

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

**Der nicht-selektive Kationenkanal TRPC6 in menschlichen Gefäßen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von: Jan Josef Joachim Abdinghoff

geboren am: 06. April 1993 in Werne an der Lippe

„Wunder stehen nicht im Gegensatz zur Natur,  
sondern nur im Gegensatz zu dem,  
was wir über die Natur wissen.“

-Augustin von Hippo-

Gewidmet:

meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung (english version below).....	1
1.1.1	Einleitung und klinische Relevanz.....	1
1.1.2	Methodik.....	2
1.1.3	Ergebnisse und Interpretation.....	2
1.1.4	Ausblick in die Zukunft.....	4
1.2	Abstract.....	5
1.2.1	Introduction and clinical relevancy.....	5
1.2.2	Methods.....	5
1.2.3	Results and interpretation.....	6
1.2.4	Outlook.....	7
<b>2</b>	<b>Einleitung und Fragestellung zu TRP-Kanälen</b> .....	<b>8</b>
2.1	Kalziumkanäle.....	8
2.1.1	Lokalisation.....	8
2.1.2	Physiologie.....	8
2.2	TRP-Kanäle.....	9
2.2.1	Entdeckung.....	9
2.2.2	TRP-Struktur.....	9
2.2.3	TRP als Kationenkanal.....	11
2.2.4	Die TRP-Superfamilie.....	12
2.2.5	Die TRP-Subfamilien.....	13

2.2.6	Subfamilie der TRPC-Kanäle.....	15
2.3	TRPC6-Kanal.....	16
2.3.1	Genaufbau .....	16
2.3.2	Molekulare Struktur .....	16
2.3.3	Physiologische Prozesse des TRPC6-Kanals.....	18
2.3.4	Klinische Relevanz im Gefäßsystem.....	20
2.3.5	Assoziierte Krankheiten .....	22
2.3.6	Nachweis in humanem Gewebe .....	24
2.4	Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19).....	25
2.5	Fragestellung.....	26
<b>3</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>27</b>
3.1	Materialliste .....	27
3.1.1	Antikörper .....	27
3.1.2	Chemikalien.....	27
3.1.3	Materialien.....	30
3.1.4	Gerätschaften.....	31
3.2	Übersicht zu den Abläufen .....	32
3.3	Arbeit mit Körperspendern.....	32
3.3.1	Umgang mit Körperspendern .....	32
3.3.2	Fixierung der Körperspender.....	33
3.3.3	Liste der Körperspender „non-COVID“ .....	35
3.3.4	Liste der Körperspender COVID.....	37



3.4	Probenauswahl.....	38
3.5	Probengewinnung .....	41
3.6	Einbettung der Proben in Paraffin .....	44
3.7	Anfertigung von Mikrotomschnitten .....	45
3.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	46
3.8.1	Versuchsaufbau .....	46
3.8.2	Versuchsdurchführung .....	46
3.9	Immunhistochemische Färbung.....	48
3.9.1	Versuchsaufbau .....	48
3.9.2	Versuchsvorbereitung.....	49
3.9.3	Versuchsdurchführung .....	50
3.10	Western-Blot.....	52
3.10.1	Versuchsaufbau .....	52
3.10.2	Versuchsvorbereitung.....	53
3.10.3	Versuchsdurchführung .....	54
3.11	Auswertung.....	56
3.11.1	Auswertung IHC.....	56
3.11.2	Statistische Auswertung .....	59
3.12	Auswertung WB .....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	Ergebnisse IHC .....	60
4.1.1	Spezifitätsnachweis .....	60

4.1.2	Kreuzschema: Ein Körperspender (Proband Nr. 6).....	64
4.1.3	Kreuzschema: Nierenarterien (alle Spender).....	82
4.1.4	Kreuzschema: Aorten (alle Spender) .....	95
4.1.5	COVID Proben .....	101
4.2	Statistische Ergebnisse der IHC.....	110
4.2.1	Daten zu non-COVID-Proben .....	110
4.2.2	Daten zu COVID-Proben .....	115
4.3	Ergebnisse Western Blot.....	117
4.4	Ergebnisse Fragestellung.....	118
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>120</b>
5.1	Methodik.....	120
5.1.1	Probenentnahme .....	120
5.1.2	Aufbewahrung der Proben in Formaldehyd nach der Entnahme .....	121
5.1.3	Mikrotomschnitte .....	121
5.1.4	Demaskierung der Antigenstrukturen .....	122
5.1.5	Blockierung der Proben.....	123
5.1.6	Verwendeter Antikörper.....	124
5.1.7	Inaktivierung der Peroxidase.....	124
5.1.8	Substrat der Peroxidasereaktion .....	125
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	126
5.2.1	Unterschied in den Gefäßabschnitten.....	126
5.2.2	Tunica intima.....	126

5.2.3	Tunica media .....	128
5.2.4	Tunica adventitia .....	130
5.2.5	Physiologie und Pathophysiologie des TRPC6-Kanals in Gefäßen.....	131
5.2.6	Literaturvergleich .....	133
5.2.7	Nicht bewertete Ergebnisse .....	134
5.2.8	COVID-Proben.....	135
5.3	Ausblick in die Zukunft .....	136
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>179</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>180</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>182</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ADPKD	Autosomal-Dominante Polyzystischen Nierenerkrankung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ARDS	akutes respiratorisches Syndrom
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BNP	brain natriuretic peptide
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium Ion
CiRB	Calmodulin/Inositoltriphosphat-Rezeptor-Bindungsstelle
cm	Zentimeter
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019

C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Antikörperfragment
Fc	kristallisierbares Antikörperfragment
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GOT	Goat anti-rabbit-Antikörper
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	Human embryonal kidney
HRP	Horseredish-peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low density lipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)

M. e. e.	Membrana elastica externa
M. e. i.	Membrana elastica interna
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NAST	Nierenarterienstenose
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	normal goat serum (Ziegenserum Blockierlösung)
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminus	Amino-Terminus
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung
PLC	Phospholipase C
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RT-PCR	Reverse transkriptase-polymerase-kettenreaktion

Sek.	Sekunden
SOC	store-operated channel (speicherregulierter Kanal)
STIM	Stromal interacting molecule
TBST	Tris-bufferd saline with Tween20
TRP	nicht-selektiver Kationenkanal der TRP-Superfamilie
TRPA	Subfamilie der TRP-Superfamilie (A für Ankyrin)
TRPC	Subfamilie der TRP-Superfamilie (C für classical)
TRPM	Subfamilie der TRP-Superfamilie (M für Melastatin)
TRPML	Subfamilie der TRP-Superfamilie (ML für Mucolipin)
TRPN	Subfamilie der TRP-Superfamilie (N für no mechanoreceptor potential)
TRPP	Subfamilie der TRP-Superfamilie (P für Polycystin)
TRPV	Subfamilie der TRP-Superfamilie (V für Vanilloid)
u. a.	unter anderem
V.	Vena
Vv.	Venae
V. a.	Verdacht auf
Z. n.	Zustand nach

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung (english version below)

### 1.1.1 Einleitung und klinische Relevanz

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Der nicht-selektive Ionenkanal TRPC6 spielt in der Physiologie und Pathophysiologie der Gefäße eine wichtige Rolle. Der TRPC6-Kanal ist ein membranständiger, nichtselektiver, kalziumpermeabler Kationenkanal. Als solcher ist er in der Regulation des Kalziumhaushalts von TRPC6-Kanal exprimierenden Zellen maßgeblich beteiligt. Aktuelle Erkenntnisse über die Funktion des TRPC6-Kanals in Gefäßen beruhen hauptsächlich auf dem Tiermodell oder Zellkulturen. Dass er in menschlichen Geweben jedoch relevante Aufgaben hat, zeigt sich in einigen Krankheitsbildern, wie der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) oder der Idiopathisch pulmonalerteriellen Hypertonie (IPAH), an deren Ätiologie der TRPC6-Kanal beteiligt ist. Allerdings sind Arbeiten zum Nachweis des Kanals in menschlichen Gefäßen bislang sehr rar. Eine bessere Erforschung der Expression und Lokalisation des TRPC6-Kanals ermöglicht in Zukunft ein besseres Verständnis seiner Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Ziel dieser Forschungsarbeit ist der erste systematische Nachweis von TRPC6-Kanälen in menschlichen Gefäßen. Dafür erfolgte ein spezifischer Proteinnachweis des TRPC6-Kanals mittels immunhistochemischer Färbung (IHC). Die histologische Auswertung soll als Grundlage für die weitere Erforschung des TRPC6-Kanals dienen.



### **1.1.2 Methodik**

Standardisiert wurden verschiedene Gefäßabschnitte aus insgesamt neun Körperspendern des Anatomischen Institutes der Universität des Saarlandes entnommen und in Formaldehyd immersionsfixiert. Anschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und mittels eines Mikrotoms in sieben Mikrometer dünne Proben geschnitten. Die Präparate wurden zunächst mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und auf intakte Morphologie der Gefäße beurteilt, als Grundvoraussetzung für die IHC. In dieser wurden die Proben mit einem Knockout-validierten Primärantikörper gegen TRPC6-Antigenstrukturen in einer Konzentration von 1:100 inkubiert. Die Spezifität und Qualität des Antikörpers wurde mittels peptidblockierten Kontrollproben nochmals überprüft. Als sekundärer Antikörper wurden Horseredish-Peroxidase (HRP) konjugierte Goat anti-rabbit-Antikörper (GOT) in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Die Verdünnungen erfolgten mit Normal-Goat-Serum (NGS). Das hinzugefügte Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde durch eine von der HRP katalysierten Chromogenumsetzung durch eine Braunfärbung objektivierbar. Die Auswertung der Proben erfolgte lichtmikroskopisch. Als zusätzlicher Nachweis des TRPC6-Proteins wurde ein Western Blot an skelettierten Gefäßproben durchgeführt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen COVID-19 assoziierten Gefäßpathologien und dem TRCP6-Kanal zu untersuchen, wurden Proben von fünf Patienten, die an COVID-19 verstorben waren, in diese Arbeit miteinbezogen.

### **1.1.3 Ergebnisse und Interpretation**

Die systematische Auswertung von spezifischen Proteinnachweisen des TRPC6-Kanals mittels IHC zeigt Unterschiede bezüglich seines Proteinvorkommens in den Gefäßwandschichten sowie in verschiedenen Gefäßabschnitten. In vielen Fällen (50 %) konnten in der Tunica intima sowohl im Endothel als auch im Stratum subendotheliale der TRPC6-Kanal nachgewiesen

werden. Gehäuft konnte der TRPC6-Kanal beispielsweise in Nierenarterien und Aorten nachgewiesen werden. Ein Nachweis des TRPC6-Kanals in der Tunica media konnte in kaum einer der untersuchten Proben gelingen (2,5 %). Dies suggeriert, dass der TRPC6-Kanal auf Zellen dieser Schicht nicht exprimiert wird. Eine Ausnahme hiervon weisen die COVID-19 Proben auf, welche als einzige braune Herde in der Tunica media zeigen. Dies könnte einen Hinweis auf ein Mitwirken des TRPC6-Kanals bei COVID-19-assoziierten Gefäßpathologien darstellen.

Die Adventitia zeigte im Vergleich zwischen verschiedenen Gefäßabschnitten zwar einen häufigen TRPC6-Kanal Nachweis (55 %), jedoch kein klares Färbungsmuster. Lediglich einzelne Strukturen in der Adventitia, wie Vasa vasorum, stellten sich reproduzierbar positiv bzgl. des immunhistochemischen Proteinnachweises von TRPC6-Kanälen dar.

Diese Ergebnisse legen eine Beeinflussung der Gefäßweitstellung des TRPC6-Kanals in den untersuchten Gefäßabschnitten nahe. Im Einklang mit aktuellen Studien könnte der TRPC6-Kanal somit bspw. an Prozessen der Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Vasodilatation, aber auch an Proliferation und Fibrose in Gefäßwänden, wie bspw. bei der Idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH), beteiligt sein. Entgegen der aktuellen Mehrheit von Forschungsmeinungen konnte kein Proteinnachweis des TRPC6-Kanals mittels IHC in der Tunica media in menschlichen Gefäßen erfolgen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der TRPC6-Kanal keinerlei Einflüsse auf vasoaktive Effekte hat, welche durch die glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica Media vermittelt werden. Studien zu diesem Thema beziehen sich allerdings fast ausschließlich auf Tiermodelle oder Zellkulturen, was den Wert eines Proteinnachweises in humanen Gefäßen unterstreicht.

#### **1.1.4 Ausblick in die Zukunft**

Das Verständnis der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen ist aufgrund der hohen Prävalenz und Mortalität dieser Entitäten von immenser Bedeutung. Durch heute bereits bekannte Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation des TRPC6-Kanals könnten sich für die Zukunft bedeutsame neue Therapieoptionen für Patientengruppen mit kardiovaskulären Erkrankungen erschließen. Jedoch ist eine weitere Erforschung des TRPC6-Kanals, zur Identifizierung seiner Aufgaben und seiner Rolle in pathophysiologischen Prozessen, in menschlichen Gefäßen unerlässlich.

## **1.2 Abstract**

### **1.2.1 Introduction and clinical relevancy**

Cardiovascular disease is one of the leading causes of death worldwide. The transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) channel plays an important role in the physiology and pathophysiology of blood vessels. The TRPC6-channel is a membrane-bound, nonselective, calcium-permeable cation channel. As such, it is significantly involved in the regulation of the calcium balance of cells expressing the TRPC6-channel. Current knowledge about the function of the TRPC6-channel in vessels is mainly based on the animal model or cell cultures. The fact that it has relevant tasks in human tissues can be seen in some clinical pictures, such as focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) or idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH), in the etiology of which the TRPC6-channel is involved. However, work on the detection of the canal in human vessels has been very rare so far. Better research into the expression and localization of the TRPC6-channel will enable a better understanding of its role in physiological and pathophysiological processes in the future. The aim of this research work is the first systematic detection of TRPC6-channels in human vessels. For this purpose, a specific protein detection of the TRPC6-channel was carried out by means of immunohistochemical staining (IHC). The histological evaluation should serve as a basis for further research into the TRPC6-channel.

### **1.2.2 Methods**

Using a standardized procedure, various vessel sections were taken from a total of nine body donors from the Anatomical Institute of Saarland University and immersion-fixed in formaldehyde. The specimens were then embedded in paraffin and cut into seven micrometer thin samples using a microtome. The specimens were first stained with hematoxylin-eosin (HE)

and assessed for intact morphology of the vessels, as a basic requirement for IHC. In this, the samples were incubated with a knockout-validated antibody against TRPC6 antigen structures in a concentration of 1: 100. The specificity and quality of the antibody was checked again using peptide-blocked control samples. Horseshoe peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit antibodies (GOT) in a concentration of 1: 500 were used as secondary antibodies. The dilutions were made with normal goat serum (NGS). The added chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB) became objectifiable through a brown coloration through a chromogen conversion catalyzed by the HRP. The samples were evaluated using a light microscope. As additional evidence of the TRPC6-protein, a Western blot was carried out on skeletonized vessel samples. In order to investigate a possible connection between COVID-19 associated vascular pathologies and the TRPC6 channel, samples from five patients who had died of COVID-19 were included in this work.

### **1.2.3 Results and interpretation**

The systematic evaluation of positive and specific protein detection of the TRPC6-channel by means of IHC shows differences in its expression in the layers of the vessel wall as well as in different vessel sections. The subendothelial stratum in the tunica intima shows clearly localizable and clear protein detection of the TRPC6-channel in only a few of the vascular sections examined. Here reproducible patterns of positive signals could be shown in several samples from the left and right renal artery as well as the aorta. The endothelial cells themselves also show evidence of the TRPC6-channel in some preparations. The tunica media is negative in almost all experiments, which suggests that the TRPC6-channel is not expressed on cells in this layer. An exception to this are the COVID-19 samples, which are the only brown herd in the tunica media. This could indicate that the TRPC6-channel is involved in COVID-19 associated vascular pathologies. The adventitia showed no clear staining pattern in a

comparison between different vessel sections. Only individual structures in the adventitia, such as the vasa vasorum, were positive and reproducible with regard to the immunohistochemical protein detection of TRPC6-channels.

These results suggest a vasoactivity of the TRPC6-channel in the examined vessel sections. In line with current studies, the TRPC6 could thus be involved in processes of nitric oxide (NO) mediated vasodilation, but also proliferation and fibrosis in vascular walls, such as in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). Contrary to the current majority of research opinions, no protein detection of the TRPC6-channel using IHC in the tunica media in human vessels could be carried out. These results suggest that the TRPC6-channel has no influence whatsoever on vasoactive effects mediated by the smooth vascular muscle cells in the tunica media. Studies on this topic relate almost exclusively to animal models or cell cultures, which underlines the value of protein detection in human vessels.

#### **1.2.4 Outlook**

Understanding the pathogenesis of cardiovascular disease is of immense importance due to the high prevalence and mortality of those affected. The possibilities of pharmacological modulation of the TRPC6-channel, which are already known today, could open up important new therapeutic options for certain patient groups in the future. However, further exploration of the TRPC6-channel is essential to identify its tasks and role in pathophysiological processes in human vessels.

## 2 Einleitung und Fragestellung zu TRP-Kanälen

### 2.1 Kalziumkanäle

#### 2.1.1 Lokalisation

Kalziumkanäle sind im Menschen ubiquitär vorkommende, transmembranöse Kanäle. So sind sie bspw. in den Zellmembranen von Endothelzellen [4], glatten Muskelzellen [58] oder in Vasa vasorum [118] zu finden. Ihr Vorkommen bleibt dabei nicht nur auf die Zellmembran beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf Strukturen innerer Zellorganellen und ihrer Abgrenzungen, wie z. B. der Kernhülle [138], dem Mitochondrium [80] oder dem Endoplasmatischen Retikulum [101].

#### 2.1.2 Physiologie

Kalziumkanäle sind essenziell für den Transport von Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) über für diese sonst nicht überwindbaren Membranen. Dadurch können sich Kalziumkonzentrationen zwischen Intra- (niedrige Kalziumkonzentration) und Extrazellularraum (hohe Kalziumkonzentration) aus- bzw. angleichen. Kalziumkanäle können auf verschiedene Arten aktiviert werden. Durch Depolarisation aktivierte Kalziumkanäle beschreibt man als spannungsabhängige Kalziumkanäle, deren Funktion u. a. das Auslösen oder Verlängern von Aktionspotenzialen ist [24]. Im Gegensatz dazu gibt es die ligandenabhängigen Kalziumkanäle, die zur Aktivierung einen direkten Liganden oder einen Second Messenger benötigen. Ihre Funktion erstreckt sich auf Prozesse, wie Genregulation, Zellproliferation, Apoptose oder Enzymkontrolle [149] [13].

In menschlichen Blutgefäßen spielen die L-Typ-Kalziumkanäle als spannungsabhängige Kalziumkanäle eine entscheidende Rolle. Diese führen in glatten Muskelzellen durch eine Erhöhung des Kalzium-Spiegels über eine Signalkaskade zur Vasonkonstriktion [8]. In

Endothelien werden durch einen erhöhten Kalzium-Spiegel physiologische Prozesse der Regeneration gefördert [126] oder die Weitstellung von Gefäßen beeinflusst [94]. Zudem kann eine dauerhaft erhöhte Kalzium-Konzentration die Apoptose einleiten [147]. Diese mannigfaltigen physiologischen Aufgaben bilden die Grundlage zum Verständnis vieler assoziierter pathophysiologischer Mechanismen.

## **2.2 TRP-Kanäle**

### **2.2.1 Entdeckung**

Die Erstbeschreibung von Transient-Rezeptor-Potential-Kanälen (TRP) erfolgte bereits 1969 bei Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila melanogaster*. Durch physiologische Untersuchungen an einer im *trp*-Gen mutierten Fruchtfliege konnte auf einen dauerhaften Lichtreiz ein vorübergehendes (transientes) Rezeptorpotenzial anstatt eines anhaltenden Ruhepotenzials gemessen werden. Daraus erschloss sich eine Bedeutung für das Impulsbildungs- und Impulsleitungssystem der Retina [31]. Zwanzig Jahre später wurde durch die Identifizierung der Gensequenz eine Assoziation mit dem Signalweg über die PLC hergestellt [127]. Darauf basierte im Verlauf eine detaillierte Beschreibung als transmembranöser, lichtsensitiver Kalziumkanal im physiologischen Sehprozess der Fliege [70].

### **2.2.2 TRP-Struktur**

Obwohl die Ähnlichkeit der Primärsequenzen der Aminosäuren zwischen den Kanälen teilweise nur 20 % beträgt, ist der Grundaufbau jedes TRP gleich [125]: Ein TRP besteht aus sechs transmembranösen Segmenten innerhalb einer Zellmembran. Die Transmembransegmente fünf und sechs stellen hierbei die porenformende Domäne dar. Beide



Enden der Aminosäurekette zeigen sich intrazellulär mit einem Amino- ( $\text{NH}_2$ ) und einem Carboxy- ( $\text{COOH}$ ) Terminus [130]. Dieser allgemeine Aufbau ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

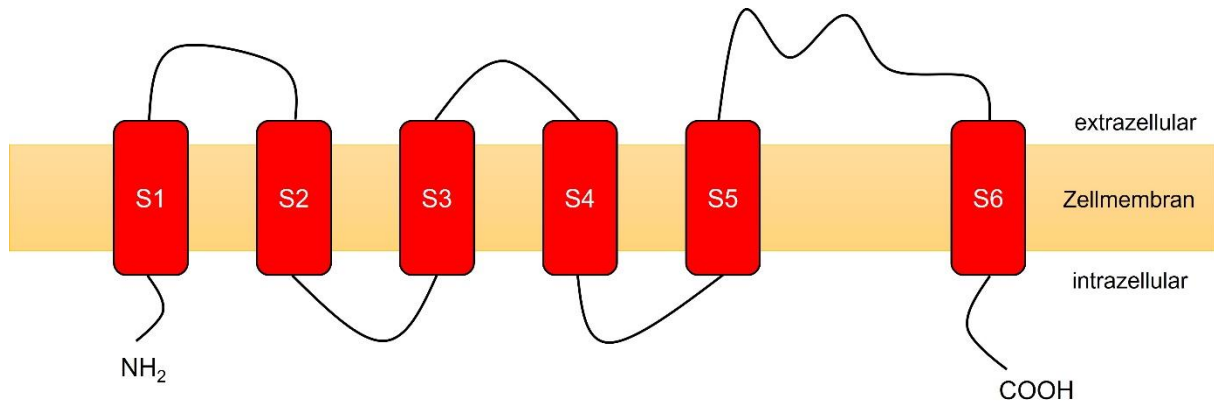


Abbildung 1: Grundstruktur von TRP-Kanälen. Jede rote Figur steht für ein transmembranöses Segment (S). Die schwarzen Kurven bilden die Aminosäurekette ab, welche die Segmente miteinander verbindet.

Vier TRPs bilden dabei als Tetramer einen funktionellen Kanal. Lagern sich vier gleiche TRPs zu einem Kanal zusammen, spricht man von einem Homotetramer. Es können sich auch verschiedene TRPs aus der gleichen oder verschiedenen Untergruppe zusammenlagern, z. B. zwei TRPC3 und zwei TRPC6. In diesem Fall spricht man von einem Heterotetramer, wie Abbildung 2 schematisch darstellt. Heterotetramere besitzen oft vollkommen andere Eigenschaften als Homotetramere [79].

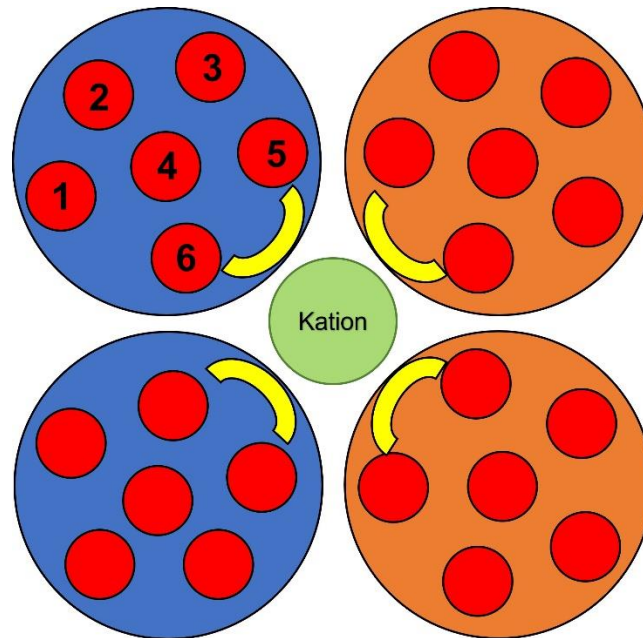


Abbildung 2: Heterotetramerbildung eines funktionellen TRP-Kanals

Jeder große Kreis steht für einen TRP-Kanal, der aus den je sechs roten Transmembransegmenten (1 bis 6) besteht. Als gelber Bogen ist jeweils die porenformende Region zwischen Transmembransegment 5 und 6 dargestellt. Die zwei blauen Kreise stehen für je einen gleichen TRP-Kanal, die orangenen für je einen anderen TRP-Kanal. Mittig ist ein Kation dargestellt.

### 2.2.3 TRP als Kationenkanal

Die TRP-Kanäle werden in fast jedem Zelltyp exprimiert und können als nicht-selektive, kalziumpermeable Kationenkanäle beschrieben werden [140]. Die Permeabilität von Kalzium im Vergleich zu anderen Kationen (meist gemessen an Natrium) hängt maßgeblich von der porenformenden Region im Strukturaufbau des Kanals ab [148]. Dadurch wird ein transmembraner Fluss von Kalziumionen und anderen Kationen entlang ihres elektrochemischen Gradienten ermöglicht und reguliert [133].

Ihre Aktivierungsmöglichkeiten sind polymodal und erfolgen über Reize, wie Temperatur [203], mechanische Stimulation [205], ligandenspezifische Aktivierung [215], oder durch intrazelluläre Signalkaskaden (Second-Messenger) [71].

In ihrer Funktion sind TRPs somit an mannigfaltigen Aufgaben beteiligt, von spezifischen Aktivierungen [27], Membranpotenzialänderung [185] bis zur Aufrechterhaltung der zellulären Kalziumhomöostase [28]. Physiologisch sind nicht immer die gesamte zytosolische Konzentrationserhöhung des Kalziums relevant, sondern auch lokale Änderungen der Konzentration („Kalzium-Spikes“) [29]. Diese lokalisierten Kalzium-Spikes entfalten ihre Wirkung dann über Enzyminduktion [30] oder als Second-Messenger in der Aktivierung anderer Kanäle [31]. Dies verdeutlicht die Relevanz von vielen TRPs im Kalziumhaushalt der Zelle.

#### **2.2.4 Die TRP-Superfamilie**

Die Einteilung in die Superfamilie der TRPs erfolgt heute anhand bestimmter Ähnlichkeiten mit dem Drosophila-TRP, der hier als Leitstruktur dient. TRPs können bei Säugetieren in sieben Subfamilien gegliedert werden, die wiederum in mehrere Untergruppen kategorisiert werden. Die Unterteilung in Subfamilien erfolgt anhand der Proteinhomologie. Spezifische Merkmale am strukturellen Aufbau der Kanäle sind ausschlaggebend für die Nomenklatur der Subfamilien [212]. Die Nummerierung in einer Subfamilie wurde anhand der chronologischen Entdeckung des jeweiligen Kanals vorgenommen. Die Untergruppen ergeben sich aus Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen den Kanälen in den Subfamilien [128]. Diese gängige Einteilung lässt dadurch leider weder auf die Funktion noch die Aktivierungsweise schließen.

## 2.2.5 Die TRP-Subfamilien

### 2.2.5.1 TRPV

Eine Subfamilie sind die TRPV-Kanäle (Vanilloid), die nach dem korrespondierenden Rezeptor, Vanilloidrezeptor-1, benannt wurden. Zu ihnen gehören die TRPV1-V6-Kanäle. Diese werden heute vor allem als thermosensitive Kanäle beschrieben, die durch verschiedene Reize aktiviert werden können [194]. Ein bekannter direkter Ligand des TRPV1-Kanals ist bspw. das Capsaicin [100].

### 2.2.5.2 TRPM

Die TRPM-Kanäle (Melastatin) umfassen eine Aminosäure eines Melastatin-1-Homologon im Aufbau. Ihnen werden die TRPM1-M8-Kanäle zugeordnet, die aufgrund ihrer funktionellen Vielfalt eine zusammenfassende Beschreibung ihrer Aufgabenbereiche nicht zulassen [52]. Vertreter sind z. B. der TRPM1-Kanal, welcher als möglicher prognostischer Faktor bei metastasierten Melanomen von Bedeutung sein könnte [46] sowie der TRPM5-Kanal, der maßgeblich an der Transduktion in Geschmacksrezeptoren beteiligt ist [92].

### 2.2.5.3 TRPML

Die TRPML-Kanäle (Melastatin) beinhalten ein anderes Melastatin-1-Homologon als die TRPM-Kanäle. Der Hauptfunktionsbereich der TRPML-Kanäle beschränkt sich auf physiologische Prozessen von Endosomen [226] und Lysosomen [97]. Sie scheinen nicht in der äußeren Zellmembran vorzukommen [10].

### 2.2.5.4 TRPP

Die TRPP-Kanäle (Polycystin), die auch als Polycystic-kindey-disease (PKD)-protein bekannt sind, sind an der Aufrechterhaltung epithelialer Funktionen involviert [190]. Mutationen dieser Kanäle sind bspw. mit der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) assoziiert [103] [211].

#### 2.2.5.5 TRPA

Die TRPA-Kanäle (Ankyrin) sind nach gehäuften Ankyrin-Repeats in ihrem Aufbau benannt. Sie werden in der Zellmembran von Neuronen des nozizeptiven Systems exprimiert [123]. Dort liegen sie vor allen an den primären Sinneszellen und tragen zur Transduktion chemischer, thermischer und mechanischer Reize bei [106]. Ebenso sind sie bei der Transduktion an Haarzellen involviert, womit sie auch an primären Sinneszellen des auditorischen Systems mitwirken [134].

#### 2.2.5.6 TRPN

TRPN-Kanäle (no mechanoreceptor potential), sind Kanäle, welche von dem zuerst in der Drosophila gefundenem Protein, das „no mechanoreceptor potential c“ (NOMPC) Protein, abgeleitet wurden [177]. Ihr Funktionsgebiet hat diese Subfamilie in Bereichen der Transduktion von mechanischen Reizen. Dies betrifft den Hör-, Tast- und Gleichgewichtssinn, jedoch nur in bestimmten Tierarten, und ist nicht im Menschen nachgewiesen [214].

#### 2.2.5.7 TRPC

Die TRPC- (canonical) Kanal-Subfamilie, erhält ihren Namen aufgrund der großen Ähnlichkeit mit dem Drosophila-TRP-Kanal. Die Nomenklatur ergibt sich hier durch das aus dem lateinisch abgeleiteten Wort für „regelrecht“, „canonicus“. Die Proteinstrukturen gleichen zu ca. 30-40 % dem Drosophila-TRP Kanal. Zu dieser Subfamilie gehören die Kanäle TRPC1-C7 [201]. Da dieser Familie das größte Augenmerk dieser Arbeit zukommt, werden ihre Funktionen und Untergruppierungen gesondert erklärt.

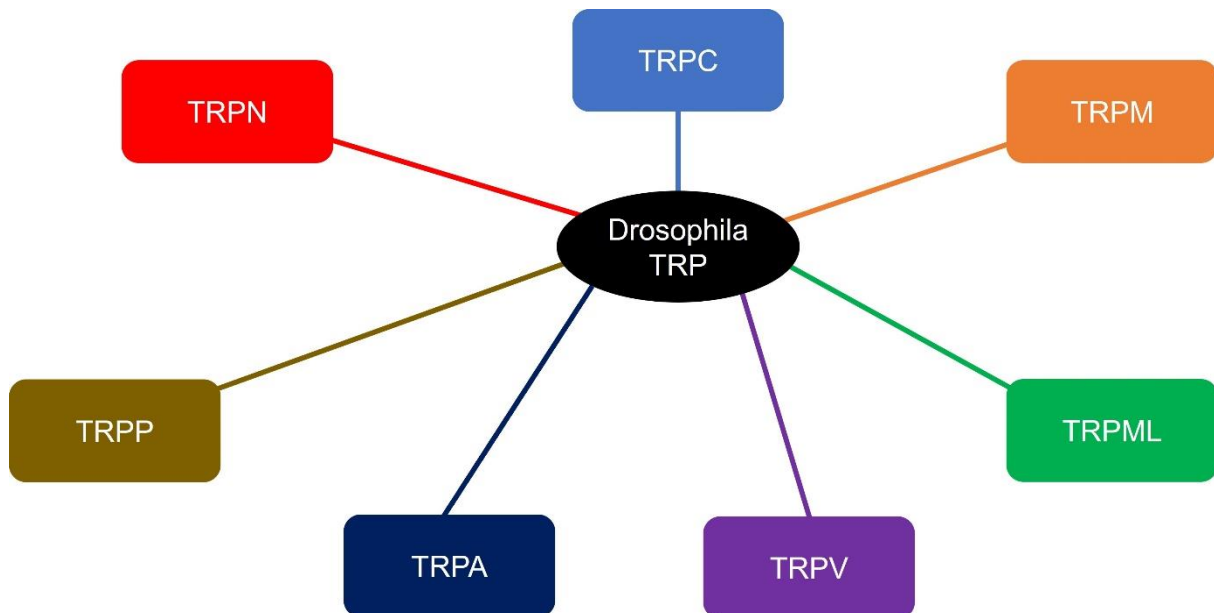


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum von TRP-Kanälen

### 2.2.6 Subfamilie der TRPC-Kanäle

Diese Subfamilie lässt sich in drei Untergruppen unterteilen: TRPC2, TRPC1/4/5, sowie TRPC3/6/7 [183]. Im Allgemeinen sind alle TRPC-Kanäle nichtselektive, kalziumpermeable Kanäle. In dieser Subfamilie können sich Heterotetramere ausbilden, deren Eigenschaften sich nochmals von den Homotetrameren unterscheiden, was die Komplexität deutlich erhöht und die Selektivität von Kalzium im Vergleich mit anderen Kationen beeinflusst [63].

