane-bound, non-selective TRPC6 ion channel is important in the pathogenesis of heart diseases. Among other things, it is permeable to calcium ion, which plays a critical role in cardiac contraction and relaxation. The TRPC6 ion channel is a promising therapeutic target in the treatment of cardiovascular diseases. A deeper understanding of the physiological and pathophysiological role as well as the localization of TRPC6 in human cardiac tissue is the basis for new drug development. Although the TRPC6 channel has been detected in animal experiments and at the mRNA level in humans, there have been no systematic studies of TRPC6 protein detection in the human heart. For the first time, TRPC6 ion channel protein was detected histologically in human heart tissue from body donors in different structures, localizations, and histological layers - particularly in cardiomyocytes and intramuscular arterioles - by immunohistochemistry, just as TRPC6 expression has already been shown in animal models of the heart by other research groups. In the sense of the translational concept, this indicates a possible transferability of research results from animal models to humans.

3 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigsten Todesursachen weltweit [86]. Global leiden allein mindestens 26 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz [84]. Mit steigender Prävalenz wird die Therapie der Herzinsuffizienz weiterhin ein entscheidendes Thema in der modernen Medizin bleiben und noch wichtiger werden [84]. Unter anderem spielen erhöhte diastolische Calciumkonzentrationen bei der Pathogenese eine Rolle [22, 67]. Die TRPC-Ionenkanäle, zu denen der TRPC6-Kanal gehört, sind u. a. calciumpermeabel und haben eine Bedeutung für die Calciumregulation im Herzen [30]. Calcium ist für die Kontraktion und Relaxation des Herzens unerlässlich [3, 30]. TRPC-Kanäle scheinen bei der Pathogenese der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz eine Rolle zu spielen [22, 52, 73, 109].

Durch die Erforschung der Aufgaben, der Expression, der Regulation und des Proteinnachweises der TRPC6-Kanäle könnten sich neue therapeutische Möglichkeiten bei kardiovaskulären Erkrankungen mit TRPC bzw. TRPC6 als Angriffspunkt bieten [30, 36, 73, 87, 109].

3.1 Die TRP-Kanal-Superfamilie

Bei den TRP-Kanälen (englisch „transient receptor potential channels“) handelt es sich um eine zelluläre, membranständige nicht-selektive Ionenkanalfamilie, welche im menschlichen und tierischen Organismus in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen vorkommt [63]. Sowohl in physiologischen Prozessen wie der Sinneswahrnehmung von Temperatur, Schmerz und Berührung [15, 112] oder der

Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase [30] als auch bei pathophysiologischen Prozessen und Krankheiten wie bei der FSGS (fokal segmentale Glomerulosklerose) [69] spielen sie eine Rolle.

Zurzeit sind sieben verschiedene Familien bekannt: TRPC (C für classical bzw. canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPN (nompC = no mechanoreceptor potential C) und TRPA (ANKTM1) [93]. Diese Subfamilien sind verschieden farblich in Abbildung 1 dargestellt. TRPC2 ist beim Menschen ein Pseudogen [61] und auch TRPN ist beim Säugetier nicht nachgewiesen [53]. Beim Menschen sind bislang fast 30 TRP-Ionenkanäle nachgewiesen [26, 93, 104], welche innerhalb ihrer Familie z. T. in Subfamilien eingeteilt und durchnummeriert werden. Die Mitglieder der TRPC-Kanäle sind in Abbildung 1 aufgezeigt.

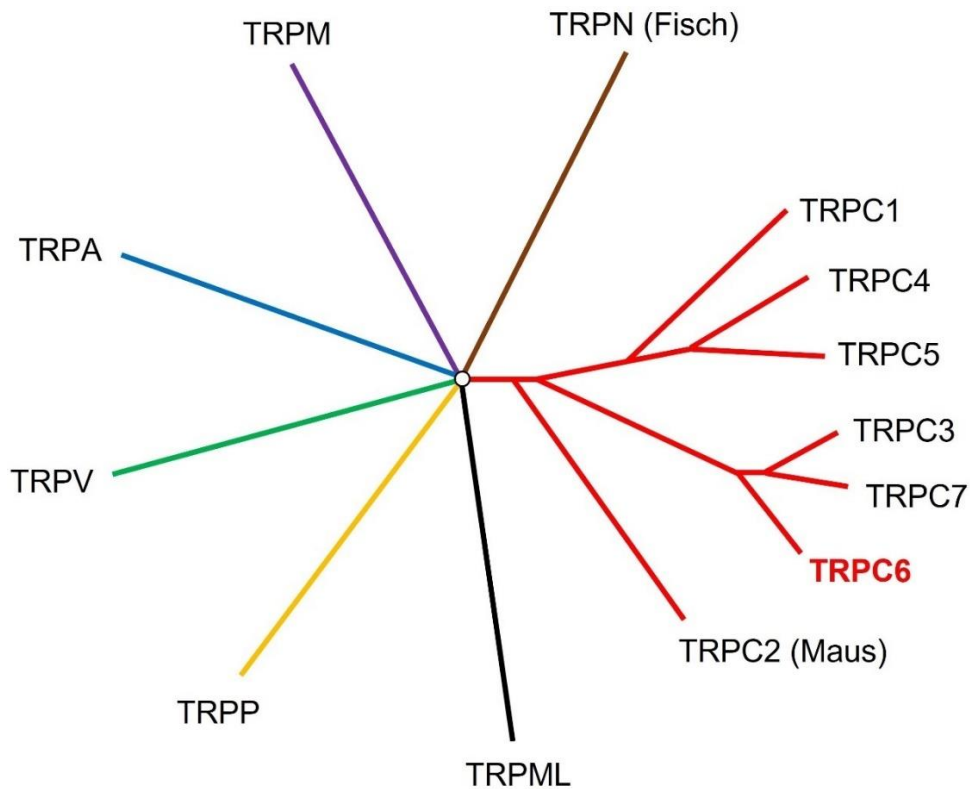


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum

(modifiziert nach [25])

3.2 Entdeckung der TRP-Kanäle

Bereits 1969 wurden die TRP-Kanäle von Cosens und Manning in einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt [17]. Die Photorezeptoren der Fliege reagierten auf einen kontinuierlichen Lichtreiz mit einem schnell vorübergehenden Stromfluss im Elektretinogramm – das Tier verhielt sich wie blind. Der Wildtyp des Tieres (also die Fliege mit der nicht mutierten Form des Gens) hingegen wies eine dauerhafte Depolarisation im Elektretinogramm auf, solange er einem Lichtreiz ausgesetzt war.

Aufgrund der schnell vorübergehenden (englisch: transient) Depolarisation wurde das Protein wenige Jahre später „transient receptor potential channel“ (TRP-Kanal) genannt [62]. 1989 konnte das verantwortliche Protein von Montell und Rubin identifiziert und kloniert werden [66]. Der reduzierte Calcium-Einstrom wurde für das Verhalten der mutierten Fruchtfliege verantwortlich gemacht. Dementsprechend wusste man, dass das TRP-Gen für einen calciumpermeablen Ionenkanal kodieren muss [33].

3.3 Proteinstruktur der TRP-Kanäle

Die Vertreter der TRP-Kanäle weisen in ihrer Struktur verschiedene Gemeinsamkeiten auf, wenngleich die Aminosäuresequenzhomologie der gesamten TRP-Superfamilie bei nur ca. 20 % liegt. Die einzelnen TRP-Familien zeichnen sich durch eine höhere Homologie aus [40].

Alle TRP-Kanäle bestehen, wie in Abbildung 2 dargestellt, als strukturelle Gemeinsamkeiten aus sechs Transmembrandomänen (S1- S6) und einen

intrazellulären, zytoplasmatischen N (Amino)- und C (Carboxy)-Terminus [14]. Vier TRPs bilden funktionelle Tetramere in der Plasmamembran aus (Abbildung 3). Die fünfte und sechste Transmembrandomäne (S5 und S6) stellen hierbei Porendomänen dar und fungieren als Ionenkanal [91].

Möglich sind sowohl Homo- (vier identische Proteinuntereinheiten), wie in Abbildung 3, als auch Heterotetramere (vier nicht-identische Proteinuntereinheiten). Heterotetramere sind allerdings nur mit Mitgliedern ihrer eigenen Subfamilie möglich, also z. B. TRPC3/6/7 [38].

Je nach TRP-Familie weisen diese eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz und verschiedene Strukturhomologien (wie z. B. Ankyrin-repeats, coiled coil-Domänen oder die TRP-Domäne) am C- bzw. N-Terminus auf [40, 72]. Die facettenreichen, weitreichenden Funktionen können durch die strukturelle Diversität der TRP-Unterfamilien und die Heteromere z. T. erklärt werden [63].

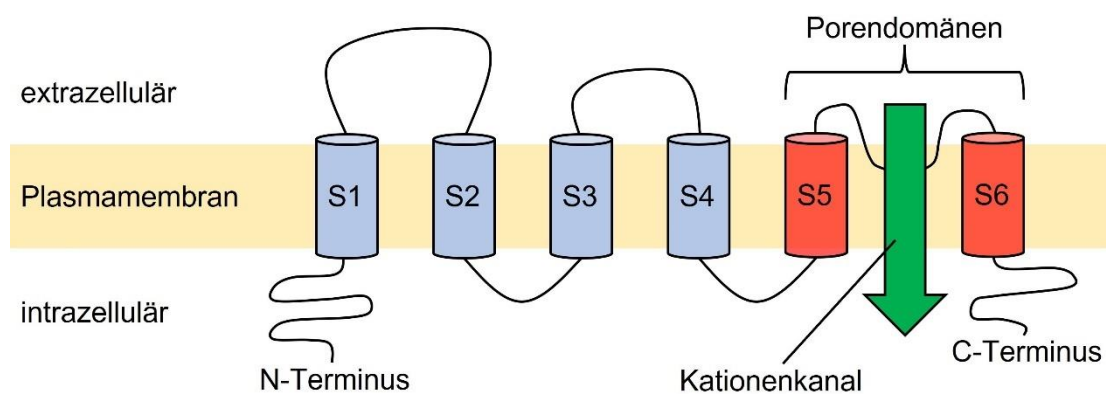


Abbildung 2: Allgemeiner Aufbau von TRP-Kanälen

(modifiziert nach [103])

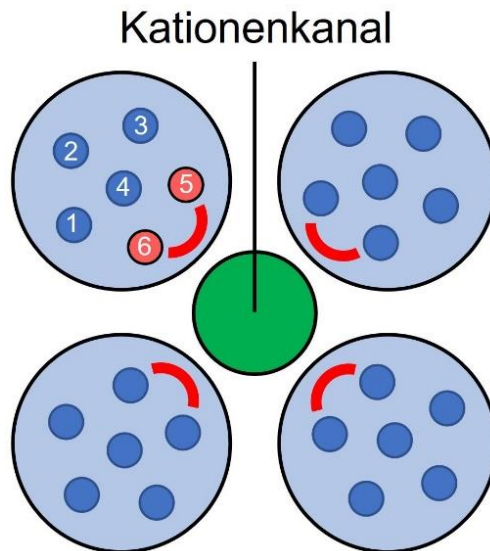


Abbildung 3: Homotetramerbildung zum funktionellen TRP-Kanal

(modifiziert nach [97])

3.4 TRPC-Kanäle

Bei der TRPC-Familie handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, welche als erste Vertreter der Superfamilie TRP beschrieben worden sind und zudem die ausgeprägteste Homologie zu den in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beteiligten TRP-Kanälen aufweisen. Demensprechend bekamen diese das „C“ im Namen für „classical“ oder „canonical“ [92].

Die Ionenfamilie besteht aus sieben Proteinen: TRPC1 bis 7. Diese können aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie und Funktion in Subfamilien unterteilt werden: TRPC1, TRPC3/6/7, TRPC4/5 und TRPC2 [92]. Innerhalb einer Subfamilie können die Proteine als Heterotetramer vorliegen. TRPC2 stellt ein Pseudogen dar und kodiert dementsprechend nicht für ein funktionsfähiges Protein. Wie alle TRP-Kanäle liegen diese als Tetramere vor [38].

3.4.1 TRPC6

Die DNA von TRPC6 wurde bereits 1997 aus einem Mausgehirn isoliert [5]. In den darauffolgenden Jahren wurde das Gen für den humanen TRPC6-Kanal auf dem Chromosom 11q21-q22, bestehend aus 13 Exons, identifiziert [18] und die Expression von humanem TRPC6 konnte u. a. in der Plazenta, Lunge, Milz und Gehirn gezeigt werden [28, 37, 77]. Das humane TRPC6 setzt sich aus 931 Aminosäuren zusammen [20].

Der TRPC6-Ionenkanal ist ein nicht-selektiver, ligandengesteuerter Kationenkanal, welcher eine fünfmal höhere Bindungsaffinität zu Ca^{2+} als zu Na^+ aufweist [77] und damit eine entscheidende Rolle im Calciumhaushalt der Zellen innehat [30].

3.5 Aktivierung von TRPC- und TRPC6-Kanälen

Für die Aktivierung der TRPC-Kanäle scheinen mehrere Mechanismen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Forschung ist sich zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht einig [2, 6, 81]. Im Folgenden werden verschiedene Öffnungsmechanismen vorgestellt.

Zum einen werden die Ionenkanäle als rezeptorregulierte Kanäle (ROC = „receptor-operated channel“) beschrieben. Die Aktivierungsschritte werden im folgenden Text beschrieben und sind in der Abbildung 4 visualisiert. TRPC6-Kanäle können als DAG (Diacylglycerin)-sensitives Mitglied über den second messenger DAG aktiviert werden [2, 37]. Durch Bindung von einem Hormon oder einem Wachstumsfaktor an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) wird die Phosphodiesterase Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche die Hydrolyse von

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und DAG katalysiert [28, 83]. Das DAG fungiert als second messenger und öffnet Membranproteine, wie auch z. B. die DAG-sensitiven TRPC3/6/7-Kanäle [2, 37].

Zum anderen wird diskutiert, dass eine intrazelluläre Ca²⁺-Entleerung ohne Rezeptoraktivierung die TRPC-Kanäle aktivieren könnte. Es wird von speicherregulierten Kanälen (SOC = „store-operated channel“) gesprochen [28, 65, 76]. Das bedeutet, dass eine Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den second messenger IP₃ über einen IP₃-Rezeptor (IP₃-R), wie in Abbildung 4 dargestellt, zu einem reaktiven Calciumeinstrom führt. Hierbei sind der in der ER-Membran exprimierte Ca²⁺-Sensor STIM und die Orai-Kanäle von Bedeutung. Es ist denkbar, dass diese mit den TRPC-Kanälen interagieren und die TRPC-Ionenkanäle als speicherregulierte Kanäle eine wichtige Rolle spielen [1, 54, 55].

Zudem ist eine indirekte Wirkung auf den Calciumspiegel denkbar. Da die TRPC-Kanäle neben Ca²⁺- auch Na⁺-permeabel sind, führt eine Öffnung der TRPC-Kanäle zur Membrandepolarisation. Dadurch wird die Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Calciumkanälen erhöht und Calcium strömt auf diese Art in die Zelle ein [29, 30].

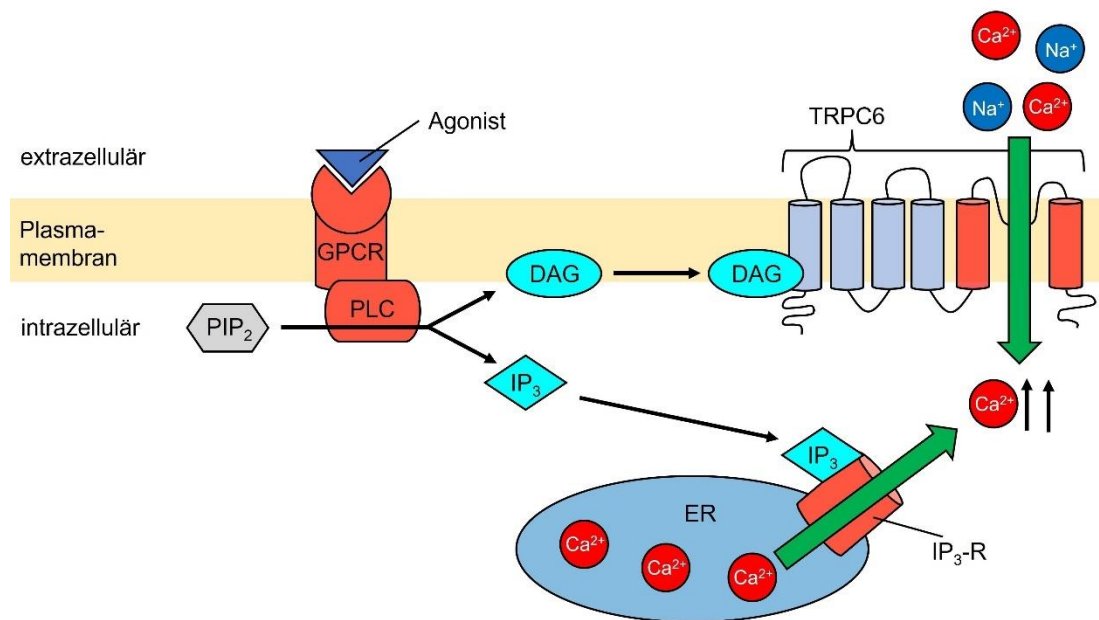


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung von TRPC-Kanälen als „receptor-operated channels“ beim Menschen

(modifiziert nach [85, 108])

3.6 Assoziierte Krankheiten mit TRPC6

Durch die Erforschung von Ionenkanälen können Erkenntnisse über Kanalopathien gewonnen und potenzielle Medikamente mit Ionenkanälen als Angriffspunkte entwickelt werden [71, 72]. Unter Kanalopathien werden Krankheiten verstanden, welche durch gestörte Funktionen von Ionenkanälen hervorgerufen werden (z. B. die Zystische Fibrose) [47].

Abbildung 5 veranschaulicht die Rolle von TRPC6-Kanälen der im Folgenden beschriebenen Erkrankungen. So wurde der TRPC6-Ionenkanal in den Podozyten, welche das viscerale Blatt der Bowman-Kapsel der Glomeruli darstellen, nachgewiesen [21]. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen des TRPC6-Kanals zu einer fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) führen können. Bei der FSGS

kommt es durch eine gestörte glomeruläre Filterung zu einer Proteinurie, einer progredienten Niereninsuffizienz und im Verlauf zu einem Nierenversagen [102].

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass TRPC6 in der Pathogenese der idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertonie eine Rolle spielt [60, 71, 106, 107]. Es handelt sich um ein Krankheitsbild, bei welchem die Patienten einen dauerhaft erhöhten mittleren pulmonalarteriellen Druck von über 25 mmHg in Ruhe aufweisen. Im Verlauf kann es zu einem terminalen Rechtsherzversagen kommen [101]. TRPC6 wurde verstärkt exprimiert bei Patienten mit dieser Erkrankung nachgewiesen [106].

Die entscheidende Rolle von TRPC6 bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion, auch Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt [23], wurde an Knockout-Mäusen bereits gezeigt [99]. Des Weiteren scheinen TRPC6-Kanäle beispielsweise beim ischämischen Schlaganfall eine wichtige Rolle zu spielen [59].

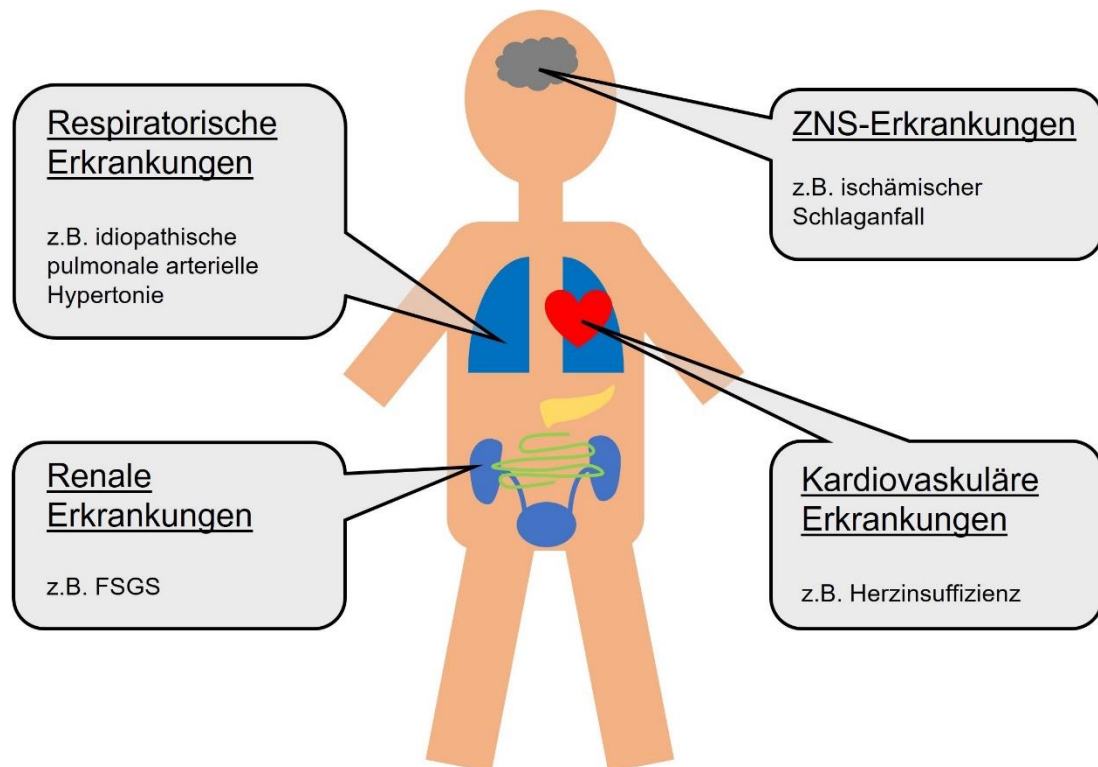


Abbildung 5: Rolle von TRPC6-Kanälen bei unterschiedlichen Erkrankungen

(modifiziert nach [46, 108])

3.7 Bedeutung von Calcium

Calcium ist ein Mineralstoff und reguliert im menschlichen Körper verschiedene Prozesse wie beispielsweise die Muskelkontraktion [89], den Knochenaufbau [10], die Apoptose [32] und es hat Einfluss auf die Freisetzung von Hormonen [11]. Zudem wirkt es als intrazellulärer second messenger über Signaltransduktionskaskaden bei der Kommunikation zwischen den Zellen mit [4, 13].