Der TRPC2-Kanal ist in Menschen nachweislich nur als Pseudogen vorhanden. Weitere Forschungen zu diesem Kanal beziehen sich daher ausschließlich auf Tiere [217].

Die Kanäle TRPC1, 4 und 5 werden hier als Untergruppe zusammengefasst, in manchen Literaturen wird der TRPC1-Kanal nochmal gesondert aufgeführt. Strukturell sind der TRPC4- und der TRPC5-Kanal zu ca. 70 % identisch zueinander und zu etwa 64 % mit dem TRPC1 [82]. Dabei wird oftmals das Vorhandensein von intrazellulärem Kalzium und einer PLC-Aktivität vorausgesetzt, um diese Kanäle zu aktivieren [79]. Einzelne Homotetramere lassen

sich auch direkt über DAG aktivieren [169] [145]. Homotetramere TRPC5 haben mit einer neunmal höheren Affinität zu Kalzium im Vergleich mit Natrium die größte Selektivität für Kalzium in der gesamten Subfamilie [151]. Heterotetramere dieser Untergruppe sind essenziell für zentrale neuronale Funktionen, wie z. B. im Bereich des Hippocampus [20].

Die Strukturen der Kanäle TRPC 3, 6 und 7 sind zu rund 70 % identisch [82]. Die Mehrheit der veröffentlichten Ergebnisse deuten auf eine direkte Aktivierung durch Liganden hin [158] [195]. Die höchste Kalziumselektivität von Homotetrameren in dieser Untergruppe im Vergleich mit Natrium hat der TRPC6-Kanal mit einer fünfmal höheren Affinität zu Kalzium [129]. Die TRPC-Kanäle dieser Untergruppe kommen in Zellen des zentralen Nervensystems, des Herzens, der Niere, Lunge, Plazenta und neutrophilen Lymphozyten vor [26].

## **2.3 TRPC6-Kanal**

### **2.3.1 Genaufbau**

Die Entdeckung der DNA für den TRPC6-Kanal erfolgte 1997 aus Mäusehirnen [16]. Das Gen für den humanen TRPC6-Kanal konnte wenig später auf dem Chromosom 11q21-q22 identifiziert werden [41] und wurde u. a. in Geweben von Plazenta, Zentrales Nervensystem und Lunge nachgewiesen [163].

### **2.3.2 Molekulare Struktur**

Die Grundstruktur des TRPC6-Kanals ist identisch mit anderen TRP-Kanälen. Auch hier liegen sechs Transmembransegmente (auch Transmembrandomäne, kurz TMD) vor. Jede TMD besteht aus sechs  $\alpha$ -Helices. Die TMDs sind mit einer durchgehenden Aminosäurekette verbunden. Die Kette endet intrazellulär mit je einem N- und C-terminalen Ende [188]. Viele

Stellen der Aminosäurekette sind flexibel und können Andockstellen für andere Moleküle sein [49]. Der Bereich zwischen der fünften (S5) und sechsten (S6) TMD ist dabei die porenformende Region. Dadurch ist die Aminosäureschleife zwischen S5 und S6 an der Selektivität des Kanals für Kationen beteiligt [107] [11]. Dem TRPC6-Kanal ist es möglich, sich mit dem TRPC3- oder TRPC7-Kanal zusammenzulagern und heterotetramere Funktionseinheiten zu bilden [82].

Die vier Ankyrin-Repeats am N-Terminale-Ende vermitteln Protein-Protein-Reaktionen mit anderen Makromolekülen [153]. Zudem können sie Anbindungen an das Zytoskelett der Zelle herstellen [124]. Sowohl am N- als auch am C-Terminus befinden sich Coiled-Coiled-Regionen, die wichtig für die Zusammensetzung des Kanals in der Quartärstruktur sind (Assemblierung) [196]. Ohne diese ist eine Zusammensetzung als Homo- oder Heterotetramer gestört [56].

Am C-Terminale-Ende folgt auf S6 eine spezifische TRP-Domäne (auch TRP-Box genannt), die etwa sechs Aminosäuren umfasst und deren Funktion bislang unbekannt ist. Sie ist für fast alle TRP-Kanäle spezifisch (Ausnahme: TRPP-Kanäle und TRPA-Kanäle) [191] [108]. Ebenfalls existiert am C-Terminus eine Calmodulin - Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor-Bindungsstelle (CiRB) [44]. Hier können sowohl Calmodulin als auch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) untereinander und bzw. oder mit Kalzium interagieren [187] [27]. Der komplette Aufbau ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.



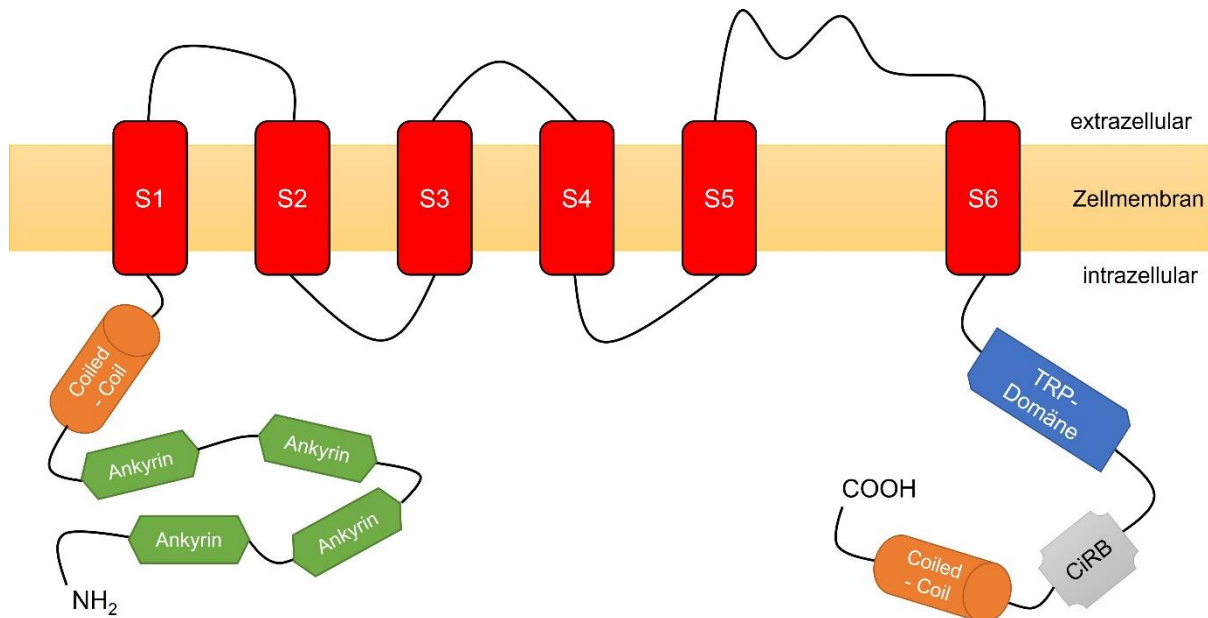


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines TRPC6-Kanals

### 2.3.3 Physiologische Prozesse des TRPC6-Kanals

Der TRPC6-Kanal hat als nicht-selektiver Kationenkanal eine entscheidende Rolle im Kalziumhaushalt. Die Aktivierungsmöglichkeiten des TRPC6-Kanals sind vielseitig und noch Gegenstand aktueller Forschung. Definitiv gesichert ist die Interaktion über den Phospholipase-C-Weg (PLC), welcher den TRPC6-Kanal als receptor-operated-channel klassifiziert. Hierbei wird ein G-Protein durch Ligandenbindung an seinem gekoppelten Rezeptor stimuliert, welches mit seiner Untereinheit ( $G\alpha_{q11}$ ) die PLC aktiviert. Die PLC phosphoryliert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) und spaltet dies in  $IP_3$  und Diacylglycerol (DAG). Das  $IP_3$  kann über einen korrespondierenden  $IP_3$ -Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER) für eine Kalziumfreisetzung sorgen [182]. Das DAG vermag den TRPC6-Kanal direkt zu aktivieren [78] [165]. Darüber hinaus können auch externe DAG-Analoga den TRPC6-Kanal aktivieren, unabhängig von der PLC. Dies ist möglich, solange diese Analoga membrangängig sind und somit ebenfalls intrazellulär am TRPC6-Kanal wirken können, wie z. B. 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) [48] [5].

Die heutige Forschung gibt Hinweise für eine weitere physiologische Aktivierung des Kanals als Store-operated-Channel [109]. Dies beschreibt ein Öffnen des Kanals durch niedrige Speicherzustände von Kalzium im ER. Mittels des Kalziumsensors Stromal interacting molecule (STIM1/2) am ER, kann der TRPC6-Kanal bei niedriger Kalziumkonzentration aktiviert werden [223] [36]. Wie genau dies von statten geht, ist Gegenstand aktueller Forschung [83] [141]. Direkt aktiviert werden z. B. der TRPC4-Kanal und auch der Orai1-Kanal, ein kalziumselektiver Kationenkanal [222] [216]. Eine mögliche Aktivierung des TRPC6-Kanals könnte damit durch Heterotetramerbildung von TRPC6-Kanälen mit TRPC4-Kanälen erfolgen. Dies beschreibt eine indirekte Aktivierung des TRPC6-Kanals durch STIM über TRPC4-Kanäle [222]. Doch auch eine direkte Interaktion von Orai1 mittels Komplexbildung am C-Terminus des TRPC6-Kanals ist in Diskussion [113] [112].

Des Weiteren ist es denkbar, dass intrazelluläre Spiegel von Kalzium und  $IP_3$  die Offenwahrscheinlichkeit des TRPC6-Kanals durch Calmodulin beeinflussen können. Über die CiRB-Region (Calmodulin und  $IP_3$  Rezeptor Bindungsstelle) am C-Terminus kann Calmodulin binden und dieses Bindungsverhalten des Calmodulins wird darüber hinaus durch intrazelluläres Kalzium moduliert. Calmodulin konkurriert dabei mit  $IP_3$  um die gleiche Bindungsstelle am TRPC6-Kanal [17] [96]. Es gibt sogar Hinweise, dass eine direkte Interaktion mit  $PIP_2$  möglich ist. [164] [142]. Schematisch werden in Abbildung 5 verschiedene gesicherte Aktivierungsmöglichkeiten veranschaulicht.

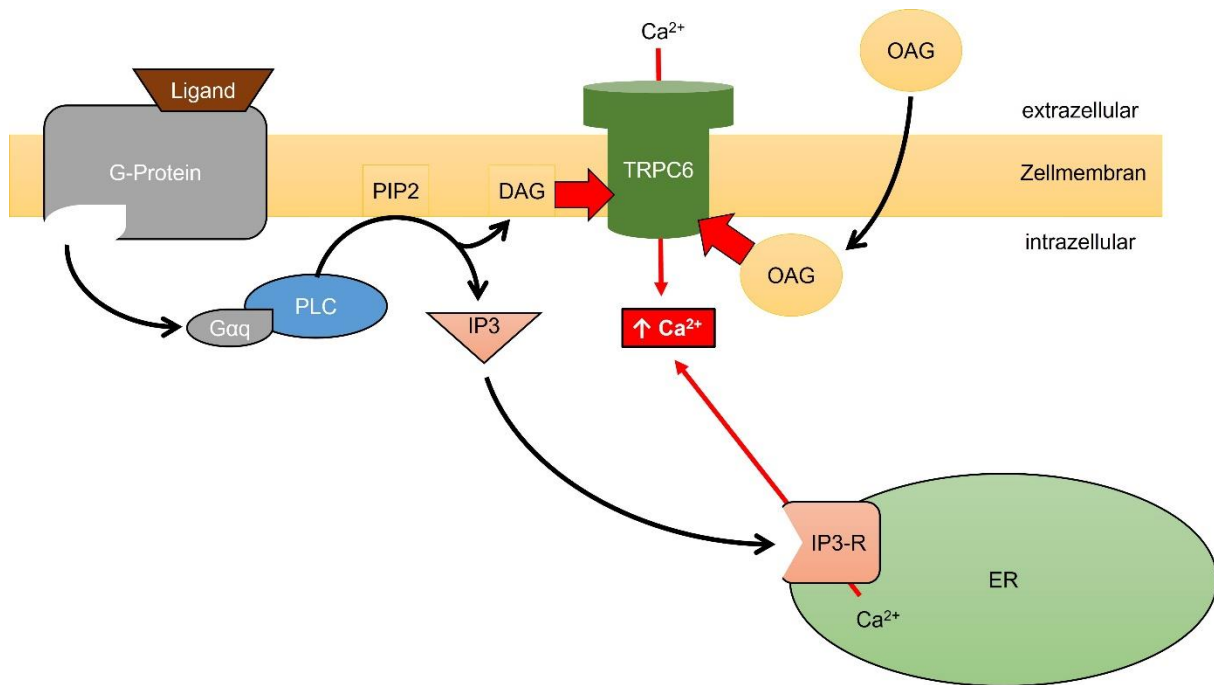


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung eines TRPC6-Kanals

Gezeigt wird die Bindung eines Liganden an einem zugehörigen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Daraufhin lösen sich Untereinheiten des G-Proteins und die  $G_{\alpha q}$ -Untereinheit aktiviert die PLC. Die PLC hydrolysiert  $PIP_2$  zu DAG und  $IP_3$ . Das  $IP_3$  bindet an seinen korrespondierenden Rezeptor auf dem ER und setzt dadurch Kalzium ins Zytoplasma frei. Das DAG aktiviert den TRPC6-Kanal direkt. Unabhängig von dem bisherigen Weg kann das OAG den TRPC6-Kanal ebenfalls direkt aktivieren; dieses muss jedoch zuvor durch die Zellmembran diffundieren muss.

### 2.3.4 Klinische Relevanz im Gefäßsystem

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit [172]. Ihre Entstehungen sind oft polymodal. Das vaskuläre System spielt auch in der Pathophysiologie anderer Entitäten, wie bspw. Schlaganfällen, eine übergeordnete Rolle. Daher ist es wichtig,

alle physiologischen und pathophysiologischen Prozesse zu verstehen. Der TRPC6-Kanal scheint im Bereich der Gefäße dabei eine tragende Rolle zu spielen, wie nachfolgende Beispiele verdeutlichen.

So zeigen Untersuchungen am Mausmodell, dass der TRPC6-Kanal ähnliche Aufgaben wie der  $\alpha$ -Adrenorezeptor hat und wichtig ist für den systemischen Blutdruck ist [85]. Durch den Kalziumeinstrom werden zelluläre Aktionen, wie die Aktivierung der Myosin-leichten-Ketten-Kinase, direkt vermittelt, wodurch es zur Vasokonstriktion kommt [90]. Durch den generellen Kationeneinstrom können weitere spannungsabhängige Kanäle aktiviert werden [144].

Der physiologische Bayliss-Effekt (auch myogene Autoregulation genannt) beschreibt eine Vasokonstriktion, ausgelöst durch einen erhöhten Blutdruck [1]. Dabei messen mechanosensible Kationenkanäle eine Druckerhöhung im jeweiligen Gefäßabschnitt und lösen eine Vasokonstriktion aus. Hierdurch wird der Strömungswiderstand erhöht und eine konstante Durchblutung im nachfolgendem Versorgungsgebiet sichergestellt. Dieser Mechanismus ist essenziell für die konstante Durchblutung des Gehirns und der Niere, welche teilweise auf eine exakte Durchblutung angewiesen sind. An Mausmodellen konnte dem TRPC6-Kanal eine tragende Rolle am Bayliss-Effekt zugeordnet werden [204] [208]. Auch pathophysiologisch konnte bei Ratten mit ischämischem Schlaganfall ein verbessertes Outcome gezeigt werden, wenn eine Aktivierung des TRPC6-Kanals vorlag [45]. Dies deutet auf eine wichtige Rolle bei der Weitstellung von Gefäßen durch den TRPC6-Kanal hin.

Die hypoxische Vasokonstriktion (auch Euler-Liljestrand-Reflex) beschreibt eine physiologische Reaktion, bei der minder ventilierte Anteile der Lunge konsekutiv minder perfundiert werden. Dies bewirkt, dass das Kapillarbett von Alveolen welche nicht ventiliert werden direkt durch arteriovenöse Anastomosen in Lungenvenen ablaufen. Dieser Mechanismus verhindert somit unnötige Durchblutung von Arealen, in denen durch minder Ventilation der Alveolen kein Gasaustausch stattfinden würde. Dabei erhöht sich auch der

Druck im pulmonalen Stromgebiet [202]. Ein wichtiger Bestandteil dieses Mechanismus ist der TRPC6-Kanal [54] [179].

Fibroblasten in Gefäßen sind wichtiger Bestandteil für die Wundheilung im vaskulären System [32]. TRPC6-Kanäle sind in der Lage diese Fibroblasten zu aktivieren und eine Fibroblastendifferenzierung zu initiieren um Wundheilungsprozesse zu fördern [33] [192]. TRPC6-Kanäle werden aufgrund dieses Mechanismus mit der Entstehung von sklerotischen und proliferativen Veränderungen an Gefäßen assoziiert und rücken auch deswegen in das Interesse wissenschaftlicher Studien [230] [111]. Der TRPC6-Kanal scheint mit morphologischen Gefäßveränderungen und kardiovaskulärem Remodeling sowie Restenosen nach Stentimplantation in Verbindung zu stehen [232] [50].

### **2.3.5 Assoziierte Krankheiten**

Dass die physiologischen Prozesse des TRPC6-Kanals eine relevante Bedeutung im menschlichen Körper haben können, zeigen die assoziierten Krankheitsbilder bei pathologisch veränderten TRPC6-Kanälen. Da es sich um einen Ionenkanal handelt, werden Krankheiten, die mit dem TRPC6-Kanal assoziiert sind, den Kanalopathien zugeordnet.

Als eine ätiologische Ursache der Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) konnte der TRPC6-Kanal identifiziert werden. Die FSGS ist eine Erkrankung des Nephrons. Ein Untergang von Podozyten und Podozytenfortsätzen führt konsekutiv zu einer fehlerhaften Schlitzmembran. Hieraus ergibt sich eine Filterfunktionsstörung, die mit einem nephrotischen Syndrom einhergeht [35]. Diese Erkrankung endet oft innerhalb von 10 Jahren nach Erstdiagnose in einer terminaler Niereninsuffizienz. 20 % aller Dialysepatienten sind mit FSGS diagnostiziert [206] [9]. Eine Mutation im TRPC6-Gen der Podozyten führt zu einer molekularen Veränderung am ersten Ankyrin Repeat. Dabei wird angenommen, dass es

hierdurch zu einer Überfunktion (auch „gain-of-function“) des Kanals kommt, was einen dauerhaft erhöhten Kalziumspiegel zur Folge hat, der eine Apoptose auslöst [210] [132] [55]. Eine weitere Möglichkeit ist eine Mutation in der Coiled-Coil-Region. Hierbei kann Calmodulin auch im mit Kalzium beladenem Zustand an den TRPC6-Kanal binden und diesen aktivieren, wodurch ein negatives Feedback des hohen Kalziumspiegels auf den TRPC6-Kanal nicht mehr möglich ist [154].

Ebenfalls liegen Hinweise vor, dass der TRPC6-Kanal an der Entstehung der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) beteiligt ist. Bei einer pulmonalarteriellen Hypertonie handelt es sich definitionsgemäß um einen chronisch erhöhten pulmonalarteriellen Mitteldruck in Ruhe von  $\geq 25$  mmHg, bei der es zum Rechtsherzversagen kommen kann. Pathophysiologisch sind u. a. eine Proliferation der Gefäßwände und der Mikroumgebung mit konsekutiver Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßsystem relevant [170]. Bei IPAH Patienten konnte eine erhöhte Expression des TRPC6-Kanals in Lungengefäßen nachgewiesen werden, was für die Entstehung der Krankheit mitverantwortlich sein könnte [220] [219]. Zudem spielen Entzündungen in der Genese der IPAH eine wichtige Rolle [73] [168]. Bei einigen IPAH Patienten konnten Genvariationen des TRPC6-Kanals nachgewiesen werden, die spezielle Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B in der Promoterregion besitzen und somit die Expression von TRPC6-Kanälen durch inflammatorische Prozesse erhöhen [221] [120]. Speziell für die IPAH zeigen Forschungsergebnisse eine Behandlungsmöglichkeit durch Modellierung des TRPC6-Kanals, was seine Rolle in der Entstehung der Erkrankung nochmals hervorhebt [88].

Darüber hinaus ist eine Beteiligung an der Pathogenese atherosklerotischer Veränderungen in Gefäßen naheliegend. Dies würde einen möglichen Einfluss des TRPC6-Kanals auf viele daraus resultierende Krankheitsbilder, wie bspw. arterieller Hypertonie, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder koronarer Herzkrankheit (KHK), bedeuten [135].

Diese Entitäten legen nahe, dass TRPC6-Kanäle in exprimierten Geweben an der Entstehung von Krankheiten im Menschen beteiligt sind.

In verschiedenen Modellen konnte die pharmakologische Beeinflussbarkeit des TRPC6-Kanals nachgewiesen werden. So kann er durch Hyperforin (Wirkstoff des Johanniskrautes) oder OAG agonisiert werden [110]. Antagonisiert werden kann er durch Larixylacetat [199], das physiologische Hormon ANP (atriales natriuretisches Peptid) [95] oder den oral verfügbaren Inhibitor BI-749327 (BI = bioavailable) [114]. Diese genannten und weitere Beispiele unterstreichen die klinische Bedeutung der TRPC6-Kanäle als möglichen pharmakologischen Angriffspunkt in der Therapie vaskulärer Erkrankungen [198] [119] [180]. Eine tiefere Forschung bezüglich des TRPC6-Kanals in humanem Gewebe ist daher unerlässlich.

### **2.3.6 Nachweis in humanem Gewebe**

Derzeit ist die Forschung bezüglich des Nachweises des TRPC6-Kanals in humanem Gewebe sehr lückenhaft. Die hauptsächliche Annahme des Vorhandenseins und der Lokalisation in Gefäßen beruht auf dem Nachweis in Tiermodellen von Ratten und Mäusen [167] [91]. Diese Modelle liefern gute Hinweise, sind aber nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Ebenso bezieht sich der Großteil der Forschung physiologischer Aufgaben des TRPC6-Kanals auf tierisches Gewebe oder isolierte humane Zellen [2] [42]. Direkte Nachweise des Kanals in humanen Geweben sind rar vorhanden. Jedoch lassen uns diese Erkenntnisse über die Lokalisation der Kanäle völlig im Unklaren [59]. Histologische Nachweise des TRPC6-Kanals in menschlichen Gefäßen sind bisher nur sehr vereinzelt publiziert und nicht reproduziert worden [218]. Grundvoraussetzung für die zukünftige Forschung ist daher eine systematische, histologische Untersuchung an menschlichen Präparaten. Aufgrund der ethischen Fragen und geringen Verfügbarkeit von menschlichen Körperspenden ist die Forschung der Funktion von TRPC6-Kanälen im menschlichen Körper sehr eingeschränkt möglich und mit viel

Zeitaufwand verbunden. Daher soll diese Arbeit eine Grundlage in der Forschung zu TRPC6-Kanälen darstellen.

## **2.4 Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19)**

Die Infektionen mit COVID-19 haben sich zu einer allumgreifenden Pandemie entwickelt. Die virale Erkrankung ist aktuell alltagsbestimmend und erweckt weit über die Fachwelt hinaus ein großes Interesse. Hierbei handelt es sich primär um eine Viruserkrankung durch Coronaviren, die als infektiöse Lungenerkrankung ein akutes respiratorisches Syndrom (ARDS) auslösen kann [28] [231] [159]. Mittlerweile ist sie jedoch als Multiorganerkrankung anzusehen und so können eine Vielzahl von Organen von dem Virus befallen werden, so auch das kardiovaskuläre System [57] [122].

Klinisch ergeben sich Hinweise darauf, dass COVID-19 eine Vaskulitis auslösen kann [121] [23] [84]. Zudem zeigt sich ein thrombogener Einfluss auf die Hämostase. Die Thrombenbildung beruht wahrscheinlich auf einer Endothelschädigung mit konsekutiven Mikrozirkulationsstörungen [150] [209] [156] [74]. Nach aktuellen Erkenntnissen wird die Endothelschädigung durch einen Zytokinsturm vermittelt und beeinflusst bereits bestehende kardiovaskuläre Vorerkrankungen negativ [173] [176] [155].

Die Untersuchungen postmortaler Befunde sollen Klarheit über die Auswirkungen des Virus auf das Gefäßsystem bringen. Studien von an COVID-19 verstorbenen Patienten mit Bezug zu Gefäßpathologien stehen noch am Anfang und müssen weiter fortgeführt werden, liefern jedoch erste Ergebnisse [69] [184] [162] [75]. Daher sollen in dieser Arbeit Gefäßproben von Patienten, die an COVID-19 verstorben sind, mittels immunhistochemischer Färbung mit anderen Gefäßproben verglichen werden. Dafür sollen systematisch erste Daten erfasst werden, um einen Beitrag zur aktuellen Forschung zu leisten.



## 2.5 Fragestellung

1. Lässt sich der TRPC6-Kanals in Gefäßen mittels Immunhistochemischer Färbung nachweisen?
2. Gibt es einen Unterschied in dem Nachweis zwischen verschiedenen Gefäßabschnitten?
3. Gibt es einen Unterschied in dem Nachweis zwischen den einzelnen Gefäßwandschichten?
4. Gibt es einen Unterschied zwischen Gefäßproben von non-COVID-Körperspendern im Vergleich zu COVID-Körperspendern?

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Materialliste

#### 3.1.1 Antikörper

Name	Firma
primärer TRPC6-Antikörper	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Isreal
sekundärer Anitkörper: HRP goat anti rabbit	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Kaninchenserum	Von einem unbehandelten Kaninchen (freundlich überlassen von Prof. Dr. Martin Jung, Biochemie, Homburg an der Saar)
Kontrollpeptid TRPC6-Antigene	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper	Ref.: A5441; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
sekundärer Antikörper: goat anti-rabbit-Antikörper mit konjugierter HRP	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA

*Tabelle 1: Verwendete Antikörper*

#### 3.1.2 Chemikalien

Name	Firma / Zusammensetzung
Polyethylenglycol (NEP)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

Formaldehyd-Lösung zur Fixierung	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	Ref.: 27244; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol 100 %ig	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Xylol	VWR International, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Methylbenzoat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraffin-Pallets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Ref.: 1105.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Ger
histologischer Klebstoff	Roti-Histokitt©, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer pH6	Ref.: ab93678; Abcam AG, Cambridge, Großbritannien
Blockierlösung: Normal-Goat-Serum (NGS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Wasserstoffperoxid 35 %ig	Ref.: UN2014; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Ref.: 7411-49-6; Vector Laboratories Inc.; Burlingame, USA
Lysepuffer Complete:RIPA im Verhältnis 1:25	Roche, Mannheim, Deutschland
Laemmlipuffer	3,125 mM TRIS-HCl pH 6,8, 50 % Glycerol, 25 % 2-Mercaptoethanol, 10 % SDS =sodium dodecyl sulfate, 0,005 % Bromphenolblau, pH 8,3
SDS-Page	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinmarker	Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
SDS-Stopp-Puffer	125mM Trisaminomethanpuffer, 2mM EDTA, 20 % Glycerol, 9 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, pH 6,8
Towbin Transferpuffer (0,025 M TRIS-Base, 1,92 M Glycin, 20 % Methanol, pH ca. 8,3)	Advansta Inc., San Jose, Vereinigte Staaten
TBST-Milch, 5 % non-fat milk	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chemilumineszens Substrat	Western Bright Quantum, Advansta Inc., San Jose, Vereinigte Staaten
Strippingpuffer	Advansta Inc., San Jose, Vereinigte Staaten

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

### 3.1.3 Materialien

Foliensarg	Pharaopack Europe, Wuppertal, Deutschland
Einbettkassetten	Ref.: M512; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Einbettring	Ref: M460; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Mikrotomklinge	DB80, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
silanisierte Objektträger	Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland
Deckglässchen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
DakoPen©	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
96-Well-Titerplatte	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare Systema, Chicago, Vereinigte Staaten
Whatman-Papier	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

*Tabelle 3: Verwendete Materialien*

### 3.1.4 Gerätschaften

Kühlanlage der Körperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Karussell-Gewebeeinbettter	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffinguss-Gerätes mit integrierter Kälteplatte	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Mikrotom	Ref.: RM2025, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH
Paraffinstreckbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwede, Deutschland
Wärmeplatte	Kunz Instruments, Sandelsgatan, Schweden
Inkubator	VWR International, Pennsylvania, USA
Wärmeschrank	Ref: 51014550; Thermo Fisher Scientific Incorporation, Massachusetts, USA
Gewebemühle	Pre Cellys; Peclab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge	
Blottig-Vorrichtung	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
Detektor	ChemiDoc System XRS, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bildaufnahme-Software (für Western Blot)	Image Lab Software, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland

Bildbearbeitungs-Software (für Western Blot)	Adobe Photoshop CS4, Adobe, San Jose, Vereinigte Staaten
Lichtmikroskop: Leica	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bildaufnahme-Software (für Immunhistochemie)	Ref.: TC Capture; Tucson Photonics Co. Limited; Tucson, USA

*Tabelle 4: Verwendete Geräte*

## 3.2 Übersicht zu den Abläufen

Nach Erhalt der Körperspende wurde diese fixiert und die Probenentnahme erfolgte wenige Tage darauf. Die fixierten Proben wurden in Paraffin eingebettet und am Mikrotom in dünnen Schnittserien auf Objektträgern fixiert. Diese Schnitte wurden zuerst einer HE-Färbung unterzogen, um die Qualität der einzelnen Proben zu beurteilen. Zum spezifischen Nachweis von TRPC6-Kanälen im Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen der Proben angefertigt. Darüber hinaus wurde mittels Western-Blot der Nachweis des TRPC6-Proteins im Gewebe bestätigt.

## 3.3 Arbeit mit Körperspendern

### 3.3.1 Umgang mit Körperspendern

Alle Mitarbeitenden im Institut sind sehr dankbar für die Entscheidung von Menschen, ihren Körper zweckgebunden zu spenden. Daher ist ein reflektierter und würdevoller Umgang mit den Körperspenden oberstes Gebot. Die Körperspenden wurden nach ihrem Ableben dem Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes gespendet und anschließend fixiert. Die

Proben wurden von mir aus erster Hand entnommen. Die Studie erfolgte nach einem Ethik-Votum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Antragsnummer: 162/20.

Die Proben der Corona-Körperspender wurden post mortem vom Pathologischen Institut der Universität des Saarlandes für diese Studie entnommen. Das Ethik-Votum der ständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes erfolgte hierzu unter der Antragsnummer: 130/21.

Zur größeren Transparenz sind die Körperspender mit Geschlecht, Sterbealter, Todesursache und jeweiliger Vorerkrankung in Tabelle 5 für die non-COVID-Spender und Tabelle 6 für die COVID-Spender dargelegt.

### **3.3.2 Fixierung der Körperspender**

Nach der Einlieferung der Körperspende in das Institut wurde diese zunächst fixiert. Dadurch konnte eine Verlangsamung der physiologischen Zerlegungs- und Fäulnisprozesse erreicht werden. Bis zur Fixierung vergingen maximal 72 Stunden post mortem. Vor Beginn der eigentlichen Fixierung wurden die Körperspenden vollständig entkleidet, gewogen und einer Rasur von Kopf- und Körperbehaarung unterzogen. Zur Identifikation der einzelnen Körperspenden wurden diese mit extern angebrachte Identifikationsnummern versehen.

Art und Stärke der Fixierung erfolgten nach den Standards des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes. Zur Fixierung der Körperspenden wurde Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglycol (NEP) nach Weigner [207] verwendet. Die Fixierung erfolgte in zwei Schritten: Zur inneren Fixierung wurden mittels großlumiger Venenkanülen die Vasa femoralia punktiert und per Arterienklemme fixiert. Über die Kanülen wurden zwischen 10 und 15 Liter der Fixierlösungen mit einem Druck zwischen 110 und 150mmHg injiziert. Die genaue Menge



der eingelaufenen Fixierlösung konnte mittels Waage errechnet und protokolliert werden. Nachinjektionen wurden in jeder Extremität sowie der Regio glutealis, der Finger- und der Zehenbeeren mittels Einmalkanüle (18G) eingebracht. Bei der anschließenden äußeren Fixierung, bei der die Fixierlösung per Osmose transdermal eindringt, wurde die Körperspende bei unter 15°C in dem Fixiermittel für wenige Tage gelagert.

Stichprobenartig wurden auch höherkonzentrierte formaldehydfixierte Körperspenden bearbeitet. Hierbei handelte es sich bei der Fixierung um die „neue Basler Lösung nach Kurz“. Die Methode unterscheidet sich nur in der äußeren Fixierung von der oben beschriebenen Fixation nach Weigner. In der Fixation nach Kurz wurden die Spender für mindestens vier Monate in dem Fixationsmittel gelagert. Danach erfolgte die Aufbewahrung in einem luft- und wasserdichten verschweißten Foliensarg in der Kühlanlage bei unter 15°C.

## 3.3.3 Liste der Körperspender „non-COVID“

Proband	1	2	3	4	5
Sterbealter	90	89	84	78	70
Geschlecht	weibl.	männl.	männl.	weibl.	weibl.
Todesursache lt. Totenschein	Demenz als Folge arterieller Hypertonie und tiefer Beinvenenthrombose	dekompensiertes Herzversagen aufgrund Herzinsuffizienz und KHK	Herz-Kreislauf-Stillstand aufgrund Herzschwäche	respiratorische Insuffizienz	plötzlicher Herztod
Begleiterkrankungen		Diabetes Mellitus	Z. n. STEMI; Atherosklerose; KHK	Nikotinabusus	Z. n. Myokardinfarkt; arterielle Hypertonie; Angiosklerose; M. Raynaud
Besonderheiten bei Entnahme		starke atherosklerotische Veränderungen an der Aorta, nicht direkt an der Entnahmestelle	teilweise atherosklerotische Veränderungen der Entnahmestellen; fehlen der A. radialis dextra	Stent der abdominal Aorta	Stent der Aorta abdominalis mit Bifurcatio aortae

Proband	6	7	8	9
Sterbealter	69	76	64	57
Geschlecht	männl.	weibl.	weibl.	weibl.
Todesursache lt. Totenschein	Tumorblutung aufgrund Tumoringfiltration des intrahepatischen Pfortadersystems durch CUP-Syndrom	respiratorische Insuffizienz aufgrund Aspiration	V. a. Herzrhythmusstörung aufgrund Hyperthyreose	Zentrale Atemlähmung aufgrund fortgeschrittenem M. Parkinson
Begleiterkrankungen	Peritoneale Kanzerose; inkomplette tiefe Querschnittslähmung metastase bedingt; Knochenmetastasen	Locked-in-Syndrom; Meningeom	M. Basedow; M. Crohn; Leberzirrhose	M. Parkinson
Besonderheiten bei Entnahme				

Tabelle 5: Liste der non-COVID-Spender

## 3.3.4 Liste der Körperspender COVID

Proband	C1	C2	C3	C4	C5
Sterbealter	90	74	73	87	61
Geschlecht	männl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.
Todesursache lt. Totenschein	Asphyxie aufgrund Pneumonie durch SARS-COV2	Bronchial-Karzinom und zerebrale Metastasen	Infektiös-toxisches Herzkreislaufversagen bei superinfizierter Covid-19 Pneumonie mit Lungenarterienembolie und Lungenblutung links	dekompensierte Herzinsuffizienz NYHA IV	Hypoxisches Herzkreislaufversagen bei Z. n. ECMO-Dislokation bei bakterieller Superinfektion bei Z. n. Covid-19-Pneumonie
Begleiterkrankungen	Herzinsuffizienz	COPD; Diabetes Mellitus, Herzinsuffizienz, Multiples Organversagen	Bronchialkarzinom; Diabetische Nephropathie	KHK-2-Gefäßerkrankung; Z. n. Mamma-Karzinom	Herzinsuffizienz

Tabelle 6: Liste COVID-Körperspender

### 3.4 Probenauswahl

Die Probenauswahl erfolgte unter Berücksichtigung der verschiedenen histologischen Besonderheiten der Gefäße sowie der möglichen klinischen Relevanz des betreffenden Blutgefäßes wie in Tabelle 7 zusammengefasst. Schlussendlich wurden 14 Gefäße ausgewählt. Schematisch wurden die häufigsten Entnahmestellen in Abbildung 6 dargestellt.

Nr.	Gefäß	Standard -Entnahmeort	Auswahl des Gefäßabschnitts
1	Arteria renalis dextra	mindestens 2 cm vom Abgang aus der Aorta entfernt	physiologischer Bayliss-Effekt in Mäusen [204]; möglicherweise pathophysiologische Beteiligung an Nierenarterienstenose (NAST) [43] ; Seitenvergleich
2	Arteria renalis sinistra	mindestens 2 cm vom Abgang aus der Aorta entfernt	physiologischer Bayliss-Effekt in Mäusen [204]; möglicherweise pathophysiologische Beteiligung an Nierenarterienstenose (NAST) [43]; Seitenvergleich
3	Arteria thoracica interna dextra	im dritten Intercostalraum	Graft für einen koronaren Bypass mit höherer Offenheitsrate als A. radialis [14]; Seitenvergleich
4	Arteria thoracica interna sinistra	im dritten Intercostalraum	Graft für einen koronaren Bypass mit höherer Offenheitsrate als A. radialis [14]; Seitenvergleich
5	Arteria radialis dextra	2 cm proximal der Höhe des Processus styloideus radii	Graft für einen koronaren Bypass [40][3]; stichprobenartiger Seitenvergleich; Arterie vom muskulären Typ mit mittlerem Druck

6	Aorta (abdominal oder thorakal)	2 cm proximal der Aortenbifurkation, bzw. Aorta ascendens	Arterie vom Übergangs-Typ mit hohem Druck, bzw. Arterie vom elastischen Typ mit hohem Druck
7	Vena cava inferior	paarig zum Entnahmeort der Aorta abdominalis	Vene mit positivem Druck und Venenklappen
8	Vena jugularis interna sinistra	Vagina carotica, auf Höhe des Larynx	Vene mit negativem Druck ohne Venenklappen
9	Truncus pulmonalis	2 cm distal der Valva trunci pulmonalis	Herznahe Arterie mit mittlerem Druck; Nachgewiesene Proteinsequenz [32]
10	Ramus interventricularis anterior	mittleres Drittel, beginnend nach Abgang Ramus circumflexus	Koronararterie, die häufig von Stenosierungen betroffen ist
11	Arteria iliaca communis sinistra	2 cm distal der Bifurcatio aortae	Arterie vom muskulären Typ mit mittlerem Druck
12	Sinus caroticus dextra	kompletter Sinus caroticus	Arterie vom muskulären Typ mit mittlerem Druck; Glomuszellen als Baro- und Chemorezeptoren
13	Vena cava superior	zwischen dem Zusammenschluss der Trunci brachiocephalicae und Einmündung in Atrium dextrum	Vene mit negativem Druck, ohne Venenklappen

14	Arteria carotis communis dextra	ventral des M. sternocleidomastoideus, in der Vagina carotica	Arterie vom muskulären Typ mit hohem Druck
----	------------------------------------	---	---

Tabelle 7: Probenauswahl und Entnahmeorte

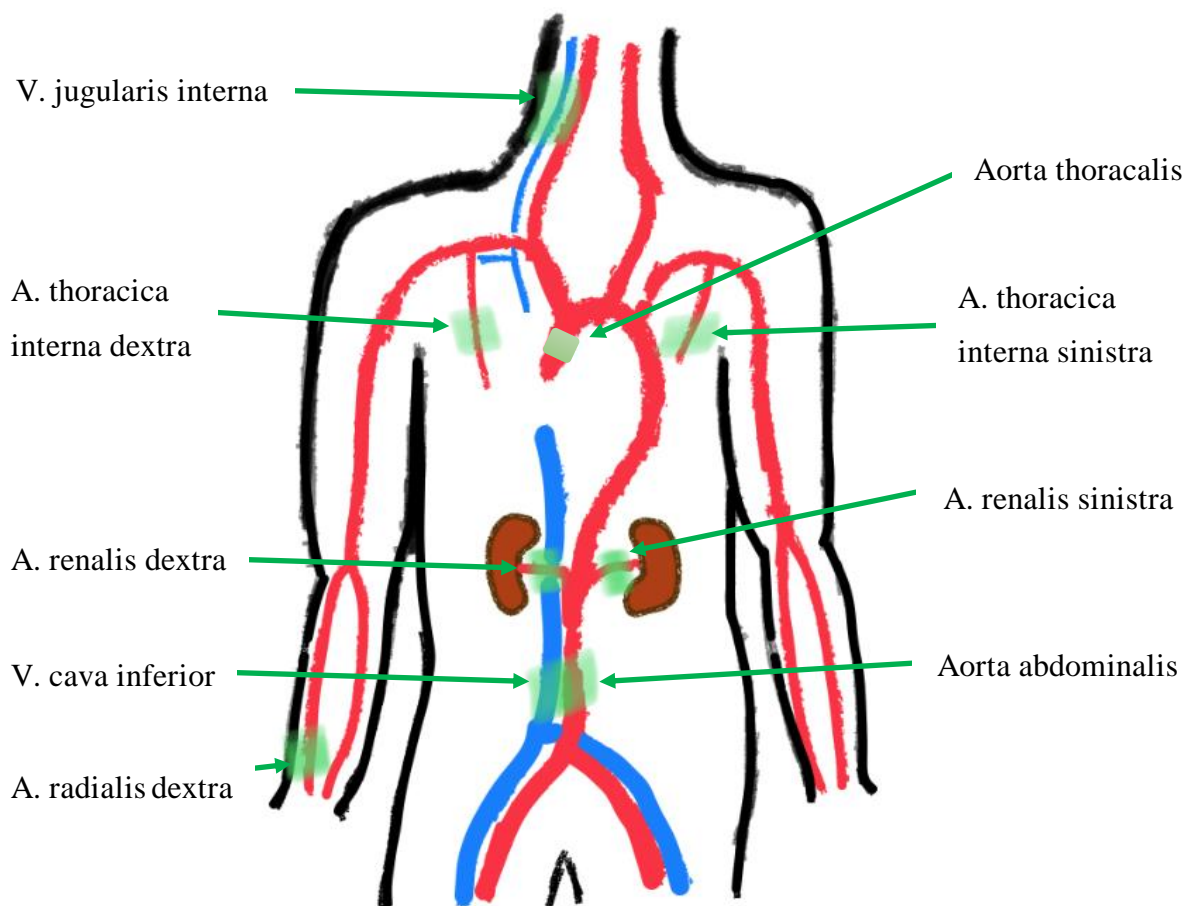


Abbildung 6: Schematisch dargestellte Beispiele für die häufigsten Entnahmeorte

Arterien sind rot und Venen blau markiert. In Grün ist der Entnahmeort eingezeichnet.

Abgebildet sind die häufigsten Entnahmeorte der Gefäße. In Braun stellen sich die Nieren dar.

### 3.5 Probengewinnung

Die Entnahme der intra- und retroperitoneal gelegenen Gefäße erfolgte durch eine mediane Laparotomie. Nach Durchtrennung des Omentum majus und Orientierung am Darmkonvolut des Dünndarms wurde die Arteria mesenterica inferior identifiziert. Im weiteren Verlauf der Arterie erfolgte die Darstellung der proximal gelegenen Aorta abdominalis sowie der kaudal gelegenen Aortenbifurkation. Anschließend konnten die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior zwei Zentimeter oberhalb der Aortenbifurkation entnommen werden. Diese wurden als ganze Gefäße auf einer Länge von ca. 1,5 cm entnommen.

Anschließend wurde dem Verlauf der Aorta folgend weiter proximal die Arteria mesenterica superior aufgesucht. Hier erfolgte die Darstellung der Aorta in Gänze sowie die Identifikation der Aa. renales. Dem Verlauf der Nierenarterien folgend, wurden die Aufteilungen der einzelnen Segmentarterien der Niere sowie das Organ als Ganzes dargestellt. Die Aa. renales in einer Länge von 1 cm wurden mindestens 2 cm vom Abgang aus der Aorta entnommen.

Für die Entnahme der Aa. thoracicae wurde der dritte Intercostalraum gefenstert (eine Präparationstechnik, bei der man die Muskeln zwischen der dritten und vierten Rippe sowie des Sternums absetzt) und im Block reseziert. In der entnommenen Gewebeprobe erfolgte die weitere Darstellung und Entnahme der Gefäße.

Die in der Regio cervicalis anterior befindlichen Gefäße wurden durch eine Inzision entlang des ventralen Randes des Musculus sternocleidomastoideus erreicht. Hier konnte ventral die Vagina carotica dargestellt und eröffnet werden. Nach Präparation der Arteria carotis communis sinistra und Vena jugularis interna sinistra konnte letztere in Gänze entnommen werden. Davon wurde ein Quader in der Größe von 1,2 cm x 1,2 cm präpariert.

Zur Entnahme der Arteria radialis dextra wurde zunächst eine laterale Inzision bis auf den Radius durchgeführt. Anschließend erfolgte nach proximal die Darstellung des Musculus



brachioradialis und nach distal der Abgang der Arteria radialis dextra in die Foveola radialis. Der Processus styloideus radii wurde als Landmarke ertastet und die Arteria radialis dextra zwei Zentimeter unterhalb der Höhe des Processus styloideus radii entnommen. Hier wurde 1 cm des Gefäßes entnommen. Die Entnahme der Arteria radialis sinistra erfolgte nach dem gleichen Prinzip auf der kontralateralen Seite.

Zur Entnahme der sich im Thoraxsitus befindlichen Proben wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt. Dies geschah durch eine mediale Inzision von der Fossa jugularis bis zum Processus xiphoideus. Davon ausgehend wurde Gewebe nach lateral vom Sternum abgesetzt und mit der Knochensäge das Sternum mittig durchtrennt. Durch Einsetzen eines Rippenspreizers konnte ein guter Zugang zum Thoraxsitus etabliert werden. Die Pleura visceralis wurde stumpf von der Pleura parietalis getrennt, um die Lungen besser in der jeweilige Pleurahöhle mobilisieren zu können und dadurch das Mediastinum deutlicher darzustellen. Zunächst wurde die Vena brachiocephalica sinistra im oberen Mediastinum dargestellt. Dieser nach rechts folgend stieß man auf die Vereinigung beider Vv. brachiocephalicae. Kaudal der Vv. brachiocephalicae wurde die Vena cava superior identifiziert und wenige Zentimeter weiter kaudal die Einmündung in das Atrium dextrum. Augenscheinlich mittig zwischen diesen beiden Landmarken wurde die Vena cava superior in Gänze entnommen.

Zur Entnahme des ganzen Herzens erfolgte das Absetzen der Aa. und Vv. pulmonales sowie der Aorta am Übergang zum Arcus aortae. Danach wurde das Pericardium fibrosum durch eine kleine Inzision an der aortalen Umschlagsfalte von Pericardium fibrosum und Pericardium serosum Lamina parietalis eröffnet. Mit einer Schere wurde der Schnitt Richtung Apex cordis erweitert. Jetzt konnte stumpf das Herz mit seinem Pericardium serosum lamina visceralis, an der Facies diaphragmatica mobilisiert werden. Nach Ertasten der Umschlagsstellen zwischen Lamina parietalis und visceralis des Pericardium serosum wurden auch diese durchtrennt. Nach

Anheben des Herzens von der Facies diaphragmatica nach kranial konnte die Vena cava inferior abgesetzt werden und das Herz in toto entnommen werden.

Der Truncus pulmonalis wurde 2 cm distal der tastbaren Valva trunci pulmonalis mit einem Scherenschnitt entnommen. Für die Entnahme des Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde zunächst der Abgang der Arteria coronaria sinistra dargestellt, welche durch sondieren des Ostium Arteria coronaria sinistra ausgemacht wurde. Dadurch konnten die Koronarien schnell aus dem umliegenden Fettgewebe herauspräpariert werden. Zur Orientierung wurde der Abgang des Ramus circumflexus aus der A. coronaria sinistra bestimmt und die nach ventral verlaufende Struktur konnte als der Ramus interventricularis anterior identifiziert werden. Aus dem in voller Länge sichtbaren RIVA wurde das mittlere Drittel entnommen.

Für die Stichprobe der Vena basilica sinistra wurde die Vena mediana cubiti sinistra dargestellt. Von dieser ausgehend konnte zwischen der lateral verlaufenden Vena cephalica sinistra und der medial gelegenen Vena basilica sinistra differenziert werden. Anschließend wurde die Vena basilica sinistra bis zum Hiatus basilicus verfolgt und dort entnommen.

Die Stichprobe der Arteria iliaca communis sinistra wurde 2 cm distal der Aortenbifurkation entnommen. Zur Darstellung dieser siehe oben. Die Entnahme der Stichproben der Arteria carotis communis dextra, Vena jugularis interna dextra und des Sinus caroticus dextra erfolgten nach demselben Prinzip wie der Entnahme der Vena jugularis interna sinistra.

Alle Proben wurden direkt nach der Entnahme und Präparation für 24 Stunden in 4 %iger Formaldehydlösung immersionsfixiert. Die Formaldehydlösung wurde danach durch eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), in der die Proben weitere 24 Stunden zur Waschung belassen wurden, ausgetauscht. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 6,5°C. Jede weitere entnommene Struktur wurde dem Spender wieder anatomisch korrekt eingesetzt und im Anschluss alle Inzisionen vernäht.

### 3.6 Einbettung der Proben in Paraffin

Zur histologischen Begutachtung wurden die Proben zunächst in Paraffin eingebettet, um diese später am Mikrotom zu schneiden und auf Objektträger aufbringen zu können. Hierzu wurde jede einzelne Probe in eine dafür vorgesehene Einbettkassette gelegt und mit dieser bis zur Bearbeitung aller Proben in einer 70 % ige Isopropanol-Lösung belassen. Anschließend wurden sie in einem Wasserbad aus Leitungswasser für 15 Minuten sprudelnd gewaschen.

Der Wasserentzug und das Entfetten erfolgte über einen Karussell-Gewebeeinbettter mittels automatisierter Verweildauer in den einzelnen Lösungen. Zuerst erfolgte eine Dehydrierung und Entfettung über eine aufsteigenden Alkoholreihe mittels Isopropanol. Das Isopropanol wurde durch das Paraffin verdrängt. Damit lagen die Proben entwässert, entfettet und komplett mit Paraffin durchtränkt zur Weiterverarbeitung vor [166].

Die Einbettkassetten mit den darin befindlichen Proben wurden dafür in einen Korb an dem Karussell befestigt. Die gesamte Dauer des Prozesses betrug 17 Stunden und 30 Minuten. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über alle Stationen mit jeweiliger Verweildauer im Karussell.

Nr.	Lösungsmittel	Verweildauer
1	Isopropanol 70 %ig	3 h 00 Min
2	Isopropanol 80 %ig	1 h 30 Min
3	Isopropanol 90 %ig	1 h 30 Min
4	Isopropanol 100 %ig	1 h 30 Min
5	Isopropanol 100 %ig	1 h 30 Min
6	Methylbenzoat	1 h 30 Min
7	Methylbenzoat	1 h 30 Min

8	Methylbenzoat	1 h 30 Min
9	Paraffin (flüssig)	2 h 00 Min
10	Paraffin (flüssig)	2 h 00 Min

*Tabelle 8: Ablauf der Einbettung*

Nach der Dehydratation befanden sich die Proben in flüssigem Paraffin zur Durchtränkung. Die Proben wurden einzeln entnommen, aus der Kassette entfernt und mittels eines Paraffingussgerätes in Paraffinblöcke gegossen. Hierzu wurde zunächst der Boden mit flüssigem Paraffin bedeckt und die Proben anschließend dort so fixiert, dass sie möglichst lumenseitig zum Boden zeigten. Durch kurze Verweildauer auf einer Kälteplatte blieb das Präparat in der Fixierung. Anschließend wurde ein Einbettring über die Gussform gelegt und mit flüssigem Paraffin aufgegossen. Daraufhin wurde die Gussform zum Aushärten des Materials auf die Kälteplatte gegeben. Nach der Aushärtung konnte der Block der Gussform entnommen werden. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte in Eisenschränken knapp unterhalb der Raumtemperatur.

### **3.7 Anfertigung von Mikrotomschnitten**

Zum Anfertigen der Schnitte wurde ein manuelles Mikrotom benutzt. In dieses wurden die Paraffinblöcke durch den Einbettring am Mikrotom eingespannt. Die Schnitte erfolgten durch eine spezielle Klinge in sieben Mikrometer dicken Schnittfolgen. Die einzelnen Schnitte wurden für wenige Minuten in ein Paraffinstreckbad mit 37 °C warmen, destilliertem Wasser überführt.

Hiernach erfolgte die Fixierung der Proben auf Objektträger aus dem Wasserbad. Die Objektträger mit den darauf befindlichen Proben trockneten für circa einer halben Stunde auf einer Wärmeplatte, bevor sie anschließend für 12 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C

vollständig antrockneten. Die Aufbewahrung der Objektträger im weiteren Verlauf erfolgte licht- und staubgeschützt bei Raumtemperatur.

## **3.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

### **3.8.1 Versuchsaufbau**

Die HE-Färbung nach Ehrlich ist ein etabliertes Verfahren zur Darstellung verschiedener Zellbestandteile. Mit dem Hämatoxylin werden negativ geladenen Strukturen (basophile) blau angefärbt. Durch das Eosin ist eine Färbung positiv geladener Strukturen (azidophil) in Rottönen anfärbt [117]. Für die Färbung wurden nicht silanisierte Objektträger benutzt. Mit HE gefärbte Präparate lassen eine gute Beurteilung über die intakte Morphologie der Probe zu.

### **3.8.2 Versuchsdurchführung**

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der Präparate mittels Xylollösung sowie eine Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe. Hierbei verweilten die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol, für zweimal fünf Minuten in 100 %iger und jeweils einmal für fünf Minuten in 90 %iger und 80 %iger Isopropanol-Lösung. Daraufhin wurden die Proben für acht Minuten in Hämatoxylin getaucht. Danach erfolgte eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser, um überschüssige Farbe zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Proben unter laufendem Leitungswasser gebläut.

Nach dem Bläuen wurden die Präparate erneut für 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült. Darauffolgend wurden die Proben für zweieinhalb Minuten in Eosin (Eosin + zwei Tropfen 0,1 %ige Essigsäure) gebadet. Anschließend wuschen die Proben kurz in 90 %igem Isopropanol aus. Schlussendlich erfolgte eine Rehydrierung der Proben durch eine absteigende Alkoholreihe (umgekehrt wie oben beschrieben), sowie Xylol.

Abschließend wurden die Proben mittels Deckgläschens und speziellem Klebstoff eingedeckt. Unter einem Abzug trockneten die fertigen Objektträger für mindestens 12 Stunden und lagerten in Kästen bei Raumtemperatur.

Tabelle 9 zeigt den Ablauf des Färbeverfahrens mit den jeweiligen Zeiten noch einmal vereinfacht.

Nr.	Lösung	Verweildauer
1	Xylol	05 Min 00 Sek
2	Xylol	05 Min 00 Sek
3	Xylol	05 Min 00 Sek
4	Isopropanol 100 %ig	05 Min 00 Sek
5	Isopropanol 100 %ig	05 Min 00 Sek
6	Isopropanol 90 %ig	05 Min 00 Sek
7	Isopropanol 80 %ig	05 Min 00 Sek
8	Hämatoxylin nach Ehrlich	08 Min 00Sek
9	destilliertes Wasser	kurz
10	Leitungswasser	12 Min 00Sek
11	destilliertes Wasser	00 Min 30 Sek
12	Eosin-Lösung	02 Min 30 Sek
13	Isopropanol 90 %ig	05 Min 00 Sek
14	Isopropanol 100 %ig	05 Min 00 Sek
15	Isopropanol 100 %ig	05 Min 00 Sek
16	Xylol	05 Min 00 Sek
17	Xylol	05 Min 00 Sek
18	Xylol	05 Min 00 Sek

*Tabelle 9: Ablauf der HE-Färbung*

Anschließend wurden die Proben mikroskopisch auf intakte Integrität und morphologische Veränderungen untersucht. Dies ist Voraussetzung für eine Immunhistochemische Färbung.

## **3.9 Immunhistochemische Färbung**

### **3.9.1 Versuchsaufbau**

Die IHC ist eine immunhistochemische Methode, die dem Nachweis spezifischer Gewebsantigene dient. Zur Markierung des gesuchten Antigens wird ein primärer Antikörper, welcher spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, mit dem Gewebe inkubiert, in welchem die gesuchte Struktur erwartet wird. Nach Abwaschen des Primärantikörpers wird die Probe mit einem Sekundärantikörper inkubiert, dessen Fab-Teil spezifisch gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist. An dem Fc-Teil des sekundären Antikörpers befindet sich ein Enzym (HRP = Meerrettich-Peroxidase), welches Chromogene als Substrat in eine sichtbare Färbung umschlagen lässt. Das Zusammenspiel von verschiedenen Antikörpern und der HRP mit dem Chromogen, DAB, ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Dieses Verfahren wird auch als indirekte IHC bezeichnet.

Zur Darstellung von TRPC6-Kanälen wurde als Zielstruktur bei der IHC ein intrazellulär am N-Terminus des S1-Segmentes liegendes Peptid ausgewählt. Es dient als Epitop für den primären Antikörper [81] und besteht aus den Aminosäuren 24-38 des TRPC6-Gens. Die Qualität des Antikörpers wurde in dieser Versuchsreihe der IHC nochmals mittels eines Kontrollpeptids bestätigt. Dieses bindet in der Vorinkubation mit dem primären Antikörper gegen TRPC6-Kanäle an den Fab-Teil einiger Antikörper. Dadurch wird weniger TRPC6-Kanal auf dem Präparat selbst gebunden und es werden mehr Antikörper in den nachfolgenden Schritten abgewaschen. Hierdurch sollte ein im Vergleich zur nicht mit Kontrollpeptid vorinkubierten Probe eine schwächere Färbung durch DAB entstehen.

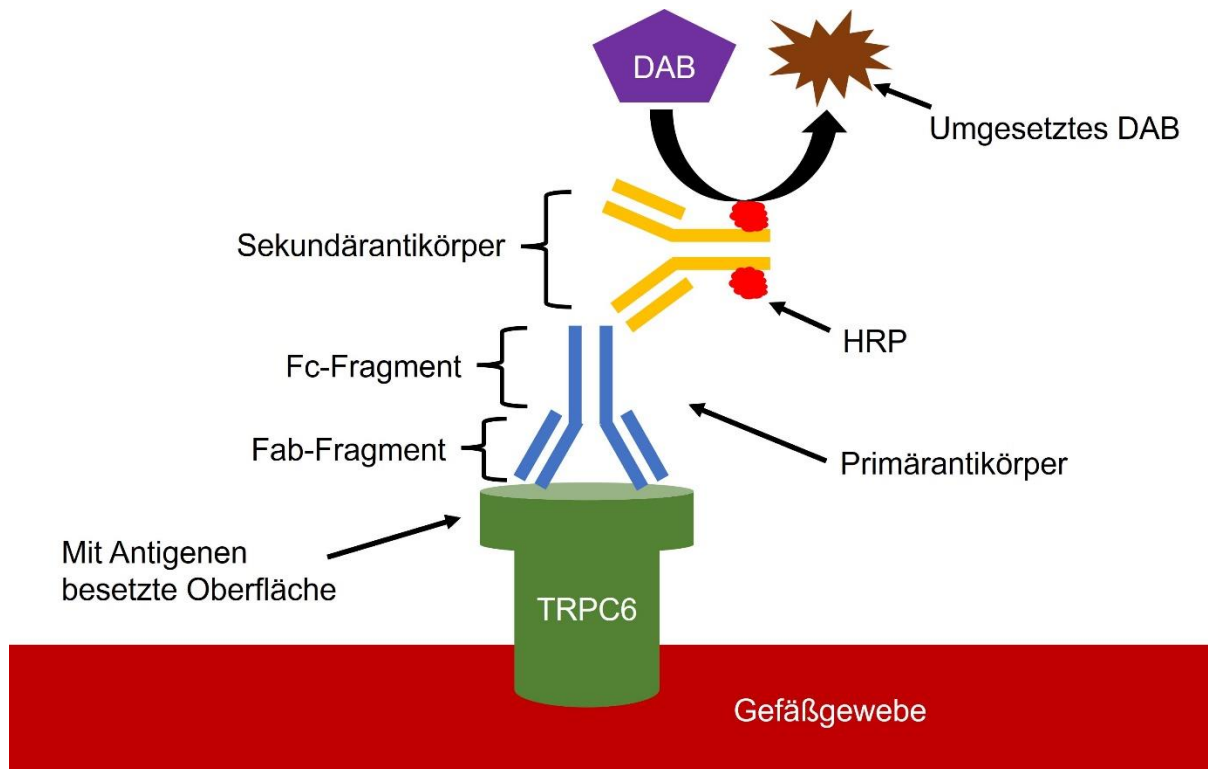


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer indirekten IHC-Färbung

### 3.9.2 Versuchsvorbereitung

In einer Färbeserie (einer kompletten Versuchsdurchführung) konnten zehn silanierte Objektträger bearbeitet werden. Die unterschiedlichen Gewebeproben wurden mit je einem Vergleichspräparat (Gewebe, in dem TRPC6-Kanäle mittels IHC nachgewiesen wurde als Positivkontrollschnitt) aus Herzgewebe (Atrium, Ventrikel, Ventrikelseptum) gefärbt. Zudem wurde für jede Gewebeart nochmals eine eigene Negativkontrolle (Gefäße und Herz) zur Überprüfung des Färbungserfolges angefertigt.

Zunächst wurde die zur Antigendemaskierung benötigte 1 %ige Citratpufferlösung angesetzt. Hierfür wurden 5ml des Citratpuffers mit 495 ml destilliertem Wasser verdünnt und in einem Wärmeschrank auf 95°C erhitzt. Zur Vorbereitung der Feuchtekkammer wurde diese mit nassen Papiertüchern ausgelegt und verschlossen. Zur Blockade unspezifischer Antigene wurde



vorgefertigtes 10 %iges (0,1 % Triton x100, 89,9 % PBS) normal-goat-serum (NGS) angewendet. Für die Negativkontrolle wurde Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:500 benutzt. Die 1:50 mit PBS vorverdünnte Stocklösung wurde mit 24.950 µl PBS weiter verdünnt, um so eine effektive Verdünnung von 1:500 zu erreichen. Der primäre Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 benutzt. Hierzu wurde jener zunächst mit NGS 1:50 vorverdünnt. Dafür wurden 4 µl Primärantikörpers mit 196 µl NGS verdünnt, um ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erreichen. 200 µl des 1:50 vorverdünnten primären Antikörpers wurden dann mit weiteren 200 µl 10 %iger NGS Blockierlösung weiter verdünnt.

Zur Herstellung einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung wurden 8,57 ml der Ausgangslösung mit 91,43 ml destilliertem Wasser verdünnt. Zur Verdünnung des Sekundärantikörpers musste das Ausgangsubstrat 1:500 verdünnt werden. Zur einfacheren Handhabung erfolgte die Verdünnung in zwei Schritten. Zunächst wurden 20 µl des Sekundärantikörpers mit 980 µl NGS-Blockierlösung vermischt, um so eine Verdünnung von 1:50 zu erreichen. Darauffolgend wurden 100 µl der Lösung mit 900 µl NGS verdünnt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Das zur Färbung eingesetzte Chromogen, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), besteht aus zwei Substraten, welche kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt wurden.

Zur Qualitätskontrolle mittels eines Kontrollpeptids wurden 40 µg des Peptids mit 20 µl PBS aufgelöst und anschließend mit 40 µl 1:100 verdünntem TRPC6-Primärantikörper über Nacht bei 7 °C inkubiert.

### **3.9.3 Versuchsdurchführung**

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der Präparate mittels Xylollösung sowie eine Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe. Hierbei verweilten die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol, für zweimal fünf Minuten in 100 %iger und jeweils einmal für

fünf Minuten in 90 %iger, 80 %iger und 70 %iger Isopropanol-Lösung. Anschließend wurden die Objektträger zur Spülung fünf Minuten in destilliertem Wasser belassen. Danach erfolgte eine Inkubation der Proben für 60 Minuten bei 95°C in 1 %igem Citratpuffer. Nach Ablauf der Inkubationszeit kühlten die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur ab und wurden für eine Minute in PBS gespült. Um die Objektträger schnell und grob zu trocknen, wurden diese der Küvette entnommen und mit der Hand kräftig abgeklopft. Mit einem hydrophoben Fettstift konnten die Proben lückenlos umrandet und in die Feuchtekammer gelegt werden. Auf die Proben wurde die fertige 10 %ige NGS-Lösung pipettiert und damit für eine Stunde in der Feuchtekammer inkubiert. Nach Ablauf der einen Stunde wurden die Objektträger der Feuchtekammer entnommen und das NGS wurde von den Schnitten geklopft. Auf die als Negativkontrollen vorgesehenen Proben wurde die Kaninchenserumlösung pipettiert; die restlichen Proben wurden mit Primärantikörpern inkubiert (oder mit der Kontrollpeptidlösung). Die Proteinkonzentration des Kaninchenserums ist in der genutzten Verdünnung die Gleiche wie bei der Lösung des primären Antikörpers. Die Feuchtekammer wurde verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur mit der jeweiligen Lösung inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben zwei Mal für je zwei Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Wasserstoffperoxidlösung auf jeden Objektträger pipettiert und für 10 Minuten in der neu vorbereiteten Feuchtekammer inkubiert. Hiernach wurden die Proben zwei mal zwei Minuten in PBS gewaschen. Nun erfolgte eine einstündige Inkubation der Proben mit dem Sekundärantikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte eine Waschung in PBS wie oben beschrieben. Unter Mikroskopiekontrolle wurde die fertig angesetzte DAB-Lösung auf je einen Schnitt pro Gewebe pipettiert und die Färbung unter dem Mikroskop verfolgt. Die Zeiterfassung erfolgte mittels Stoppuhr. Die Reaktion des DAB mit der am Sekundärantikörper befindlichen Peroxidase wurde mit Eintauchen in PBS gestoppt, sobald mikroskopisch eine deutliche Braunfärbung registrierbar war. Die Inkubationszeiten wurden in jeder Färbeserie für

alle Proben des gleichen Gewebes eingehalten, konnten jedoch von Färbeserie zu Färbeserie variieren und wurden für jede Serie neu erfasst. Der zeitliche Rahmen der Inkubation lag zwischen acht und 15 Minuten. Zur Gegenfärbung wurde die Küvette entnommen und eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde die Küvette für eine Sekunde in Hämatoxylinlösung nach Ehrlich (gefiltert) getaucht und anschließend für fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Nach Abschluss des Bläuens erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit jeweils fünf Minuten in 70 %igem, 80 %igem, 90 %igem und zweimal fünf Minuten in 100 %igem Isopropanol. Danach wurden die Proben drei Mal je fünf Minuten in Xylol gebadet. Im letzten Schritt wurden die Proben mittels Roti-Histokitts und einem Deckglas eingedeckt. Über Nacht verweilten die Proben zur Aushärtung unter einem Abzug.