Die Calciumkonzentrationen innerhalb und außerhalb einer Zelle sind durch verschiedene Pumpen, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle streng reguliert [30]. So wird Calcium durch Ca^{2+} -ATPasen aus dem Zytosol nach extrazellulär (durch PMCA in der Plasmamembran) bzw. in das Endoplasmatische Retikulum (durch SERCA im ER) gepumpt. Damit sorgen sie für ein starkes Konzentrationsgefälle zwischen Intra- (niedrige Calciumkonzentration) und Extrazellularraum (hohe Calciumkonzentration) [32]. Das ER dient als intrazellulärer Calciumspeicher [64]. Damit Zellen miteinander kommunizieren können, leiten extrazelluläre Botenstoffe wie z. B. Hormone oder Wachstumsfaktoren über Signaltransduktionskaskaden Informationen an die Zelle weiter. Durch intrazelluläre Konzentrationsverschiebungen von z. B. Ca^{2+} als second messenger kann die Zelle auf die extrazellulären Signale reagieren. Calcium kann dabei sowohl über die Plasmamembran durch Ionenkanäle (z. B. TRPC6-Ionenkanal) als auch aus intrazellulären Zellorganellen wie dem ER strömen [28, 30].

In den letzten Jahrzehnten sind die TRP-Ionenkanäle als calciumpermeable Kanäle und ihre Bedeutung für den Calciumhaushalt immer mehr in den Fokus gerückt.

Auch im menschlichen Herzen spielt Calcium sowohl bei Kontraktion und Relaxation als auch beim Remodeling und der Ausbildung einer Herzinsuffizienz eine

entscheidende Rolle [3, 30]. Das Aufrechterhalten der Calciumhomöostase [51] und die Regulation des Calciumlevels sind für die physiologische Funktion des Herzens von großer Bedeutung [4] und bei gestörten Verhältnissen – wie erhöhten diastolischen Calciumkonzentrationen – kann es u. a. zu einer Herzinsuffizienz kommen [22, 67]. Ein erhöhter intrazellulärer Calcium-Spiegel bei anhaltender kardialer Belastung, der z. B. durch Adrenalin oder Angiotensin 2 ausgelöst sein kann, führt zu Herzhypertrophie, arterieller Hypertonie, KHK, Herzklappenerkrankungen und Herzversagen [16, 30, 35]. Es gibt sogar Hinweise dafür, dass TRPC3 und TRPC6 essenziell für eine Ausbildung von durch Angiotensin 2 ausgelöster Herzhypertrophie sind. Der Calciumeinstrom durch die TRPC3- und TRPC6-Kanäle, welche durch DAG aktiviert wurden, wird hierfür verantwortlich gemacht [75]. Dementsprechend ist naheliegend, dass die TRP-Kanäle, welche als calciumpermeable Kanäle einen Einfluss auf die Calciumkonzentrationen in Kardiomyozyten haben, bei der Entstehung von verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten beim Menschen eine wichtige Rolle spielen [30].

So wurde bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz eine signifikant erhöhte Expression von TRPC6 nachgewiesen [52]. Transgen veränderte Mäuse mit einer erhöhten Expression von TRPC6 isoliert im Herzen starben gehäuft an einer Kardiomyopathie [52, 109]. Andererseits fanden sich in einer anderen Forschungsarbeit bei Patienten mit hochgradiger Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) keine signifikanten Expressionsveränderungen von TRPC3 und TRPC6, wohl aber bei anderen TRP-Kanälen [22]. TRPC3 und TRPC6 Doppel-Knockout-Mäuse zeigten in einer weiteren Forschungsarbeit einen protektiven Effekt gegenüber Herzhypertrophie und kardialer Dysfunktion durch Druckbelastung [73, 87, 109].

Des Weiteren wird diskutiert, inwiefern TRPC6-Kanäle bei der Ausbildung eines Vorhofflimmerns eine Rolle spielen [70, 109].

3.8 Expression von TRPC6 im menschlichen Herzen

Da einige TRP-Kanäle in mehreren Organen exprimiert werden und verschiedene Funktionen innehaben, ist eine detaillierte Aufschlüsselung der Expression essenziell, um die Pathophysiologie von z. B. TRP-Knockout-Mäusen zu verstehen [94]. Sehr viele Forschergruppen arbeiten mithilfe von Tiermodellen (häufig Mäuse). Die Mäuse sind klein, leicht zu züchten und es gibt viele Inzuchtstämme, die genetisch sehr ähnlich zueinander sind [78]. Da Mäuse physiologische und genetische Ähnlichkeiten und Differenzen zum Menschen aufweisen, können Ergebnisse auf den Menschen bedingt übertragen und durch eine Forschung am Menschen bestätigt werden [78]. Die Tierforschung ist für das Verstehen der Physiologie und Pathophysiologie vom Menschen unverzichtbar. Der TRPC6-Ionenkanal wurde beispielsweise 2006 von Ohba et al. unter anderem mittels immunhistochemischer Färbungen und Western Blot bei der Maus im Herzen nachgewiesen. Die Forschungsgruppe konnte u. a. eine einheitliche Färbung in den ventrikulären Kardiomyozyten zeigen [74]. Die Forschung und Untersuchung von menschlichem Gewebe benötigt aufgrund ethischer Fragen (z. B. prämortales Einverständnis), schwieriger Handhabung (z. B. Präparation, Größe) und Verfügbarkeit von Gewebeproben oder Körperspendern viel Zeit und Aufwand [78, 79]. Nichtsdestotrotz ist sie – zusätzlich zu der Forschung an Tieren – unabdingbar, da Mausgewebe in Experimenten (z. B. in der Krebsforschung) häufig anders reagieren, als es beim Menschen der Fall ist [35, 78].

Dadurch lässt sich erklären, dass, wenngleich TRP-Kanäle verschiedenster Familien in Tieren in unterschiedlichen Organen und Geweben nachgewiesen sind, systematische Expressions- und Proteinuntersuchungen von TRP-Kanälen beim Menschen in einigen Geweben oftmals fehlen.

Durch systematische Untersuchungen sowohl der Bedeutung von Calcium als auch der physiologischen und pathophysiologischen Rolle und Lokalisation von TRPC6-Ionenkanälen im menschlichen Herzen lassen sich eventuell in Zukunft neue Medikamente für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen finden. Die TRP-Kanäle, wie auch der TRPC6-Kanal, stellen vielversprechende therapeutische Angriffspunkte für kardiovaskuläre Erkrankungen dar [30, 36, 73, 87, 109]. Ein Nachweis des TRPC6-Proteins und ein tiefgreifendes Verständnis der Lokalisation der TRPC6-Ionenkanäle im humanen Herzgewebe ist hierfür die Grundvoraussetzung.

3.9 Fragestellungen

Daraus folgend schließen sich die Fragestellungen für meine Dissertationsarbeit an:

- 1) Zeigt sich der Proteinnachweis von TRPC6 im menschlichen Herzgewebe mittels immunhistochemischer Färbungen?
- 2) Lässt sich ein Unterschied im Proteinnachweis zwischen den histologischen Schichten (Epikard, Myokard, Endokard) und Strukturen (z. B. Kardiomyozyten, Bindegewebe) erkennen?
- 3) Gibt es einen Unterschied im Proteinnachweis zwischen Atrium (rechts und links), Ventrikel (rechts und links) bzw. Septum interventriculare?
- 4) Zeigt sich ein Einflussfaktor für den TRPC6-Proteinnachweis (z. B. das Geschlecht oder die Fixierungsart)?

4 Material und Methoden

4.1 Eingesetzte Materialien

Die folgenden vier Tabellen zeigen die gebrauchten Materialien auf.

4.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der eingesetzten Antikörper

Name	Firma
Primärer TRPC6-Antikörper	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärer Antikörper: HRP goat anti rabbit	Ref.: A10547; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Kaninchenserum	Von einem unbehandelten Kaninchen (freundlich überlassen von Prof. Dr. Martin Jung, Biochemie, Homburg/Saar)
Kontrollpeptid (TRPC6-Blocking-Peptid)	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Chemikalien

Name	Firma
Citratpuffer	Ref.: ab93678; Abcam AG, Cambridge, Großbritannien

DAB	Ref.: 7411-49-6; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Eosin	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	Ref.: 27244; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formalinlösung	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Methylbenzoat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NEP	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
NGS-Blockierlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin Pastillen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Ref.: 1105.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoff-Peroxid (35%ig)	Ref.: UN2014; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

4.1.3 Geräte

Tabelle 3: Übersicht der eingesetzten Geräte

Name	Firma
Aufnahmesoftware für das Lichtmikroskop (TCapture)	Tucsen Photonics, Fuzhou, Fujian, China
Einbettzentrum	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Einkanalpipetten (UHP)	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Gewebeeinbettautomat	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
GFL Paraffin-Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Inkubator	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Kühlanlage der Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	Ref.: RM2025, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nikon ECLIPSE E200 Fotomikroskop	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Vakuum-Wärmeschrank	Ref: 51014550; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Mixer	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Wärmeplatte	Kunz Instruments, Stockholm, Schweden

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Biopsiestanze (8 mm und 10 mm)	Acuderm Inc, Fort Lauderdale, USA
DakoPen	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten	Ref.: M512; Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Einbettring	Ref: M460; Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Feuchtigkeitskammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Foliensarg	Pharaopack Europe, Wuppertal, Deutschland
Mikrotomklinge	DB80, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	SuperFrost plus Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Skalpellklingen	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Synthetisches Einschlussmittel (Roti-Histokitt)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 Körperspende

Die Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen wurden von Körperspendern gewonnen. Hierbei handelt es sich um Menschen, welche sich zu Lebzeiten entschieden haben, dass ihr Körper nach dem Tod der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes übergeben wird. Die Lehre und die Weiterentwicklung der medizinischen Wissenschaft wird und wurde maßgeblich durch die wissenschaftliche Aufarbeitung und Untersuchung der Anatomie von Körperspendern vorangetrieben. Ein würdevoller, pietätvoller und dankbarer Umgang mit den Körperspendern steht an erster Stelle. Die Forschungsarbeit wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Antragsnummer 163/20 genehmigt.

4.2.2 Fixierung

Zur Konservierung des Gewebes wurden die Körperspender nach dem Eintreffen in das Anatomische Institut innerhalb von 72 Stunden post mortem fixiert. Durch eine Fixierung wird der Zerfalls- und Verwesungsprozess verlangsamt. Vor Beginn wurden die Körperspender entkleidet, gewogen und mit einem Schild mit einer Journalnummer zur Identifikation versehen.

Zur Fixierung wurde NEP nach Weigner genutzt. Durch den Einsatz dieser Fixierungslösung kann die Menge an als 1B karzinogen eingestuftem Formaldehyd erheblich reduziert werden [95] und NEP ist weniger gesundheitsschädlich [44]. Die Fixierung lief in zwei Schritten ab.

Zunächst erfolgte die innere Fixierung über die rechte A. femoralis. Es wurde mithilfe von großlumigen Venenkanülen, die in das Gefäß eingeführt und mittels Arterienklemmen fixiert wurden, 10-15 l Fixationslösung mit einem Druck von 1,5-2,0 bar bzw. 110-150 mmHg in das Gefäß injiziert. Die genaue Menge der eingelaufenen Lösung wurde mithilfe einer Waage abgelesen und in einem Protokoll notiert. Mithilfe einer 18-G-Einmalkanüle wurde in jede Extremität, in die Regio glutealis, die Regio nuchae und in die Finger- und Zehenbeeren nachinjiziert. Im Rahmen der äußeren Fixierung lagerten die Körperspender in einer 3-5%igen Formalinlösung.

4.2.3 Auswahl der Präparate und Entnahmestellen

Die Voraussetzung für die Probenentnahme war eine gelungene Fixierung der Präparate und keine nachweisbare ansteckende Infektionskrankheit. Damit sich eventuelle Geschlechtsunterschiede bei dem TRPC6-Proteinnachweis in der histologischen Untersuchung widerspiegeln, wurden von fünf männlichen und sieben weiblichen Körperspendern Proben gewonnen.

Um eine mögliche Verfälschung der immunhistochemischen Färbung durch die chemische Fixierung zu erkennen, wurden zusätzlich von zwei unfixierten Präparaten, einer männlichen und einer weiblichen Körperspende, mit einem postmortalen Intervall unter 24 Stunden Proben entnommen.

Es wurden bei jeder Präparation jeweils ein Zylinder mit einem Durchmesser von 8-10 mm aus dem rechten und linken Atrium, dem rechten und linken Ventrikel, sowie aus dem Septum interventriculare (variierend vom rechten bzw. linken Ventrikel) standardmäßig biopsiert (Abbildung 6).

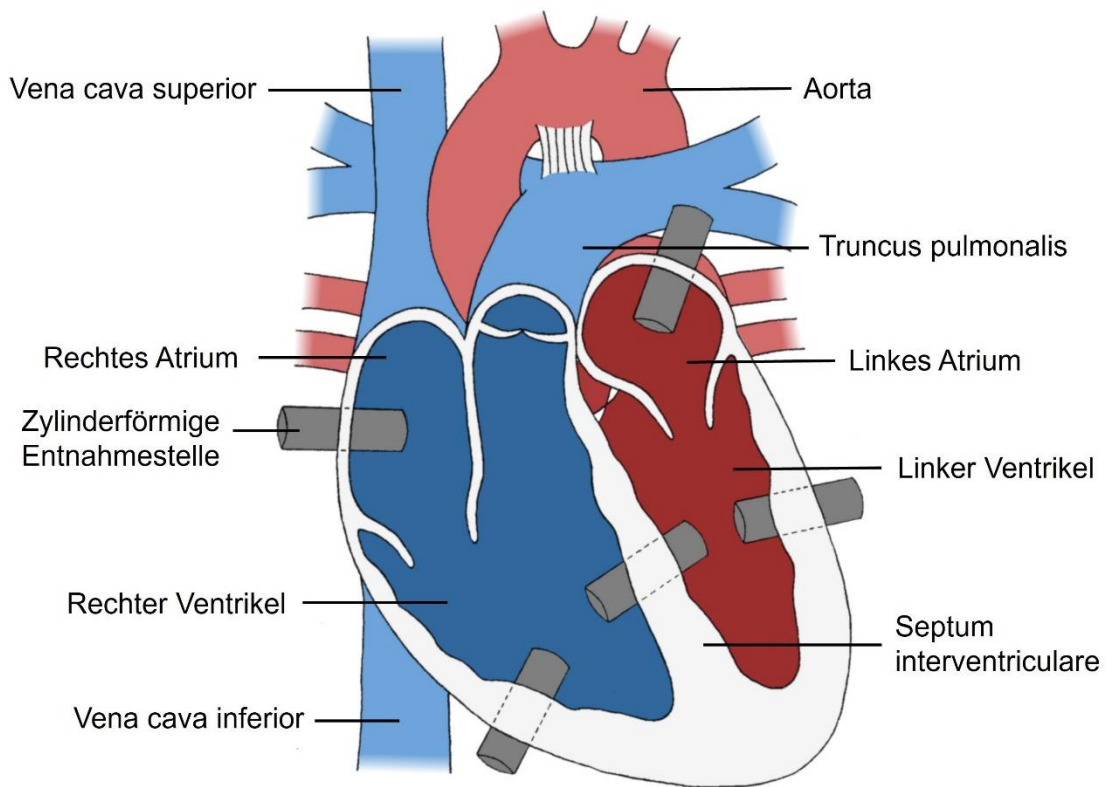


Abbildung 6: Herzskizze mit fünf zylinderförmigen Entnahmestellen

4.2.4 Übersicht der Präparateherstellung

Die mikroskopische und histologische Untersuchung setzt eine Aufarbeitung der Gewebe bis zum fertigen Objektträger voraus.

Die im Folgenden aufgeführten Schritte schließen aneinander an.

- 1) Entnahme der Gewebeproben und Fixierung
- 2) Paraffineinbettung
- 3) Schnittanfertigung
- 4) Färbung (Immunhistochemische und HE-Färbung)

4.2.5 Entnahme der Gewebeproben und Fixierung

Die Gewinnung von Herzproben von fixierten Körperspendern erfolgte mithilfe verschiedener Instrumente zur Eröffnung des Thorax und Entnahme der Gewebestücke. Außerdem war eine entsprechende Schutzausrüstung unverzichtbar.

Zunächst wurden oberflächlich auf dem Thorax des Präparates vom linken Processus coracoideus bis zur 5. rechten Rippe und analog vom rechtem Processus coracoideus bis zur 5. linken Rippe mit dem Skalpell Schnitte geführt. Unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Pinzette konnte die Haut präpariert werden. Dieses schonende Verfahren gewährleistete ein Zusammenklappen der Haut nach Gewebsentnahme. Die Rippen wurden nach vorherigem tiefen Skalpellschnitt mit der Rippenschere durchtrennt. Es hatte sich bewährt, die Rippen 2-5 und den Angulus Sterni horizontal durchzuschneiden, um ein Aufklappen des Thorax und ein genügend großes Arbeitsfeld zur Entnahme des Herzens zu ermöglichen. Die feinere Präparation von Bindegewebe, Fettgewebe o. ä. erfolgte mithilfe von verschiedenen Pinzetten, einem Skalpell und Scheren. Die spitzen Rippenkanten erforderten hierbei ein kontrolliertes und vorsichtiges Vorgehen, um Verletzungen zu vermeiden. Das Perikard wurde mit einer einseitig stumpfen Schere vorsichtig eröffnet, wobei darauf geachtet wurde, umliegendes Gewebe nicht zu beschädigen. Je nach Präparat sammelte sich Blut aus dem Perikard im Thorax, welches mit der Absaugpumpe entfernt werden konnte.

Der gefensterter Thorax zeigte neben dem Herzen und Teilabschnitten der Lunge auch die großen Gefäße V. cava superior, Arcus aortae und den Truncus pulmonalis als Orientierungshilfe. Um eine gezielte und sichere Probenentnahme zu ermöglichen, war die vollständige Entnahme des Organs notwendig. Die zu- und abführenden Gefäße mussten hierbei durchtrennt und das Herz aus dem umliegenden Gewebe

herausgelöst werden. Zum Teil erschwerte insbesondere flüssiges Blut aus den Gefäßen, welches sich im Thorax sammelte, die Orientierung. Die Unterschiede in der Blutgerinnung und damit auch die Schwierigkeit der Herzentnahme bei den verschiedenen Präparaten waren erheblich.

Sowohl die Ventrikel als auch die Atrien wurden auf einem Tablett mit dem Skalpell und einer Schere eröffnet. Dieses Vorgehen ermöglichte eine zielgerichtete Probenentnahme. Die Biopsiestanze ließ sich von der epikardialen Seite durchstechen und bot einen standardisierten Durchmesser von 8 bzw. 10 mm.

Das Herz wurde anschließend dem Körperspender anatomisch korrekt wieder eingesetzt und die Inzisionen vernäht.

Die gewonnenen Proben wurden zur Haltbarmachung des Gewebes sofort nach Entnahme mittels Paraformaldehyd bzw. Formaldehyd-Lösung immersionsfixiert. Dieses Verfahren verhindert durch Proteinfällung eine Autolyse, härtet das Material zur besseren Schneidbarkeit und tötet vorhandene Bakterien ab.

Zwei Tage nach Entnahme und Fixierung wurden die Proben in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen.

Die Biopsien wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.5.1 Besonderheiten der Probeentnahmen

Die Vielfältigkeit des menschlichen Körpers spiegelt sich auch in der Herzentnahme wider. Je nach körperlicher Beschaffenheit, möglichen Voroperationen, Medikamenteneinnahme o. ä. hat sich diese unterschiedlich gestaltet und verschiedene Herausforderungen geboten. Es wurde jede Entnahme und die jeweils damit

verbundenen Schwierigkeiten detailliert protokolliert. Im Folgenden wird beispielhaft auf eine Herausforderung bei der Probenentnahme eingegangen.

Bei der Herzbiopsie des Körperspenders mit der Nummer 4 sammelte sich beim Öffnen der sehr verkalkten Aorta thoracica viel flüssiges Blut im Thorax, welches mit einer Absaugpumpe regelmäßig abgesaugt wurde. Zudem waren Thorax und Perikard stark miteinander verklebt. Beides erschwerte die Lokalisation und Unterscheidung der anatomischen Strukturen im Mediastinum. Des Weiteren fanden sich Stents und Schrittmacherkabel bei der Präparation, die vor der Herzentnahme durchgeschnitten werden mussten. Denkbar ist eine Korrelation zwischen Antikoagulans-Einnahme bei bspw. bestehendem Vorhofflimmern und dem flüssigeren Blut.

Die folgende Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verschiedenen Körperspender und Probenentnahmen.

Tabelle 5: Übersicht der Körperspender und Probenentnahmen

	Entnahme- datum	Sterbe- -alter	Geschlecht	Todesursache (Angaben auf den Totenscheinen)	Fixierung	Makroskopische Besonderheiten
1	15.05.19	71	Männlich	Respiratorische Insuffizienz, fortgeschrittene COPD	Unfixiert; postmortales Intervall < 24 h	Thorakal freie Flüssigkeit
2	15.05.19	84	Männlich	Plötzlicher Herztod	NEP	
3	15.05.19	79	Männlich	Myokardinfarkt, KHK, Vorhofflimmern, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz	NEP	Perikarderguss, Herzschriftmacher, viel flüssiges Blut
4	12.06.19	73	Männlich	Herz-Kreislauf-Stillstand, terminale Herzinsuffizienz	NEP	Stark verkalkte Aorta thoracica, Verklebung des Thoraxes mit dem Perikard, Stents, Herz- schriftmacher, viel flüssiges Blut

5	12.06.19	57	Weiblich	Mediainfarkt	NEP	Adipositas, Lipomatosis cordis
6	14.06.19	83	Weiblich	V. a. Embolie, Herzinsuffizienz, Thrombose	Unfixiert; postmortales Intervall < 24 h	Adipositas, rechtsventrikuläre Hypertrophie
7	04.07.19	94	Weiblich	Marasmus senilis, COPD	NEP	Kachexie, Fassthorax, Kalkplatte 2,5 × 1,5 cm auf dem rechten Ventrikel, multiple Verkalkungen im linken Ventrikel
8	04.07.19	85	Weiblich	Sekundentod, cerebrale Ischämie	NEP	Viel flüssiges Blut

9	04.07.19	93	Weiblich	Pneumonie beidseits mit Multiorganversagen, Dysphagie, Mediainfarkt links, Kachexie	NEP	Sehr kachektisch, verhärtete Pleura, viel flüssiges Blut, verfettetes Blut, Verkalkungen im linken Ventrikel
10	26.08.19	93	Männlich	Herz-Kreislauf-Versagen, Kachexie, Anämie, Rheumatismus	NEP	Kachexie, bifaszikulärer Herzschrittmacher, Blutkoagel im linken Ventrikel
11	26.08.19	87	Weiblich	Herz-Kreislauf-Versagen, Kachexie	NEP	Stark kachektisch, Hämatothorax, Perikarderguss, handflächengroße Blutkoageln im Perikard, sehr kleines Herz
12	26.08.19	92	Weiblich	Herzinsuffizienz, arterielle Hypertonie, Osteoporose	NEP	Blutkoagel, Ventrikelhypertrophie, Perikard am Sternum verwachsen

4.2.6 Paraffineinbettung

Die zylinderförmigen Proben wurden mit Wasser ausgewaschen, um Fixierungsmittel zu entfernen. Danach wurden diese mithilfe eines Gewebereinbettautomaten in geeignete Lösungsmittel gebracht und in Paraffin eingebettet. Hierfür wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dieser Arbeitsschritt führte zum Wasserentzug und damit zur erforderlichen Härtung der Probe. Das Gewebe wurde anschließend in Methylbenzoat durchtränkt und in verflüssigtes Paraffin gebracht. Zuvor wassergefüllte Räume waren dadurch von Paraffin besetzt. Tabelle 6 zeigt auf, wie lange die Proben in welchen Chemikalien verweilten.