## **3.10 Western-Blot**

### **3.10.1 Versuchsaufbau**

Bei einem Western-Blot handelt es sich um ein etabliertes biochemisches Verfahren zum Nachweis von Proteinstrukturen, bei dem man Proteine durch eine Gelelektrophorese nach Größe voneinander trennen kann und auf einem Sammelgel auffängt. Über das Blotten werden die getrennten Proteine auf ein Medium gebracht, mit dem man Antikörperfärbungen zum spezifischen Proteinnachweis durchführen kann. Die einzelnen Banden der in der Gelelektrophorese gelaufenen Proteine werden mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) photometrisch sichtbar und können anhand des Vergleichs mit einer Kontrollbahn abgelesen werden.

Zur Darstellung von TRPC6-Kanälen wurde als Zielstruktur bei dem WB der gleiche primäre Antikörper wie bei der oben beschriebenen IHC verwendet, der sich nachweislich auch für eine

WB-Analyse eignet [228]. Die Qualität des Antikörpers wurde in dieser Versuchsreihe auch für den WB nochmal mittels Kontrollpeptids bestätigt. Die Ladekontrolle erfolgte mit Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper.

### **3.10.2 Versuchsvorbereitung**

Für den Versuch wurde die Aorta ascendens aus der gleichen Lokalisation wie für die IHC verwendet. Das Probenmaterial wurde nativ (aus einem unfixiertem Körperspender) entnommen und ohne Medium in einem Eppendorfgefäß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für zwei Wochen aufbewahrt. Das post mortem Intervall betrug weniger als 48 Stunden. Vorbereitend taute das Gewebe, auf Eis liegend, für eine Stunde lang auf und wurde mit Lysepuffer (Complete:RIPA im Verhältnis 1:25) bedeckt. Mittels mechanischer Lyse durch eine Gewebemühle homogenisierten die Proben mit dem Lysepuffer. Durch anschließende Zentrifugation mit 12.000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  entstand ein flüssiger Überstand in Abgrenzung zu restlichen Bestandteilen. Der Überstand der Flüssigkeit wurde in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert und im Verhältnis 1:15 erneut mit Lysepuffer verdünnt ( $2\ \mu\text{l}$  Überstand +  $28\ \mu\text{l}$  1:25 Complete/RIPA). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in dem Überstand, wurde der etablierte Bradford-Test angewendet [30]. Bei der Kalibrierung wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 (CBBG) versetztes BSA (bovine serum albumin) verwendet und zusammen mit dem Überstand in 96-Well-Titerplatte pipettiert. Die photometrische Messung zur Proteinbestimmung erfolgte mit Pierce 660 nm, einer auf Bicinchoninsäure (BCA) beruhender kolorimetrischer Lösung. Zum Angleichen der Proteinkonzentrationen wurde die benötigte Zugabe von weiterem Lysepuffer und  $20\ \mu\text{l}$  Laemmlipuffer (3,125 mM TRIS-HCl pH 6,8, 50 % Glycerol, 25 % 2-Mercaptoethanol, 10 % SDS =sodium dodecyl sulfate, 0,005 % Bromphenolblau, pH 8,3) berechnet, sodass bei einem Endvolumen von  $100\ \mu\text{l}$  eine Endkonzentration an Proteinen von  $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  erreicht wurde. Die

Lösungen wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und für fünf Minuten bei 95 °C mit 300 Umdrehungen pro Minute nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol zentrifugiert und anschließend eingefroren.

### **3.10.3 Versuchsdurchführung**

Die Gelelektrophorese mittels gegossener SDS-Page (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde in eine mit Laemmli-Puffer gefüllte Wanne versenkt, so dass die Taschen mit Puffer vollliefen. Danach wurde ein Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichts (Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) in die erste Tasche gefüllt; die anderen wurden entweder mit den Proben Lysaten oder SDS-Stopp-Puffern (125 mM Trisaminomethanpuffer, 2mM EDTA, 20 % Glycerol, 9 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, pH 6,8) beladen. Daraufhin wurde eine Spannung von 250 Volt und einer Stromstärke von 50 Milliampere für 60 Minuten angesetzt. Als die Lauffront das untere Ende des Gels (Sammelgel) in Richtung Anode erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel entnommen. Das Sammelgel wurden abgeschnitten und äquilibrierte für 10 Minuten in Towbin Transferpuffer (0,025 M TRIS-Base, 1,92 M Glycin, 20 % Methanol, pH ca. 8,3).

Für das Blotten wurden vorbereitend sechs Lagen Whatman-Papier und eine Nitrozellulose-Membran auf das Sammelgel zugeschnitten und in Transferpuffer eingelegt. Auf die untere Platte (Anode) der Blottig-Vorrichtung (Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland) wurden drei Lagen Whatman-Papier gelegt und darauf die Nitrozellulose-Membran. Auf diese Membran wurde dann der Gelausschnitt und dann weitere drei Lagen Whatman-Papier gelegt. Die obere Platte (Kathode) wurde nach Anfeuchten mit Transferpuffer aufgesetzt und ein Strom mit einer Spannung von 10 Volt bei 54 Milliampere Stromstärke für 40 Minuten angelegt. Augenscheinlich war zu betrachten, ob die Kontrollmarker auf die Nitrozellulose-Membran übertragen wurden. Die Nitrozellulose-Membran wurde für 30

Minuten zum Blockieren in TBST-Milch (TRIS-buffered Saline + 0,005 % Tween20) belassen und anschließend über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem 1:200 verdünnten primären TRPC6-Antikörper (1,5 ml 1:50 TRPC6-AK + 4,5 ml TBST-Milch) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in TBST-Milch 1:7.000 verdünntem Sekundärantikörper für 90 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Nun wurde die Membran erneut für 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen und bis zur Entwicklung darin belassen. Zur Entwicklung wurde die Membran für fünf Minuten mit dem Chemilumineszenz Substrat inkubiert. Daraufhin erfolgte die Erkennung der photometrischen Signale mit einem Detektor und die Umwandlung dieser in Bilder mit anschließender Bildbearbeitung.

Die Entfernung der Antikörper von der Membran erfolgte durch fünfminütiges Waschen in bidestilliertem Wasser und fünfminütiges Verweilen in Strippingpuffer. Daraufhin wurde die Membran für 3 x 5 Minuten in 5 %igem TBST-Milchpulver gewaschen. Zur Ladekontrolle wurde Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper 1:1.000 in 1 %iger TBST-Milch bei 4 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag 3 x 5 Minuten mit der Membran gewaschen. Die folgende Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus HRP 1:7.000 verdünnt mit 1 %iger TBST-Milch) dauerte 90 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt erfolgte eine Waschung für 3 x 5 Minuten in TBST und die Entwicklung nach dem selben Schema wie in diesem Kapitel bereits erklärt.

## 3.11 Auswertung

### 3.11.1 Auswertung IHC

Im Rahmen der IHC soll eine spezifische Färbung nachgewiesen werden, welche sich signifikant von der Negativkontrolle oder eventueller Hintergrundfärbung darstellt. Zur histologischen Auswertung wurden die IHC-gefärbten Proben mit einem Fotomikroskop doppelblind von zwei histologisch Fachkundigen nach selben Schema ausgewertet.

Ein Kriterium der Auswertung ist die Qualität der Braunfärbung durch das DAB, bezogen auf die Abgrenzbarkeit zur Negativkontrolle bzw. zur Hintergrundfärbung. Positiv bedeutet hier eine gute bzw. signifikante Abgrenzbarkeit und negativ keine Abgrenzbarkeit zur Negativkontrolle. Hierbei gibt es Abstufungen von deutlich positiv [++], signifikant positiv [+], fraglich positiv [?] bis zu negativen [0] TRPC6-Kanal Nachweisen, wie Tabelle 10 zusammenfasst.

Bewertete Qualität	Bedeutung
[++]	deutlich positiv
[+]	positiv
[?]	fraglich positiv
[0]	negativ

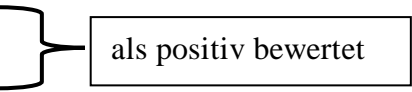


Tabelle 10: Auswertungsschema

Die Proben wurden anhand des histologischen Aufbaus eines Gefäßes in Tunica intima, Tunica media und Adventitia gegliedert. Jedes Kompartiment wurde gesondert betrachtet und die jeweilige Qualität des Signals beurteilt. Inhalte der Tunica intima sind das Stratum endotheliale

(Endothel), Stratum subendotheliale (Subendothel) und die Membrana elastica interna (M. e. i.) als Abgrenzung zur Tunica media. Die Tunica media beinhaltet das Stratum musculare und die Membrana elastica externa (M. e. e.) als Abgrenzung zur Adventitia. Die Adventitia beinhaltet umliegendes Bindegewebe, ggfs. mit Nerven, kleinen Gefäßen zur Selbstversorgung (Vasa vasorum) oder anderen Zellarten. Diese Landmarken sind zweckdienlich zur Beschreibung der Ergebnisse, wie Tabelle 11 aufzeigt.

Lokalisation	Inbegriffene Strukturen
Tunica intima	Endothel + Subendothel + Membrana elastica interna
Tunica media	Muscularis + Membrana elastica externa
Adventitia	umliegendes Bindegewebe + Vasa vasorum + periphere Nerven

*Tabelle 11: Übersicht der Inhalte einzelner Gefäßwandschichten*

Die Färbung und Auswertung der Proben erfolgte nach einem Kreuzschema. Hierbei wurden zum einen möglichst viele Gefäßabschnitte aus einem Körperspender beurteilt. Zum anderen wurden möglichst viele Nierenarterien und Aorten aus allen zu Verfügung stehenden Körperspendern genutzt.

Abbildung 8 stellt ein Beispiel für Verbildlichung dieser Strukturen dar. Zudem sind die histologischen Landmarken beschriftet, an denen sich in der Auswertung orientiert wurde. Dies dient vorab als Überblick für die groben Größenverhältnisse und zum vertraut machen mit den unterschiedlichen Erscheinungsmöglichkeiten von Strukturen und vor allem als Hilfestellung für nachfolgende Erklärungen.



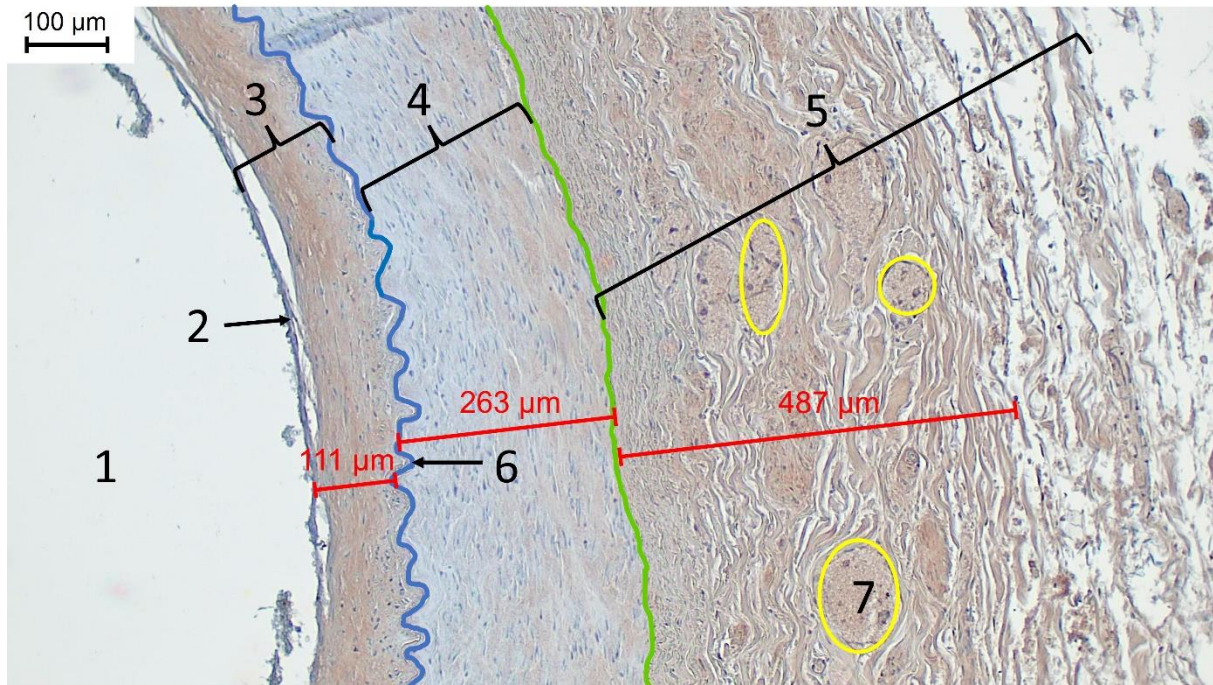


Abbildung 8: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia, 6 und blaue Linie = Membrana elastica interna, 7 und gelbe Kreise = Vasa Vasorum, grüne Linie = Membrana elastica externa) Dies ist eine zehnfache Vergrößerung. Die 1 markiert hier das Lumen, in diesem findet der eigentliche Blutfluss statt. Die 2 weist auf das Endothel. Dies ist Teil der Tunica intima und löst sich häufig bei Fixierungsprozessen als einzelne dünne Schicht Richtung Lumen ab. Die 3 deutet das Stratum subendotheliale an, welches sich adluminal des Endothels (auf der sich vom Lumen abwendenden Seite) bis zur blauen Markierung erstreckt. Die blaue Markierung ist mit 6 gekennzeichnet und überlagert zur Veranschaulichung die Membrana elastica interna. Es ergibt sich eine Dicke der Tunica intima von 111  $\mu\text{m}$ , hier gezeigt als roter Begrenzungsbalken über der jeweiligen Gefäßwandschicht. Die 4 stellt die Tunica media dar, die hier 263  $\mu\text{m}$  groß ist. Diese beinhaltet die mit grünen Markierungen überlagerten Membrana elastica externa. Die 5 beschreibt einen Teil der Adventitia, die hier beispielhaft mit einer Länge von 487  $\mu\text{m}$  gemessen wurde. Durch das lockere Bindegewebe und

*die anatomische Lage als äußerste Schicht kommen hier besonders häufig artifizielle Veränderungen zu Stande. Eine Auflockerung des gesamten Gewebes, die adluminal weiter zunimmt, ist an dieser Stelle gut zu sehen. Eine klare Begrenzung zum Ende der Adventitia ist hier nicht möglich. Zudem können bei der Präparation der Adventitia Gewebe verloren gehen oder vermehrt erhalten bleiben. Die 7 zeigt beispielhaft ein Vasa vasorum in dem sich Erythrozyten befinden. Die gelben kreisförmigen Figuren schließen beispielhaft einige Vasa vasorum in Quer- wie im Längsschnitt ein.*

### **3.11.2 Statistische Auswertung**

Beim Vergleich dieser qualitativen Merkmale wurde eine semiquantitative Statistik benutzt. Zur Erhebung kamen hier die Modalwerte (gibt den häufigsten Wert in einer Stichprobe an), absolute und relative Häufigkeit. Dabei richtete sich die Wertung als positiv, negativ sowie fraglich positiv nach denen in 4.1.2 beschriebenen Kriterien.

### **3.12 Auswertung WB**

Die Auswertung des Western Blots bezieht sich auf die sichtbar markierten Proteinbanden in ihnen durch das Molekulargewicht bedingten Ausprägungen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse IHC

#### 4.1.1 Spezifitätsnachweis

Für den Spezifitätsnachweis erfolgte eine Vorinkubation mit einem Immunogen, hier das Kontrollpeptid. In den Abbildungen 9 bis 11 ist eine Schnittserie einer Arteria renalis sinistra dargestellt. Alle drei Proben wurden im gleichen IHC-Durchgang gefärbt. Abbildung 9 zeigt den mit primären TRPC6-Antikörpern inkubierten Schnitt. Hier stellen sich deutliche Färbungen in der Tunica intima [++], klar begrenzt durch die Membrana elastica interna, zur Tunica media, dar. Zudem erscheint die Adventitia ebenfalls deutlich braungefärbt [++]. Die Tunica media weist keine TRPC6-Kanäle auf und wurde als negativ [0] bewertet. Abbildung 10 zeigt die mit dem Kontrollpeptid vorinkubierte Probe. In dieser sieht man exakt dieselben Färbungsmuster wie in der Probe ohne Kontrollpeptid, nur mit einer deutlichen niedrigeren Intensität. Die Tunica intima und Adventitia wurde jeweils als signifikant positiv [+] bewertet und die Tunica media als negativ [0]. Dies beweist, dass der verwendete TRPC6-Antikörper qualitativ gegen das gesuchte Antigen des TRPC6-Kanals gerichtet ist und die Vorinkubation eine Abschwächung der Färbung durch vorherige Bindung von Antikörpern gewährleistet. Abbildung 11 zeigt dieselbe Probe in der gleichen Schnittserie, welches mit Kaninchenserum inkubiert wurde. Hierbei wies keine der Gefäßwandschichten einen bräunlichen Niederschlag auf und sie wurden somit negativ gewertet [0]. In dieser Negativkontrolle zeigte sich zudem, dass kaum Hintergrundfärbung bei der hier verwendeten Methodik entstand. In den nachfolgenden Abbildungen sind die wichtigsten Strukturen annotiert.

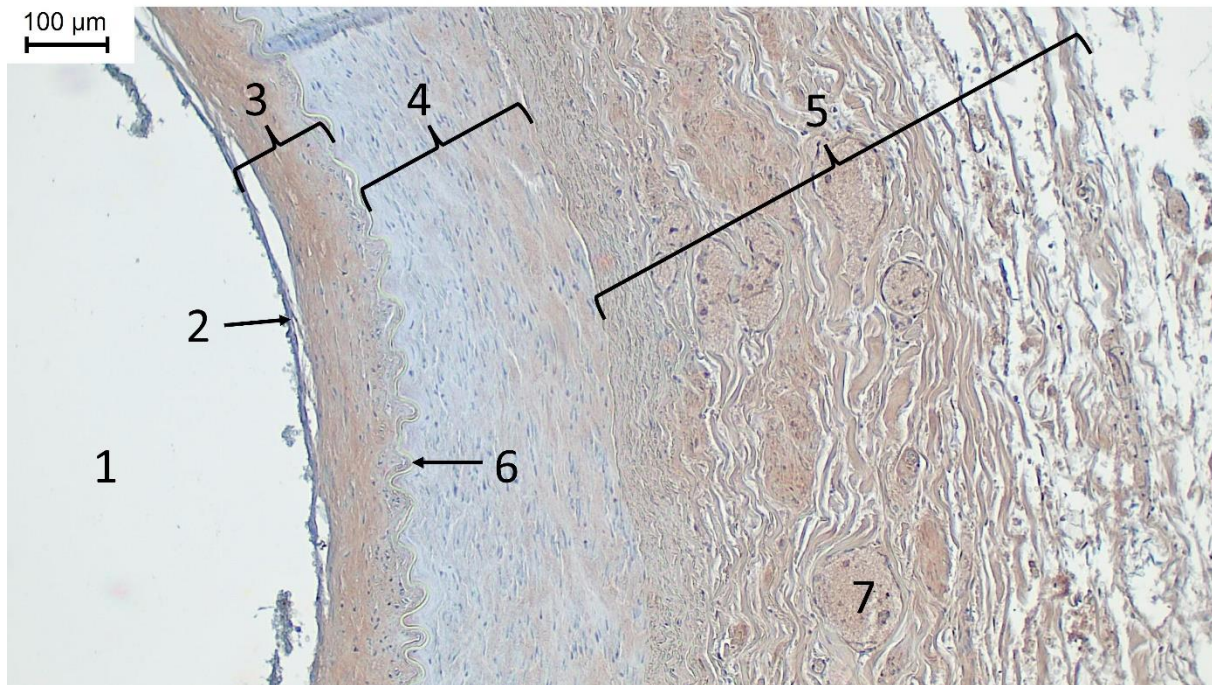


Abbildung 9: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia, 6 = Membrana elastica interna, 7 = Vasa vasorum). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in der Tunica intima [++] und Adventitia [++] nachgewiesen. Die Tunica media weist keine Signale auf [0].



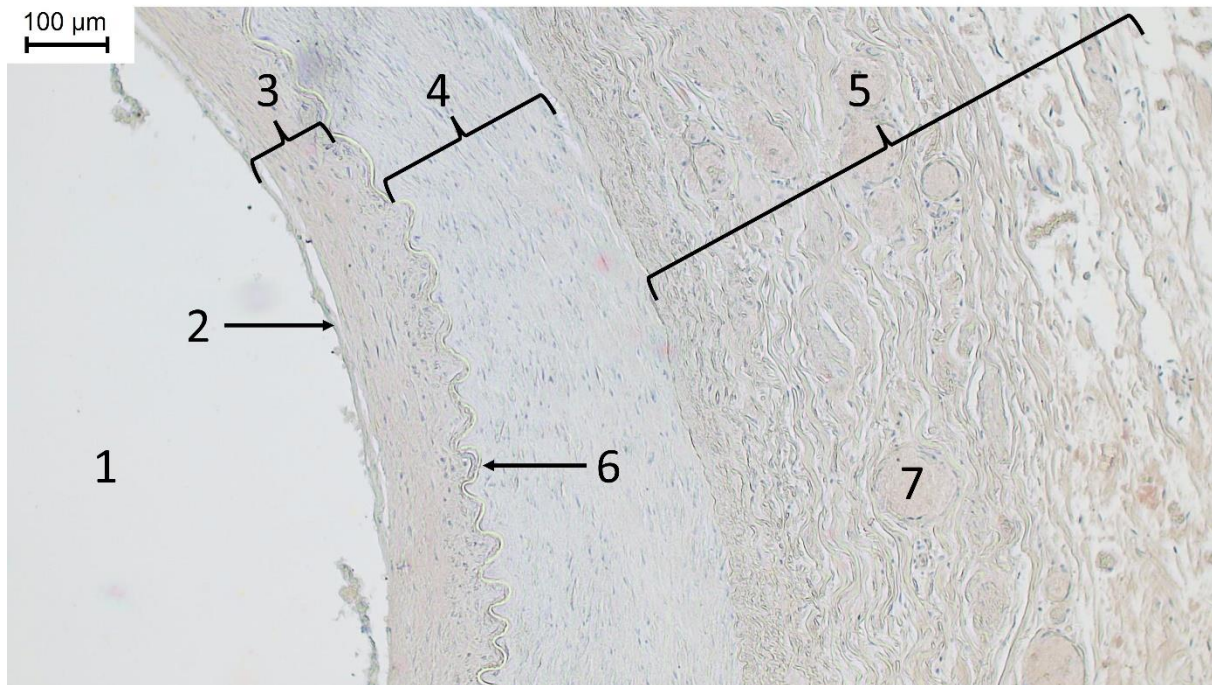


Abbildung 10: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin, nach Präinkubation mit Kontrollpeptiden als Spezifitätsnachweis.

(1 = Lumen, 2 = Endothelzelle, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia, 6 = Membrana elastica interna, 7 = Vasa vasorum). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in der Tunica intima [+] und Adventitia [+] nachgewiesen. Die Tunica media weist keine Signale auf [0].

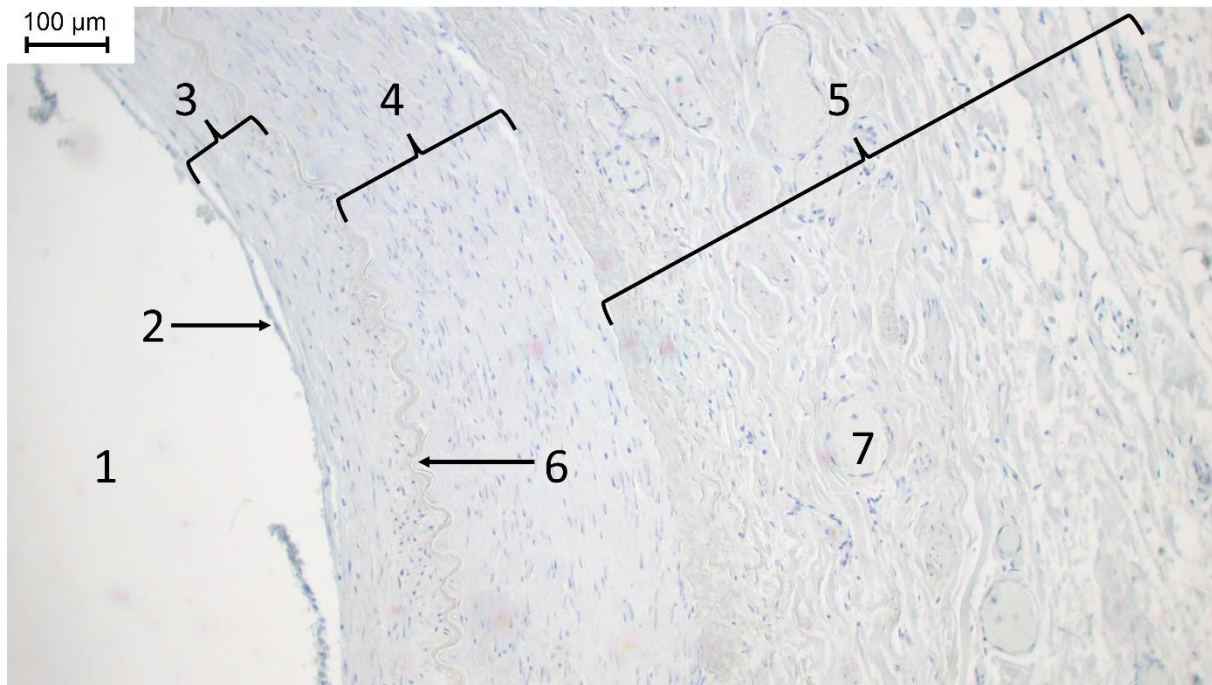


Abbildung 11: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 7) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothelzelle, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia, 6 = Membrana elastica interna, 7 = Vasa vasorum). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in keiner Gefäßwandschicht nachgewiesen [0].

### 4.1.2 Kreuzschema: Ein Körperspender (Proband Nr. 6)

Bei dem Körperspender Nr. 6 wurden die Entnahmeorte eins bis acht ausgewertet. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der IHC immer im Vergleich zwischen Proben, welche mit primärem TRPC6-Antikörper inkubierten wurden, verglichen werden mit Proben, welche als Negativkontrolle mit Kaninchenserum inkubierten wurden.

In Abbildung 12 sieht man eine deutliche Braunfärbung des Subendothels und des zum Teil abgelösten Endothels als Nachweis von TRPC6-Kanälen. Daher wurde die Tunica intima hier als deutlich positiv [++] bewertet. Die Tunica media zeigt sich komplett ungefärbt und wurde als negativ [0] gewertet. Die Adventitia unterscheidet sich nicht signifikant gegenüber der Negativkontrolle in Abbildung 13 und wurde daher auch als negativ [0] bewertet. Bei der Arteria renalis sinistra in Abbildung 14 zeigt sich eine deutlich braungefärbte Adventitia. Diese wurde als deutlich positiv [++] angesehen. Die Tunica intima ist hier besonders subendothelial deutlich braun gefärbt [++]. In der Tunica media sind keine Braunfärbungen zu erkennen, weshalb sie als negativ [0] gewertet wurde. Die mitgeführte Negativkontrolle in Abbildung 15 weist keinerlei Braunfärbung auf, weshalb alle Gefäßwandschichten als negativ [0] bewertet wurden. Bei der Arteria thoracica interna dextra (Abbildung 16) zeigt sich in allen drei Schichten kein Unterschied in den Färbungen zwischen der mit primären Antikörpern gegen TRPC6-Protein inkubierten Probe und der Negativkontrolle in Abbildung 17. Hier wurden in beiden Proben alle Schichten als negativ [0] bewertet. Kontralateral zeigt sich bei der Arteria thoracica interna sinistra (Abbildung 18) ebenfalls kein Unterschied zur Negativkontrolle (Abbildung 19). Daher wurden auch hier alle Gefäßwandschichten als negativ [0] beurteilt. Abbildung 20 zeigt die Arteria radialis dextra. Sämtliche Schichten ließen unter mikroskopischer Beobachtung keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 21) erkennen und wurden daher als negativ [0] bewertet.

Die Tunica intima der Aorta (Abbildung 22) imponiert deutlich positiv gefärbt [++]. Der Übergang zur Tunica media ist hier nicht scharf abgrenzbar, jedoch bleibt der Großteil der Tunica media ungefärbt und ist daher als negativ [0] zu bewerten. Das Gewebe der Adventitia zeigt abschnittsweise signifikant positive [+] Braunfärbungen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 23). Unter mikroskopischer Begutachtung der Negativkontrolle konnte keine Wandschicht eine Braunfärbungen aufweisen, weshalb hier alle Schichten als negativ [0] bewertet wurden. Als Nebenfund kann man in Abbildung 22 ein längs angeschnittenes Vasa vasorum mit sich darin befindlichen Erythrozyten erkennen. Die Erythrozyten zeigen einen deutlichen Nachweis von TRPC6-Kanälen. Die mit primären Antikörpern gefärbte Vena cava inferior (Abbildung 24) kann keinen Unterschied zur korrespondierenden Negativkontrolle in Abbildung 25 aufweisen. Daher wurden in beiden Präparaten alle Wandschichten als negativ [0] gewertet. In der Vena jugularis interna (Abbildung 26), wurde die Tunica intima als negativ [0] angesehen. Die Tunica media zeigt genauso wie die Adventitia keine Braunfärbungen [0]. Kontralateral zeigt sich kein Unterschied (Abbildung 27). Auch hier wurden alle Gefäßwandschichten als negativ [0] bewertet. In den nachfolgenden Abbildungen sind die wichtigsten Strukturen annotiert.



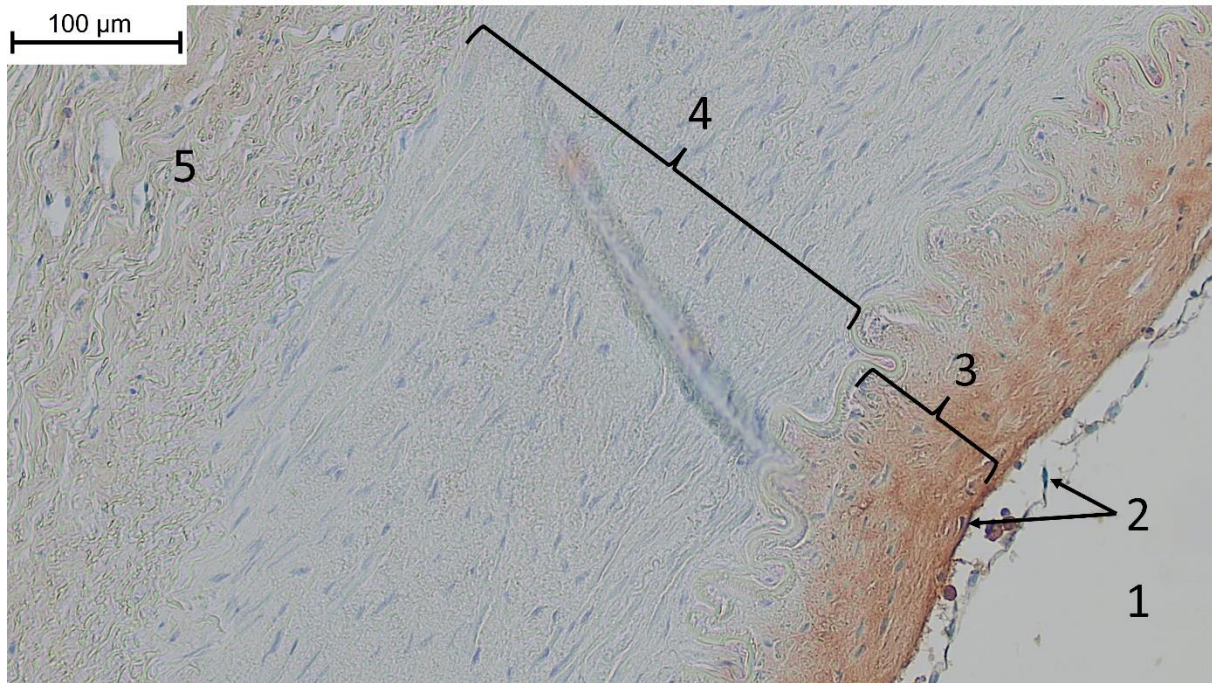


Abbildung 12: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothelzelle teilweise artifiziell abgelöst, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in der Tunica intima deutlich nachgewiesen [++]. In der Tunica media und der Adventitia zeigt sich keine Braunfärbung [0].

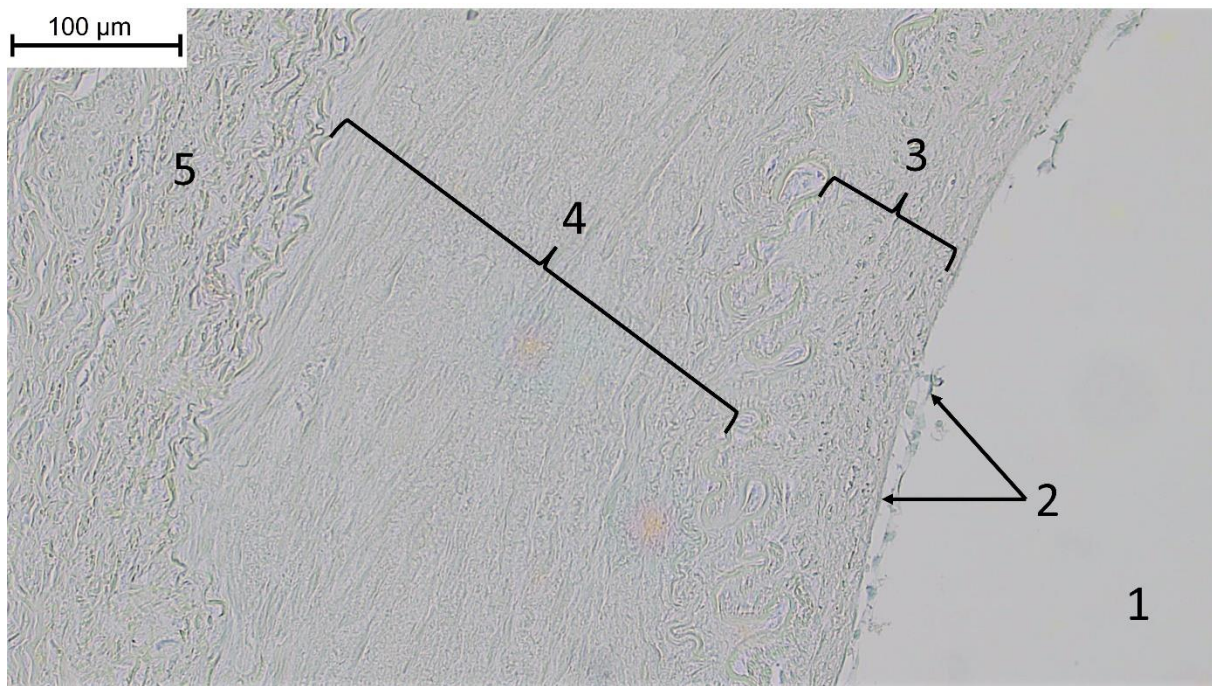


Abbildung 13: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothelzelle teilweise artifiziell abgelöst, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in keiner Gefäßwandschicht nachgewiesen [0].



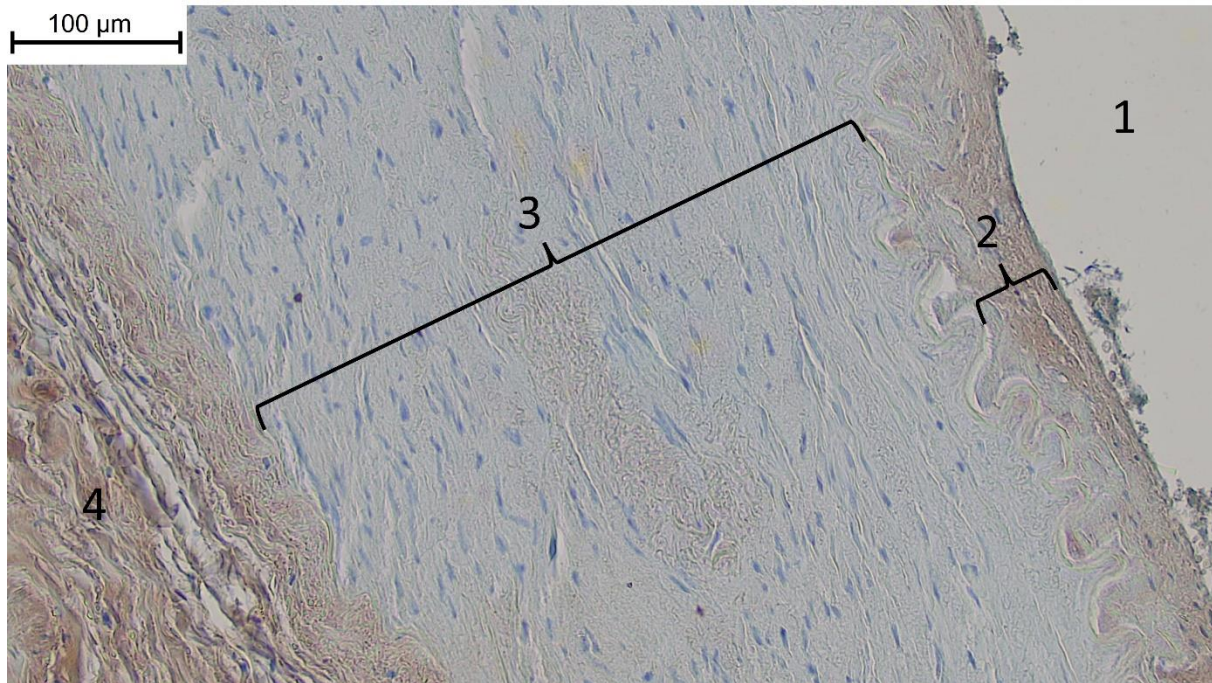


Abbildung 14: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 6) mit immunohistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Stratum subendotheliale, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Ein TRPC6-Kanal Nachweis erfolgte in der Tunica intima [++]. Ebenso zeigt die Adventitia deutlich positive Braunfärbungen [++]. Die Tunica media wurde negativ bewertet [0].

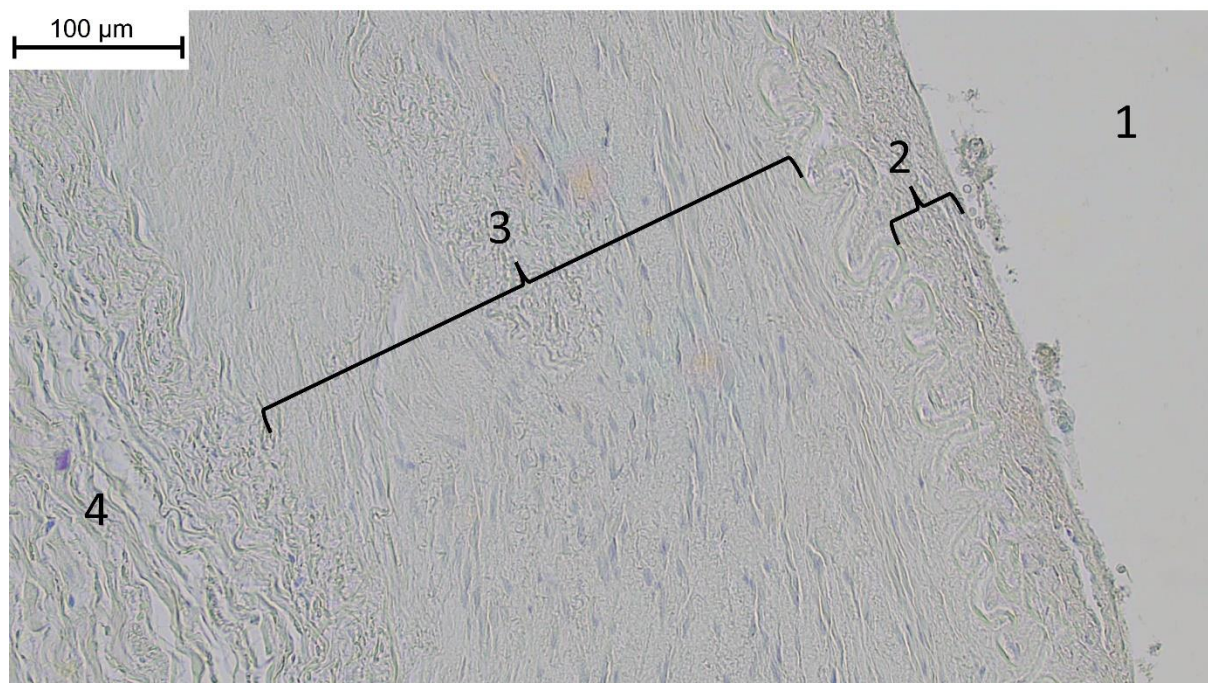


Abbildung 15: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Stratum subendotheliale, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Eine Braunfärbung konnte in keiner Gefäßwandschicht nachgewiesen werden [0].



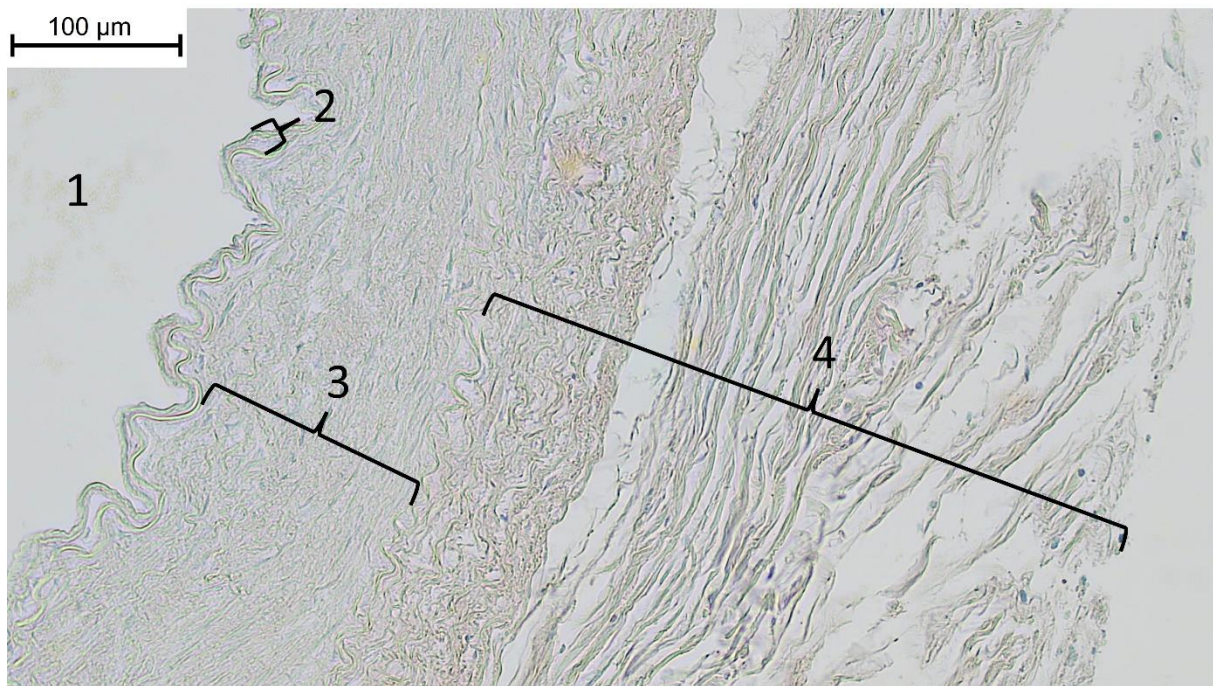


Abbildung 16: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. thoracica interna dextra*, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). In keiner der Gefäßwandschichten konnten TRPC6-Kanäle nachgewiesen werden [0].

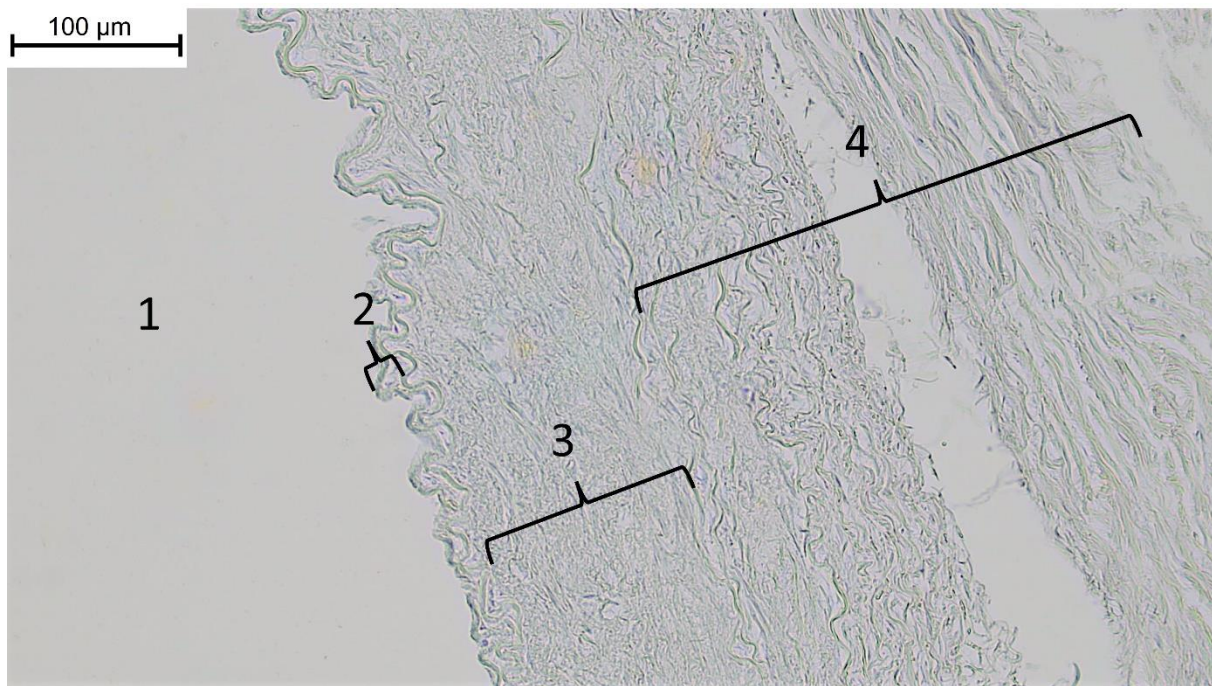


Abbildung 17: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. thoracica interna dextra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Es konnte keine Braunfärbung im gesamten Präparat nachgewiesen werden, weshalb alle Gefäßwandschichten als negativ [0] gewertet wurden.

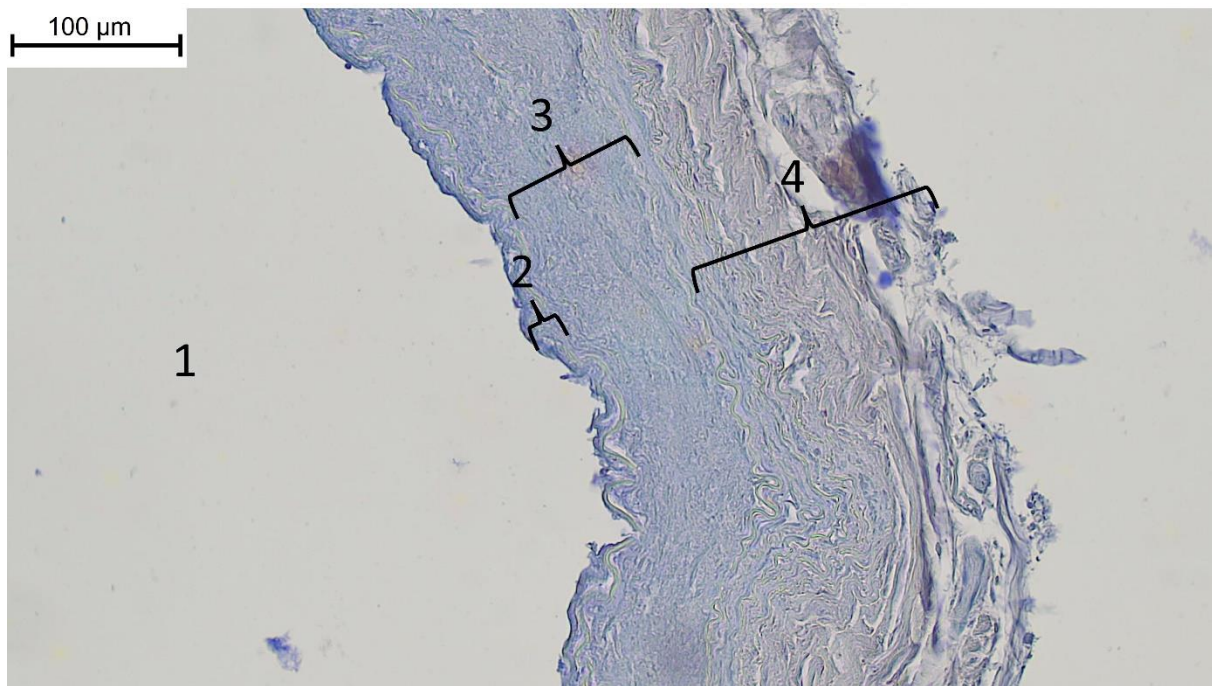


Abbildung 18: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. thoracica interna sinistra*, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). In keiner der Wandschichten konnte ein TRPC6-Kanal nachgewiesen werden, weshalb alle Schichten hier negativ [0] bewertet wurde.



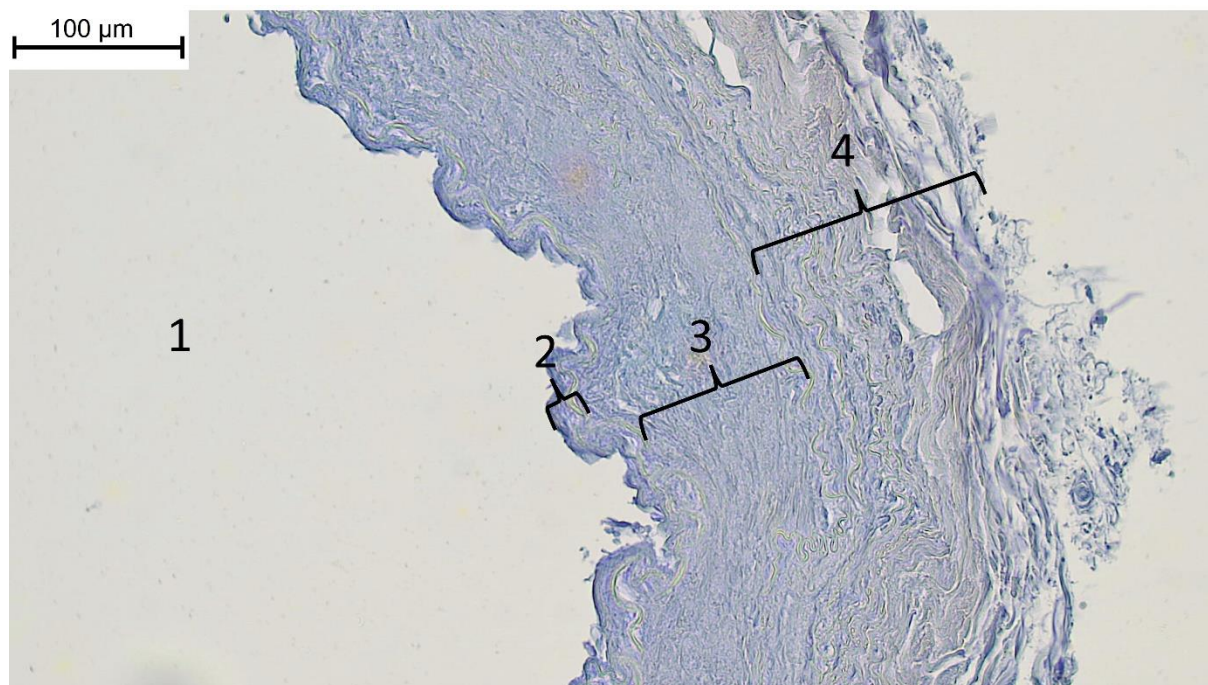


Abbildung 19: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. thoracica interna sinistra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = *Tunica intima*, 3 = *Tunica media*, 4 = *Adventitia*). Es konnte keine Braunfärbung innerhalb des Präparates nachgewiesen werden, weshalb alle Schichten hier als negativ [0] bewertet wurde.



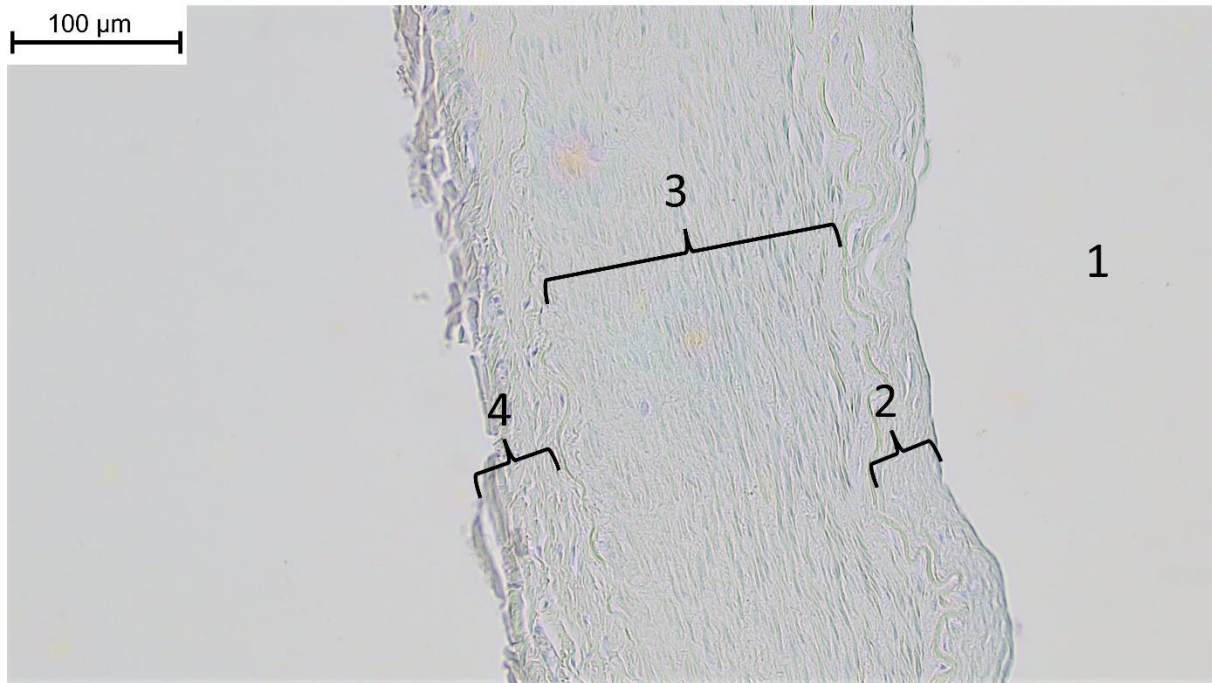


Abbildung 20: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. radialis dextra*, Spender 6) mit immunohistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Alle Gefäßwandschichten erbrachten keinen Nachweis des TRPC6-Kanals, weshalb alle negativ [0] bewertet wurden.



Abbildung 21: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. radialis dextra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Es konnte keine Braunfärbung im gesamten Präparat nachgewiesen werden, weshalb alle Gefäßwandschichten als negativ [0] gewertet wurden.

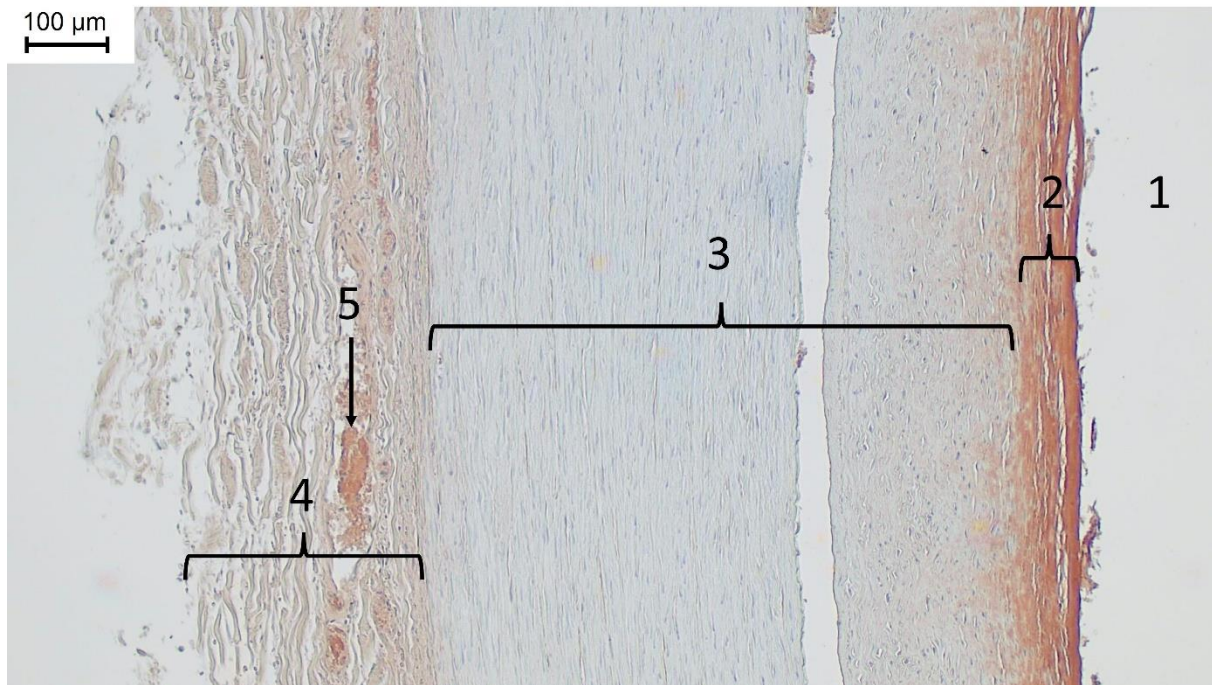


Abbildung 22: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia, 5 = Vasa Vasorum im Längsschnitt mit Erythrozyten). Die Tunica intima wurde als deutlich positiv [++] bewertet. In der Tunica media konnten keine TRPC6-Kanäle nachgewiesen werden [0]. Die Adventitia ist als signifikant positiv [+] gewertet worden.

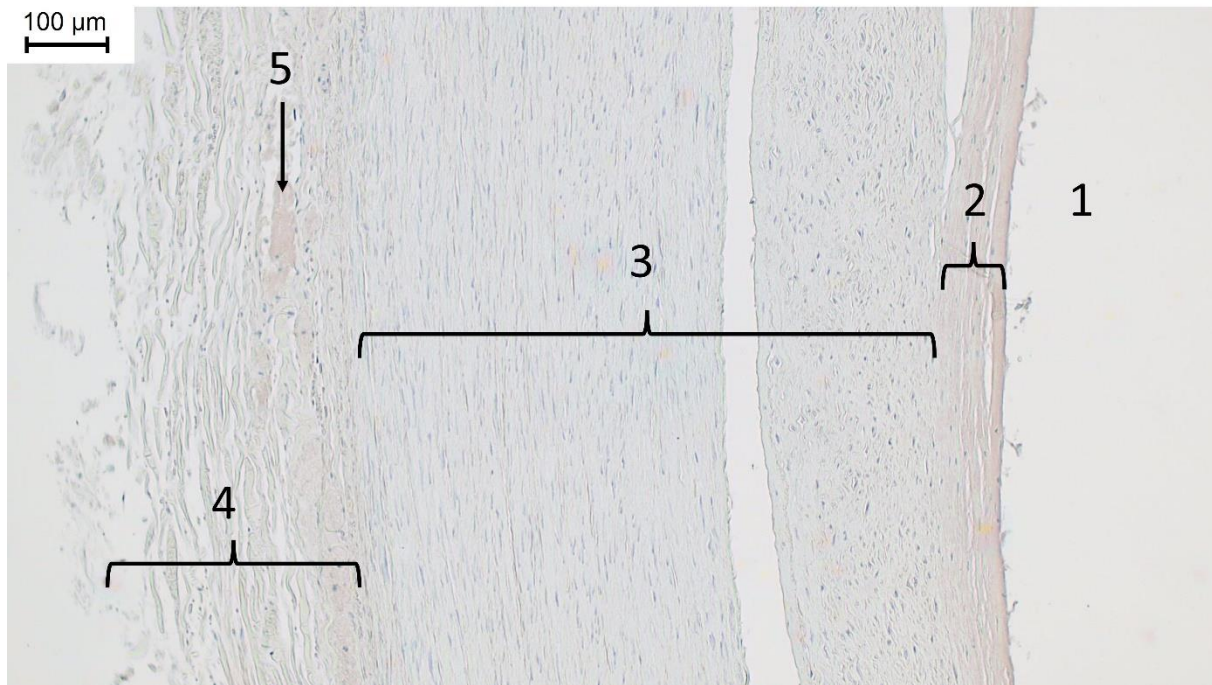


Abbildung 23: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia, 5 = Vasa Vasorum im Längsschnitt mit Erythrozyten). Alle Gefäßwandschichten wurden negativ hinsichtlich eines TRPC6-Kanal-Nachweises [0] bewertet.



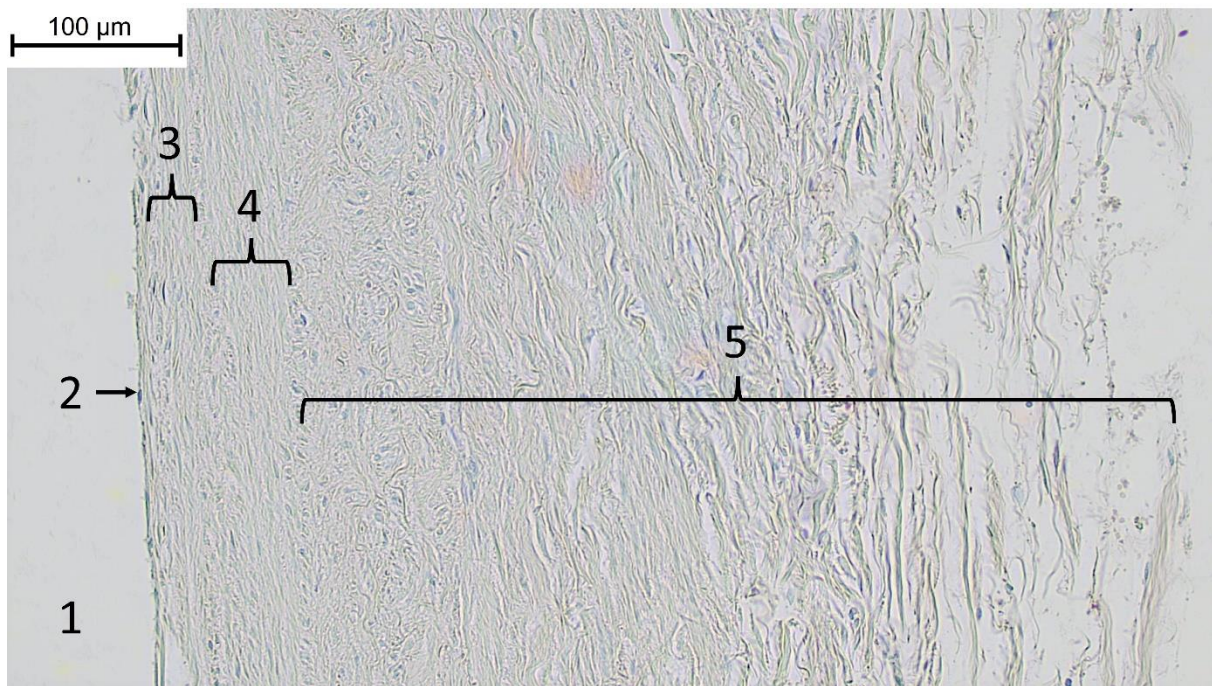


Abbildung 24: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*V. cava inferior*, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). In keiner der Gefäßwandschichten konnten TRPC6-Kanäle nachgewiesen werden, weshalb alle Schichten hier negativ [0] bewertet wurden.

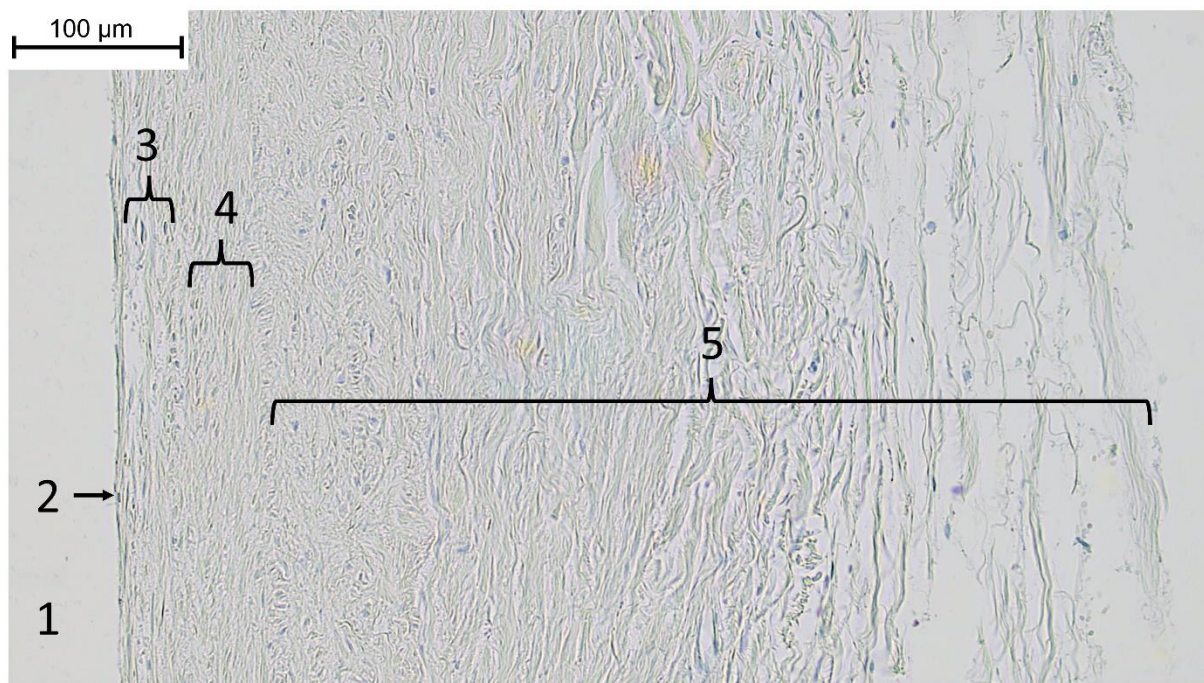


Abbildung 25: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*V. cava inferior*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia).  
TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in keiner Gefäßwandschicht nachgewiesen [0].