Tabelle 6: Schema für die Einbettung in Paraffin

Verweildauer	Chemikalien
3 h	70 % 2-Propanol
1,5 h	80 % 2-Propanol
1,5 h	90 % 2-Propanol
2 × 1,5 h	100 % 2-Propanol
3 × 1,5 h	Methylbenzoat (Benzoessäuremethylester)
2 × 2 h	Paraffin

Es wurden kleine Paraffinquader mit dem Herzgewebe hergestellt. An einem Einbettzentrum wurde das flüssige Paraffin ausgegossen, die Proben mit einer Präpariernadel bzw. einer Pinzette ausgerichtet und auf einer Kühlplatte zum Erstarren gebracht. Anschließend wurde ein Einbettring über die Gewebeprobe gelegt und flüssiges Paraffin nachgegossen.

Wenn die Proben liegend eingeblockt und längs geschnitten werden, können Epi-

(grün), Myo- (rot) und Endokard (blau) angeschnitten sein (Abbildung 7 Bildseite A), wohingegen bei aufrechter Einblockung und querer Schnitthanfertigung beispielsweise, wie in Abbildung 7 Bildseite B visualisiert, nur das Myokard angeschnitten sein könnte. Deswegen wurde das zylinderförmige Herzgewebe liegend eingeblockt.

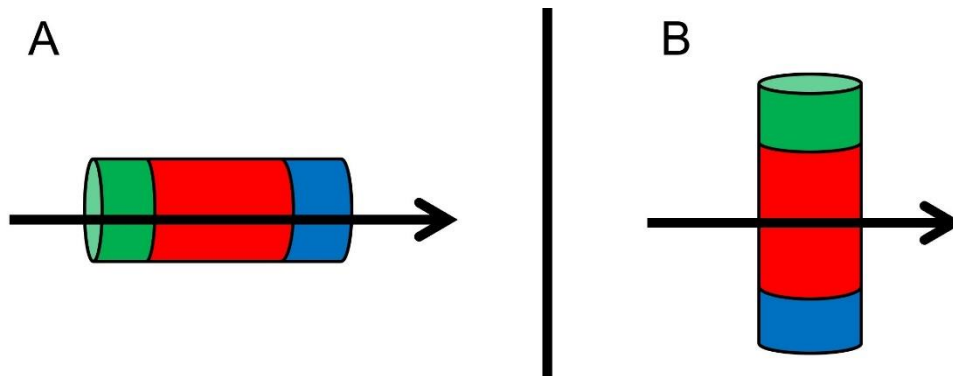


Abbildung 7: Einblockung der Gewebeprobe

4.2.7 Schnitthanfertigung

Mithilfe eines Mikrotoms wurden die Paraffinquader 5-10 μm dick geschnitten. Es zeigte sich, dass bei einer 5- μm -Dicke die Färbungen am besten beurteilt werden konnten und sich z. B. Herzmuskelzellen weniger überlagern, sodass standardmäßig diese Schnittstärke verwendet wurde. Anschließend wurden die angefertigten Schnitte auf ein 37 °C heißes Wasserbad gelegt. Durch die Wärme streckten sich die Schnitte. Diese wurden auf einem Objektträger aufgezogen und für ca. 45 Minuten auf eine 37 °C warme Wärmeplatte gelegt. Über Nacht kamen die Objektträger zum letzten Trocknen in den auf 37 °C erwärmten Inkubator.

Die angefertigten Schnitte wurden bis zur Färbung in einem Aufbewahrungskasten gelagert.

4.2.8 HE-Färbung

4.2.8.1 Prinzip der HE-Färbung

Zur besseren Kontrastierung müssen die Schnitte gefärbt werden. Die HE-Färbung ist eine histologische Routinefärbung, die der Überprüfung der Intaktheit der Morphologie und Orientierung im Gewebe dient. Sie wurde vor jeder Immunhistochemie durchgeführt.

Die Anfärbung beruht hierbei auf einer elektrostatischen Wechselwirkung. Der basische Farbstoff Hämatoxylin bindet an saure (bzw. basophile) Komponenten, zu welchen bspw. DNA, RNA und das raue Endoplasmatisches Retikulum gehören. Dadurch werden Zellkerne und Ribosomen blau-violett gefärbt. Eosin hat als saurer Farbstoff eine hohe Affinität zu basischen (bzw. azidophilen) Strukturen (v. a. glattes Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) und färbt Zytoplasmaanteile und Kollagenfasern rot.

Die HE-Färbung lässt sich in zwei Abschnitte gliedern. Die im Folgenden aufgeführten Schritte schließen aneinander an:

- 1) Entparaffinierung
- 2) Färben (Anfärbung der Kerne, Gegenfärbung)

4.2.8.2 Versuchsdurchführung der HE-Färbung

Entparaffinierung

Die Schnitte mussten zuvor entparaffiniert und danach rehydriert werden, sodass auf dem Objektträger nur das eingebettete Organ zurückblieb. Dafür wurden die Proben

in verschiedene Lösungen gegeben, die in der folgenden Tabelle 7 aufgeführt sind.

Tabelle 7: Schema für das Entparaffinieren für die HE-Färbung

Verweildauer	Chemikalien
3 × 5 min	Xylol
2 × 5 min	100 % 2-Propanol
5 min	90 % 2-Propanol
5 min	80 % 2-Propanol

Färben

Im ersten Schritt wurden die Objektträger in gefiltertes Hämatoxylin nach Ehrlich für 8 Minuten überführt und damit die Kerne angefärbt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser die überschüssige Farbe entfernt und unter fließendem Leitungswasser für 12 Minuten gebläut, wodurch der pH-Wert erhöht wurde. Abschließend folgte eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser für 30 Sekunden.

Im zweiten Schritt wurde mit gefiltertem Eosin (0,1%iges Eosin + 2 Tropfen Essigsäure) für 2,5 Minuten gegengefärbt. Anschließend wurde in 90 % 2-Propanol so lange gedippt, bis die gewünschte rote Farbe erreicht war (ca. 2-3-mal).

Abschließend wurden die Proben zweimal 5 Minuten lang durch 100 % 2-Propanol und anschließend dreimal 5 Minuten lang durch Xylol entwässert.

Die Objektträger wurden mit dem Roti-Histokitt und mit Deckgläsern eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

Eine gelungene HE-Färbung und eine intakte Morphologie des Herzgewebes war die Voraussetzung für die folgende immunhistochemische Färbung.

4.2.9 Immunhistochemische Färbung

4.2.9.1 Prinzip der Immunhistochemie

Mithilfe der Immunhistochemie können spezifische Gewebsantigene wie das Protein TRPC6 über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen und histologisch lokalisiert werden.

Die Abbildung 8 bietet einen visualisierten Überblick über das Prinzip der indirekten Immunhistochemie, welche im Folgenden erklärt wird. Bei der genutzten indirekten Methode werden die erstellten Herzschnitte zunächst mit einem spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichteten primären Antikörper inkubiert. Der im zweiten Schritt inkubierte Sekundärantikörper bindet spezifisch mit dem Fab-Fragment an das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers. Die Visualisierung erfolgt durch die Zugabe des Chromogens DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid). Das Enzym HRP (horseradish peroxidase = Peroxidase aus Meerrettich), welches sich am Fc-Fragment des Sekundärantikörpers befindet, wandelt das DAB in einer enzymhistochemischen Oxidation in ein farbiges, braunes Endprodukt um. Abschließend wird zur besseren Kontrastierung mit Hämatoxylin nach Ehrlich gegengefärbt. Dadurch sind alle histologischen Strukturen, die der Primärantikörper ursprünglich gebunden hat, sichtbar.

Für den immunhistochemischen Nachweis von TRPC6 wurde ein polyklonaler primärer Antikörper vom Kaninchen verwendet. Dieser bindet spezifisch direkt gegen ein intrazellulär am N-terminus liegendes Peptid, welches aus den Aminosäuren 24-38 von TRPC6 besteht.

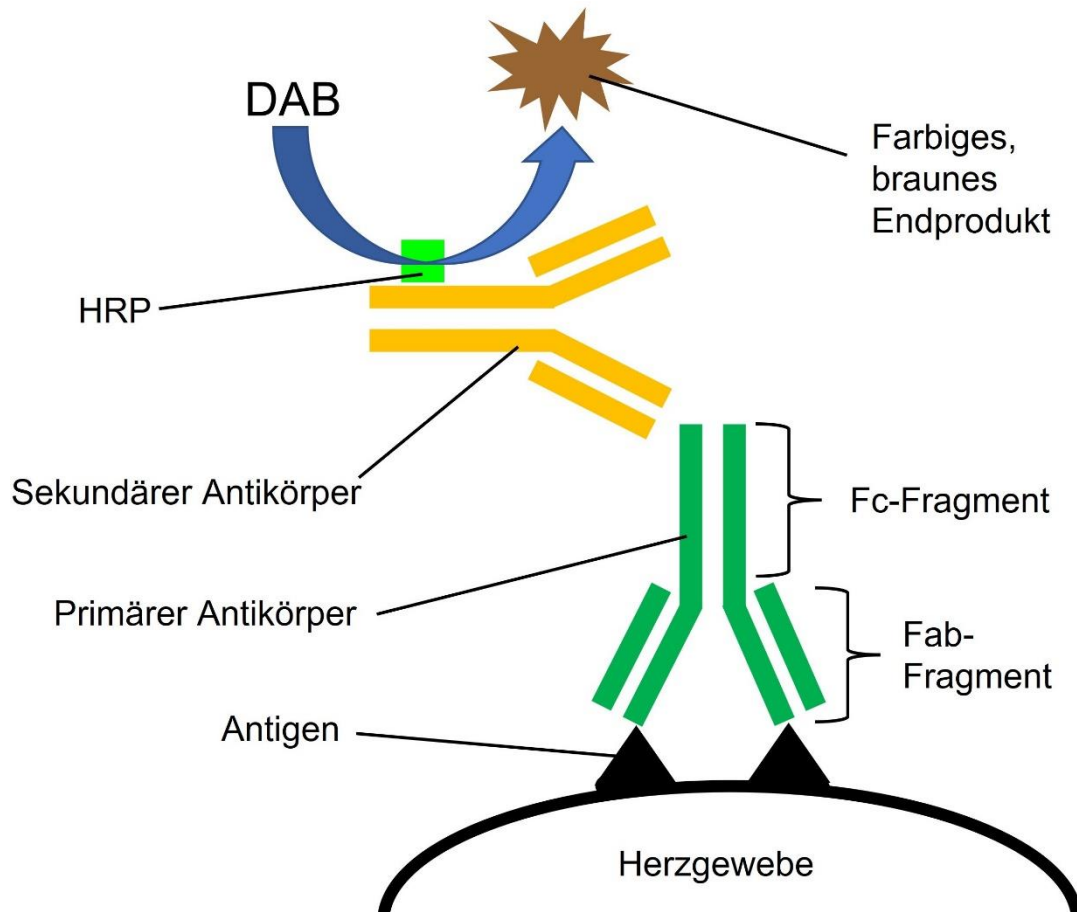


Abbildung 8: Indirekte Immunhistochemie mit DAB als Chromogen

4.2.9.2 Überblick der Versuchsdurchführung der Immunhistochemie

In einem Färbedurchgang konnten bis zu 10 Objektträger gefärbt werden. Wichtig war, dass immer ein Positivkontrollschnitt und ein Negativkontrollschnitt mitgeführt wurden, um unspezifische Antigen-Antikörperreaktionen auszuschließen. Da das Herzgewebe in den ersten Probedurchläufen nachgewiesenermaßen das zu untersuchende Antigen enthielt, konnte bei späteren Färbedurchgängen im Sinne einer internen Kontrolle auf eine zusätzliche positive Kontrolle verzichtet werden.

Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nie austrockneten.

Die immunhistochemische Färbung lässt sich in vier Abschnitte gliedern. Die im Folgenden aufgeführten Schritte schließen aneinander an:

- 1) Vorbereitung von Paraffinschnitten (Entparaffinierung, Demaskierung, Blockierung)
- 2) Antigen-Antikörper-Reaktion (Antikörper, Peroxidase-Inaktivierung, Sekundärantikörper)
- 3) Enzymhistochemische DAB-Färbung
- 4) Nachbehandlung der Schnitte (Gegenfärbung, Entwässerung)

4.2.9.3 Vorbereitung von Paraffinschnitten

Entparaffinierung

Die Entparaffinierung der Objektträger erfolgte durch Xylol und die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe und abschließender Spülung in destilliertem Wasser nach dem Schema in Tabelle 8. Wichtig war, auf ggf. vorhandene Paraffinreste aus anderen Färbedurchgängen zu achten und die Lösungen bei sichtbarer Verschmutzung auszutauschen.

Tabelle 8: Schema für das Entparaffinieren für die immunhistochemische Färbung

Verweildauer	Chemikalien
3 × 5 min	Xylol
2 × 5 min	100 % 2-Propanol
5 min	90 % 2-Propanol
5 min	80 % 2-Propanol
5 min	70 % 2-Propanol
5 min	Destilliertes Wasser

Demaskierung

Im Rahmen der Formalinfixierung und Paraffineinbettung kann es zu Eiweißquervernetzungen und daraus resultierender Epitopmaskierung kommen. Mithilfe von Hitze und einer Citratlösung können diese aufgebrochen und die Immunogenität wiederhergestellt werden.

Hierfür wurden die Proben für 60 Minuten in schon angesetztem und vorgewärmtem 1%igen Citratpuffer (5 ml Citratpuffer + 495 ml destilliertes Wasser) bei 95 °C im Wärmeschrank aufbewahrt und kühlten anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur ab. Als letzten Schritt wurden die Schnitte eine Minute lang mit PBS gewaschen.

Blockierung

Das Inkubieren mit einer Blockierlösung verringert die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Antigen-Antikörper-Bindung und damit einer nicht-spezifischen Hintergrundreaktion.

Die Objektträger wurden trocken geklopft, in eine Feuchtkammer gelegt und eine Blockierlösung wurde auf die Schnitte pipettiert. Bei der Blockierlösung handelte es sich um 10%iges NGS (normal goat serum) in PBS, mit welchem die Schnitte für 1 Stunde inkubierten. Eine Umrandung der Proben mit einem hydrophoben Fettstift sorgte dafür, dass die Gewebe überall benetzt waren.

4.2.9.4 Antigen-Antikörper-Reaktion

Antikörper

Nach Abklopfen der Blockierlösung wurde auf die Negativkontrollen 1:500

verdünntes Kaninchenserum (50 µl Kaninchenserum + 24,95 ml PBS) und kein Primärantikörper pipettiert. Auf die restlichen Schnitte wurde 1:100 verdünnter Primärantikörper (200 µl 1:50 vorverdünnte Antikörperlösung + 200 µl NGS) pipettiert. Alle Schnitte inkubierten über Nacht in der Feuchtkammer. Das Kaninchenserum hat eine Proteinkonzentration von 50 mg/ml und der Primärantikörper von 1 mg/ml. In der verwendeten Verdünnung sind die Proteinkonzentrationen vom verdünnten Primärantikörper und der verwendeten Lösung des verdünnten Kaninchenserums somit vergleichbar.

Peroxidase-Inaktivierung

Das Blockieren endogener Enzyme wie die Peroxidase verringert die Wahrscheinlichkeit einer nicht-spezifischen Hintergrundreaktion bei der Verwendung von HRP (horseradish peroxidase) -konjugierten Sekundärantikörpern. Hierfür wurden alle Schnitte mit 3%igem H₂O₂ (8,57 ml von 35%ige H₂O₂-Ausgangslösung + 91,43 ml PBS) für 10 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Vor und nach Inkubation wurden die Objektträger jeweils 2×2 Minuten mit PBS in einer Küvette gewaschen.

Sekundärantikörper

Der HRP-konjugierte Antikörper wurde in einer Verdünnung mit NGS von 1:500 auf die Schnitte pipettiert und für 60 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in 2 Schritten. Zunächst wurde eine 1:50 verdünnte Stocklösung durch Mischen von 20 µl Sekundärantikörper und 980 µl NGS hergestellt. 100 µl der Stocklösung wurden im zweiten Schritt mit 900 µl NGS verdünnt.

Abschließend erfolgte eine erneute Waschung der Objektträger für 2×2 Minuten mit PBS.

4.2.9.5 Enzymhistochemische DAB-Färbung

Für den entscheidenden Schritt der Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindungen wurde als Chromogen DAB gewählt, welches durch das am Sekundärantikörper konjugierte Enzym HRP zu einem braunen Endprodukt in einer enzymhistochemischen Reaktion reagierte.

Das DAB bestand aus 2 Substraten, welche im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Inkubation erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle und wurde für eine Färbung für alle Schnitte gleich lang gehalten. Die Inkubation und damit auch die chemische Reaktion wurde durch Eintauchen in PBS nach einer deutlichen Braunfärbung unter dem Mikroskop gestoppt. Je nach Färbedurchgang variierte die Inkubation zwischen 8 und 11 Minuten.

4.2.9.6 Nachbehandlung der Schnitte

Gegenfärbung

Um eine bessere Kontrastierung zu erreichen, wurden die Objektträger in einer Küvette 1 Minute in destilliertem Wasser gespült, 1-2 Sekunden in Hämatoxylin nach Ehrlich (gefiltert) gedippt und abschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut.

Entwässerung

Durch das Spülen der Objektträger durch Alkohollösungen mit aufsteigenden Konzentrationen und mit dem Intermedium Xylol nach dem Schema in Tabelle 9 konnte Wasser von den Schnitten verdrängt werden.

Tabelle 9: Schema der Entwässerung für die immunhistochemische Färbung

Verweildauer	Chemikalien
5 min	70 % 2-Propanol
5 min	80 % 2-Propanol
5 min	90 % 2-Propanol
2 × 5 min	100 % 2-Propanol
3 × 5 min	Xylol

Abschließend wurden die Proben eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

4.2.9.7 Spezifitätskontrolle

Einmalig wurde ein TRPC6-Blocking-Peptid auf einen histologischen Schnitt gegeben, bei dem zuvor bei der Immunhistochemie eine deutliche Braunfärbung gesehen wurde. Das Kontrollpeptid wurde mit dem Primärantikörper inkubiert, sodass der Antikörper an das blockierende Peptid band und sich eine abgeschwächte Farbreaktion bei der Immunhistochemie zeigte.

Hierfür wurden 40 µg Kontrollpeptid mit 20 µl PBS aufgelöst. Anschließend wurde 1:100 verdünnter Primärantikörper dazugegeben, sodass genug Volumen für einen Schnitt bestand. Die Lösung inkubierte über Nacht im Kühlschrank bei 7 °C und wurde auf den histologischen Schnitt pipettiert.

4.2.10 Histologische Auswertung

4.2.10.1 Auswahl der Schnitte

Die Präparate wurden systematisch histologisch ausgewertet. Die Auswertung wurde durch zwei histologisch versierte Personen doppelverblindet stichprobenartig kritisch hinterfragt und bestätigt. Es wurde die in jedem Färbedurchgang gemachte Negativkontrollfärbung und positive Färbung vergleichend angeschaut. Damit es möglichst wenig Störfaktoren gab, war es besonders wichtig, dass die Negativkontrollen keine Braunfärbung aufwiesen, das Gewebe morphologisch intakt war und alle Schnitte gleichbehandelt wurden (z. B. gleich gefärbt, geschnitten, fixiert).

Standardmäßig wurde das Septum interventriculare bei den Präparaten 1-6 und 8-10 lichtmikroskopisch untersucht. Zudem wurden vom Präparat 6 alle 5 Entnahmestellen (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel, Septum interventriculare), vom Präparat 4 stichprobenartig der rechte und linke Ventrikel und die Spezifitätskontrolle vom Präparat 1 beurteilt. Auf ein ausgeglichenes Männer-Frauen-Verhältnis wurde geachtet. Von ausgewählten Stellen wurden mit einer Aufnahmesoftware Bilder gemacht. Die Färbungen der Präparate 7, 11 und 12 wurden aufgrund artifizierlicher Veränderungen bzw. unzureichender morphologischer Qualität der Gewebe nicht in die Auswertung mit einbezogen.

4.2.10.2 Auswertungsparameter

Im Rahmen der Auswertung wurden die histologischen Schnitte nach ihrer Färbung beurteilt, um eine Aussage über das Vorhandensein (= Braunfärbung) bzw. das Nichtvorhandensein (= keine Braunfärbung) von TRPC6 zu treffen.

Die Negativkontrollfärbung dient dem Ausschluss von nicht-spezifischen Hintergrundsignalen und unspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen. Diese wurde als gelungen interpretiert, wenn keine Braunfärbung zu sehen war.

Eine histologische Struktur wurde als positiv bewertet, wenn eine Braunfärbung zu erkennen war. Die Histologie wurde dort beurteilt, wo kein artifizierlicher Abgang des Gewebes zu sehen war und es wurde insbesondere der überwiegende Anteil der Stärke der Braunfärbung berücksichtigt. Nach dem Schema in Tabelle 10 wurde die Braunfärbung eingeteilt.