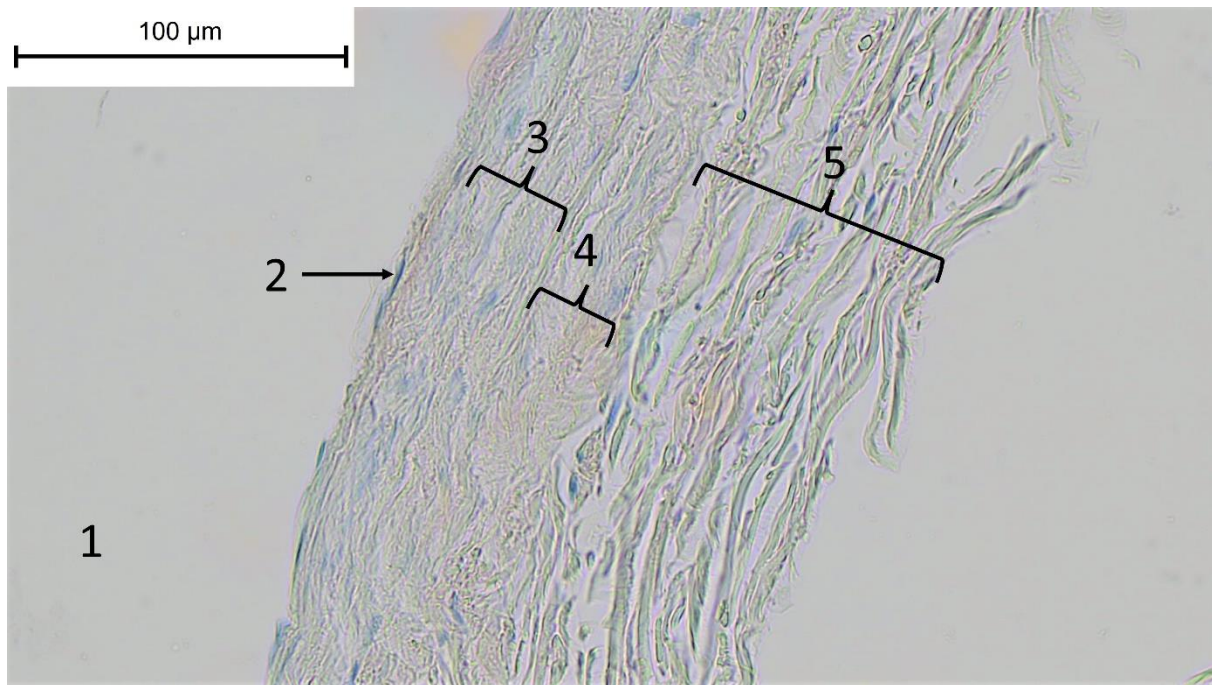


Abbildung 26: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*V. jugularis interna sinistra*, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). In dieser Probe erfolgte kein Nachweis des TRPC6-Kanals, weshalb alle Gefäßwandschichten hier als negativ [0] gewertet wurden.



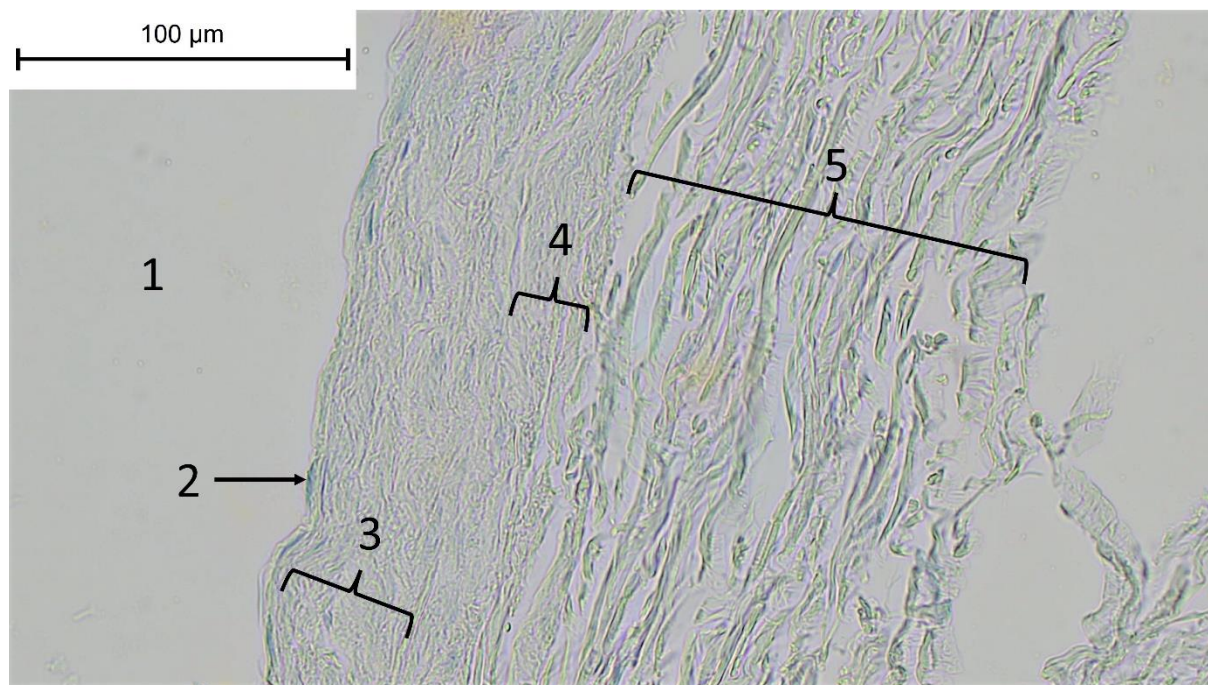


Abbildung 27: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*V. jugularis interna sinistra*, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). In dieser Probe wurden alle Gefäßwandschichten negativ [0] bewertet.



### 4.1.3 Kreuzschema: Nierenarterien (alle Spender)

Die Tunica intima stellt sich in Abbildung 28, V. a. durch das stark braungefärbte Endothel, als signifikant positiv [+] dar. Die Tunica media ist als negativ [0] bewertet worden, da sich hier kein TRPC6-Kanal Nachweis zeigt. In der Adventitia sind deutliche Braunfärbungen zu erkennen. Die Adventitia wurde als deutlich positiv [++] gewertet.

Bei der rechten Nierenarterie (Abbildung 29) stellt sich zwar das Endothel als negativ dar, jedoch zeigt das Subendothel deutliche Braunfärbungen. Daher wurde die Tunica intima als deutlich positiv [++] bewertet. Die Tunica media bleibt ohne Braunfärbung [0]. Die Adventitia wurde als deutlich positiv bewertet [++]. In der korrespondierenden linken Nierenarterie (Abbildung 30) stellt sich die Tunica intima als deutlich positiv [++] dar. Die Tunica media ist komplett negativ [0]. Die Adventitia stellte sich größtenteils als braungefärbt dar und wurde daraufhin als deutlich positiv [++] bewertet.

In der Arteria renalis dextra (Abbildung 31) stellen sich sowohl die Tunica intima als auch die Adventitia durch kräftige Braunfärbung als deutlich positiv [++] dar. Die gut abgrenzbare Tunica media ist hier als negativ [0] bewertet worden. Die kontralaterale Arteria renalis sinistra dieses Spenders (Abbildung 32) weist ein ähnliches Färbemuster auf. Hier sind die Tunica intima und Adventitia als signifikant positiv [+] gewertet worden und die Tunica media als negativ [0].

In Abbildung 33 weisen die Tunica intima und die Adventitia eine andere Farbintensität als die korrespondierende Negativkontrolle auf. Bei alleiniger Durchsicht dieser Probe kann keine direkte Braunfärbung ausgemacht werden. Durch den Vergleich mit der Negativkontrolle wurden die Tunica intima und die Adventitia als fraglich positiv [?] bewertet. Die Tunica media stellt sich als homogen blaugefärbt dar [0]. Eine signifikant positive [+] Färbung der Tunica

intima und Adventitia ist in Abbildung 34 zu erkennen. Auch wenn die Abbildung Braunfärbungen in diesem Abschnitt in der Tunica media erahnen lässt, so waren diese lichtmikroskopisch nicht auszumachen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Tunica media wurde hier als negativ [0] gewertet.

Eine klare Braunfärbung der Tunica intima lässt sich in der in Abbildung 35 gezeigten Arteria renalis dextra erkennen, die als deutlich positiv [++] gewertet wurde. Die Tunica media zeigt vereinzelte braune Färbungen nahe der Adventitia. Diese sind lichtmikroskopisch schwach erkennbar und unscharf ausgeprägt. Die Negativkontrolle präsentiert hier jedoch keine Besonderheiten. Die Tunica media wurde hier als fraglich positiv [?] bewertet, da diese Braunfärbungen an nur wenigen Stellen im Präparat vorkommen. Die Adventitia wurde als deutlich positiv [++] bewertet. In der Arteria renalis sinistra des gleichen Spenders stellt sich das Stratum subendotheliale stark braungefärbt dar (Abbildung 36). Die Abgrenzung der Tunica intima zur Tunica media ist sehr klar durch die Membrana elastica interna differenzierbar. Hier wurde die Tunica intima daher als deutlich positiv [++] gewertet. Ebenso zeigt die Adventitia eine homogene Braunfärbung als Nachweis des TRPC6-Kanals. Gut erkennbar sind in diesem Fall mehrere Vasa vasorum mit ebenfalls braungefärbten Erythrozyten. Die Adventitia ist als deutlich positiv [++] bewertet worden. Die Tunica media spiegelt hier die gleichen Ergebnisse wie in der kontralateralen Nierenarterie des Körperspenders wider. Lichtmikroskopisch schwer zu erkennende Braunfärbungen der Tunica media sind hier ebenfalls erkennbar, stellen sich jedoch anders dar als in der korrespondierenden Negativkontrolle. Daher wurde die Tunica media als fraglich positiv [?] gewertet.

Die Tunica intima und media der in Abbildung 37 gezeigten Nierenarterie zeigen keinen Unterschied zur Negativkontrolle und wurden beide als negativ [0] bewertet. Die Adventitia präsentiert sich inhomogen mit Braunfärbungen an teilweise artifiziell auseinandergezerrtem

Gewebe und wurde hier als fraglich positiv [?] gewertet. Abbildung 38 zeigt die linke Nierenarterie des Körperspenders. Hier wurde die Tunica intima ebenfalls negativ [0] bewertet. Die Tunica media lässt fragliche Braunfärbungen in dieser Gefäßwandschicht erkennen, weshalb sie als fraglich positiv [?] bewertet wurde. Beide Gefäßwandschichten lassen lichtmikroskopisch keine klaren Braunfärbungen erkennen. Die Adventitia hier ist als signifikant positiv [+] bewertet worden. In den nachfolgenden Abbildungen sind die wichtigsten Strukturen annotiert.

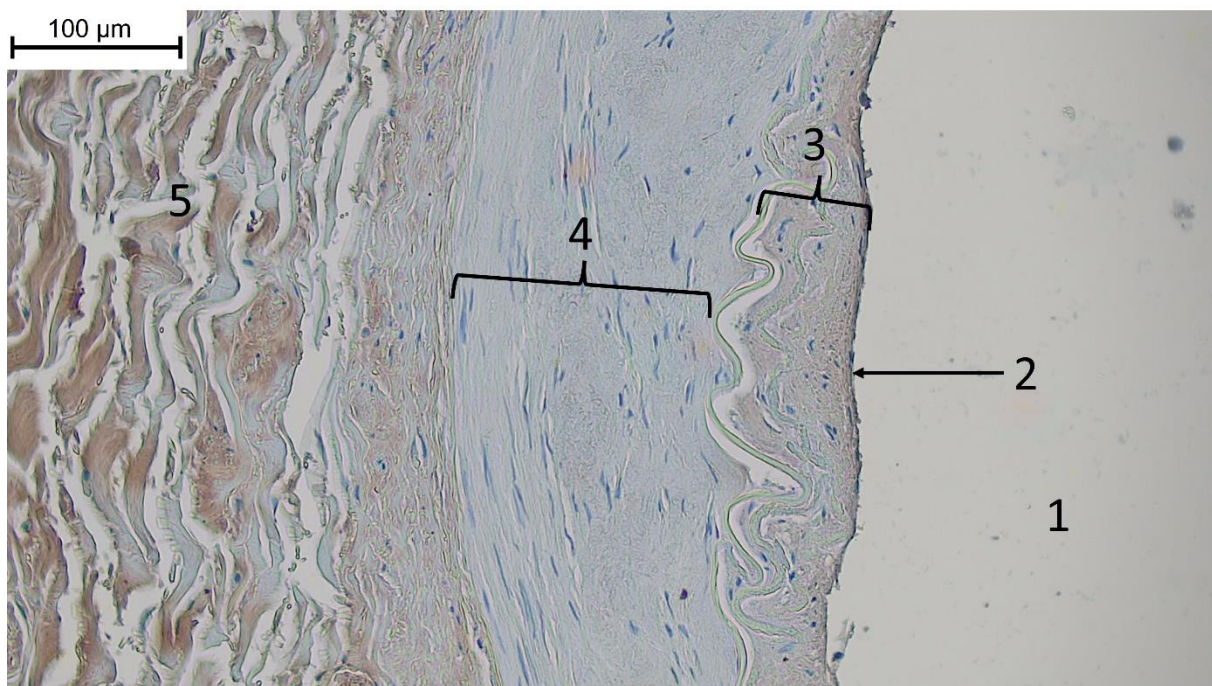


Abbildung 28: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). Die Tunica intima stellt sich als signifikant positiv [+] dar. Die Tunica media bleibt negativ [0] und die Adventitia ist braun gefärbt [++].

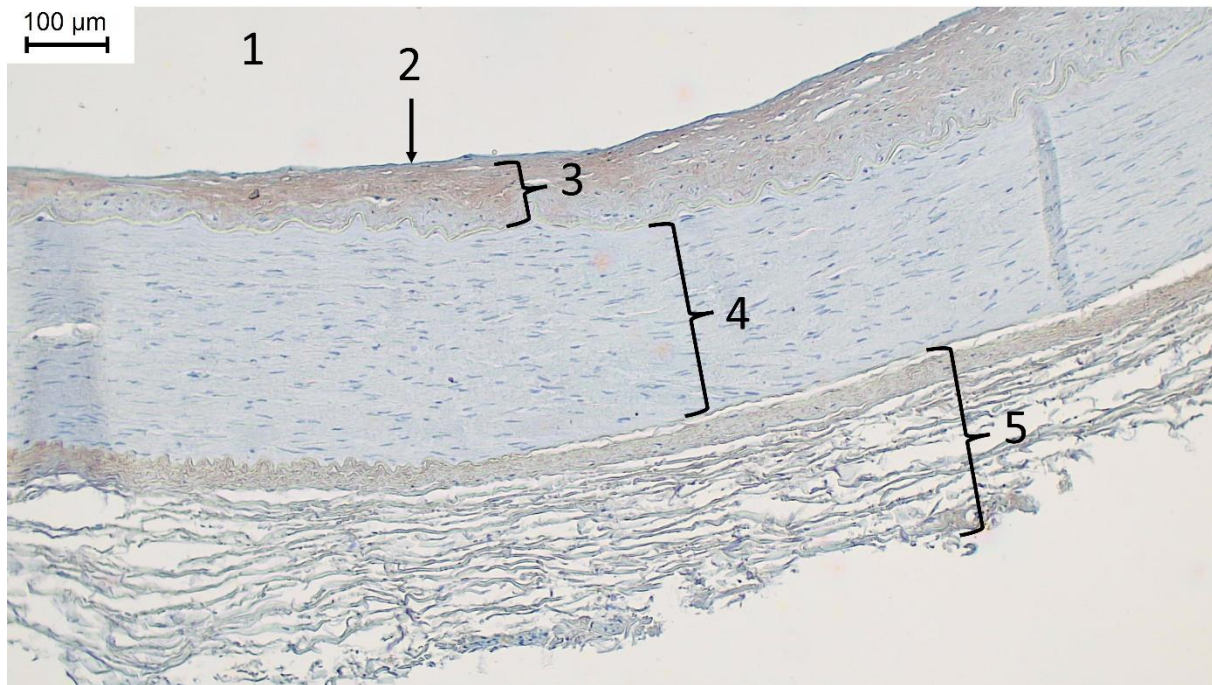


Abbildung 29: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). Die Tunica intima und Adventitia zeigen einen deutlichen TRPC6-Kanal Nachweis [++]. Die Tunica media zeigt keinerlei Braunfärbung [0].



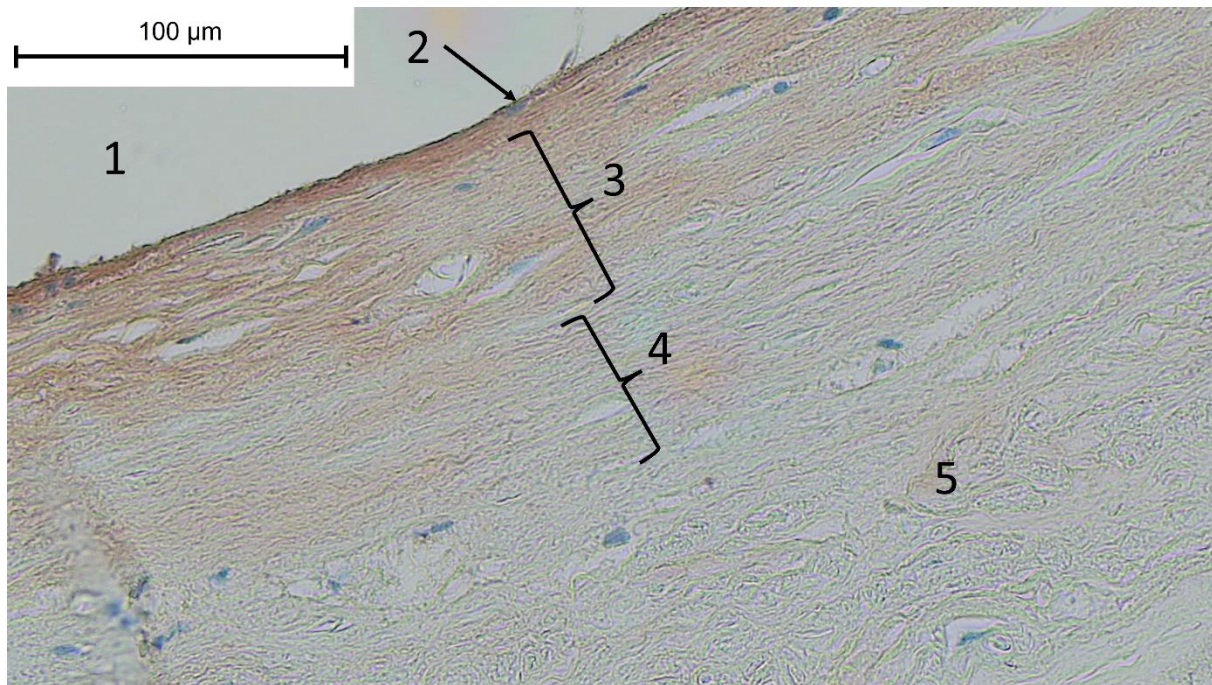


Abbildung 30: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 2) mit immunohistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). Die Tunica intima ist deutlich braun gefärbt [++]. Die Adventitia ist an dieser Stelle schwächer braun gefärbt, weist im gesamten Präparat jedoch eine deutliche Braunfärbung auf [++]. Die Tunica media zeigt keinerlei Braunfärbung [0].

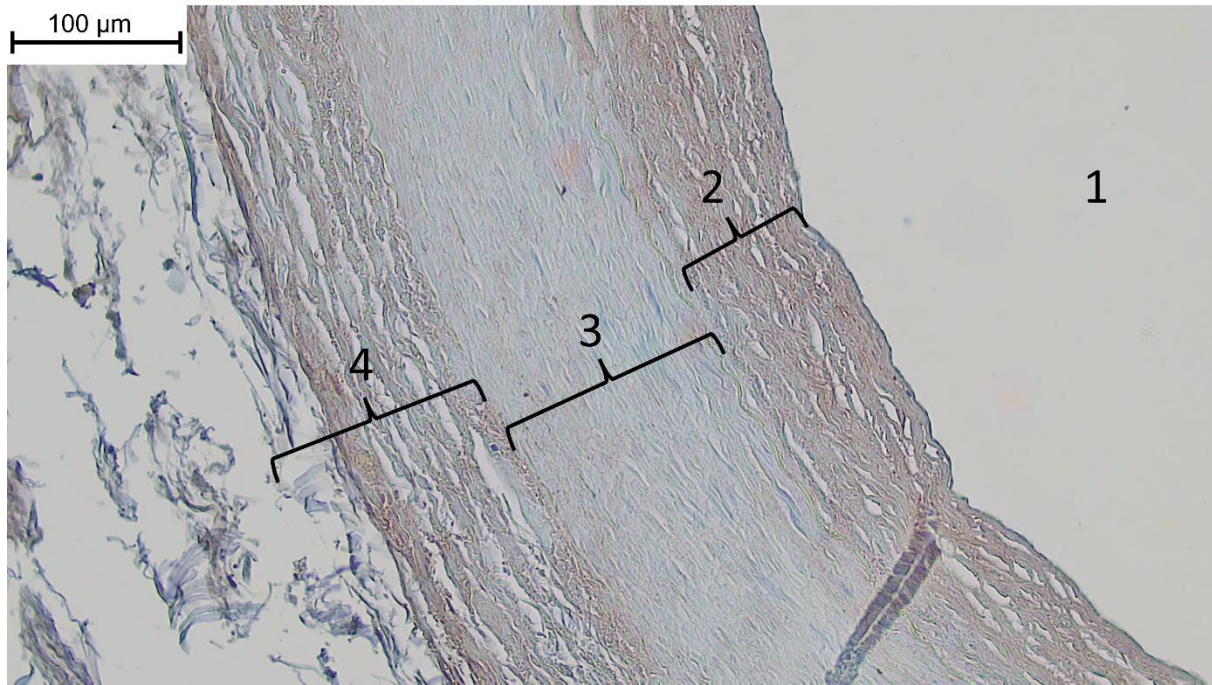


Abbildung 31: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Die Tunica intima und Adventitia zeigen eine deutliche Braunfärbung [++]. In der Tunica media ist kein TRPC6-Kanal nachweisbar [0].





Abbildung 32: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia, 5 = Erythrozyten in Vasa vasorum). Die Tunica intima und Adventitia weisen einen signifikanten TRPC6-Kanal Nachweis auf [+], die Tunica media verbleibt negativ [0]. Als Zufallsbefund sind hier deutlich positive Erythrozyten in den Vasa vasorum zu erkennen.

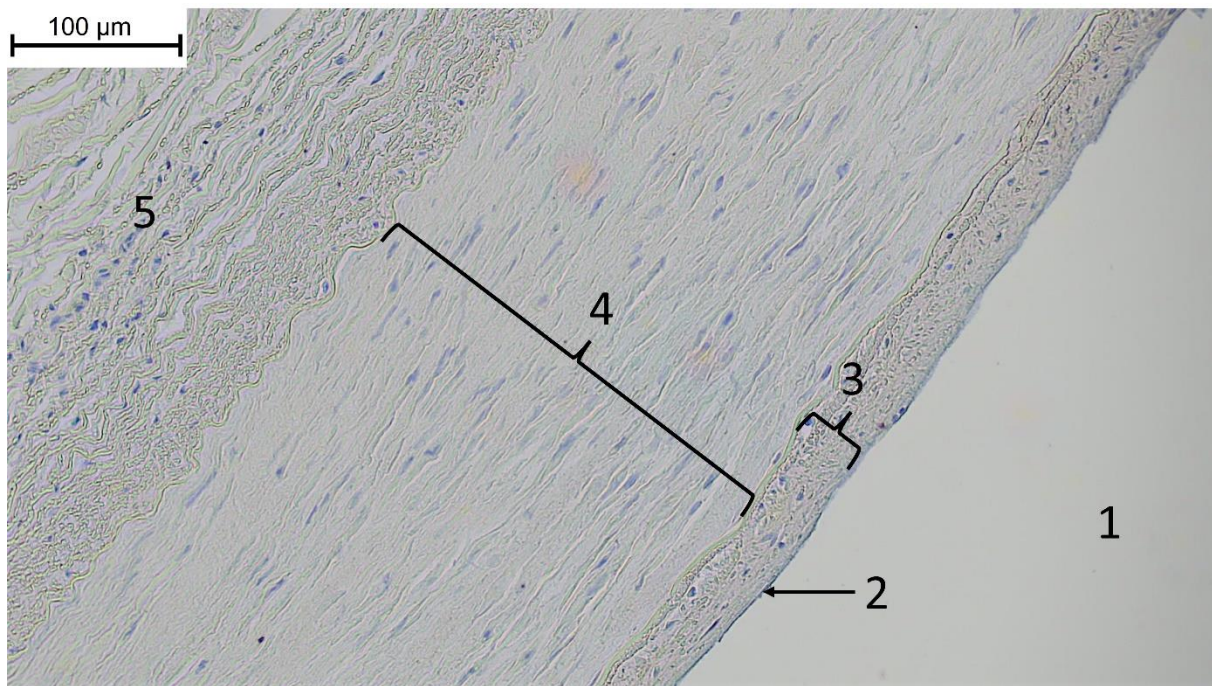


Abbildung 33: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 5) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia). Stratum subendotheliale und Adventitia wurden (in Zusammenschau mit der Negativkontrolle) als fraglich positiv [?] bewertet, die Tunica media zeigt keinerlei Braunfärbung [0].



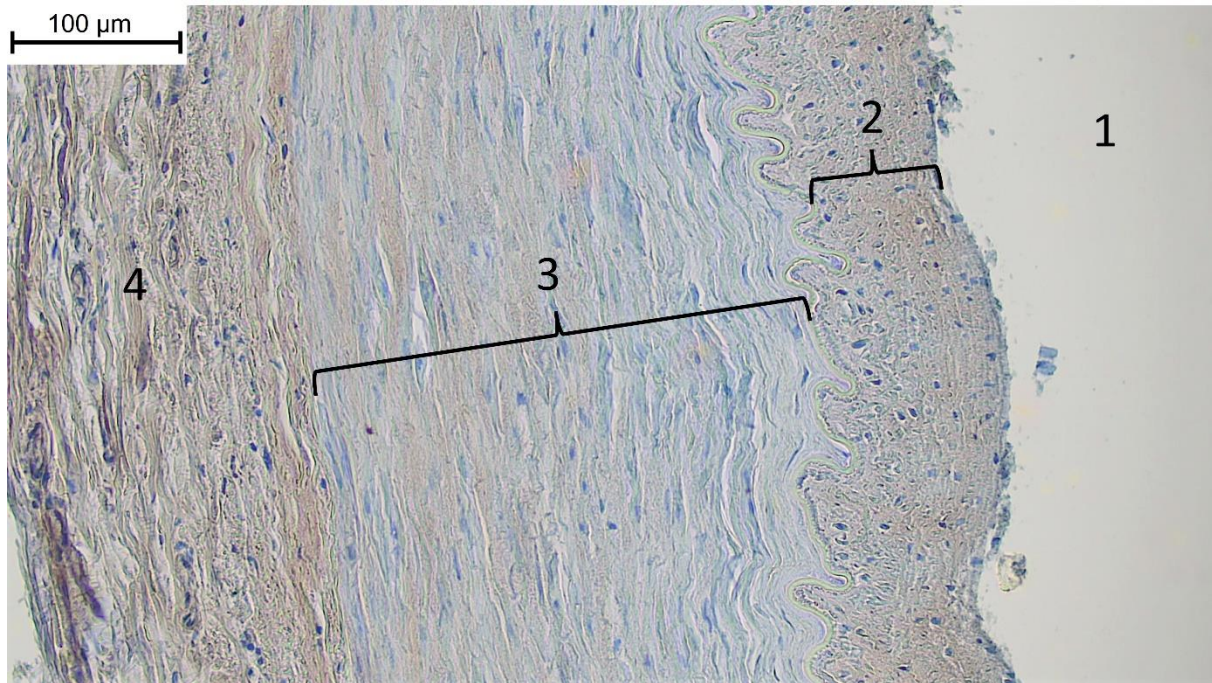


Abbildung 34: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 5) mit immunohistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Tunica intima und Adventitia wurden als signifikant positiv [+] bewertet. Die Tunica media als negativ [0].

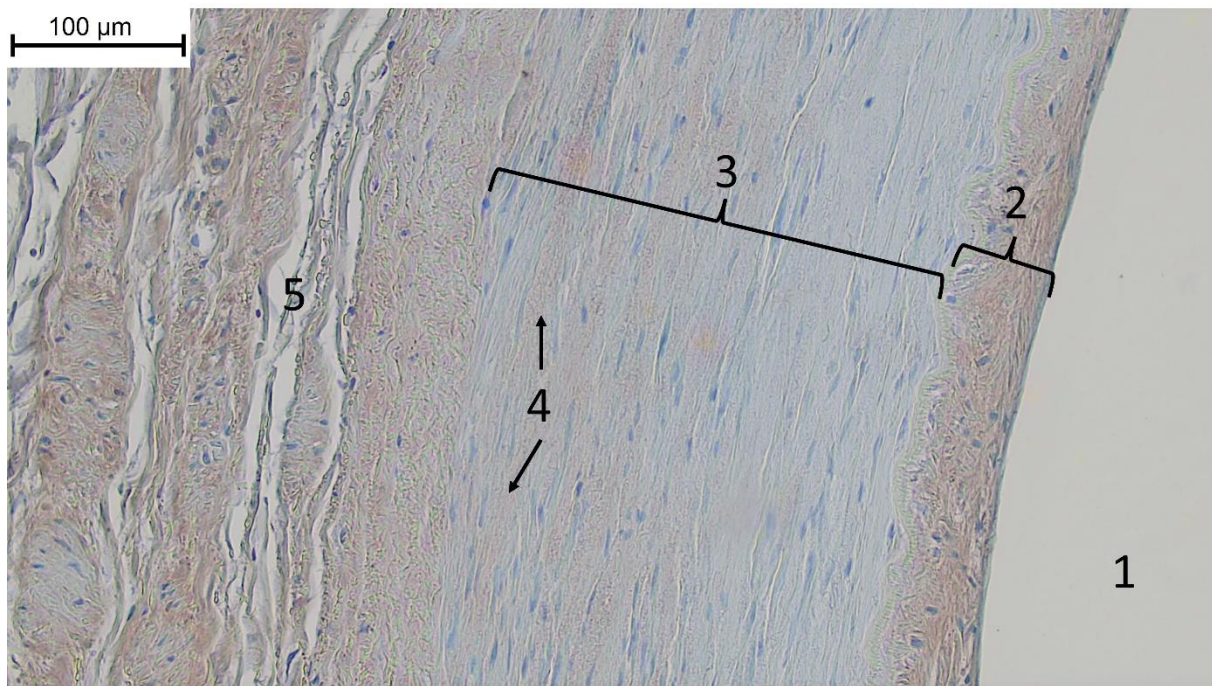


Abbildung 35: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = braungefärbte Anteile, 5 = Adventitia). Die Tunica intima und Adventitia zeigen einen deutlichen TRPC6-Kanal Nachweis [++]. In der Tunica media sind fragliche Braunfärbungen zu erkennen. Diese Schicht wurde als fraglich positiv [?] bewertet.



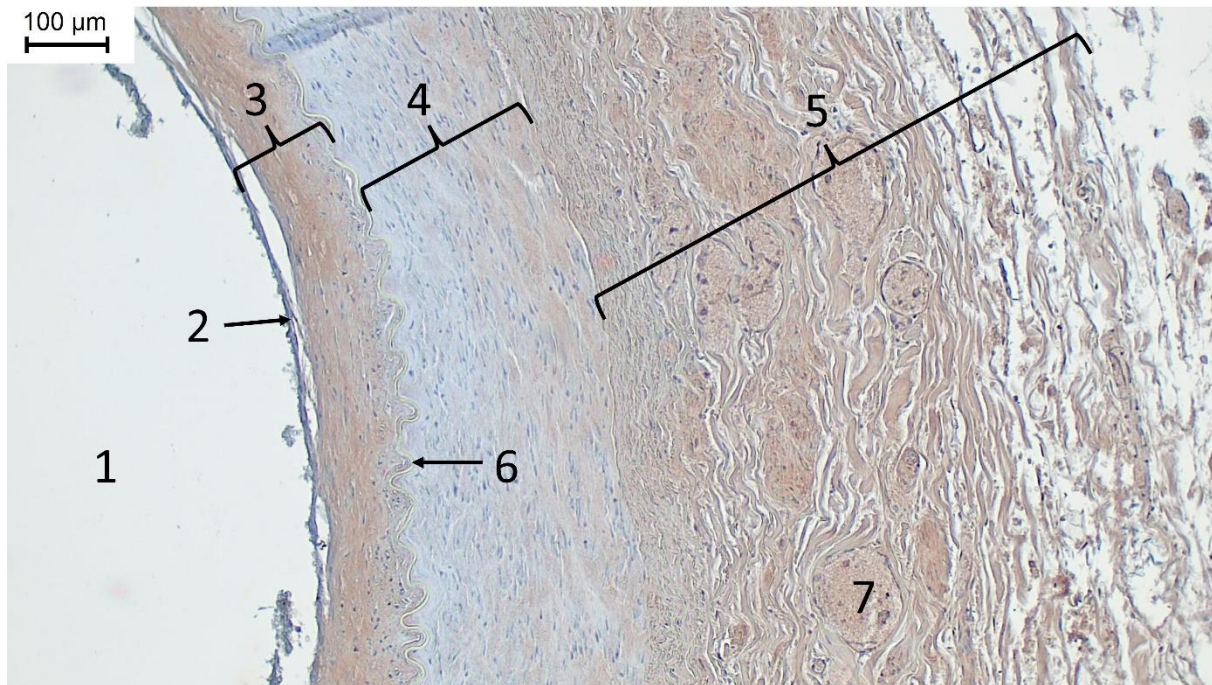


Abbildung 36: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Tunica intima, 4 = Tunica media, 5 = Adventitia, 6 = Membrana elastica interna, 7 = Vasa vasorum). TRPC6-Kanäle wurden in diesem Präparat in der Tunica intima [++] und Adventitia [++] deutlich nachgewiesen. Die Tunica media enthält keine signifikante Braunfärbung [0].

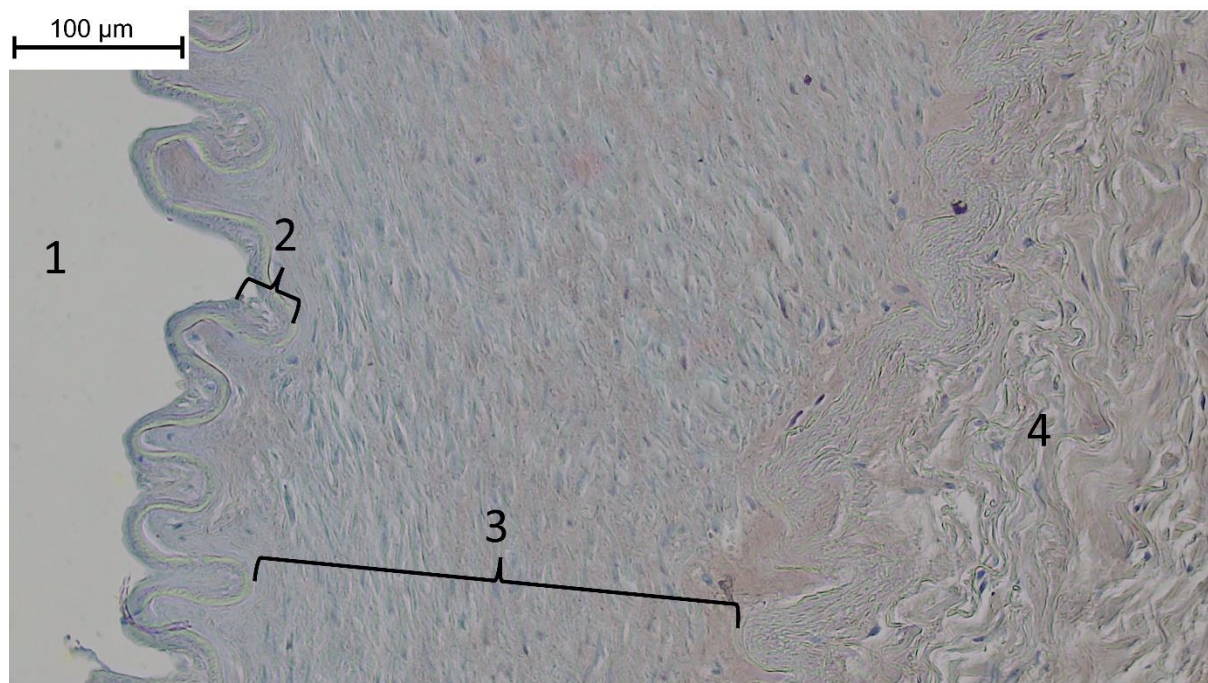


Abbildung 37: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis dextra*, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Tunica intima und Tunica media sind als negativ [0] bewertet. Die Adventitia zeigt fraglich positive [?] Braunfärbungen.



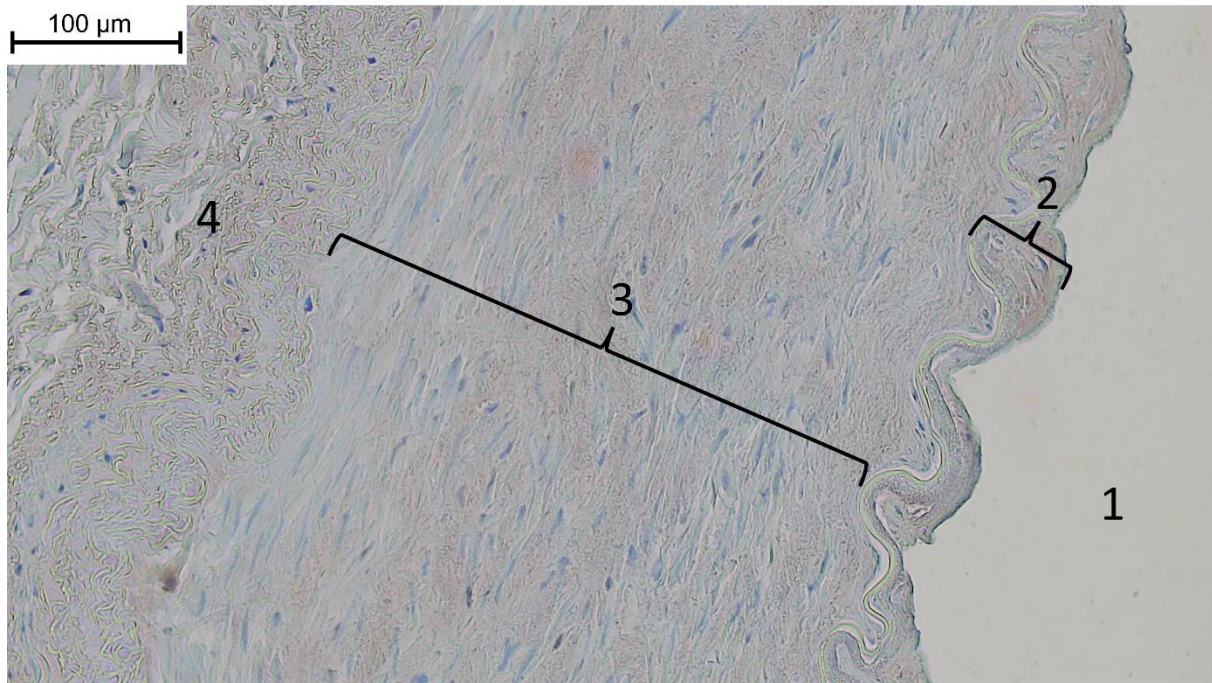


Abbildung 38: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (*A. renalis sinistra*, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Die Tunica intima präsentiert sich als negativ [0]. Die Tunica media wurde fraglich positiv [?] bewertet. Die Adventitia zeigt signifikant positive [+] Braunfärbungen.

#### 4.1.4 Kreuzschema: Aorten (alle Spender)

In Abbildung 39 ist ein Gefäßabschnitt der Aorta abdominalis dargestellt. Ein großer Teil der Tunica intima kann als deutlich positiv [++] bewertet werden. In diesem Fall ist die Abgrenzung zur Tunica media unscharf. Dennoch konnte in der Tunica media kein TRPC6-Nachweis erfolgen und diese Gefäßwandschicht wurde als negativ [0] gewertet. Die Adventitia präsentiert sich als deutlich positiv [++]. In der Tunica intima der Aorta abdominalis (Abbildung 40) ist das Endothel nicht braungefärbt. Die Adventitia ist signifikant positiv [++]. Dahingegen weist das Stratum subendotheliale starke Braunfärbungen auf. Die Tunica intima ist artifiziell auseinandergezerrt. Diese Gefäßwandschicht wurde als deutlich positiv [++] bewertet. Die in der Tunica media angedeutete Braunfärbung zeigte sich in gleicher Form auch in der mitgeführten Negativkontrolle. Die korrespondierende HE-Färbung dieser Schnittserie deutete durch überfärbte Areale an diesen Stellen ebenfalls auf eine teilweise veränderte Integrität des Gewebes hin. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde die Tunica media hier als negativ [0] bewertet.

Die Tunica intima und Tunica media der thorakalen Aorta (Abbildung 41) zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Farbintensität im Vergleich zur Negativkontrolle. Daher wurden diese beiden Gefäßwandschichten als negativ [0] gewertet. Die Adventitia zeigt eine andere Farbintensität als die Negativkontrolle, aber keine klare Braunfärbung. Sie ist somit als fraglich positiv [?] bewertet worden. Die in Abbildung 42 dargestellte Aorta thoracica zeigt sehr flache Zellkerne an der luminalen Seite, welche als Endothelzellen identifiziert werden können. Das darunter liegende Stratum subendotheliale weist eine klare braune Färbung als Nachweis des TRPC6-Kanals auf. Hier ist die Abgrenzung zwischen Tunica intima und Tunica media unscharf. Die Tunica intima kann als deutlich positiv [++] bewertet werden. Die Tunica media weist hingegen keinerlei Braunfärbung auf und ist negativ [0] anzusehen. Die Adventitia

zeigt eine signifikant positive [+] Braunfärbung. Die Besonderheit an der in Abbildung 43 dargestellten Aorta thoracica ist die Fixierweise des Körperspenders. Bei diesem komplett auf Formalinbasis fixierten Spender zeigt sich die Tunica intima als signifikant positiv [+], ebenso wie die Adventitia [+]. Die Tunica media blieb negativ [0]. Dieses Ergebnis entspricht dem erwarteten Ergebnis aufgrund der Beobachtungen in anderen Aortenproben, bei welchen der Körperspender mit NEP-Lösung fixiert wurden. In den nachfolgenden Abbildungen sind die wichtigsten Strukturen annotiert.

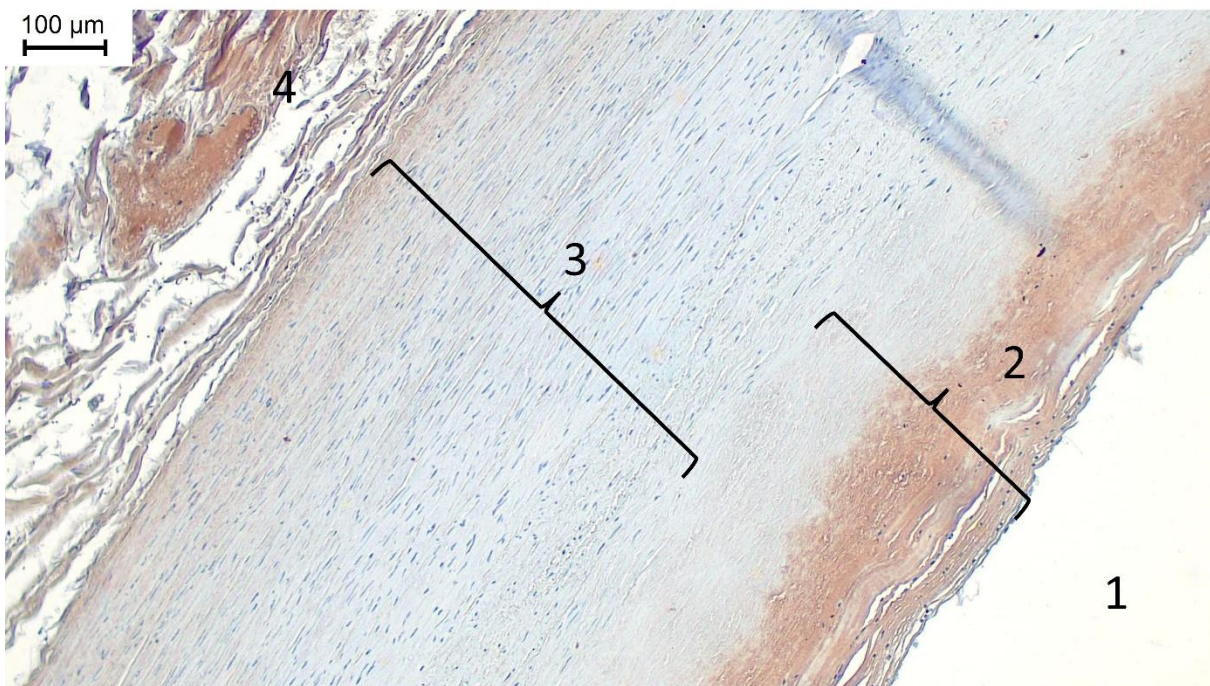


Abbildung 39: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender 2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Die Tunica intima und Adventitia zeigen einen deutlichen TRPC6-Kanal Nachweis [++], die Tunica media zeigt keinerlei Braunfärbung [0].



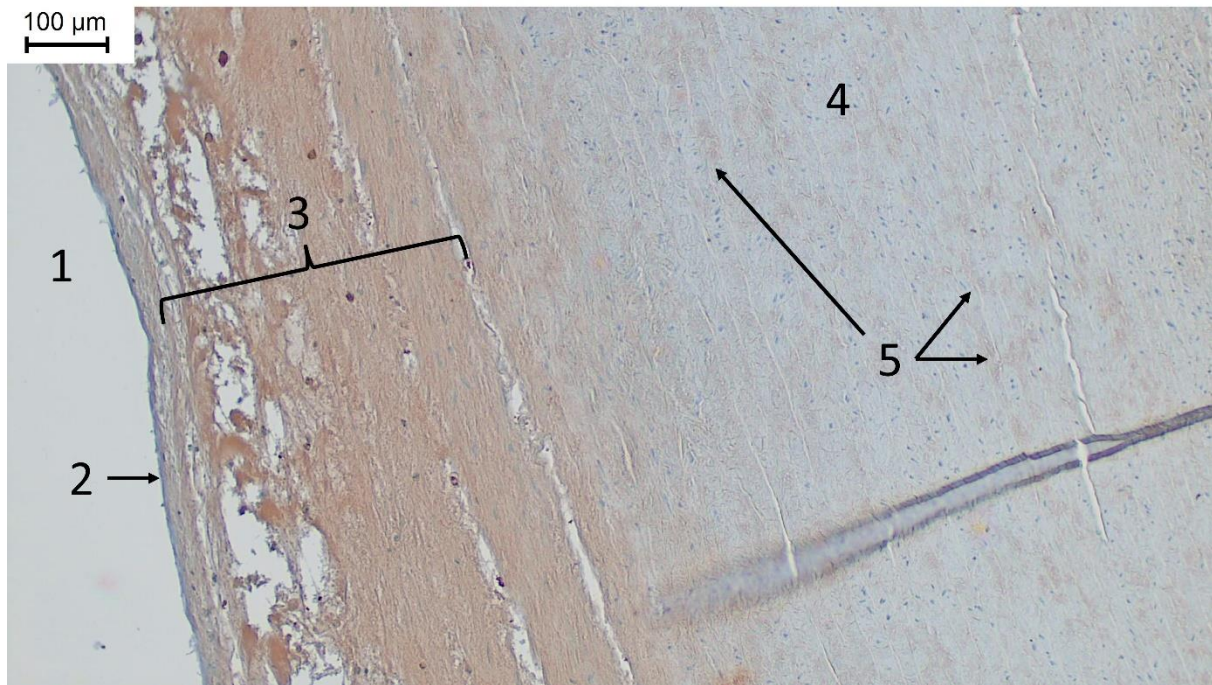
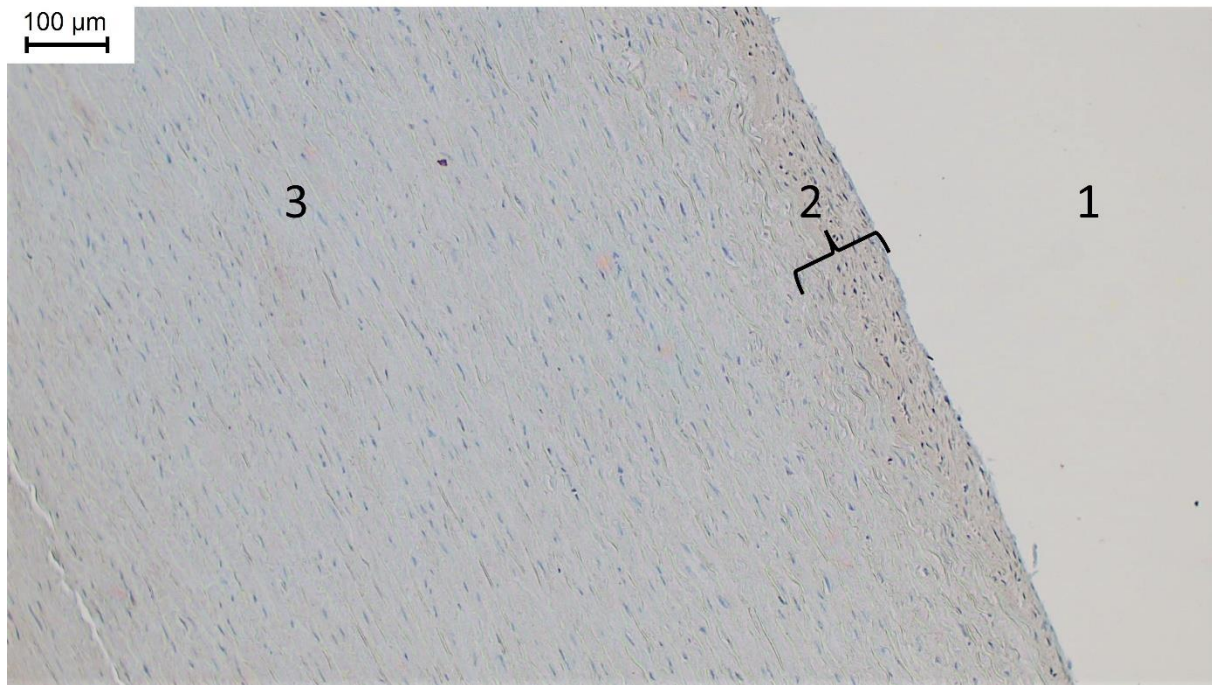


Abbildung 40: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media, 5 = angedeutete Braunfärbungen). Die Tunica intima und Adventitia wurden als deutlich positiv gewertet [++]. Die Tunica media zeigt fragliche Braunfärbungen, die ebenfalls in der Negativkontrolle und HE-Färbung zu sehen sind und daher als nicht signifikant bewertet wurden [0].





*Abbildung 41: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta thoracica, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.*

*(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media). Die Tunica intima und Tunica media zeigen keinerlei Braunfärbungen [0].*

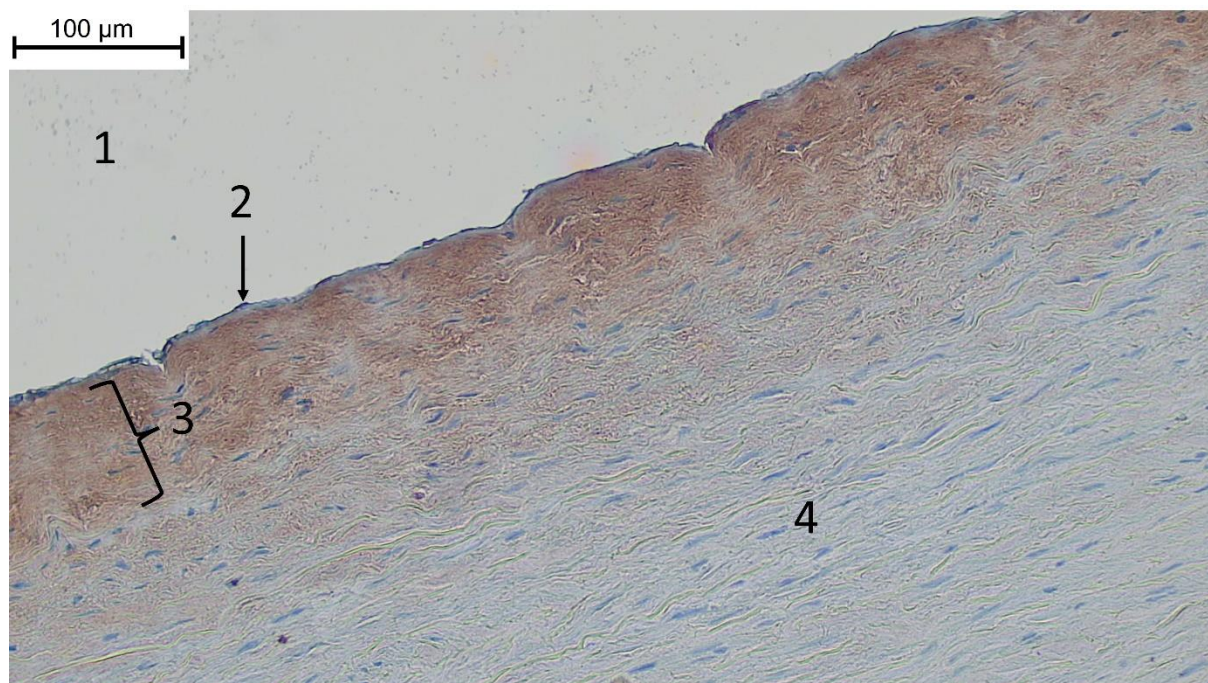
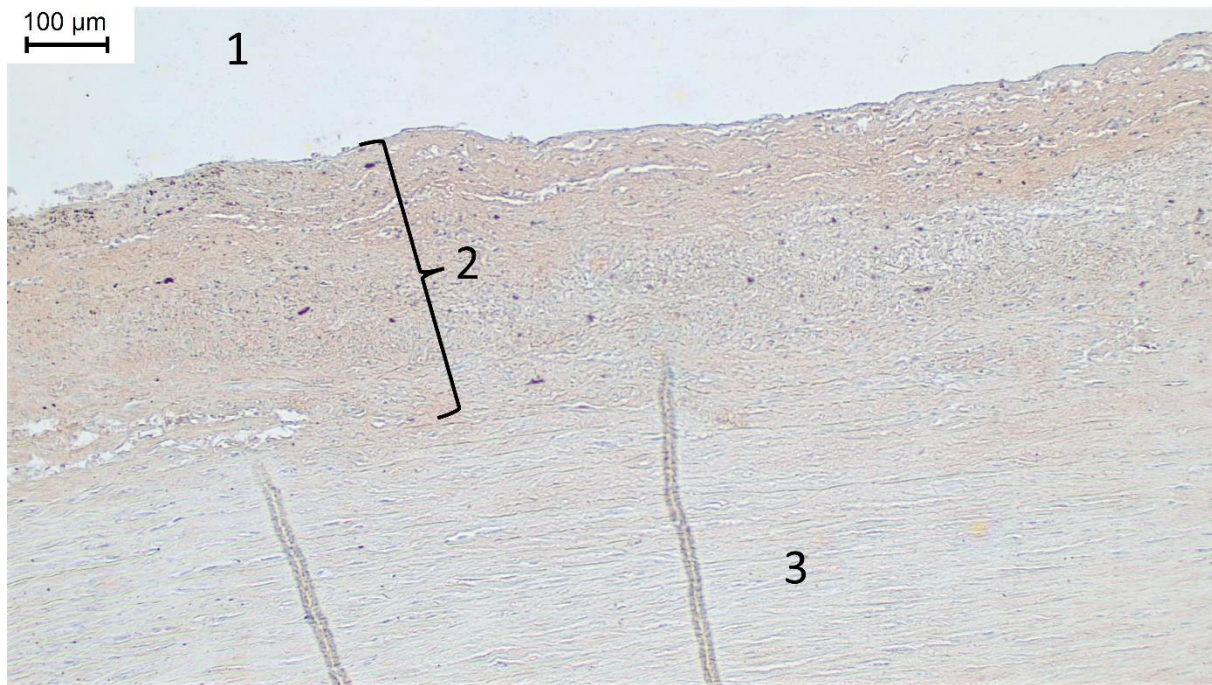


Abbildung 42: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta thoracica, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Endothel, 3 = Stratum subendotheliale, 4 = Tunica media). Die Tunica intima enthält einen deutlichen TRPC6-Kanal Nachweis [++], die Tunica media weist keinerlei Braunfärbung auf [0].



*Abbildung 43: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta thoracica, Spender 9) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.*

*(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media). Die Tunica intima wurde als signifikant positiv [+] gewertet. Die Tunica media ist negativ bewertet worden [0]. Die zwei länglichen Strukturen die sich vom unteren Bildrand durch die Tunica media strecken sind typische Schnittartefakte bei großen Gefäßen.*



#### 4.1.5 COVID Proben

Bei der Auswertung der COVID-Proben wurde vor allem auf Besonderheiten und Unterschiede zu bereits ausgewerteten non-COVID-Proben geachtet. Die Todesursache und mögliche Begleiterkrankungen sind in Tabelle 6 nachzulesen.

Der Gefäßabschnitt der Aorta abdominalis des Spenders C1 wurde in Abbildung 44 mit der korrespondierenden Negativkontrolle in Abbildung 45 verglichen. Die Tunica intima zeigt keinen Unterschied zur Negativkontrolle und wurde als negativ [0] gewertet. Im Vergleich zur Negativkontrolle sind in der Tunica media mehrere gefärbte Herde zu sehen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von allen anderen Ergebnissen aus non-COVID-Proben in dieser Arbeit. Hier ist die braungefärbte Herdformation nicht in der Negativkontrolle sichtbar. Auch weist die HE-Färbung keine Anzeichen auf eine zerstörte Integrität auf. Somit fällt sie an dieser Stelle als mögliche Quelle einer falsch positiven Färbung weg. Diese gefärbten Herde konnten in einem Großteil des gesamten Präparates nachgewiesen werden. Es war keine Verstärkung oder Abschwächung zur luminalen bzw. adluminalen Seite zu erkennen. Abbildung 46 zeigt eine andere Position des gleichen Präparates. Auch hier sind die negative Tunica intima und die braunen Herde in der Tunica media zu erkennen. Die Tunica media ist daher als signifikant positiv [+] bewertet worden. Die Adventitia zeigt sich deutlich positiv [++] gefärbt. In der Adventitia sind Entitäten wie Vasa vasorum mit ebenfalls deutlich gefärbten Erythrozyten als Nebenbefund zu sehen. Die Negativkontrolle (Abbildung 45) enthält keine Braunfärbung und alle Gefäßwandschichten stellen sich als negativ [0] dar.

In Abbildung 47 ist die Probe einer Aorta abdominalis des Probanden C2 dargestellt. Die Tunica intima ist signifikant positiv gefärbt [+], die Tunica media verbleibt ohne TRPC6-Nachweis [0]. Die Adventitia stellt sich als fraglich positiv [?] dar. Im Vergleich zu non-COVID-Proben zeigten sich bei Spender C2 keine Auffälligkeiten.

In Abbildung 48 ist ein Ausschnitt der abdominalen Aorta des Spenders C3 zu sehen. Die Tunica intima und die Adventitia sind in diesem Präparat durch eine schwache Braunfärbung als fraglich positiv [?] bewertet worden. In der Tunica media konnte kein Nachweis für TRPC6-Kanäle erbracht werden [0].

Ein exemplarischer Ausschnitt aus der Tunica media der Aorta abdominalis des Spenders C4 ist in Abbildung 49 dargestellt. Die Tunica intima in dieser Probe konnte keine Braunfärbung erkennen lassen und wurde negativ [0] bewertet. Die Adventitia zeigt einen deutlichen Nachweis von TRPC6-Kanälen [++]. Die Tunica media enthält in großen Teilen dieser Gefäßwandschicht die in Abbildung 49 exemplarisch dargestellten braunen Herde. Das Färbemuster ähnelt dem des Spenders C1. Die Auffälligkeiten in den Aortae der beiden COVID-Spendern konnten bei non-COVID-Spendern nicht nachgewiesen werden. Die Tunica media wurde hier als signifikant positiv [+] gewertet.

In Abbildung 50 ist die Aorta abdominalis des Spenders C5 zu sehen. Das Präparat enthält keinen Nachweis des TRPC6-Kanals in der Tunica intima und Tunica media [0]. Die Adventitia wurde als signifikant positiv [+] bewertet. In den nachfolgenden Abbildungen sind die wichtigsten Strukturen annotiert.

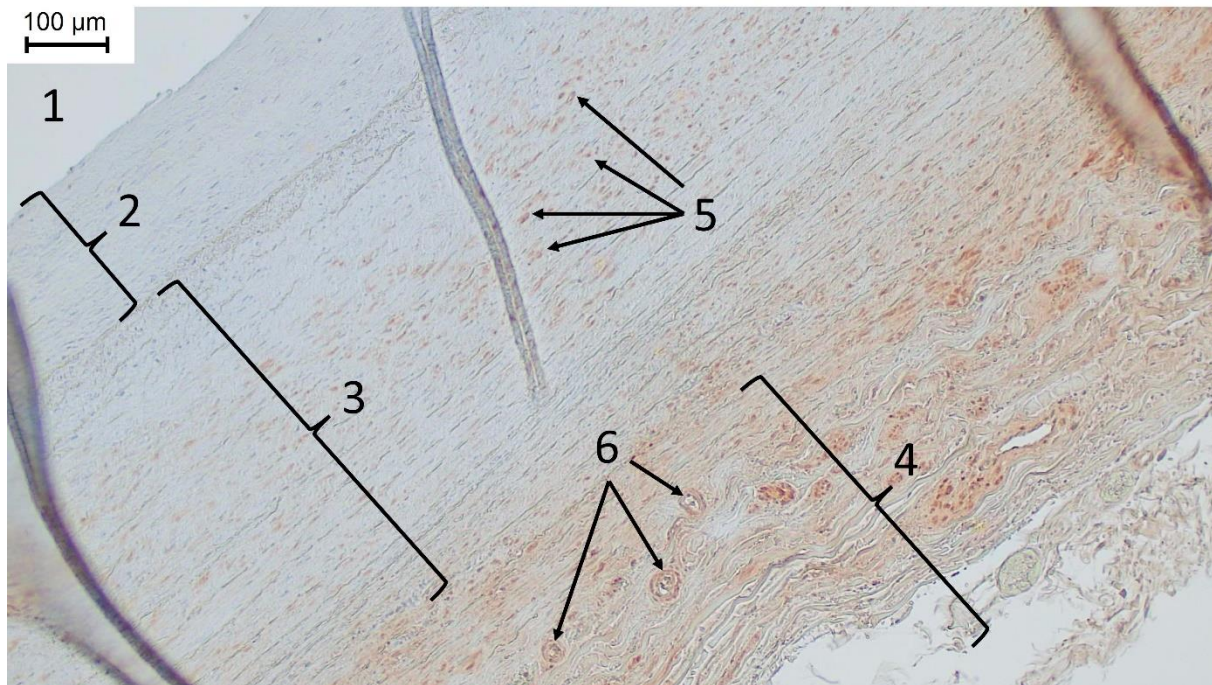


Abbildung 44: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia, 5 = brauner Herdbefund, 6 = Vasa vasorum mit Erythrozyten). Die Tunica intima wurde als negativ gewertet [0]. Die Tunica media wird durch die braunen Herde als signifikant positiv [+] bewertet. Ein deutlicher TRPC6-Kanal Nachweis erfolgte in der Adventitia [++]. Nebenbefundlich sind hier die gut gefärbten Vasa vasorum mit auf dem Bild zu erahnenden Erythrozyten erkennbar. Ganz links im Bild stellt sich ein großes Schnittartefakt dar.

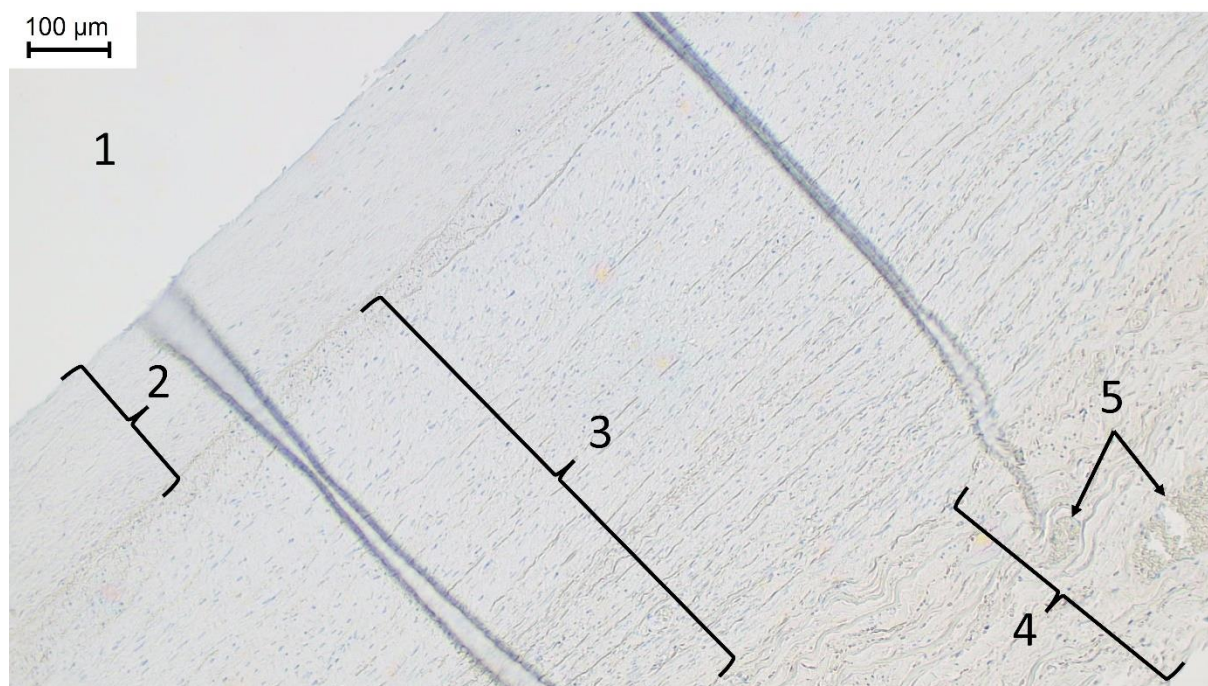


Abbildung 45: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C1) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia, 5 = Vasa vasorum mit Erythrozyten). Alle Gefäßwandschichten lassen keine Braunfärbung erkennen [0].





Abbildung 46: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

In der Abbildung sind die wichtigsten Strukturen annotiert (1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = brauner Herdbefund). Die Tunica intima wurde als negativ gewertet [0]. Die Tunica media wird durch die braunen Herde als signifikant positiv [+] bewertet.