Tabelle 10: Auswertungsschema der immunhistochemischen Färbung

Stärke der Braunfärbung	Bewertung
++	Deutlich positiv (= deutliche Braunfärbung)
+	Positiv (= blässere Braunfärbung)
(+)	Fraglich positiv (= fragliche, angedeutete Braunfärbung)
-	Negativ (= keine signifikante Braunfärbung)

Folgende Strukturen, falls vorhanden, wurden gesondert nach ihrer Färbung eingeteilt und im Ergebnisteil aufgeführt:

- Epikard (Tunica serosa + Tela subserosa)
- Myokard (insb. Kardiomyozyten)

- Endokard (Lamina epithelialis + Lamina propria)
- Gefäße (z. B. Koronararterien, intramuskuläre Arteriolen)
- Reizleitungssystem (Purkinjefasern)

4.2.10.3 Statistische Auswertung

Es wurden im Rahmen der qualitativen bzw. semiquantitativen Auswertung nach positiv [++] und [+], fraglich positiv [(+)] und negativ [-] kategorisiert. Signifikanzberechnungen sind nicht sinnvoll bzw. nicht möglich.

5 Ergebnisse

5.1 Spezifitätskontrolle

Bei der Spezifitätskontrolle (Abbildung 10, Abbildung 12) zeigen sich die Kardiomyozyten in einer angedeuteten, blassen Braunfärbung [(+)]. Einige Herzmuskelzellen sind nicht signifikant braun angefärbt [-]. In der immunhistochemischen Färbung (Abbildung 9, Abbildung 13 Bildseite B) weisen diese hingegen eine deutliche Braunfärbung [++] auf und die Negativkontrolle (Abbildung 11, Abbildung 13 Bildseite A) erscheint blass-bläulich [-]. Verglichen wurden die gleichen Stellen in einer Schnittserie des Präparates Nr. 1.

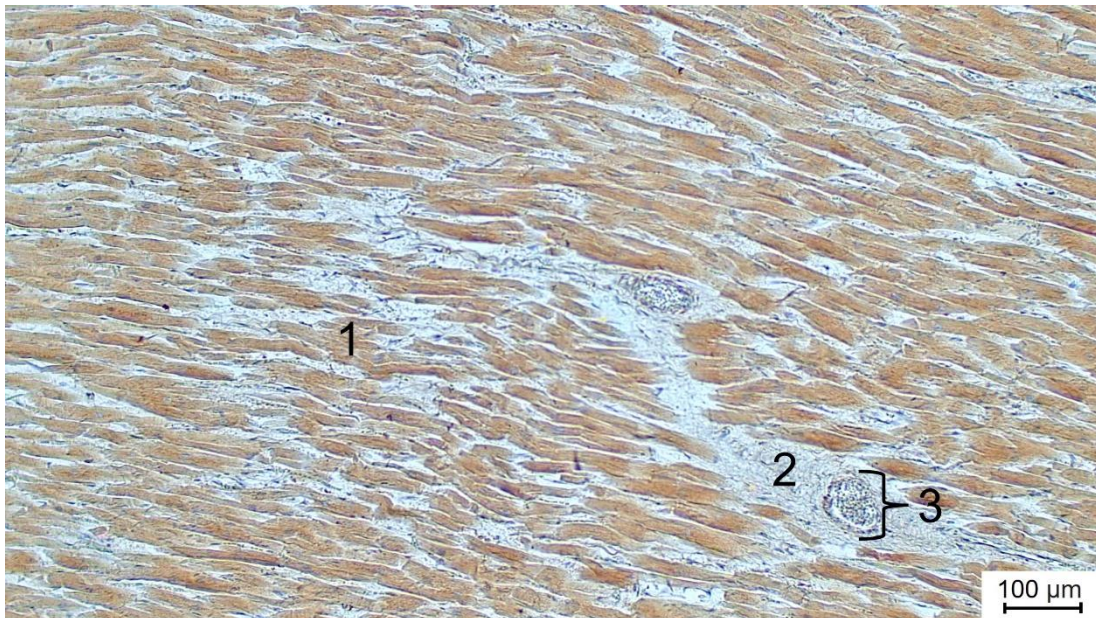


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Kardiomyozyten, 2 = Bindegewebe, 3 = Kapillargefäß. Alle Kardiomyozyten sind deutlich braun gefärbt (positiv). (Präparat Nr. 1)

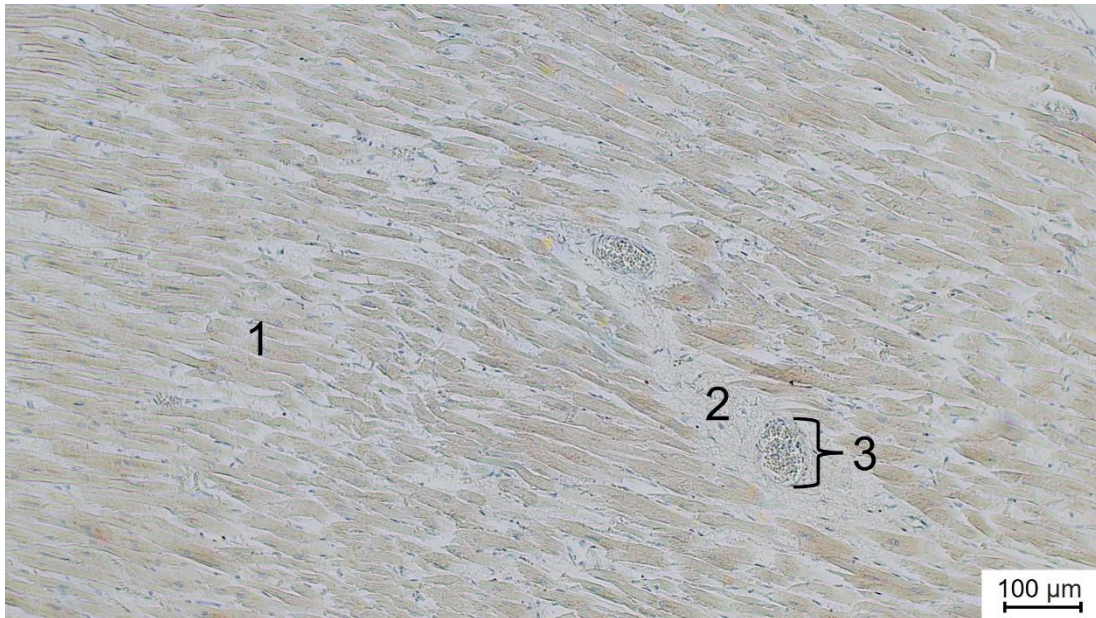


Abbildung 10: Spezifitätskontrolle nach Vorinkubation des Antikörpers mit TRPC6-Blocking-Peptid am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare
1 = Kardiomyozyten, 2 = Bindegewebe, 3 = Kapillargefäß. Die Kardiomyozyten sind angedeutet braun bzw. einige nicht braun gefärbt. (Präparat Nr. 1)

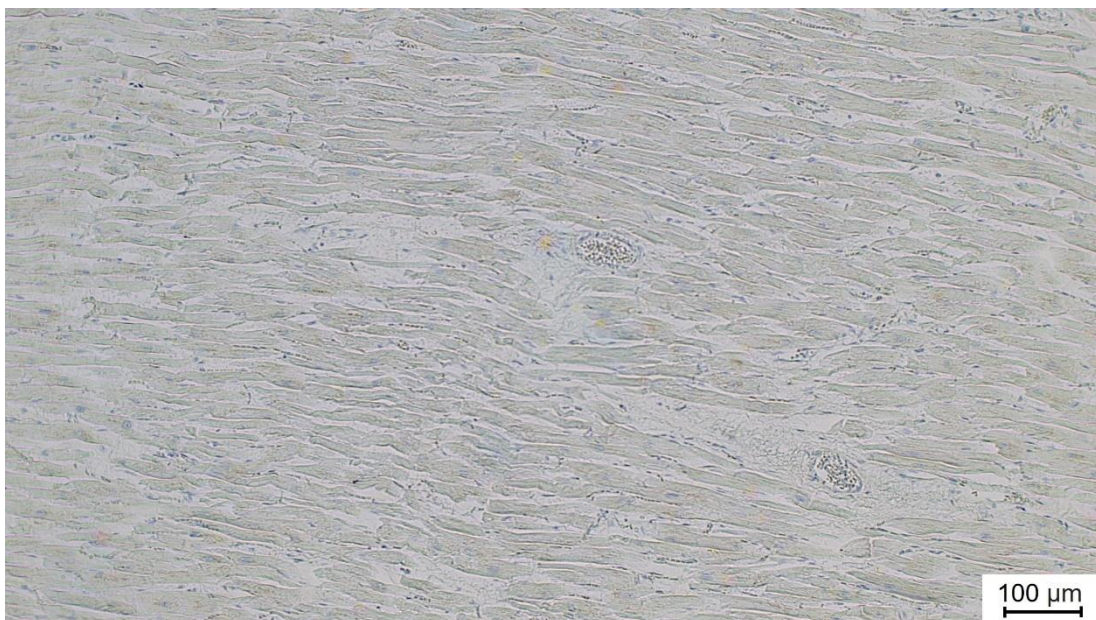


Abbildung 11: Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare

Alle Kardiomyozyten sind nicht braun gefärbt (negativ). (Präparat Nr. 1)

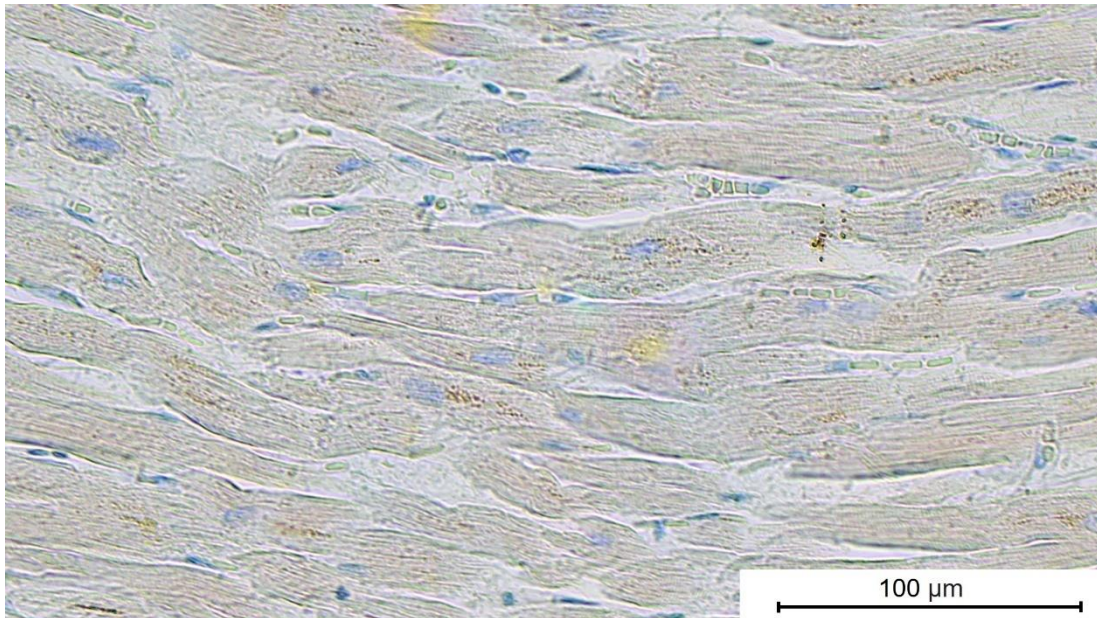


Abbildung 12: Spezifitätskontrolle nach Vorinkubation des Antikörpers mit TRPC6-Blocking-Peptid am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare. Die Kardiomyozyten sind angedeutet braun bzw. einige nicht braun gefärbt. (Präparat Nr. 1)

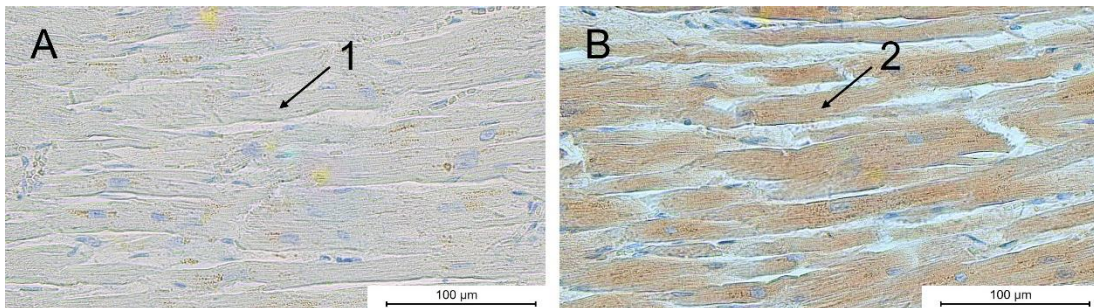


Abbildung 13: Negativkontrolle (Bildseite A) und immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 (Bildseite B) am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare

1 = negativ gefärbter Kardiomyozyt, 2 = positiv gefärbter Kardiomyozyt. Alle Kardiomyozyten der Negativkontrolle (Bildseite A) sind nicht braun gefärbt, wohingegen alle Kardiomyozyten der immunhistochemischen Färbung von TRPC6 (Bildseite B) deutlich braun gefärbt sind. (Präparat Nr. 1)

5.2 Alle Entnahmestellen des Präparates Nr. 6

Bei dem Präparat Nr. 6 wurden alle fünf Entnahmestellen (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel, Septum interventriculare) gefärbt und ausgewertet.

In der Abbildung 14 zeigen sich das Endokard des rechten Atriums und die Kardiomyozyten des Myokards (quer und längs angeschnitten) in einer deutlichen Braunfärbung [++].

Abbildung 15 zeigt eine immunhistochemische Färbung des Epikards des rechten Atriums. Die Tunica serosa mit der einschichtigen Mesothelzellschicht ist – wie auch das univakuoläre Fettgewebe – nicht signifikant braun gefärbt [-]. Die im epikardialen Fettgewebe liegenden Kardiomyozyten weisen eine fragliche Braunfärbung [(+)] im Vergleich zur Negativkontrolle [-] (Abbildung 16) auf.

Das Endokard des linken Atriums ist fraglich braungefärbt [(+)], wohingegen die quer angeschnittenen Kardiomyozyten eine deutliche Braunfärbung [++] aufweisen (Abbildung 17).

In Abbildung 18 stellen sich die im epikardialen Fettgewebe liegenden Gefäße (insb. die Media) im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich braungefärbt [++] dar. Univakuoläres Fettgewebe und Bindegewebe, welches neben den Gefäßen zu sehen ist, erscheint blass-bläulich [-].

Das angeschnittene Endokard, das Fettgewebe und das Myokard septierende Bindegewebe von der immunhistochemischen Färbung des rechten Ventrikels sind in Abbildung 19 nicht braungefärbt [-]. Die quer angeschnittenen Kardiomyozyten weisen hingegen eine deutliche Braunfärbung [++] auf.

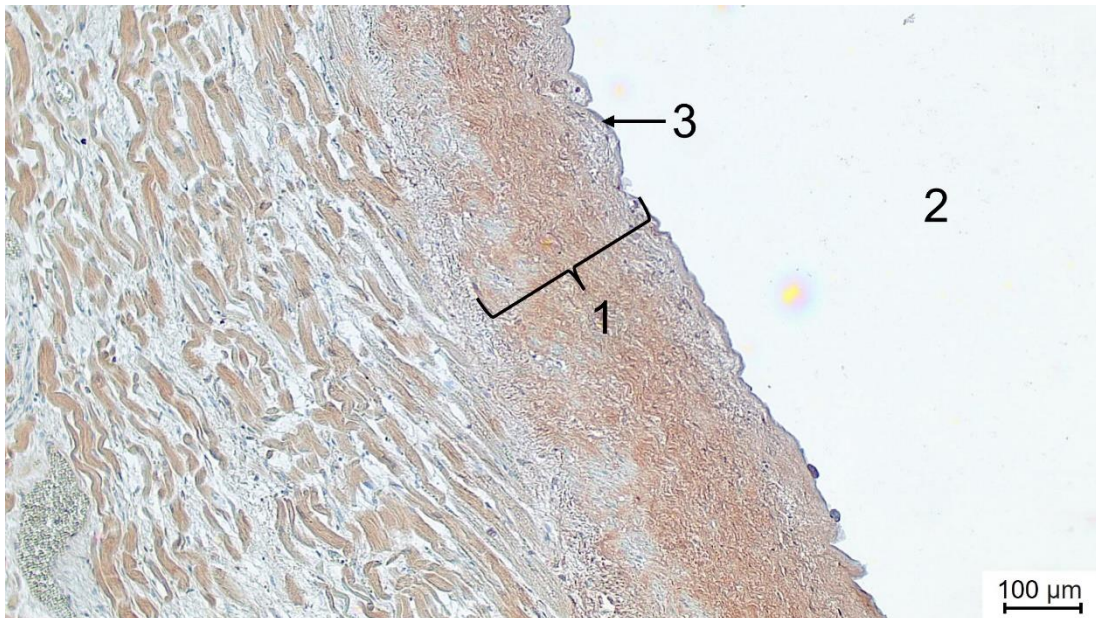


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Endo- und Myokards aus einem rechten Atrium (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Endokard, 2 = Lumen des rechten Atriums, 3 = Lamina epithelialis. Sowohl das Endokard als auch alle Kardiomyozyten des Myokards sind deutlich braun gefärbt (positiv). (Präparat Nr. 6)

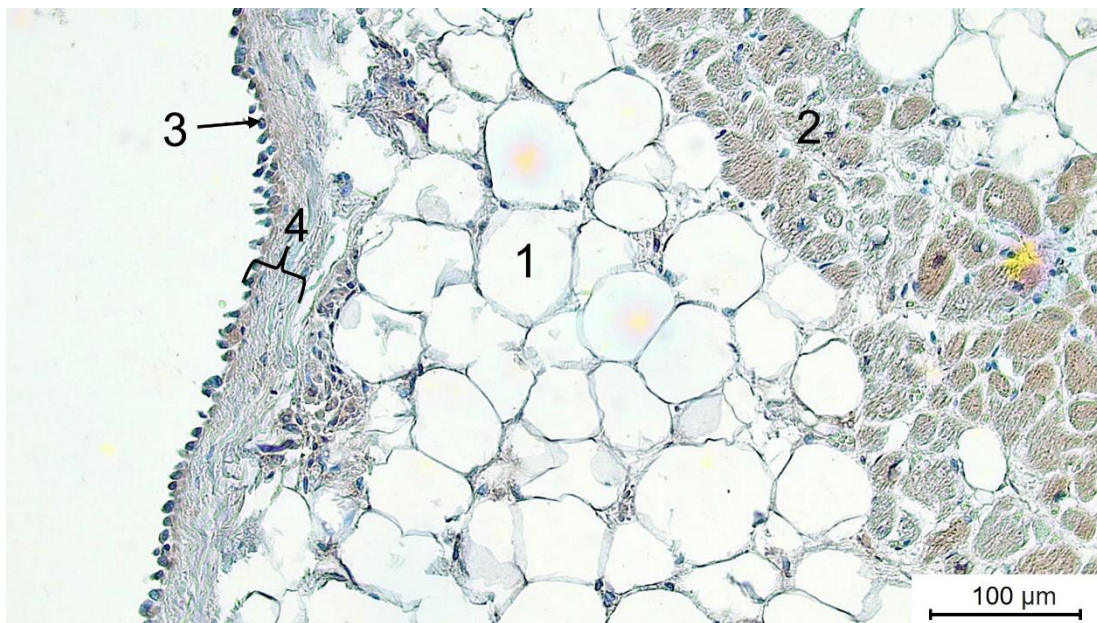


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von TRPC6 am Gewebeschnitt des Epikards aus einem rechten Atrium

1 = epikardiales Fettgewebe, 2 = Kardiomyozyten, 3 = einschichtige Mesothelzellschicht, 4 = Tunica serosa. Das Fettgewebe und die Tunica serosa sind nicht (negativ) und die Kardiomyozyten fraglich braun gefärbt. (Präparat Nr. 6)

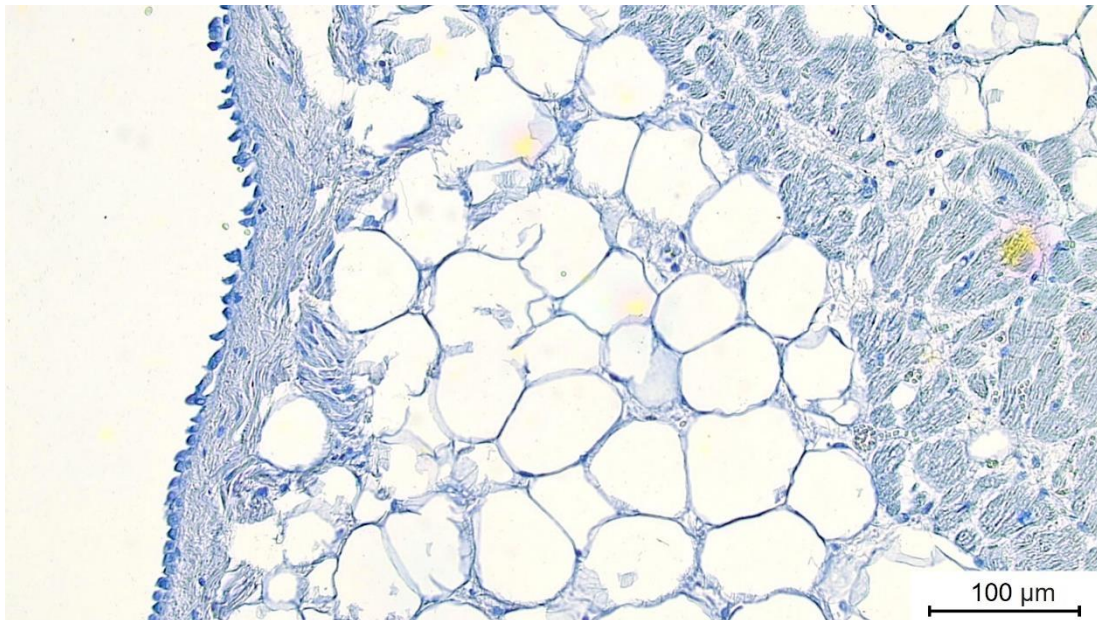


Abbildung 16: Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Epikards aus einem rechten Atrium

Das Fettgewebe, die Kardiomyozyten und die Tunica serosa sind bläulich gefärbt (negativ). (Präparat Nr. 6)

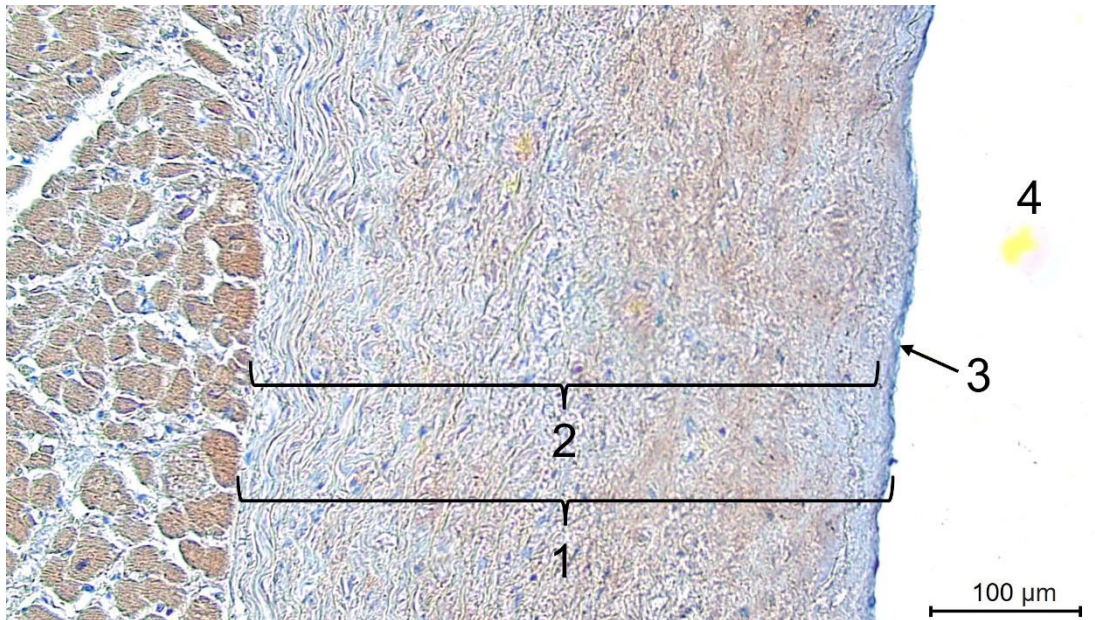


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Atrium (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Endokard, 2 = Lamina propria, 3 = Lamina epithelialis, 4 = Lumen des linken Atriums. Die Kardiomyozyten des Myokards sind deutlich braun gefärbt (positiv) und das Endokard, insb. die Lamina propria, weist eine fragliche Braunfärbung auf. (Präparat Nr. 6)

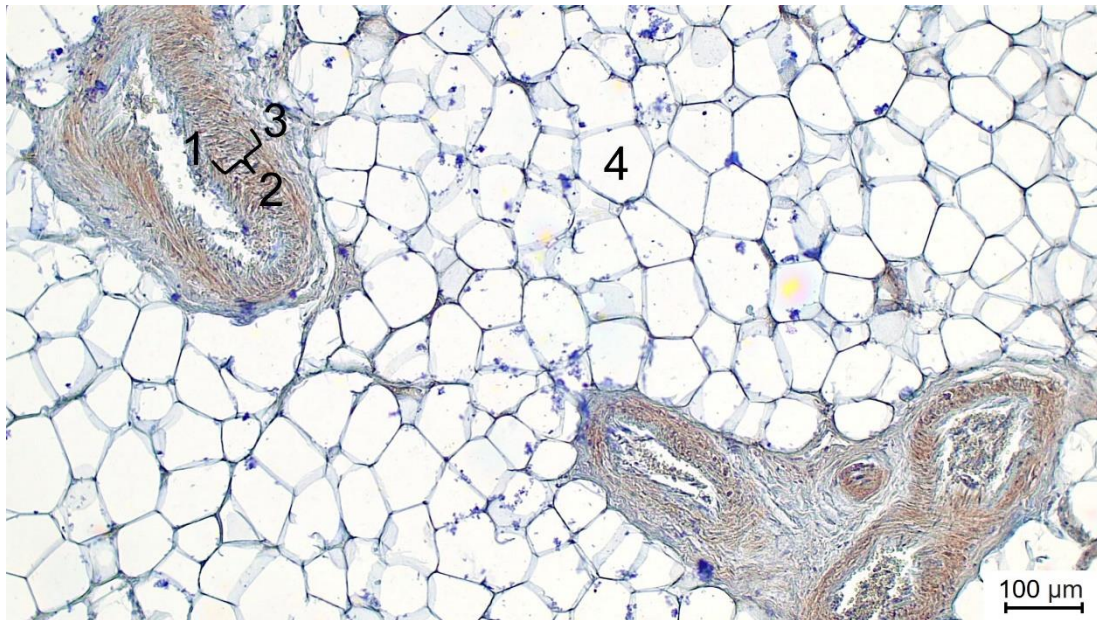


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt von epikardialen Gefäßen aus einem rechten Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Intima, 2 = Media, 3 = Adventitia, 4 = epikardiales Fettgewebe. Insbesondere die Media der Gefäße ist deutlich braun gefärbt (positiv), wohingegen das Fettgewebe keine Braunfärbung aufweist (negativ). (Präparat Nr. 6)

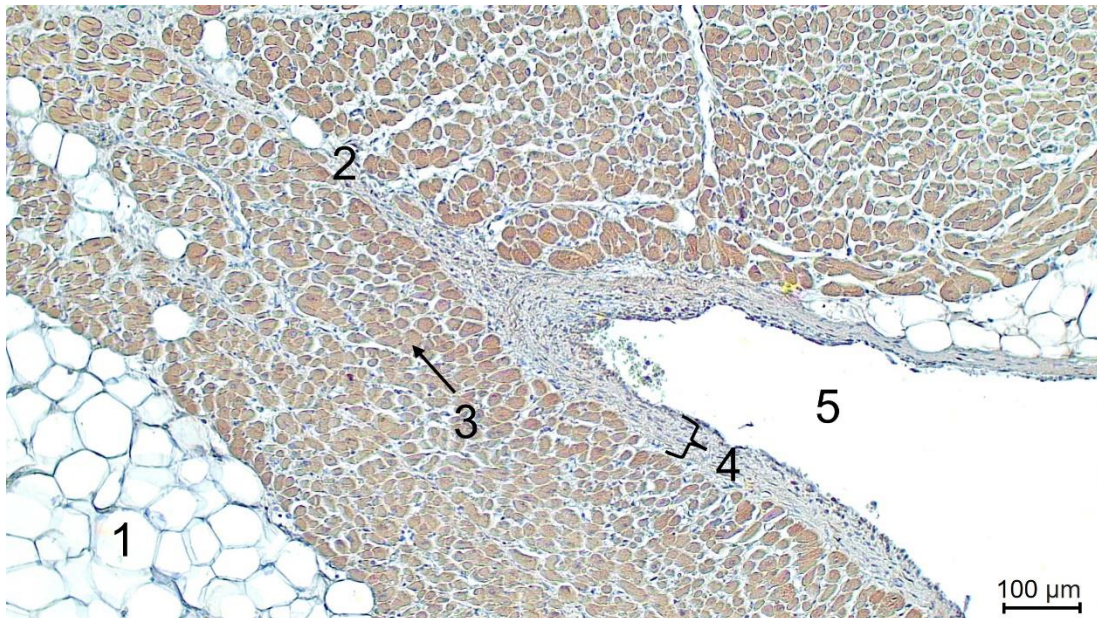


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem rechten Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Fettgewebe, 2 = Bindegewebe, 3 = positiv gefärbte Kardiomyozyten, 4 = Endokard, 5 = Lumen des rechten Ventrikels. Alle quer angeschnittenen Kardiomyozyten des Myokards sind deutlich braun gefärbt (positiv). Das Fettgewebe, Bindegewebe und das Endokard weisen keine Braunfärbung auf (negativ). (Präparat Nr. 6)

5.3 Restliche Präparate

Standardmäßig wurden die Gewebeproben vom Septum interventriculare bei allen Präparaten histologisch ausgewertet. Stichprobenartig wurden der rechte und linke Ventrikel des Präparates Nr. 4 untersucht. Im Folgenden ist eine Auswahl der histologischen Schnitte beschrieben und dargestellt.

Das Myokard mit den Kardiomyozyten des linken Ventrikels ist in Abbildung 20 deutlich braun [++] gefärbt. Das epikardiale, univakuoläre Fettgewebe und die Negativkontrolle hingegen weisen eine blass-bläuliche Färbung auf [-] (Abbildung 21).

Abbildung 22 bildet das Endokard des Septum interventriculare ab, welches nicht braungefärbt [-] ist. Die quer angeschnittenen Herzmuskelzellen sind deutlich braungefärbt [++]. Das Endokard eines anderen Präparates weist hingegen überwiegend – wie auch das Myokard – eine deutliche Braunfärbung [++] auf (Abbildung 23). Die in Abbildung 24 dargestellte, zugehörige Negativkontrolle ist blass-bläulich gefärbt [-].

In Abbildung 25 ist die epikardial gelegene Koronararterie teilweise im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 26) positiv gefärbt. Die Adventitia ist blass [+], die Intima fraglich [(+)] und die Media nicht [-] braun gefärbt. Abbildung 27 zeigt die Koronararterie des rechten Ventrikels in voller Ausdehnung.

Die im Myokard gelegene Arteriole mit den Erythrozyten fällt durch die deutliche Braunfärbung [++] auf (Abbildung 28).

Die Abbildung 29 zeigt eine immunhistochemische Färbung des Endo- und Myokards des Septum interventriculare. Die Herzmuskelzellen sind deutlich braun [++] gefärbt und das Endokard mit dem Endothel stellt sich blass-bläulich [-] dar.

Die Purkinje-Fasern in Abbildung 30 stellen sich negativ [-] dar.

Die quer angeschnittenen Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards des linken Ventrikels in Abbildung 31 sind deutlich braun [++] gefärbt. Das Bindegewebe, welches dieses septiert, erscheint hingegen blass-bläulich [-].

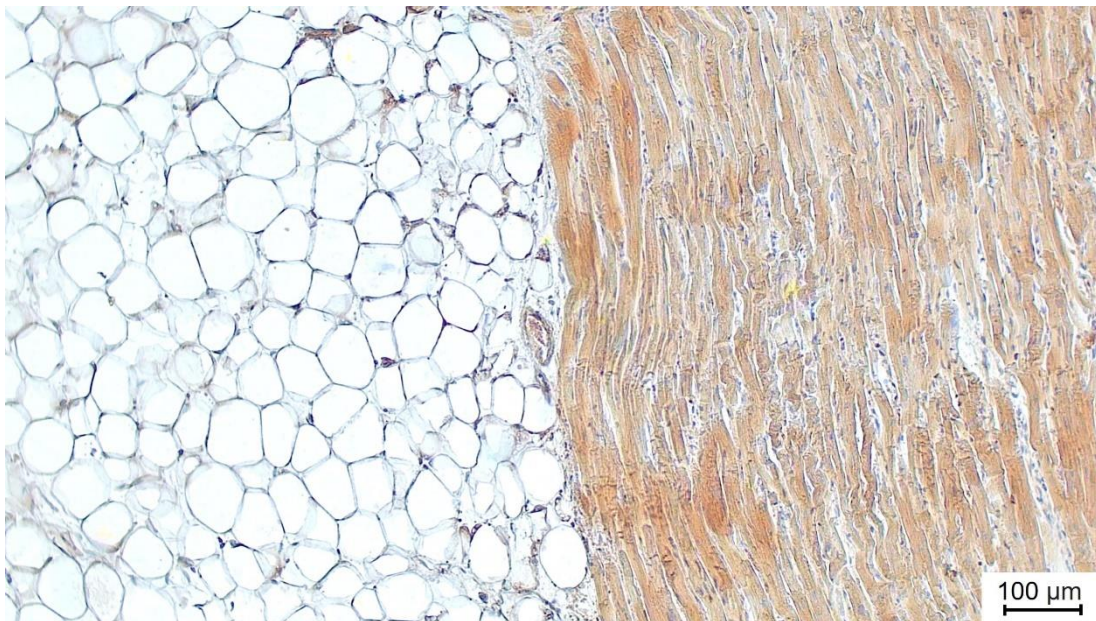


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt vom Übergang epikardiales Fettgewebe in das Myokard aus einem linken Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

Das epikardiale Fettgewebe ist negativ und die Kardiomyozyten des Myokards deutlich braun (positiv) gefärbt. (Präparat Nr. 4)

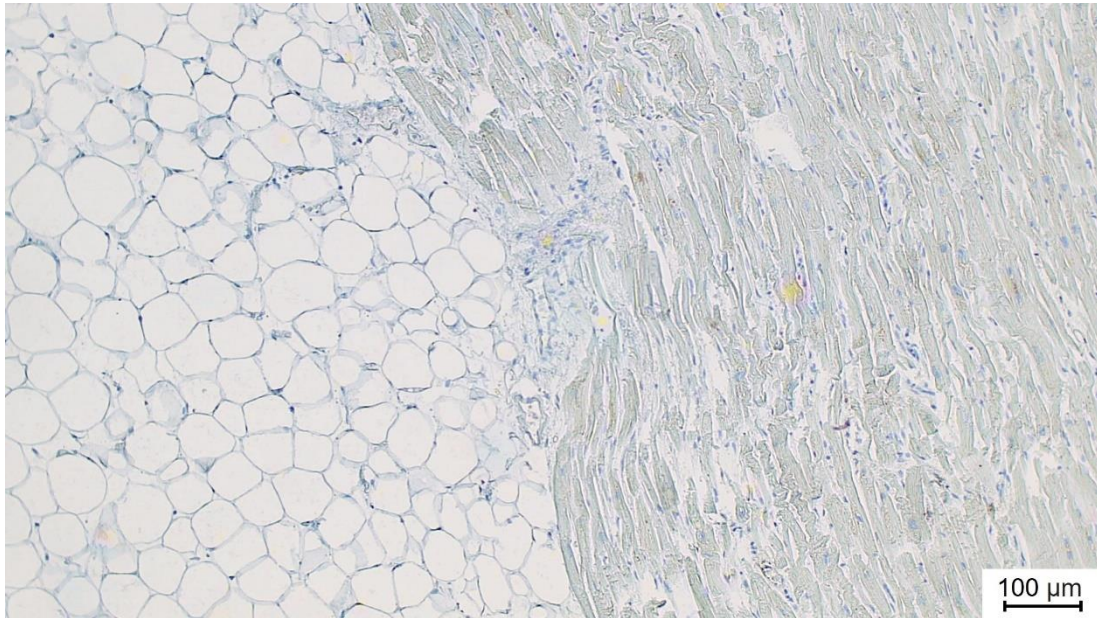


Abbildung 21: Negativkontrolle am Gewebeschnitt vom Übergang epikardiales Fettgewebe in das Myokard aus einem linken Ventrikel

Das Fettgewebe und das Myokard sind nicht braun (negativ) gefärbt. (Präparat Nr. 4)

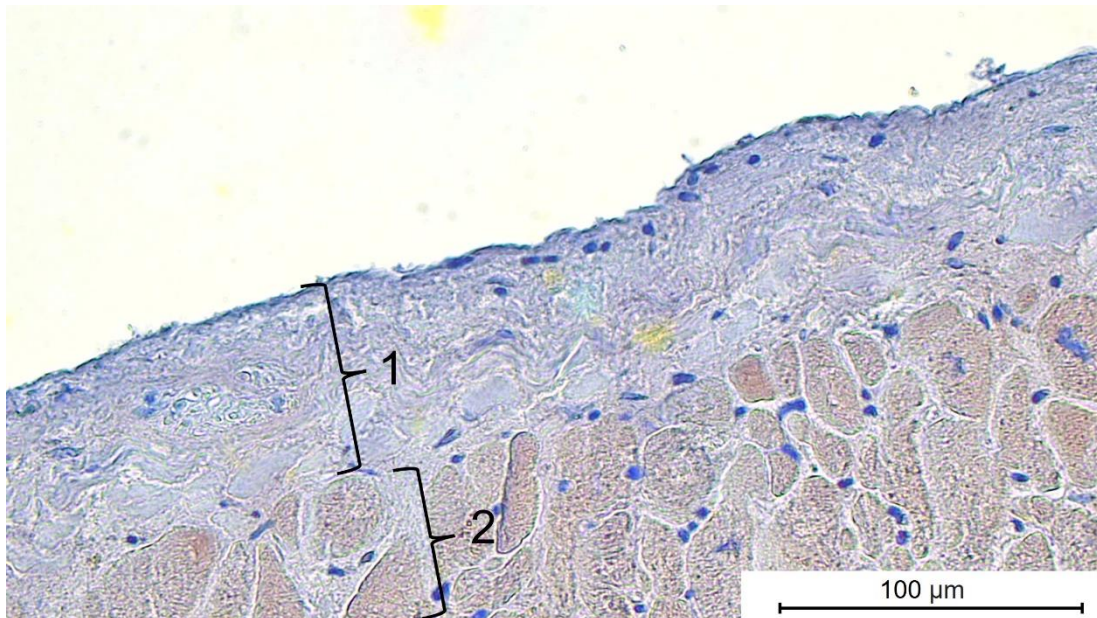


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem Septum interventriculare (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Endokard, 2 = Myokard. Das Endokard ist bläulich (negativ) und das Myokard braun (positiv) gefärbt. (Präparat Nr. 3)

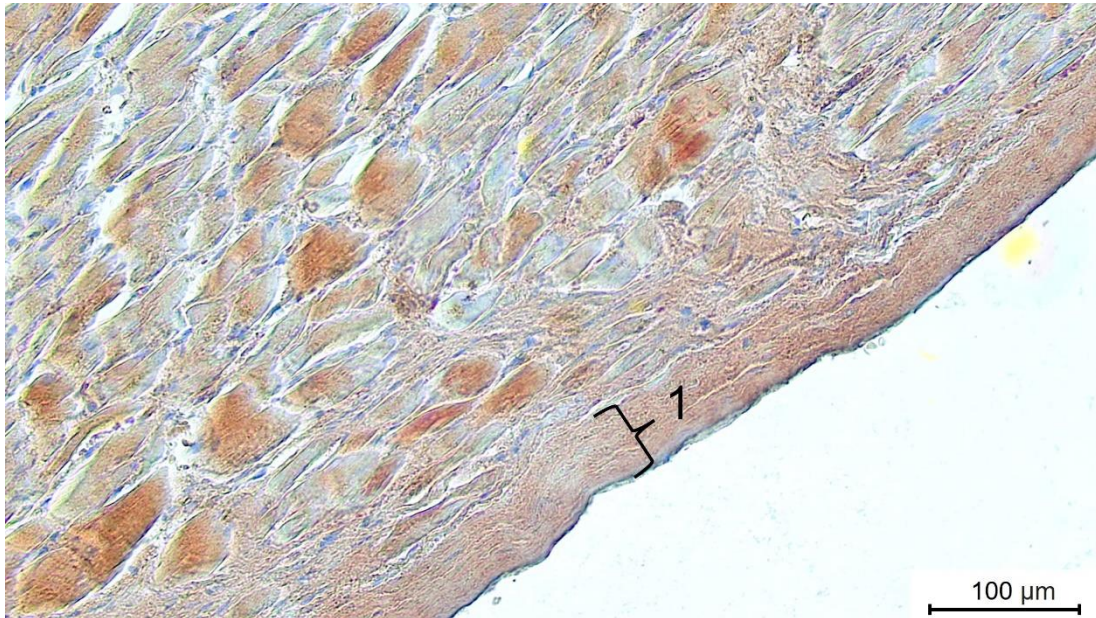


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Endokard. Sowohl das Endokard als auch die Kardiomyozyten des Myokards sind deutlich braun (positiv) gefärbt. (Präparat Nr. 4)

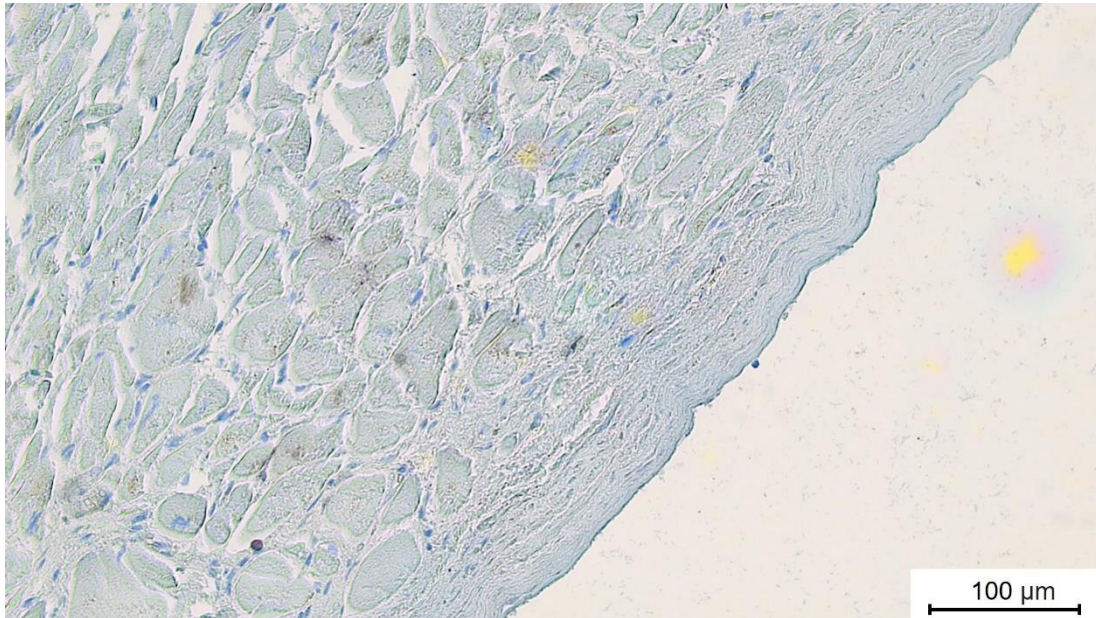


Abbildung 24: *Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Ventrikel*

Sowohl das Endokard als auch die Kardiomyozyten des Myokards erscheinen bläulich (negativ). (Präparat Nr. 4)

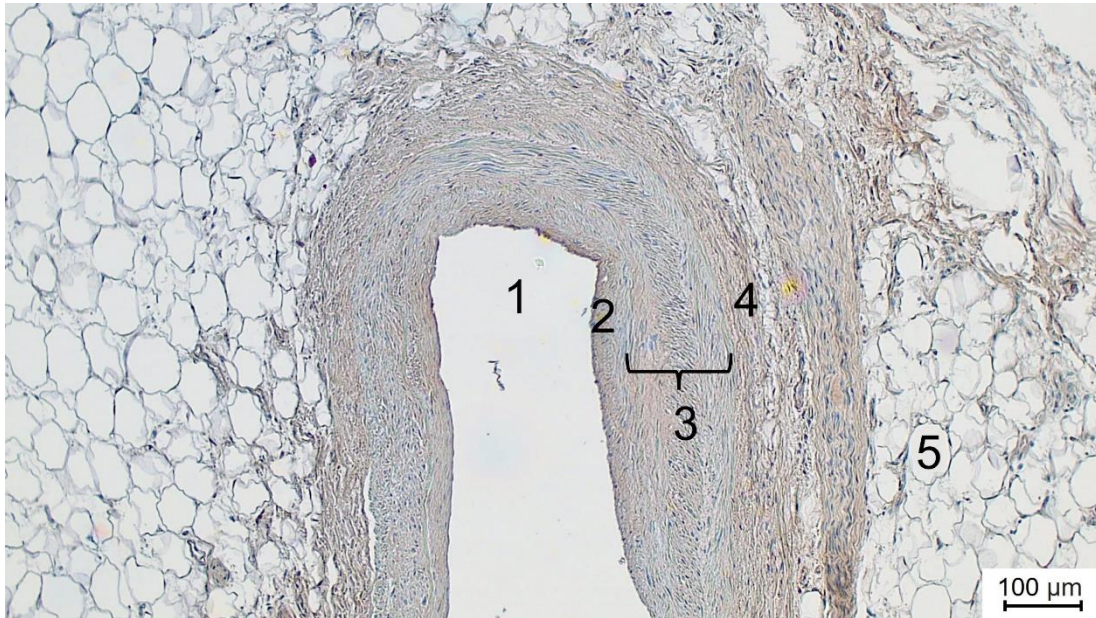


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Lumen der Koronararterie, 2 = Intima, 3 = Media, 4 = Adventitia, 5 = Fettgewebe. Insbesondere die Adventitia der epikardial gelegenen Koronararterie ist braun gefärbt (positiv), wohingegen das umliegende Fettgewebe keine Braunfärbung aufweist (negativ). (Präparat Nr. 4)

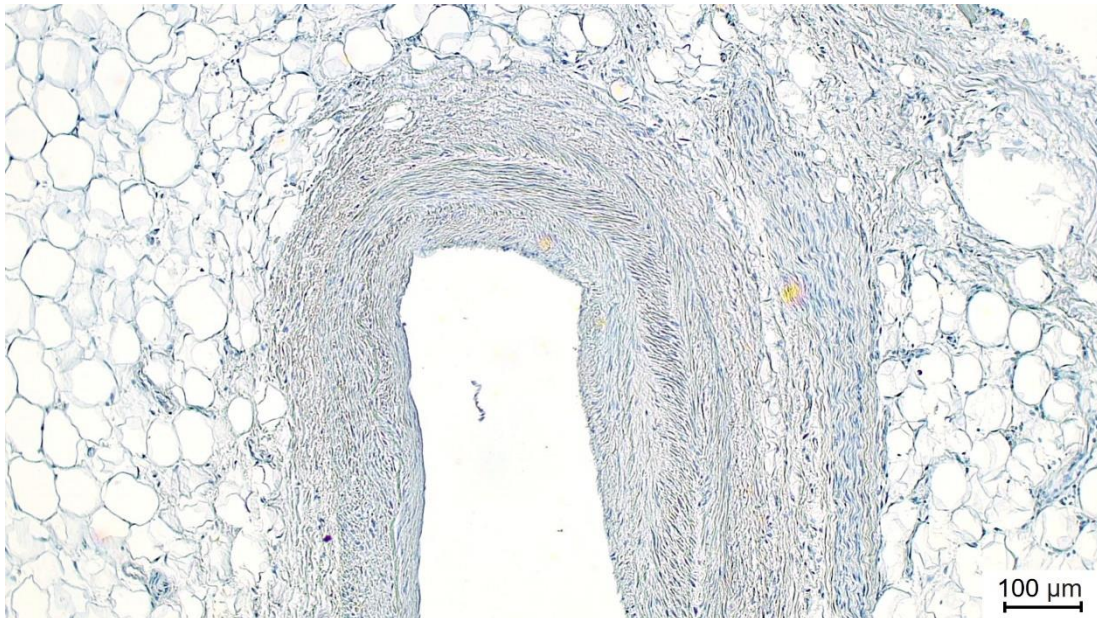


Abbildung 26: *Negativkontrolle am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel*

Die Koronararterie und das Fettgewebe sind negativ gefärbt. (Präparat Nr. 4)

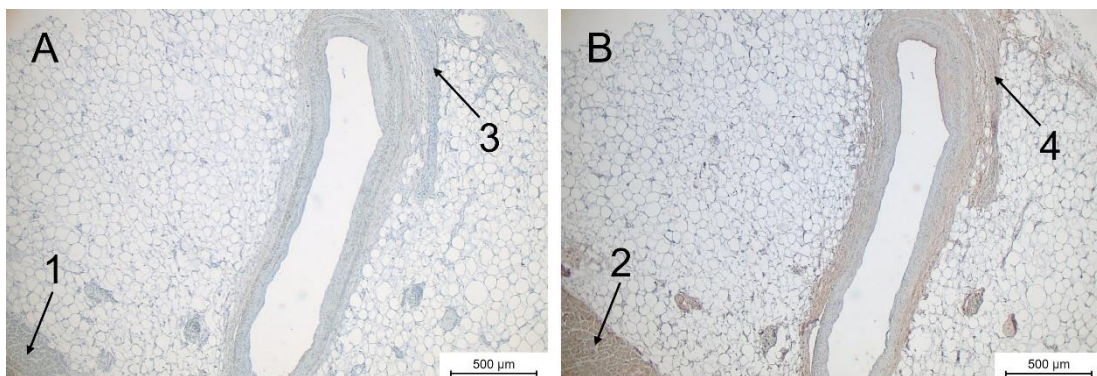


Abbildung 27: *Negativkontrolle (Bildseite A) und immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 (Bildseite B) am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel*

1 = negativ gefärbte Kardiomyozyten, 2 = positiv gefärbte Kardiomyozyten, 3 = negativ gefärbte Adventitia, 4 = positiv gefärbte Adventitia. Alle Kardiomyozyten und die Koronararterie der Negativkontrolle (Bildseite A) sind nicht braun gefärbt, wohingegen die alle Kardiomyozyten und die Adventitia der immunhistochemischen Färbung von TRPC6 (Bildseite B) braun gefärbt sind. (Präparat Nr. 4)



Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt einer intramuskulären Arteriole aus einem linken Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Wand der Arteriole, 2 = Erythrozyten. Die intramuskuläre, myokardial gelegene Arteriole mit den Erythrozyten ist deutlich braun (positiv) gefärbt. (Präparat Nr. 4)

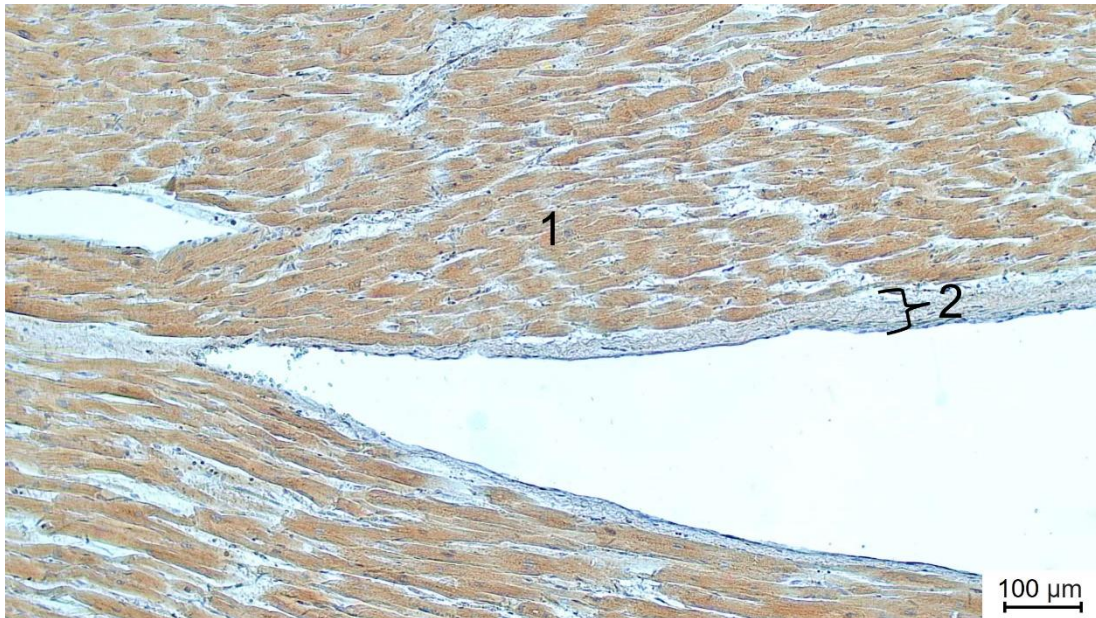


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem Septum interventriculare (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Kardiomyozyten, 2 = Endokard. Die Kardiomyozyten des Myokards sind deutlich braun gefärbt (positiv), währenddessen das Endokard bläulich (negativ) erscheint. (Präparat Nr. 1)

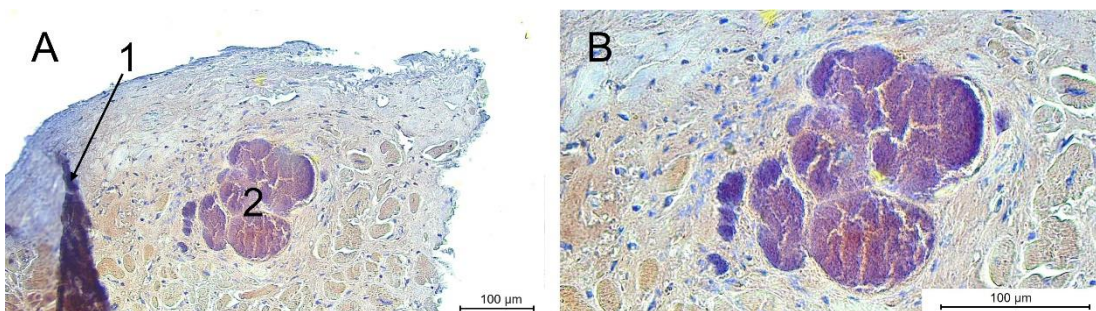


Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung von TRPC6 am Gewebeschnitt von Purkinje-Fasern aus einem Septum interventriculare

1 = Schnittartefakt, 2 = Purkinje-Fasern. Die Purkinje-Fasern sind nicht positiv gefärbt (negativ), wohingegen die umliegenden Kardiomyozyten eine Braunfärbung aufweisen (positiv). (Präparat Nr. 3)

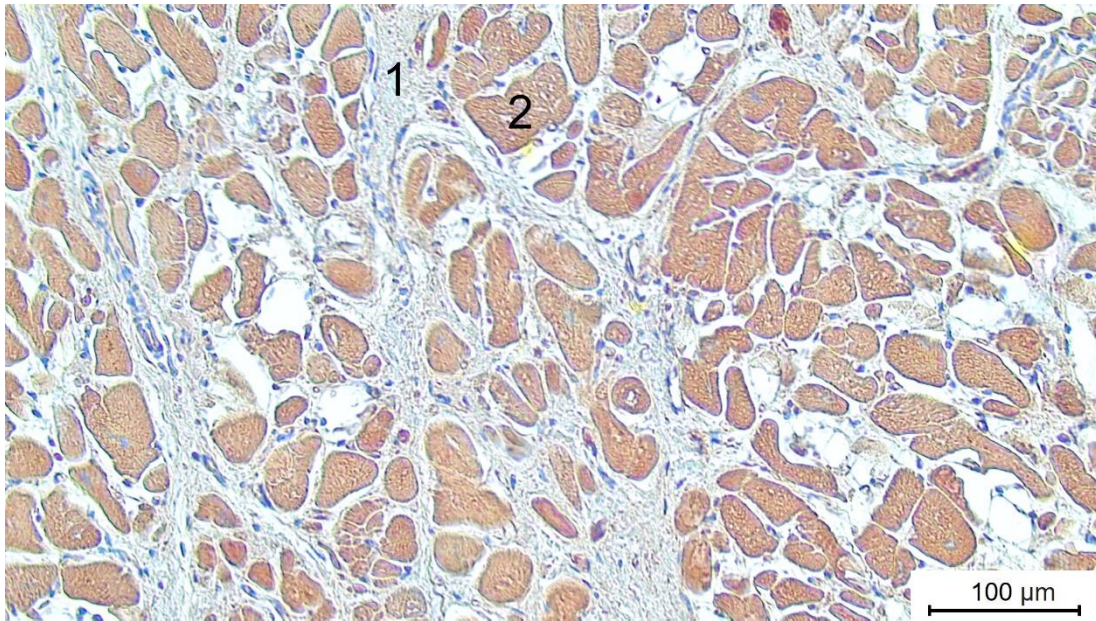


Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myokards aus einem linken Ventrikel (bräunliches Reaktionsprodukt nach Entwicklung der Peroxidase mit DAB)

1 = Bindegewebe, 2 = Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten des Myokards fallen durch eine deutliche, positive Braunfärbung auf, wohingegen das Bindegewebe, welches das Myokard septiert, negativ gefärbt ist. (Präparat Nr. 4)

5.4 Übersicht der Auswertung

Die Negativkontrollfärbungen (mindestens eine pro Färbedurchgang) wurden alle mitausgewertet und sind alle nicht braun [-] gefärbt.

Die Kardiomyozyten der Spezifitätskontrolle sind fraglich braun [(+)] und z. T. nicht [-] angefärbt. Dieser ist deutlich blasser braun als die deutlich [++] gefärbte immunhistochemische Färbung von TRPC6, aber brauner als die blau-blasse [-] Negativkontrolle.

Abbildung 32 bietet eine Übersicht der Auswertung. Die darauffolgenden vier Tabellen zeigen die detaillierten Auswertungsergebnisse.

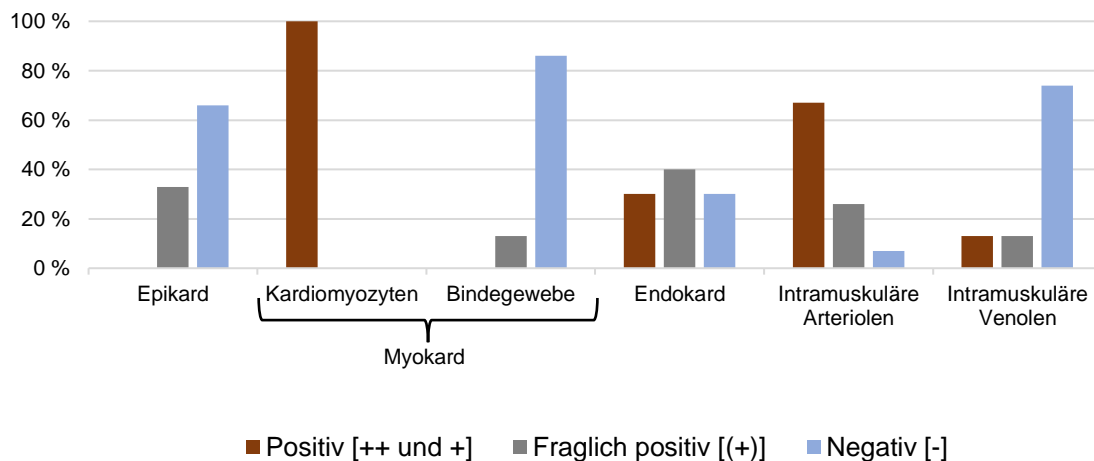


Abbildung 32: Prozentualer Anteil von positiv, fraglich positiv und negativ gefärbten Strukturen

x-Achse = Histologische Strukturen, y-Achse = Prozentualer Anteil von gefärbten Strukturen

Tabelle 11: Immunhistochemische Färbung des Epikards

Präparat-Nr.	Entnahmestelle	Tunica serosa	Tela subserosa
4	Rechter Ventrikel	(+)	-
4	Linker Ventrikel		-
6	Rechtes Atrium	-	(+)
6	Linkes Atrium	-	-
6	Rechter Ventrikel	-	-
6	Linker Ventrikel		-

Tabelle 12: Immunhistochemische Färbung des Endokards

Präparat-Nr.	Entnahmestelle	Lamina epithelialis	Lamina propria
1	Septum interventriculare	-	-
2	Septum interventriculare	-	-
3	Septum interventriculare	-	-
4	Linker Ventrikel	(+)	++
5	Septum interventriculare	-	(+)
6	Septum interventriculare	-	(+)
6	Rechtes Atrium	-	++
6	Linkes Atrium	-	(+)
6	Rechter Ventrikel	(+)	(+)
10	Septum interventriculare	(+)	+

Tabelle 13: Immunhistochemische Färbung des Myokards

Präparat-Nr.	Entnahmestelle	Kardiomyozyten (quer und lang)	Bindegewebe
1	Septum interventriculare	++	(+)
2	Septum interventriculare	++	-
3	Septum interventriculare	+	(+)
4	Septum interventriculare	+	-
4	Rechter Ventrikel	++	-
4	Linker Ventrikel	++	-
5	Septum interventriculare	+	-
6	Septum interventriculare	++	-
6	Rechtes Atrium	++	-
6	Linkes Atrium	++	-
6	Rechter Ventrikel	++	-
6	Linker Ventrikel	+	-
8	Septum interventriculare	++	-
9	Septum interventriculare	++	-
10	Septum interventriculare	+	-

Tabelle 14: Immunhistochemische Färbung der Gefäße

Präparat-Nr.	Entnahmestelle	Intra-muskuläre Arteriole	Intra-muskuläre Venole	Koronararterie
4	Rechter Ventrikel	+	(+)	Intima: (+) Media: - Adventitia: +
6	Linker Ventrikel	+	-	Intima: - Media: - Adventitia: +
1	Septum interventriculare	+	-	

2	Septum interventriculare	+	-
3	Septum interventriculare	(+)	-
4	Linker Ventrikel	++	-
4	Septum interventriculare	(+)	-
5	Septum interventriculare	(+)	(+)
6	Rechtes Atrium	(+)	-
6	Linkes Atrium	-	-
6	Rechter Ventrikel	++	+
6	Septum interventriculare	+	-
8	Septum interventriculare	++	+
9	Septum interventriculare	+	-
10	Septum interventriculare	+	-

6 Diskussion

Ziel dieser Forschungsarbeit war der immunhistochemische Nachweis des TRPC6-Ionenkanals im humanen Herzgewebe in verschiedenen histologischen Schichten (Epikard, Endokard, Myokard), Strukturen (z. B. Kardiomyozyten, Bindegewebe) und Lokalisationen (Vorhöfe, Ventrikel, Septum interventriculare). Wenngleich der TRPC6-Kanal in Tierversuchen und auch auf mRNA-Level beim Menschen nachgewiesen wurde, gibt es keine systematischen Untersuchungen zum TRPC6-Proteinnachweis am humanen Herzen. Erstmals konnten wir in dieser Arbeit den TRPC6-Proteinnachweis an mehreren Herzlokalisationen erbringen.

6.1 Methodendiskussion

Die Aufarbeitung der Gewebe bis zum fertigen Objektträger weist mehrere Schritte und somit potenzielle Fehlerquellen auf, sodass eine stetige Evaluierung der Methodik zur Minimierung von Fehlern erforderlich war.

6.1.1 Aufbereitung der Proben für die Färbung

Wenngleich die Herzproben standardmäßig nach einem ausgearbeiteten System entnommen wurden, boten verschiedene anatomische Besonderheiten (z. B. Übergewicht, Kachexie, flüssiges Blut) Schwierigkeiten bei einigen Entnahmen. Die Zuordnung bezüglich der Lokalisation (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel, Septum interventriculare) konnte durch Absaugen des Blutes und Auffinden charakteristischer Gefäße (z. B. V. cava superior, Truncus pulmonalis) immer sicher

bestimmt werden. Da die Herzen je nach Geschlecht, Ernährungszustand und möglichen Vorerkrankungen der Körperspender stark in der Größe variierten, war es schwierig, dieselbe Lokalisation bei jeder Entnahme zu reproduzieren. Bei stark kachektischen Körperspendern waren die Vorhofwände durch wenig vorhandenes epikardiales Fettgewebe so dünn, dass die Proben nicht durch die standardisierte Biopsiestanze entnommen werden konnten. Stattdessen wurde mit dem Skalpell eine viereckige Probe herausgeschnitten. Auch das Einblocken in Paraffin und das Schneiden gestaltete sich bei wenigen Proben schwierig. Gerade die dünnen, am Rand des Präparates gelegenen Epithel- und Endothelzellschichten könnten hierdurch beschädigt worden sein und artifizielle Veränderungen in der Histologie erklären.

Beim Schneiden der Paraffinquader fiel auf, dass einige Proben sich schlecht in 5 µm Dicke schneiden ließen. Vorstellbar ist, dass die Qualität und Dauer der Fixierung einen Einfluss haben könnten. Dementsprechend mussten wenige Proben 7 µm dick geschnitten werden. Das könnte dazu geführt haben, dass sich z. B. Kardiomyozyten überlagert haben, sich viele Bindungsstellen für den Antikörper boten und es bei der immunhistochemischen Färbung zu Farbüberlagerungen kam. Die Farbüberlagerungen könnten bei der Auswertung als eine verstärkte Braunfärbung gewertet werden. Zur Minimierung einer solchen Problematik wurde die Schnittdicke auf den Objektträgern notiert und bei der Auswertung beachtet. Die allermeisten Proben ließen sich gut bei 5 µm schneiden.

6.1.2 Verwendeter TRPC6-Antikörper

Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper vom Kaninchen als Wirt. Er richtet sich gegen verschiedene Epitope des Zielantigens

und ist dementsprechend nicht spezifisch gegenüber einem Epitop. Dieses kann zur Hintergrundfärbung führen. Vorteilhaft ist, dass polyklonale Antikörper unempfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen wie z. B. pH-Wert-Veränderungen sind.

Zur Gewährleistung der Antikörperspezifität wurde ein Knockout-validierter Antikörper verwendet. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wurde hierbei in insgesamt vier Knockout- oder Knockdown-Forschungen geprüft [24, 34, 39, 49]. Kistler et al. z. B. konnten durch eine immunhistochemische Färbung von Nierenbiopsien die TRPC6-Expression beschreiben. Sie verglichen Gewebeproben von mit an membranöser Glomerulonephritis bzw. fokal segmentaler Glomerulosklerose erkrankten Patienten im Vergleich zu normalem Nierengewebe aus Tumornephrektomien [49].

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde eine Spezifitätskontrolle durchgeführt, bei welcher ein vorinkubiertes Blocking-Peptid den primären Antikörper band und dieser die Epitope des Zielmoleküls (in diesem Fall das TRPC6-Antigen) nicht binden konnte.

Mithilfe des Antikörpers konnten verschiedene Forschungsgruppen unter anderem in Western Blots, Immunhistochemie und Immunzytochemie die TRPC6-Expression bzw. das Protein in unterschiedlichen humanen und tierischen Geweben nachweisen. Kim et al. machten beispielsweise eine immunhistochemische Färbung und einen Western Blot von humanen Harnblasenproben bzw. Zellen, um die Ca^{2+} -abhängige Proliferation in Harnblasenkrebszellen und deren Regulierung zu untersuchen [48]. Dieses wurde im „Nature Oncogenesis“ publiziert. Auch bei rechten Vorhofohrproben vom Menschen konnte 2017 mithilfe einer Immunfluoreszenz TRPC6 im

endokardialen Endothel gezeigt und der Einfluss der mechanischen Dehnung auf diesen beschrieben werden [70].

Der Antikörper besitzt eine „Bioz-Stars“-Bewertung von 95/100 Punkten und wurde bereits 107-mal zitiert [114, 115].

6.1.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Etablierung eines standardisierten immunhistochemischen Färbeprotokolls musste die richtige Antikörperverdünnung für den Versuch gefunden werden. Verschiedene Antikörperverdünnungen wurden getestet. Bei einer zu hohen Antikörperkonzentration kann es zu unspezifischen Hintergrundreaktionen kommen. Eine zu niedrige Antikörperkonzentration kann zu einem negativen oder fraglich negativen Färbeergebnis trotz Vorhandenseins des gesuchten Zielmoleküls führen. Des Weiteren hat auch die Inkubationszeit einen entscheidenden Einfluss bei der Wahl der richtigen Antikörperverdünnung. Durch Verlängerung der Inkubationszeit lässt sich eine niedrigere Antikörperverdünnung verwenden. Letztlich erwies sich eine Verdünnung des primären Antikörpers von 1:100 bei einer Inkubationszeit über Nacht in einer Feuchtkammer zum Nachweis des TRPC6-Kanals ohne unspezifische Hintergrundfärbungen als optimal.

Die Inkubationszeit mit dem Chromogen DAB wurde in den ersten Versuchsdurchführungen zu kurz gewählt (1-3 min), sodass sich eine Braunfärbung nur schwach zeigte. Beim Wiederholen der Versuche mit einer deutlich längeren Inkubationszeit (8-11 min) hob sich die Braunfärbung deutlich vom Hintergrund ab, sodass die längere Inkubationszeit unter mikroskopischer Kontrolle als Standard genommen wurde.

Durch die Gegenfärbung der immunhistochemischen Schnitte mit destilliertem Wasser, Hämatoxylin nach Ehrlich und dem Bläuen im fließenden Leitungswasser wird eine bessere Kontrastierung erreicht. Ein zu langes Bläuen könnte die Braunfärbung des Gewebes durch Blaufärbung kaschieren und bei der Auswertung fälschlicherweise als negativ (blau) gewertet werden. Die optimale Kontrastierung konnte durch Testen verschiedener Zeiten gefunden werden. Damit zwischen den Schnitten eine Vergleichbarkeit herrscht, wurden alle Proben nach dem immunhistochemischen Färbeprotokoll gleichbehandelt.

6.2 Ergebnisdiskussion

Der TRPC6-Ionenkanal konnte im menschlichen Herz bei allen untersuchten Präparaten immunhistochemisch nachgewiesen werden. Eine Braunfärbung ([++] bzw. [+]) zeigte das Vorhandensein von TRPC6.

6.2.1 Spezifitätskontrolle und Negativkontrolle

Bei der Spezifitätskontrolle wiesen die Kardiomyozyten im Vergleich zur Positivkontrolle [++] eine deutlich abgeschwächte Farbreaktion ([-] bzw. [(+)) auf. Dieses spricht dafür, dass das Blocking-Peptid die meisten Epitope von TRPC6-Ionenkanälen gebunden hatte. Die Braunfärbung, die in den immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden konnte, beruht dementsprechend auf einer spezifischen Färbung von TRPC6-Antigenen.

In jedem Färbedurchgang wurden Negativkontrollen durchgeführt, welche immer blass-bläulich [-] gefärbt waren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die braune

Farbreaktion durch den TRPC6-Antikörper und nicht durch andere Chemikalien hervorgerufen wird.

6.2.2 TRPC6-Proteinnachweis

Die Kardiomyozyten wiesen in jedem Schnitt eine Braunfärbung ([+] bzw. [++]) auf. Es zeigte sich, dass der TRPC6-Ionenkanal in den Kardiomyozyten sowohl im Atrium, im Ventrikel als auch im Septum interventriculare vorhanden ist. Diese Färbung hob sich deutlich von dem im Myokard gelegenen Bindegewebe, welches nie positiv gefärbt war ([-] bzw. [(+)]), hervor. Ein Unterschied nach der Lokalisation (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel, Septum interventriculare) hat sich nicht gezeigt.

Das Epikard war bei keinem Präparat positiv gefärbt und es konnte somit kein TRPC6-Protein im Epikard nachgewiesen werden.

Beim Endokard zeigten sich in der immunhistochemischen Färbung keine eindeutigen Ergebnisse. Bei einigen Präparaten ließ sich insbesondere in der Lamina propria des Endokards, welche u. a. glatte Muskelzellen enthält, eindeutig [++] der TRPC6-Ionenkanal nachweisen. Das Endokard anderer Präparate hingegen erschien blass-bläulich [-] und wies kein TRPC6-Protein auf. Insgesamt geht aus den Ergebnissen nicht eindeutig hervor, ob TRPC6 im Endokard vorhanden ist.

Die glatten Muskelzellen und das Endothel der im Myokard gelegenen intramuskulären Arteriolen wiesen im überwiegenden Anteil TRPC6-Ionenkanäle auf, wohingegen in den intramuskulären Venolen meist kein TRPC6 nachgewiesen werden konnte.

Stichprobenartig wurde insbesondere in der Adventitia zweier epikardial gelegener Koronararterien und kleinerer epikardialer Gefäße das TRPC6-Protein gezeigt. Die angeschnittene Purkinje-Faser weist kein TRPC6 auf.

6.2.3 Literaturbesprechung

Für die Erforschung des Vorhandenseins und der Lokalisation des TRPC6-Ionenkanals werden verschiedene Gewebe (z. B. vom Menschen, Ratte, Maus) und Methoden (z. B. RT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie) genutzt. Mithilfe einer RT-PCR kann ein mRNA-Nachweis erfolgen und ein Western Blot oder eine Immunhistochemie weist das Protein nach. Für die Erforschung der TRPC6-Expression bzw. des Proteinnachweises am Herzen nutzen die meisten Forschungsgruppen Tiermodelle (häufig Mäuse und Ratten). Die TRPC6-Expression an menschlichem Gewebe ist auf mRNA-Level von mehreren Forschungsgruppen untersucht. Wenngleich eine positive Korrelation zwischen mRNA und Protein besteht, kann die mRNA-Expression den Proteinnachweis z. T. nur bedingt vorhersagen [27, 31]. Proteinnachweise am humanen Herzen gibt es nur spärlich und lückenhaft [30, 96]. Erstmalig wurde in dieser Arbeit humanes Herzgewebe histologisch systematisch nach dem TRPC6-Ionenkanal untersucht und wir konnten den TRPC6-Proteinnachweis an mehreren Herzlokalisationen zeigen.

Bereits 2002 konnten Riccio et al. die mRNA-Verteilung von TRPC-Kanälen (auch TRPC6) in verschiedenen Organen, wie auch dem menschlichen Herzen, mithilfe einer RT-PCR zeigen [82].

2013 untersuchten Zhang et al. mithilfe einer RT-PCR isolierte Kardiomyozyten aus Vorhoföhren von Patienten, die eine Koronararterien-Bypass-Operation bekommen

hatten. Interessanterweise zeigten TRPC3, TRPC4 und TRPC6 eine schwache Expression, wohingegen TRPC1 stark vorhanden war [110]. Diese Erkenntnisse können wir mit unseren Stichprobenergebnissen von der immunhistochemischen Färbung der Vorhöfe bestätigen. Denn in unserer Forschungsarbeit konnten wir das TRPC6-Protein sowohl im rechten als auch im linken Atrium nachweisen. Auch Nikolova-Krstevski et al. untersuchten Gewebeproben aus den rechten Vorhoföhren von jeweils 4 männlichen Patienten mit und 4 ohne Vorhofflimmern. Die Forschungsgruppe konnte in beiden Gruppen mit einer Immunfluoreszenz das TRPC6-Protein im Endokard nachweisen [70]. Da auch unsere immunhistochemische Färbung einen TRPC6-Proteinnachweis im Endokard des rechten Atriums zeigte, können wir diese Vorergebnisse von Nikolova-Krstevski et al. bestätigen. Die Färbung des Endokards beim Septum interventriculare zeigte keine eindeutigen Ergebnisse und es ließ sich TRPC6 im Endokard nicht immer nachweisen. Da Epi- und Endokard am Rand der Objektträger liegt, könnten die Ergebnisse verfälscht worden sein. Zum einen könnte es gerade an dieser Stelle zu einer Ablösung der Gewebeproben gekommen sein, zum anderen könnten sich die Antikörper ungleichmäßig am Probenrand verteilt haben. Zur Verifizierung der Ergebnisse des Epi- und Endokards sind weitere Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl notwendig.

Kulturell angezüchtete humane Fibroblasten wurden von Chen et al. auf die mRNA mittels RT-PCR untersucht. Sie wiesen unter anderem eine TRPC6-Expression nach [12]. Auch Ikeda et al. nutzten kultivierte humane Fibroblasten aus dem Ventrikel zum TRPC6-Nachweis. Die TRPC6-mRNA wurde mit einer RT-PCR und das TRPC6-Protein mit einer Immunzytochemie und einem Western Blot nachgewiesen [41]. Bei unserer Immunhistochemie zeigte sich nie eine positive Färbung des Bindegewebes. Ein möglicher Erklärungsansatz, wie Ikeda et al. es auch als Limitation der

Forschungsarbeit in ihrer wissenschaftlichen Publikation aufgreifen, ist, dass die Zellen sich durch die Kultivierung beispielsweise in Rezeptor- und Ionenkanalfunktionsweise verändert haben könnten. Die Autoren folgern daraus, dass weitere Studien am intakten Herzen notwendig seien [41]. Andererseits besteht Bindegewebe nicht nur aus Fibroblasten, sondern auch beispielsweise aus Extrazellulärmatrix, welche den überwiegenden Anteil ausmachen und zu der negativen Färbung in der Immunhistochemie geführt haben könnte. Da die kardialen Fibroblasten eine entscheidende Rolle sowohl in der Regulation normaler Herzfunktionen als auch in der Entstehung von kardialem Remodeling z. B. nach einem Herzinfarkt im Sinne einer Fibrose spielen, sollte die Expression und Funktion von TRP-Kanälen in Fibroblasten bzw. im Bindegewebe genauer erforscht werden [8, 30, 80].

2004 zeigten Yip et al. an kultivierten endothelialen Koronararterienzellen mittels RT-PCR die TRPC6-Expression. Zusätzlich untersuchten sie humane Gewebeproben von verschiedenen Gefäßen, u. a. Koronararterien und Arteriolen, mittels immunhistochemischer Färbungen und In-situ-Hybridisierung und fanden eine TRPC6-Expression in den Endothel- und glatten Muskelzellen [105]. Auch Takahashi et al. fanden eine TRPC6-Expression durch eine RT-PCR in kultivierten humanen glatten Muskelzellen von Koronararterien [90]. Auch die glatte Muskulatur und das Endothel der Gefäßwand der im Myokard gelegenen intramuskulären Arteriolen wiesen in unserer Forschungsarbeit im überwiegenden Anteil das TRPC6-Protein auf. In den stichprobenartig untersuchten epikardial gelegenen Koronararterien ließ sich in der Adventitia TRPC6 nachweisen.

Mehrere Forschergruppen verglichen die TRPC6-Expression von gesunden zu pathologisch veränderten humanen Herzen und kamen zu z. T. widersprüchlichen

Ergebnissen. Kuwahara et al. untersuchten bereits 2006 die TRPC6-mRNA durch eine RT-PCR von Gewebeproben vom linken Ventrikel. Sie stellten eine erhöhte TRPC6-Expression in den von dilatativer Kardiomyopathie betroffenen Herzen im Vergleich zu gesunden Herzen fest [52]. Dragun et al. zeigten 2019 mittels RT-PCR die TRPC6-mRNA von insgesamt 43 linksventrikulären Gewebeproben. Die Gewebeproben stammten aus explantierten Herzen von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz mit NYHA-Stadium III-IV. Auch wenn TRPC3 und TRPC6 von den TRPC-Kanälen im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz und Hypertrophie am meisten diskutiert werden, konnte die Forschungsgruppe im Gegensatz zu Kuwahara et al. im Vergleich zu 5 gesunden Myokardproben keinen signifikanten TRPC6-Expressionsunterschied feststellen. Andere TRP-Kanäle (z. B. TRPC1, TRPM4) wiesen Veränderungen auf [22]. Ebenso zeigten die Forschungsarbeiten von Bush et al. keinen mRNA-Expressionsunterschied von TRPC6, welcher mittels RT-PCR bestimmt wurde, in Herzen von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu gesunden Herzen auf [9, 73]. Morine et al. verglichen humanes links- und rechtsventrikuläres Gewebe von 12 Patienten mit hochgradiger Herzinsuffizienz mit 3 gesunden Herzen. Sie fanden mittels RT-PCR eine mRNA-Level-Veränderung von verschiedenen TRP-Kanälen, u. a. eine Erhöhung der TRPC6-Expression. Interessanterweise waren bei den Gewebeproben mit Herzinsuffizienz die TRPC1- und TRPC6-Level im rechten Ventrikel höher als im linken Ventrikel [68]. Diese erwähnten Forschergruppen konnten die TRPC6-Expression in Myokardproben bei krankhaft veränderten Herzen (z. B. durch Herzinsuffizienz) zeigen. Wir konnten das TRPC6-Protein sowohl bei herzgesunden Gewebeproben als auch bei pathologisch veränderten Herzen (z. B. fortgeschrittene Herzinsuffizienz, kardiale Todesursache) nachweisen. Ein Unterschied zwischen

Präparaten mit kardialer Todesursache bzw. Vorerkrankung und herzgesunden Präparaten konnte nicht festgestellt werden, wenngleich aufgrund des hohen Alters der Körperspender bei einigen Präparaten von einer altersentsprechenden kardialen Veränderung auszugehen und die Aussagekraft durch eine geringe Stichzahl an Gewebeproben limitiert ist.

6.2.4 Einflussfaktoren auf den TRPC6-Proteinnachweis

Es hat sich kein Einflussfaktor für die TRPC6-Färbung im humanen Herzgewebe gezeigt. Unabhängig vom Geschlecht, Sterbealter, Todesursache und Fixierungsart (u. a. postmortales Intervall unter 24 h) konnte TRPC6 gleichermaßen nachgewiesen werden. Auch Patienten mit kardialer Todesursache und Herzinsuffizienz zeigten das TRPC6-Protein.

6.3 Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren gab es zunehmend Forschungsgruppen, die die Auswirkungen von TRPC-Inhibitoren (z. B. dem oral bioverfügbaren TRPC6-Inhibitor BI 749327) in Tiermodellen überprüft haben. So verbesserte 2021 in einem Experiment von Jain et al. BI 749327 die pulmonal-arterielle Hypertonie und wird als mögliches neues Medikament angesehen [42, 43]. In einer Forschungsarbeit von Seo et al. schützte eine selektive, kombinierte Hemmung mit TRPC3- und TRPC6-Inhibitoren vor durch Drucküberlastung entstehender Herzhypertrophie und -dysfunktion, eine Gendeletion von TRPC3 bzw. TRPC6 allein allerdings nicht [87]. Bei der Behandlung eines akuten Myokardinfarktes kann es bei der Reperfusion des ischämischen Myokards zu einem

Reperfusionsschaden kommen, bei welchem u. a. eine Calcium-Überladung durch TRPC-Kanäle entsteht [50]. Kojima et al. fanden im Mausmodell eine Verbesserung der linksventrikulären Funktionen während der Reperfusion des ischämischen Myokards durch Blocken von TRPC-Kanälen mittels 2-Aminoethoxydiphenyl borate und La^{3+} [50]. Auch bei der Behandlung und Prävention vom Myokardinfarkt könnte TRPC6 eine Rolle spielen [111, 113]. Zudem ging im Mausmodell von Wierer et al. 2021 eine erhöhte TRPC6-Expression mit einem erhöhten Restenoserisiko nach Koronarstenting einher [100]. Sowohl die Nieren- als auch die Herzdysfunktion und -fibrose verbesserten sich durch Blocken mit dem TRPC6-Inhibitor BI 749327 bei den Untersuchungen von Brain et al. an Mausmodellen in vivo [56]. Diese Forschungsarbeiten verdeutlichen, dass TRPC6-Inhibitoren kardiale Erkrankungen verbessern könnten. Wir konnten das TRPC6-Protein immunhistochemisch am menschlichen Gewebe nachweisen, so wie andere Forschungsgruppen es bereits am Tiermodell zeigen konnten. Dieses deutet im Sinne des translationalen Konzeptes auf eine mögliche Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen vom Tiermodell auf den Menschen hin. Es sind weitere Studien erforderlich, um die Wirkung von TRPC6-Inhibitoren im Tiermodell und letzten Endes im menschlichen Organismus und klinischen Kontext besser zu verstehen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wir den TRPC6-Ionenkanal im humanen Herzgewebe bei allen Körperspendern insbesondere in den Kardiomyozyten und den intramuskulären Arteriolen nachgewiesen haben. In den intramuskulären Venolen, dem myokardialen Bindegewebe und dem Epikard fand sich kein TRPC6-Protein. Aus den Ergebnissen geht nicht eindeutig hervor, ob das Endokard TRPC6 enthält. Zu vermuten ist das Protein v. a. in der Lamina propria des Endokards, welche sich in

einigen Präparaten braun färbte. Es zeigte sich kein Unterschied im Proteinnachweis bezüglich der Lokalisationen, dem Geschlecht, der Fixierungsart o. ä.

Damit der Proteinnachweis im Epi- und Endokard verifiziert oder widerlegt werden kann, sind weitere Studien mit einer größeren Fallzahl notwendig. Um kardiovaskuläre Erkrankungen in Zukunft besser zu verstehen und therapieren zu können, ist es sinnvoll, zwischen Gewebeproben von Patienten mit einer Herzinsuffizienz oder ähnlicher kardialer Erkrankung und kardial gesunden Patienten zu differenzieren. Es könnte sich hierbei ein Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zeigen.

In zukünftigen Forschungsarbeiten wäre es zusätzlich sinnvoll, Proben aus dem Reizleitungssystem des Herzens zu gewinnen, um das Vorkommen von TRPC6 und die Bedeutung in der Erregungsbildung und -leitung zu erklären. Es werden einige TRP-Kanäle, z. B. TRPM4, TRPM7, TRPC3 und TRPC6 mit Herzrhythmusstörungen in Verbindung gebracht [108]. Ju et al. beispielsweise untersuchten mithilfe einer RT-PCR die mRNA-Expression von TRPC-Kanälen im Sinusknoten von Mäusen. Sie wiesen TRPC1, 2, 3, 4, 6 und 7, aber keine TRPC5-Expression nach. Weiterhin konnten sie durch eine Immunhistochemie mit u. a. TRPC6-Antikörpern ihr Ergebnis bestätigen [45, 109]. Es wird diskutiert, inwiefern TRPC6 als dehnungsempfindlicher Ionenkanal zu dehnungsassoziiertem Vorhofflimmern beiträgt [98, 109]. Untersuchungen zum TRPC6-Protein im Reizleitungssystem des Herzens an humanem Gewebe gibt es nur spärlich. TRPM4-Mutationen allerdings wurden bei Patienten mit verschiedenen Formen von Reizleitungsstörungen, wie z. B. AV-Block [88] oder beim Brugada-Syndrom [58], gefunden [57, 108]. Bei dem Brugada-Syndrom handelt es sich um eine seltene, meist autosomal-dominant vererbte Herzrhythmusstörung, welche mit einem hohen Risiko für einen plötzlichen Herztod einhergeht. Mehrere pathogene Varianten von Genen, wie z. B. SCN5A oder TRPM4,

werden mit dieser Erkrankung assoziiert [7]. Zudem wurde die Expression und das TRPM4-Protein im Sinusknoten der Maus [19] und eine starke TRPM4-Expression in Purkinje-Fasern entdeckt [57].

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass auch andere TRP- bzw. TRPC-Kanäle eine Rolle bei der Entstehung und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen spielen könnten [30, 36, 73, 87, 109], deren Expression und Protein im humanen Herzgewebe untersucht werden sollte. So werden neben dem TRPC6-Ionenkanal auch andere TRP-Kanäle mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, aber auch mit physiologischen Funktionen des Herzens in Verbindung gebracht. Diese scheinen z. B. für die Schrittmacherfunktion des Herzens oder als calciumpermeable Kanäle bei der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase und bei der Inotropie eine Rolle zu spielen [36, 108]. Multiple TRP-Kanäle, v. a. TRPC und TRPM-Kanäle, sind im Mausmodell an Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie beteiligt [30, 108]. Auch Untersuchungen am menschlichen Gewebe wurden durchgeführt. Dragun et. al z. B. fanden deutliche Expressionsveränderungen verschiedenster TRP-Kanäle in Myokardproben von Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA-Stadium III-IV im Vergleich zu Biopsien gesunder Herzen. Die Expression von TRPC1, TRPC5, TRPM4 und TRPM7 nahm zu und die Expression von TRPC4 und TRPV2 nahm ab [22]. Morine et al. konnten bei ähnlichen Untersuchungen ebenfalls unterschiedliche Expressionsprofile der TRP-Kanäle finden, wenngleich in ihrer Forschungsarbeit andere mRNA-Level erhöht bzw. erniedrigt waren [68].

Abschließend ist zu sagen, dass TRPC6 durch den eindeutigen immunhistochemischen Nachweis im humanen Herzgewebe als therapeutischer Angriffspunkt eine wichtige Rolle bei der Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten wie dem Myokardinfarkt [111, 113] spielen könnte. Damit der Proteinnachweis im Endo- und Epikard

quantifiziert immunhistochemisch gezeigt werden kann, sind weiterführende Studien mit größeren Fallzahlen notwendig. Wie oben beschrieben sollten auch andere TRP-Kanäle sowohl in Hinblick auf Expressions- und Proteinnachweis als auch auf ihre Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens untersucht werden. Eine Translation von Forschungsergebnissen aus Tiermodellen auf den menschlichen Organismus und den klinischen Kontext scheint möglich.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Phylogenetischer Stammbaum	7
Abbildung 2:	Allgemeiner Aufbau von TRP-Kanälen	9
Abbildung 3:	Homotetramerbildung zum funktionellen TRP-Kanal	10
Abbildung 4:	Vereinfachte Darstellung der Aktivierung von TRPC-Kanälen als „receptor-operated channels“ beim Menschen	13
Abbildung 5:	Rolle von TRPC6-Kanälen bei unterschiedlichen Erkrankungen	14
Abbildung 6:	Herzskizze mit fünf zylinderförmigen Entnahmestellen.....	25
Abbildung 7:	Einblockung der Gewebeproben	33
Abbildung 8:	Indirekte Immunhistochemie mit DAB als Chromogen.....	37
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare.....	46
Abbildung 10:	Spezifitätskontrolle nach Vorinkubation des Antikörpers mit TRPC6-Blocking-Peptid am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare.....	47
Abbildung 11:	Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare	47
Abbildung 12:	Spezifitätskontrolle nach Vorinkubation des Antikörpers mit TRPC6-Blocking-Peptid am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare.....	48

Abbildung 13: Negativkontrolle (Bildseite A) und immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 (Bildseite B) am Gewebeschnitt des Myokards aus einem Septum interventriculare	48
Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Endo- und Myokards aus einem rechten Atrium	50
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von TRPC6 am Gewebeschnitt des Epikards aus einem rechten Atrium	51
Abbildung 16: Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Epikards aus einem rechten Atrium.....	52
Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Atrium	53
Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt von epikardialen Gefäßen aus einem rechten Ventrikel.....	54
Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem rechten Ventrikel.....	55
Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt vom Übergang epikardiales Fettgewebe in das Myokard aus einem linken Ventrikel	57

Abbildung 21: Negativkontrolle am Gewebeschnitt vom Übergang epikardiales Fettgewebe in das Myokard aus einem linken Ventrikel.....	58
Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem Septum interventriculare.....	59
Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Ventrikel.....	60
Abbildung 24: Negativkontrolle am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem linken Ventrikel.....	61
Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel.....	62
Abbildung 26: Negativkontrolle am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel	63
Abbildung 27: Negativkontrolle (Bildseite A) und immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 (Bildseite B) am Gewebeschnitt einer Koronararterie aus einem rechten Ventrikel	63
Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt einer intramuskulären Arteriole aus einem linken Ventrikel.....	64

Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myo- und Endokards aus einem Septum interventriculare.....	65
Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung von TRPC6 am Gewebeschnitt von Purkinje-Fasern aus einem Septum interventriculare.....	65
Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 am Gewebeschnitt des Myokards aus einem linken Ventrikel	66
Abbildung 32: Prozentualer Anteil von positiv, fraglich positiv und negativ gefärbten Strukturen	67

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der eingesetzten Antikörper	19
Tabelle 2:	Übersicht der eingesetzten Chemikalien	19
Tabelle 3:	Übersicht der eingesetzten Geräte	21
Tabelle 4:	Übersicht der eingesetzten Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 5:	Übersicht der Körperspender und Probenentnahmen.....	29
Tabelle 6:	Schema für die Einbettung in Paraffin	32
Tabelle 7:	Schema für das Entparaffinieren für die HE-Färbung.....	35
Tabelle 8:	Schema für das Entparaffinieren für die immunhistochemische Färbung.....	38
Tabelle 9:	Schema der Entwässerung für die immunhistochemische Färbung.....	42
Tabelle 10:	Auswertungsschema der immunhistochemischen Färbung	44
Tabelle 11:	Immunhistochemische Färbung des Epikards	68
Tabelle 12:	Immunhistochemische Färbung des Endokards	68
Tabelle 13:	Immunhistochemische Färbung des Myokards	69
Tabelle 14:	Immunhistochemische Färbung der Gefäße.....	69

9 Literaturverzeichnis

1. Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 23:297–328
2. Aires V, Hichami A, Boulay G, Khan NA (2007) Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: A comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid. *Biochimie* 89:926–937
3. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198–205
4. Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23–49
5. Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (TRP) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272:29672–29680
6. Bouron A, Chauvet S, Dryer S, Rosado JA (2016) Second messenger-operated calcium entry through TRPC6. *Adv Exp Med Biol* 898:201–249
7. Brugada R, Campuzano O, Sarquella-Brugada G, et al. (1993 [aktualisiert 2016]) Brugada Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds) GeneReviews, University of Washington, Seattle, Seattle (WA)
8. Burlew BS, Weber KT (2000) Connective tissue and the heart: Functional Significance and Regulatory Mechanisms. *Cardiol Clin* 18:435–442
9. Bush EW, Hood DB, Papst PJ, Chapo JA, Minobe W, Bristow MR, Olson EN, McKinsey TA (2006) Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol*

- Chem* 281:33487–33496
10. Bushinsky DA, Monk RD (1998) Calcium. *Lancet* 352:306–311
 11. Carafoli E (1988) Membrane transport of calcium: An overview. *Methods Enzymol* 157:3–11
 12. Chen JB, Tao R, Sun HY, Tse HF, Lau CP, Li GR (2010) Multiple Ca²⁺ signaling pathways regulate intracellular Ca²⁺ activity in human cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol* 223:68–75
 13. Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259–268
 14. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387–396
 15. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524
 16. Colella M, Pozzan T (2008) Cardiac cell hypertrophy in vitro: Role of calcineurin/NFAT as Ca²⁺ signal integrators. *Ann N Y Acad Sci* 1123:64–68
 17. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224:285–287
 18. D’Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D’Urso M CA (1998) Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22. *Cytogenet Cell Genet* 83:46–47
 19. Demion M, Bois P, Launay P, Guinamard R (2007) TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells. *Cardiovasc Res* 73:531–538
 20. Dietrich A, Gudermann T (2007) TRPC6. In: Flockerzi V, Nilius B (eds) Transient receptor potential (TRP) channels. Handbook of Experimental Pharmacology 179, Springer, Berlin, Heidelberg

21. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: Physiological function and pathophysiological relevance. In: Nilius B, Flockerzi V (eds) Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Handbook of Experimental Pharmacology 222, Springer, Berlin, Heidelberg
22. Dragún M, Gažová A, Kyselovič J, Hulman M, Mát'uš M (2019) TRP channels expression profile in human end-stage heart failure. *Med* 55:380
23. Euler US v., Liljestrand G (1946) Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 12:301–320
24. Feng S, Li H, Tai Y, Huang J, Su Y, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L, Wang Y (2013) Canonical transient receptor potential 3 channels regulate mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11011–11016
25. Ferreira G, Raddatz N, Lorenzo Y, González C, Latorre R (2015) Biophysical and molecular features of thermosensitive TRP channels involved in sensory transduction. In: Madrid R, Bacigalupo J (eds) TRP Channels in sensory transduction. Springer, Cham
26. Flockerzi V (2007) An introduction on TRP channels. In: Flockerzi V, Nilius B (eds) Transient receptor potential (TRP) channels. Handbook of Experimental Pharmacology 179, Springer, Berlin, Heidelberg
27. Fortelny N, Overall CM, Pavlidis P, Freue GVC (2017) Can we predict protein from mRNA levels? *Nature* 547:E19–E20
28. Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weißgerber P, Flockerzi V (2005) Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* 567:59–66
29. Freichel M, Tsvilovskyy V, Camacho-Londoño JE (2014) TRPC4- and TRPC4-containing channels. In: Nilius B, Flockerzi V (eds) Mammalian transient

- receptor potential (TRP) cation channels. Handbook of Experimental Pharmacology 222, Springer, Berlin, Heidelberg
30. Freichel M, Berlin M, Schürger A, Mathar I, Bacmeister L, Medert R, Frede W, Marx A, Segin S, Londoño JEC (2017) TRP channels in the heart. In: Emir TLR (ed) Neurobiology of TRP channels. Kapitel 9, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis
 31. Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S, Deng H (2008) How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40:426–436
 32. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:445–454
 33. Hardie RC, Minke B (1992) The TRP gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651
 34. Harper MT, Camacho Londoño JE, Quick K, Londoño JC, Flockerzi V, Philipp SE, Birnbaumer L, Freichel M, Poole AW (2013) Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure. *Sci Signal* 6:ra50
 35. Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589–600
 36. Hof T, Chaigne S, Récalde A, Sallé L, Brette F, Guinamard R (2019) Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol* 16:344–360
 37. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by

- diacylglycerol. *Nature* 397:259–263
38. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7461–7466
 39. Hou X, Xiao H, Zhang Y, Zeng X, Huang M, Chen X, Birnbaumer L, Liao Y (2018) Transient receptor potential channel 6 knockdown prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation. *Cell Death Dis* 9:1015
 40. Huang CL (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* 15:1690–1699
 41. Ikeda K, Nakajima T, Yamamoto Y, Takano N, Tanaka T, Kikuchi H, Oguri G, Morita T, Nakamura F, Komuro I (2013) Roles of transient receptor potential canonical (TRPC) channels and reverse-mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger on cell proliferation in human cardiac fibroblasts: Effects of transforming growth factor β 1. *Cell Calcium* 54:213–225
 42. Jain PP, Lai N, Xiong M, Chen J, Babicheva A, Valdez-Jasso D, Thistlethwaite PA, Shyy JYJ, Wang J, Makino A, Yuan JXJ (2021) Oral TRPC6 inhibitor BI-749237 ameliorates experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 203:A3671
 43. Jain PP, Lai N, Xiong M, Chen J, Babicheva A, Zhao T, Parmisano S, Zhao M, Paquin C, Matti M, Powers R, Balistrieri A, Kim NH, Valdez-Jasso D, Thistlethwaite PA, Shyy JYJ, Wang J, Garcia JGN, Makino A, Yuan JXJ (2021) TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 321:L1161–L1182
 44. Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J (2011) Nitrite

- pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy - A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat* 193:71–75
45. Ju YK, Chu Y, Chaulet H, Lai D, Gervasio OL, Graham RM, Cannell MB, Allen DG (2007) Store-operated Ca²⁺ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ Res* 100:1605–1614
46. Kaneko Y, Szallasi A (2014) Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 171:2474–2507
47. Kim JB (2014) Channelopathies. *Korean J Pediatr* 57:1–18
48. Kim JM, Heo K, Choi J, Kim K, An W (2013) The histone variant MacroH2A regulates Ca²⁺ influx through TRPC3 and TRPC6 channels. *Oncogenesis* 2:e77
49. Kistler AD, Singh G, Altintas MM, Yu H, Fernandez IC, Gu C, Wilson C, Srivastava SK, Dietrich A, Walz K, Kerjaschki D, Ruiz P, Dryer S, Sever S, Dinda AK, Faul C, Reiser J (2013) Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem* 288:36598–36609
50. Kojima A, Fukushima Y, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H (2018) Transient receptor potential canonical channel blockers improve ventricular contractile functions after Ischemia/Reperfusion in a Langendorff-perfused mouse heart model. *J Cardiovasc Pharmacol* 71:248–255
51. Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H (2006) Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7:159
52. Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN (2006) TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during

- pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 116:3114–3126
53. Lee J, Moon S, Cha Y, Chung YD (2010) Drosophila TRPN (= NOMPC) channel localizes to the distal end of mechanosensory cilia. *PLoS One* 5:e11012
54. Lee KP, Yuan JP, So I, Worley PF, Muallem S (2010) STIM1-dependent and STIM1-independent function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. *J Biol Chem* 285:38666–38673
55. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3202–3206
56. Lin BL, Matera D, Doerner JF, Zheng N, Del Camino D, Mishra S, Bian H, Zeveleva S, Zhen X, Blair NT, Chong JA, Hessler DP, Bedja D, Zhu G, Muller GK, Ranek MJ, Pantages L, McFarland M, Netherton MR, Berry A, Wong D, Rast G, Qian HS, Weldon SM, Kuo JJ, Sauer A, Sarko C, Moran MM, Kass DA, Pullen SS (2019) In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10156–10161
57. Liu H, Zein L El, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P (2010) Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3:374–385
58. Liu H, Chatel S, Simard C, Syam N, Salle L, Probst V, Morel J, Millat G, Lopez M, Abriel H, Schott JJ, Guinamard R, Bouvagnet P (2013) Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in

- the TRPM4 channel. *PLoS One* 8:e54131
59. Liu L, Gu L, Chen M, Zheng Y, Xiong X, Zhu S (2020) Novel targets for stroke therapy: Special focus on TRPC channels and TRPC6. *Front Aging Neurosci* 12:70
60. Malczyk M, Erb A, Veith C, Ghofrani HA, Schermuly RT, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N, Sydykov A (2017) The role of transient receptor potential channel 6 channels in the pulmonary vasculature. *Front Immunol* 8:707
61. Miller BA (2014) TRPC2. In: Nilius B, Flockerzi V (eds) Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Handbook of Experimental Pharmacology 222, Springer, Berlin, Heidelberg
62. Minke B, Wu CF, Pak WL (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258:84–87
63. Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429–472
64. Misquitta CM, Mack DP, Grover AK (1999) Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25:277–290
65. Molnar T, Barabas P, Birnbaumer L, Punzo C, Kefalov V, Križaj D (2012) Store-operated channels regulate intracellular calcium in mammalian rods. *J Physiol* 590:3465–3481
66. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* TRP locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323
67. Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK (1990) Abnormal

- intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 81:III21—32
68. Morine KJ, Paruchuri V, Qiao X, Aronovitz M, Huggins GS, DeNofrio D, Kiernan MS, Karas RH, Kapur NK (2016) Endoglin selectively modulates transient receptor potential channel expression in left and right heart failure. *Cardiovasc Pathol* 25:478–482
69. Mukerji N, Damodaran T V, Winn MP (2007) TRPC6 and FSGS: The latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1772:859–868
70. Nikolova-Krstevski V, Wagner S, Ze C, Yu Y, Cox CD, Cvetkovska J, Hill AP, Huttner IG, Benson V, Werdich AA, Macrae C, Feneley MP, Friedrich O, Martinac B, Fatkin D (2017) Endocardial TRPC-6 channels act as atrial mechanosensors and load-dependent modulators of endocardial/myocardial cross-talk. *JACC Basic to Transl Sci* 2:575–590
71. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217
72. Nilius B, Owsianik G (2010) Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 460:437–450
73. Nishida M, Kurose H (2008) Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:395–406
74. Ohba T, Watanabe H, Takahashi Y, Suzuki T, Miyoshi I, Nakayama S, Satoh E, Iino K, Sasano H, Mori Y, Kuromitsu S, Imagawa K, Saito Y, Iijima T, Ito H, Murakami M (2006) Regulatory role of neuron-restrictive silencing factor in expression of TRPC1. *Biochem Biophys Res Commun* 351:764–770
75. Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y,

- Nagao T, Kurose H (2006) TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25:5305–5316
76. Parekh AB, Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757–810
77. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38:233–252
78. Perlman RL (2016) Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Heal* 2016:170–176
79. Pigeot I, Mansmann U, Rauch G (2019) Forschung am Menschen – Prinzipien und Herausforderungen für die Arbeit von Ethikkommissionen. *Bundesgesundheitsbl* 62:679–681
80. Porter KE, Turner NA (2009) Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123:255–278
81. Putney JW (2004) The enigmatic TRPCs: Multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* 14:282–286
82. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 109:95–104
83. Rohacs T (2013) Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Adv Biol Regul* 53:341–355
84. Savarese G, Lund LH (2017) Global public health burden of heart failure. *Card Fail Rev* 3:7–11
85. Schaefer M, Urban N (2013) TRP-Kanäle: Vielseitige zelluläre Sensoren und Effektoren. *BioSpektrum* 19:143–145
86. Schmidt J (2019) Weltweit häufigste Todesursache: Überholt Krebs

- kardiovaskuläre Erkrankungen? *CardioVasc* 19:11
87. Seo K, Rainer PP, Hahn VS, Lee DI, Jo SH, Andersen A, Liu T, Xu X, Willette RN, Lepore JJ, Marino JP, Birnbaumer L, Schnackenberg CG, Kass DA (2014) Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:1551–1556
88. Stallmeyer B, Zumhagen S, Denjoy I, Duthoit G, Hébert JL, Ferrer X, Maugendre S, Schmitz W, Kirchhefer U, Schulze-Bahr E, Guicheney P, Schulze-Bahr E (2012) Mutational spectrum in the Ca²⁺-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat* 33:109–117
89. Szent-Györgyi AG (1975) Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys J* 15:707–723
90. Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Radovanovic M, Ono K, Iijima T, Ito H (2007) Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Atherosclerosis* 195:287–296
91. Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273:8675–8679
92. Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1742:21–36
93. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417
94. Wartenberg P, Lux F, Busch K, Fecher-Trost C, Wyatt A, Flockerzi V, Krasteva-Christ G, Boehm U, Weissgerber P (2022) Combining mass

- spectrometry and genetic labeling in mice to report TRP channel expression. *MethodsX* 9:101604
95. Waschke J, Bergmann M, Bräuer L, Brenner E, Buchhorn A, Deutsch A, Dokter M, Egu DT, Ergün S, Fassnacht U, Fietz D, Gundlach S, Heermann S, Hirt B, Kugelmann D, Müller-Gerbl M, Neiss W, Nimtschke U, Plendl J, Pretterklieber M, Redies C, Scaal M, Schmidt MHH, Schmiedl A, Schnittler HJ, Schomerus C, Sebestény T, Spittau B, Steiniger B, Tschernig T, Unverzagt A, Viebahn C, Voigt E, Weigner J, Weyers I, Winkelmann A, Winkler M, Paulsen F (2019) Recommendations of the working group of the Anatomische Gesellschaft on reduction of formaldehyde exposure in anatomical curricula and institutes. *Ann Anat* 221:179–185
96. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H (2008) TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118:337–351
97. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Ono K, Ito H (2009) The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ J* 73:419–427
98. Watanabe H, Iino K, Ohba T, Ito H (2013) Possible involvement of TRP channels in cardiac hypertrophy and arrhythmia. *Curr Top Med Chem* 13:283–294
99. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Y Schnitzler MM, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19093–19098
100. Wierer M, Werner J, Wobst J, Kastrati A, Cepele G, Aherrahrou R, Sager HB,

- Erdmann J, Dichgans M, Flockerzi V, Civelek M, Dietrich A, Mann M, Schunkert H, Kessler T (2021) A proteomic atlas of the neointima identifies novel druggable targets for preventive therapy. *Eur Heart J* 42:1773–1785
101. Wilkens H (2004) Pulmonale Hypertonie. *Anaesthesist* 53:734–740
102. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308:1801–1804
103. Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJM, Hoenderop JGJ (2009) The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5:441–449
104. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the Mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62:381–404
105. Yip H, Chan WY, Leung PC, Kwan HY, Liu C, Huang Y, Michel V, Yew DTW, Yao X (2004) Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochem Cell Biol* 122:553–561
106. Yu Y, Fantozzi I, Remillard C V, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JXJ (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13861–13866
107. Yu Y, Keller SH, Remillard C V, Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang JY, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan

- MD, Rubin LJ, Yuan JXJ (2009) A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2313–2322
108. Yue L, Xu H (2021) TRP channels in health and disease at a glance. *J Cell Sci* 134:jcs258372
109. Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L (2015) Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 308:H157–H182
110. Zhang YH, Wu HJ, Che H, Sun HY, Cheng LC, Li X, Au WK, Tse HF, Li GR (2013) Functional transient receptor potential canonical type 1 channels in human atrial myocytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 465:1439–1449
111. Zhao J, Hang P, Li Y (2012) TRPC6, a potential novel target for enhancing cardiac repair of bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* 155:497–498
112. Zheng J (2013) Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol* 3:221–242
113. Zhou R, Hang P, Zhu W, Su Z, Liang H, Du Z (2011) Whole genome network analysis of ion channels and connexins in myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem* 27:299–304
114. Anti Trpc6 Antibody | Alomone Labs | Bioz. Abgerufen 22. Januar 2022 von URL: [https://www.bioz.com/result/anti-trpc6-antibody/product/Alomone Labs/](https://www.bioz.com/result/anti-trpc6-antibody/product/Alomone-Labs/)
115. Anti-TRPC6 Antibody | KO Validated | Alomone Labs. Abgerufen 22. Januar 2022 von URL: <https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017>

10 Publikationen

Jacobs T, Abdinghoff J, Tschernig T (2022) Protein detection and localization of the non-selective cation channel TRPC6 in the human heart. *Eur J Pharmacol* 924:174972

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. *Biomed Reports* 16:42

11 Danksagung

Der Verfasser dieser Dissertation hat die Entnahme und Aufarbeitung der Gewebeproben bis zum fertigen Objektträger, die histologische Auswertung, das Erstellen der Dissertationsschrift und das Anfertigen aller verwendeten Abbildungen selbstständig durchgeführt. Im Folgenden soll denen gedankt werden, die mich bei dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, Leiter der Prosektur des Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, für die großartige Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Dissertationsarbeit danken. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich und hast mir in jeder Situation und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ohne Deine Unterstützung wäre die Arbeit nie entstanden.

Ausdrücklich danken möchte ich auch der Sektionsassistentin Irina Scheck und dem Sektionsassistenten Rony Dollwett für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Anatomischen Institut. Ihr habt mir viele Tipps gegeben und hattet immer Zeit für mich und meine Fragen.

Einen herzlichen Dank gilt meinem Kommilitonen, Laborkumpanen und Freund Jan Abdinghoff für die zahlreichen fruchtbaren Stunden im Labor und den kreativen

Austausch beim Schreiben der Doktorarbeit. Es hat mir immer sehr viel Freude bereitet, mit Dir zusammenzuarbeiten.

Für die freundliche Zusammenarbeit und stets schnelle Hilfe danke ich den Sekretärinnen Helga Meyer und Barbara Michahelles.

Ein demütiger Dank gilt auch den Körperspendern, welche sich zu Lebzeiten entschieden haben, die Lehre und medizinische Forschung durch ihren Körper nach ihrem Tod voranzutreiben. Dieses Vorhaben leistet einen großen Beitrag für die Gesellschaft. Selbstverständlich danke ich auch den Angehörigen, welche diese Entscheidung unterstützen.

Besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Freundin Fabienne und meinen Freunden, die meine Forschungsarbeit mit Liebe und Freude tatkräftig begleitet haben. Ohne Eure liebevolle Unterstützung wäre das alles niemals möglich gewesen.

Ihr alle habt einen entscheidenden Beitrag an dieser Dissertationsarbeit geleistet und ich danke Euch und allen, die unerwähnt blieben, von ganzem Herzen!

12 Lebenslauf

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