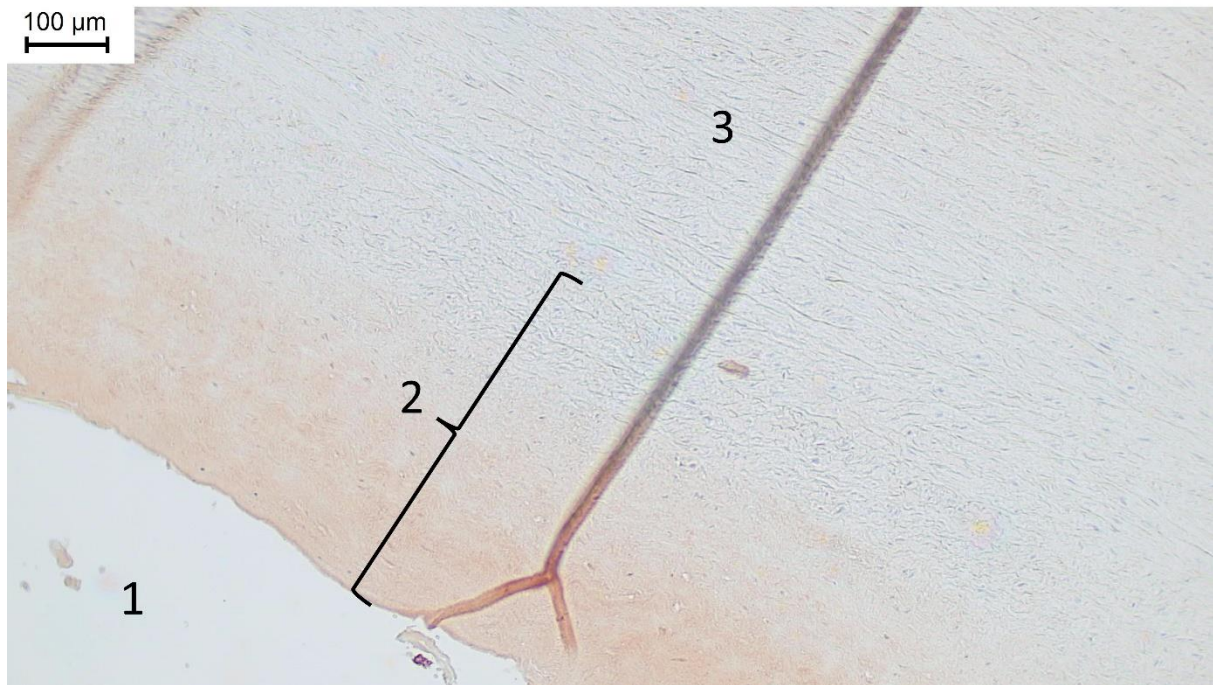


Abbildung 47: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media). Die Tunica intima wurde als signifikant positiv [+] gewertet. Die Tunica media enthält keinen TRPC6-Kanal Nachweis [0].

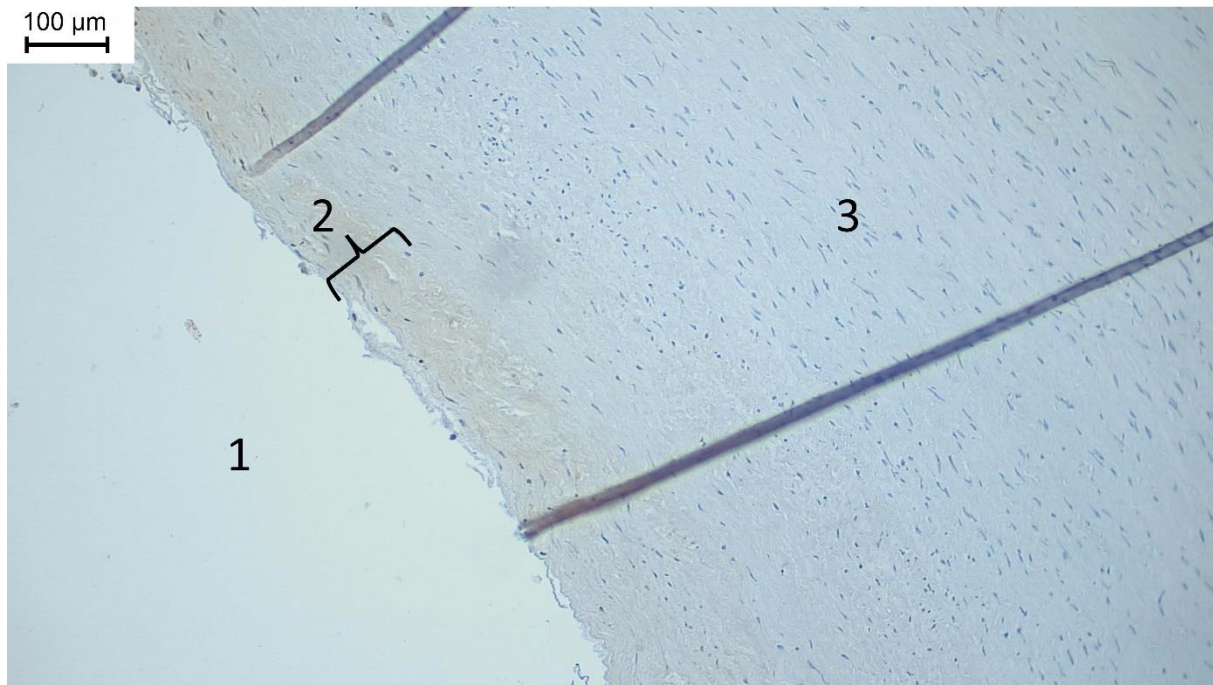
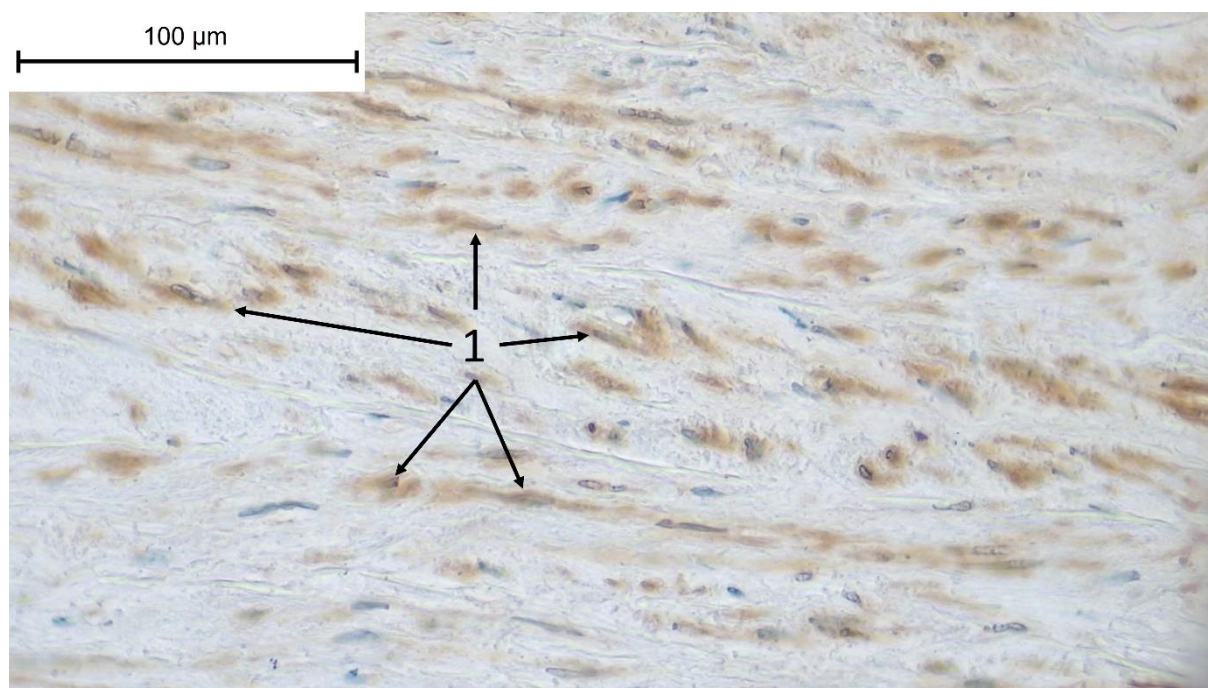


Abbildung 48: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media). Die Tunica intima und Adventitia zeigen fraglich positive [?] Braunfärbungen. Die Tunica media wurde als negativ bewertet [0].



*Abbildung 49: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C4) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.*

*(1 = braune Herde). Die Tunica media wurde aufgrund der herdartigen TRPC6-Kanal-Nachweise als signifikant positiv [+] bewertet.*



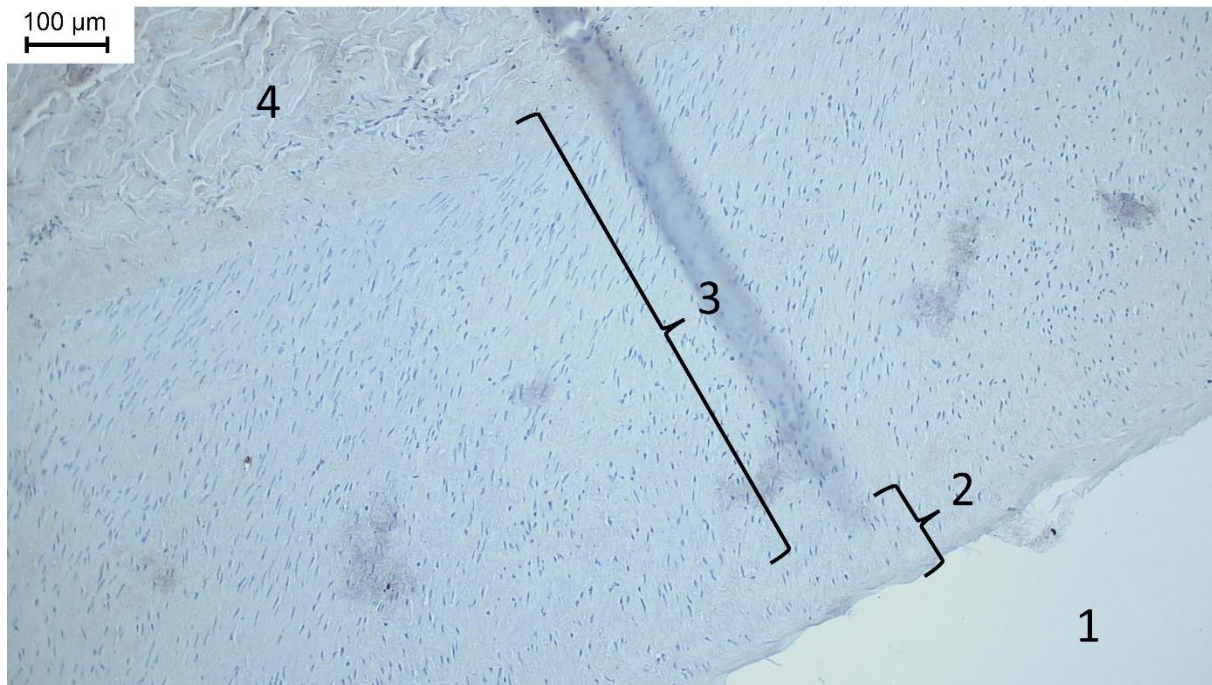


Abbildung 50: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Aorta abdominalis, Spender C5) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(1 = Lumen, 2 = Tunica intima, 3 = Tunica media, 4 = Adventitia). Die Tunica intima und Tunica media zeigen keine Braunfärbungen [0]. Die Adventitia wurde als signifikant positiv [+] bewertet.

## 4.2 Statistische Ergebnisse der IHC

Die semiquantitative Auswertung bezieht sich auf das Auswertungsschema der IHC. Somit wurde die Qualität der Braunfärbung, unter Berücksichtigung der Negativkontrollen, für jede Gefäßwandschicht bestimmt. Insgesamt wurden 40 non-COVID-Proben und 18 COVID-Proben in dieser Statistik ausgewertet. Die Tabelle 12 gibt dabei die Rohdaten für die non-COVID-Proben an und die Tabelle 13 bildet diese für die COVID-Proben ab. Hierbei werden in den Zeilen die nummerierten Gefäßabschnitte dargestellt. In den Spalten sind die Gefäßwandschichten mit jeweiliger Bewertung der Qualität der Braufärbung eingetragen. Die Zahlen geben die absolute Häufigkeit an mit der die jeweilige Gefäßwandschichten in dem jeweiligen Gefäßabschnitt bewertet wurde.

### 4.2.1 Daten zu non-COVID-Proben

Nr.	Probe	Tunica intima	Tunica media	Adventitia
1	Arteria renalis dextra	++ → 3	++ → 0	++ → 4
		+ → 2	+ → 0	+ → 0
		? → 0	? → 1	? → 2
		0 → 2	0 → 6	0 → 1
2	Arteria renalis sinistra	++ → 3	++ → 0	++ → 3
		+ → 2	+ → 0	+ → 3
		? → 0	? → 2	? → 0
		0 → 1	0 → 4	0 → 0

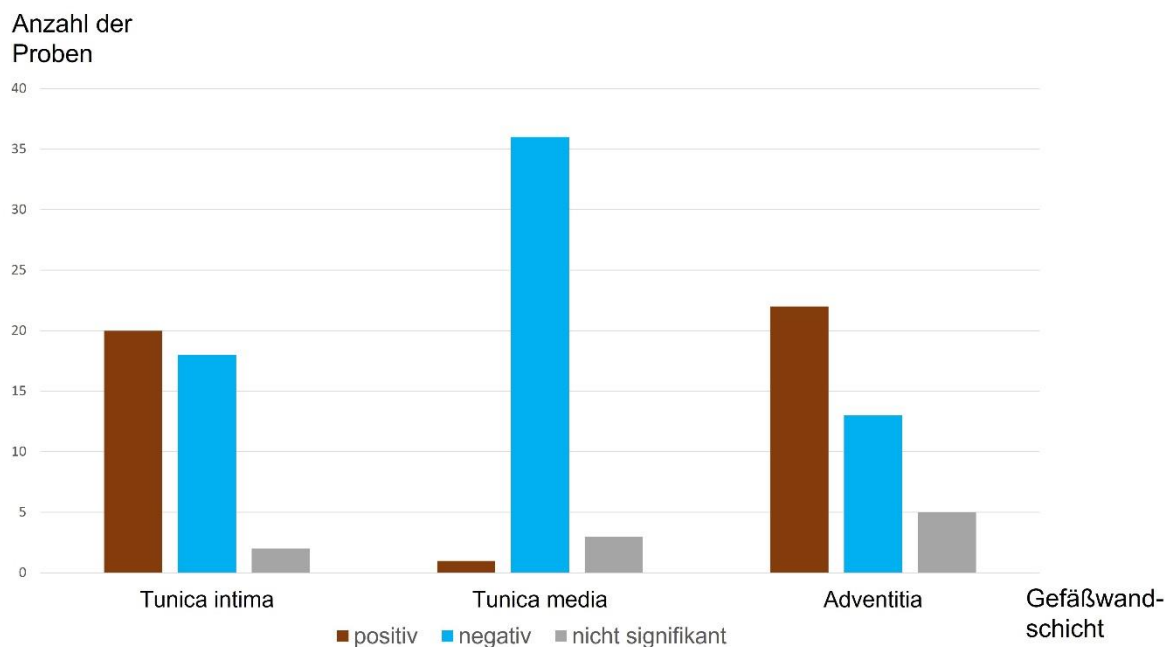
3	Arteria thoracica interna dextra	++ → 0 + → 0 ? → 1 0 → 3	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 4	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 3
4	Arteria thoracica interna sinistra	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 1
5	Arteria radialis dextra	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2
6	Aorta abdominalis/ thoracica	++ → 4 + → 0 ? → 1 0 → 1	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 6	++ → 1 + → 4 ? → 1 0 → 0
7	Vena cava inferior	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 1
8	Vena jugularis interna sinistra	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2
9	Truncus pulmonalis	++ → 1	++ → 0	++ → 0

		+ → 0 ? → 1 0 → 0	+ → 1 ? → 0 0 → 1	+ → 1 ? → 1 0 → 0
10	Ramus interventricularis anterior	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 1 + → 0 ? → 1 0 → 0
11	Arteria iliaca communis sinistra	++ → 1 + → 0 ? → 0 0 → 0	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 1	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 0
12	Sinus caroticus	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 1	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 2	++ → 1 + → 0 ? → 0 0 → 1
13	Vena cava superior	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 1	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 1	++ → 0 + → 0 ? → 1 0 → 0
14	Arteria carotis communis dextra	++ → 1 + → 0 ? → 0 0 → 0	++ → 0 + → 0 ? → 0 0 → 1	++ → 0 + → 1 ? → 0 0 → 0

Tabelle 12: Rohdaten non-COVID-Proben



Von insgesamt 40 bewerteten Proben zeigten 20 (50 %) einen deutlichen Nachweis von TRPC6-Kanälen in der Tunica intima. In 18 Proben (45 %) konnte kein Nachweis von TRPC6-Kanälen erbracht werden und zwei Proben (5 %) zeigten eine nicht genügend von der Negativkontrolle abweichende Färbung. In der Tunica media konnte in einem von 40 Fällen (2,5 %) der TRPC6-Kanal-Nachweis erbracht werden. In 36 Fällen (90 %) konnte der TRPC6-Kanal nicht nachgewiesen werden. In drei Fällen (7,5 %) wurde ein fraglicher Nachweis erbracht. In der Adventitia waren in 22 von 40 Fällen (55 %) ein deutlicher Nachweis des TRPC6-Kanals sichtbar. In 13 Fällen (32,5 %) war kein Nachweis von TRPC6-Kanälen möglich. In fünf von 40 Fällen (12,5 %) konnte ein fraglicher Nachweis von TRPC6-Kanälen erbracht werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 51 übersichtlich dargestellt.



*Abbildung 51: Ergebnisse des TRPC6-Kanal-Nachweises in einzelnen Gefäßwandschichten bei non-COVID-Proben als Balkendiagramm*

Gehäuft konnte der TRPC6-Kanal in der quantitativ größten Probengruppe nachgewiesen werden. Dies betrifft Nierenarterien sowie thorakal und abdominell entnommene Aorten. Dabei zeigten 10 von 13 Nierenarterien (77 %) eine deutliche Färbung in der Tunica intima, wohingegen in zwei von 13 Fällen (15,4 %) kein Nachweis gelang. In einem von 13 Fällen (7,7 %) war der Nachweis von TRPC6-Kanälen in der Tunica intima fraglich positiv. In der Tunica media konnte in keiner der 13 Proben (0 %) ein Nachweis für den TRPC6-Kanal erbracht werden. Hier stellte sich diese Schicht in 10 von 13 Fällen (77 %) als negativ und in drei von 13 Fällen (23 %) als fraglich positiv dar. In der Adventitia der Nierenarterien wurde der TRPC6-Kanal in 10 von 13 Fällen (77 %) nachgewiesen. In einem von 13 Fällen (7,7 %) erfolgte kein Nachweis und in zwei von 13 Fällen (15,4 %) zeigte sich eine fragliche Färbung, die auf den TRPC6-Kanal hindeutet.

Fünf von sechs Aorten (83 %) enthielten eine deutliche Färbung der Tunica intima. Eine von sechs (17 %) zeigte keinen TRPC6-Nachweis in dieser Wandschicht. In allen sechs von sechs Fällen (100 %) konnte kein Nachweis für den TRPC6-Kanal in dieser Gefäßwandschicht ausgemacht werden. In der Adventitia wurde der TRPC6-Kanal in fünf von sechs Fällen (83 %) nachgewiesen. In einem von sechs Fällen (17 %) zeigte sich eine fragliche Färbung, die auf den TRPC6-Kanal hindeutet.

Die beidseitig entnommenen thorakalen Arterien sind mit insgesamt sechs ausgewerteten Proben ebenfalls eine der häufigsten Proben dieser Arbeit. Die Tunica intima konnte in keinem von sechs Fällen (0 %) einen Nachweis für den TRPC6-Kanal liefern. Das gleiche Ergebnis wurde in der Tunica media erzielt. In der Adventitia wurde je ein positiver und ein fraglich positiver Nachweis von sechs Fällen (je 17 %) des TRPC6-Kanals gezeigt. In vier von sechs Fällen (67 %) blieb die Adventitia hier ohne Nachweis für TRPC6-Kanäle.

## 4.2.2 Daten zu COVID-Proben

Nr.	Probe	Tunica intima	Tunica media	Adventitia
6	Aorta abdominalis	++ → 0	++ → 0	++ → 2
		+ → 1	+ → 2	+ → 1
		? → 1	? → 0	? → 2
		0 → 3	0 → 3	0 → 0
6	Arcus aortae	++ → 2	++ → 0	++ → 1
		+ → 2	+ → 1	+ → 2
		? → 1	? → 1	? → 1
		0 → 0	0 → 3	0 → 1
(11)	Arteria iliaca externa sinister	++ → 0	++ → 0	++ → 0
		+ → 0	+ → 0	+ → 2
		? → 1	? → 0	? → 2
		0 → 3	0 → 4	0 → 0
14	Arteria carotis communis dextra	++ → 0	++ → 0	++ → 0
		+ → 0	+ → 0	+ → 2
		? → 1	? → 0	? → 0
		0 → 3	0 → 4	0 → 2

Tabelle 13: Rohdaten COVID-Proben

Bei insgesamt 18 ausgewerteten COVID Proben zeigte sich in 5 von 18 Fällen (27 %) ein positiver Nachweis für den TRPC6-Kanal in der Tunica intima. Die größte Gruppe, bei der die Tunica intima positive Ergebnisse erzielte, waren die Aortenproben. Hier waren fünf von zehn Proben (50 %) positiv, zwei von 10 (20 %) waren fraglich positiv und in drei von 10 Fällen (30 %) konnte in der Tunica intima keine Braunfärbung ausgemacht werden. In allen 18 Proben

konnte der TRPC6-Kanal drei Mal (16,7 %) in der Tunica media nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte sich dies bei den non-COVID-Proben nur in einem von 40 Fällen (2,5 %). In 10 von 18 Fällen konnte in der Adventitia der TRPC6-Kanal nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der COVID-Proben für die jeweilige Gefäßwandschicht werden in Abbildung 52 vereinfacht visualisiert.

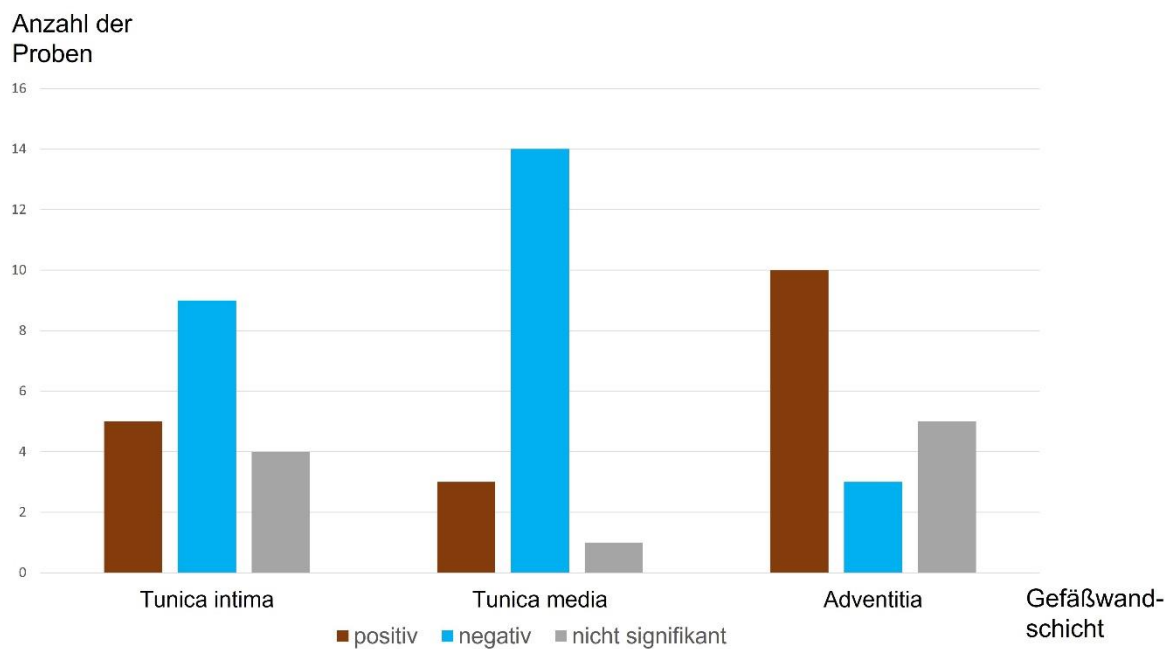


Abbildung 52: Ergebnisse des TRPC6-Kanal Nachweises in einzelnen Gefäßwandschichten bei COVID-Proben als Balkendiagramm

### 4.3 Ergebnisse Western Blot

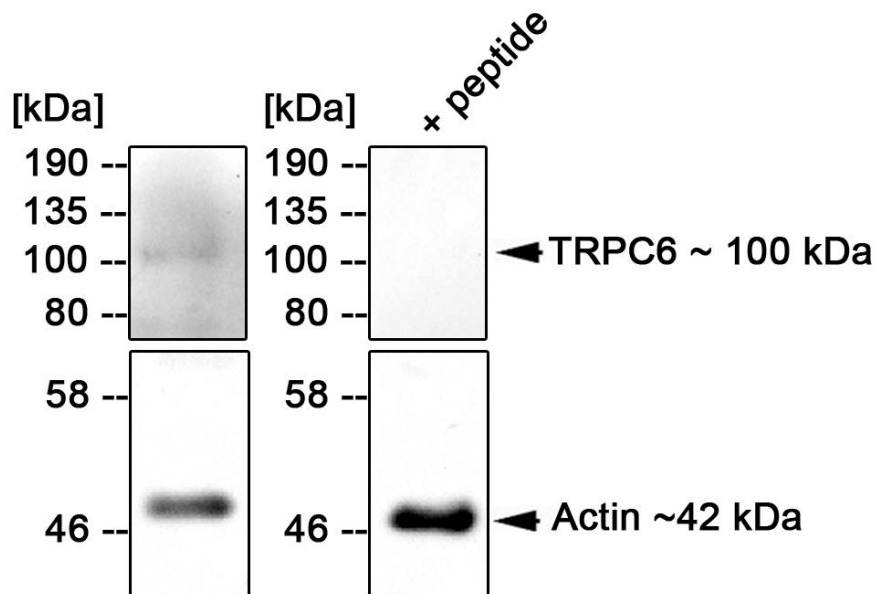


Abbildung 53: Ergebnis des Western Blots

Im Western Blot kann das Vorhandensein von dem TRPC6-Protein in skelettierten Präparaten der Aorta nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 53 zu sehen, erscheint eine Proteinbande bei den erwarteten ca. 110 kDa. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien, welche den gleichen Antikörper im Western Blot verwendet haben [229]. Zur Verifizierung eines korrekt durchgeführten Western Blots erscheint bei ca. 42 kDa die Kontrollbande mit Aktin.

## 4.4 Ergebnisse Fragestellung

Im Nachfolgenden sollen die Kernaussagen der Fragestellungen kurz zusammengefasst werden:

### 1. Lässt sich der TRPC6-Kanals in Gefäßen mittels Immunhistochemischer Färbung nachweisen?

Ja, ein Nachweis von TRPC6-Kanälen ist möglich. In vielen Fällen konnte ein spezifischer Nachweis durch den Vergleich mit Negativkontrollen erfolgen.

### 2. Gibt es einen Unterschied in dem Nachweis zwischen verschiedenen Gefäßabschnitten?

Ja, es konnte ein Unterschied abhängig vom betrachteten Gefäßabschnitt belegt werden. So zeigten sich in Nierenarterien und Aorten spezifische Färbungsmuster, die so nicht in anderen Abschnitten reproduziert werden konnten. Im Groben kann zusammengefasst werden, dass in größeren Arterien der TRPC6-Kanal eher nachgewiesen wurde als in kleineren Arterien oder Venen.

### 3. Gibt es einen Unterschied in dem Nachweis zwischen den einzelnen Gefäßwandschichten?

Ja, es gibt Unterschiede des TRPC6-Nachweises in den einzelnen Gefäßwandschichten. So zeigten die Tunica intima und die Adventitia TRPC6-Kanal spezifische Färbungen. In der Tunica media konnte, bis auf eine Ausnahme, bei allen non-COVID-Proben kein TRPC6-Kanal nachgewiesen werden.

4. Gibt es einen Unterschied zwischen Gefäßproben von non-COVID-Körperspendern im Vergleich zu COVID-Körperspendern

Ja, es konnten Unterschiede zwischen non-COVID-Proben und COVID-Proben beobachtet werden. Diese beziehen sich v. a. auf die Tunica media. Hier konnten in manchen Fällen TRPC6-Kanäle herdförmig angeordnet nachgewiesen werden. Eine Beobachtung, die in allen non-COVID-Proben nicht zu machen war.



## **5 Diskussion**

Ziel dieser Forschungsarbeit ist der Nachweis des TRPC6-Kanals mittels immunhistochemischer Färbung in humanen Gefäßen in verschiedenen histologischen Gefäßwandschichten und an verschiedenen Gefäßabschnitten.

### **5.1 Methodik**

Um mögliche Fehlerquellen oder Verbesserungspotential detektieren zu können, sollen hier einzelne Schritte der Methodik kritisch hinterfragt und diskutiert werden.

#### **5.1.1 Probenentnahme**

Die Anatomie des Menschen ist nur in den Lehrbüchern immer übereinstimmend. Die hier verwendeten Landmarken (Tabelle 7) beschreiben dabei Strukturen, die eine hohe Vergleichbarkeit aufgrund der anatomischen Lage ermöglichen. Bedingt durch zu Lebzeiten durchgeführte operative bzw. interventionelle Eingriffe war es nicht möglich, bei jedem Körperspender auch jeden Gefäßabschnitt zu entnehmen. Durch Eingriffe beeinflusste Gefäße wurden in dieser Arbeit nicht entnommen. Beispiel hierfür ist die Ross-Operation, ein herzchirurgischer Eingriff, bei der die Pulmonalklappe als Autograft (der Spender des Gewebes ist auch gleichzeitig der Empfänger) für die Aortenklappe eingesetzt wird und somit den Entnahmeort der Aorta ascendens nicht mehr nachvollziehbar ist. Auch mit Polyester ummantelte Stents der Aorta abdominalis erschwerten eine Probengewinnung, wobei die Aortenprobe an dieser Stelle vom Stent hätte abgeschält werden müssen. Auch ein gänzlich fehlendes Gefäßabschnittes ist möglich. So fehlte bei einer Entnahme die A. radialis, da diese als Graft (Transplantat) für einen koronaren Bypass verwendet wurde.

Genauso haben offensichtlich pathologisch veränderte Gefäßabschnitte (bspw. sehr starke Atherosklerose am Entnahmepunkt) die Probe unbrauchbar gemacht.

Da alle Gefäße aus einem Spender unter dessen Lebensbedingungen relativ gleich geprägt wurden, ist die Vergleichbarkeit zwischen den Gefäßabschnitten verschiedener Spender dadurch schwieriger. Eine Lösung wäre eine deutlich erhöhte Stückzahl an Proben, was wiederum mehr Körperspender voraussetzt und aus ethischen und zeitlich Gründen zu diskutieren ist. Da es sehr variabel ist wie viele Körperspenden das Institut pro Jahr erhält sollte für zukünftige Untersuchungen ein größerer Beobachtungszeitraum gewählt werden, um eine mögliche Verzerrung besser auszuschließen.

### **5.1.2 Aufbewahrung der Proben in Formaldehyd nach der Entnahme**

Die chemische Fixierung dient der Unterbrechung autolytischer Prozesse und verhindert so eine Gewebsdestruktion, die das TRPC6-Protein zerstören könnte. Es ist in der Diskussion, Formaldehyd für die Fixierung zu substituieren, da dieses mit größerem Anteil irreversible Denaturierungen verursacht als mögliche Substituenten, wie z. B. Ethanol. Durch Formaldehyd als Fixierungslösungen werden Proteine besser vor der Autolyse geschützt als Lipide und viele als Antigen dienende Kohlenhydrate. Auch die Renaturierung von Lipid- und Kohlenhydratstrukturen gelingt deutlich schwerer [12] [117]. Da die Zielstruktur des verwendeten primären Antikörpers hier ein Peptid ist wurde sich in dieser Arbeit für Formaldehyd entschieden.

### **5.1.3 Mikrotomschnitte**

Einige Proben sind in diesem Schritt aus der Studie gefallen. Starke sklerotische Veränderungen können die Proben unbrauchbar machen. Eine Dicke von sieben Mikrometer

zu schneiden, war bei Präparaten mit makroskopischen Plaques nicht möglich. Die Proben zerfledderten, selbst wenn die Paraffinblöcke zuvor gekühlt wurden. Es hätte eine deutlich größere Schnittdicke gewählt werden müssen. Hierbei sind dann mehrere Zellschichten überlagert was eine Auswertung deutlich erschwert und die Ergebnisse verzerren könnte. Damit in Zukunft auch atherosklerotisch veränderte Proben nicht unbrauchbar sind, ist eine chemische Entkalkifizierung möglich [189] [157]. Welche Auswirkung das auf den Nachweis des TRPC6-Kanals hat, ist jedoch unklar. In Schnittserien, die nur mikroskopisch Plaques zeigten, war der Mikrotomschnitt einfacher und die Qualität der Proben einer Schnittserie im Regelfall ausreichend.

#### **5.1.4 Demaskierung der Antigenstrukturen**

Durch die Konservierung der Proben in Formaldehyd bilden sich Quervernetzungen zwischen einzelnen Proteinen und teilweise irreversible Denaturierungen aus. Als Folge dieser Prozesse können Antigenstrukturen verdeckt werden, was man als Antigenmaskierung bezeichnet. Um diese Strukturen als Epitope für korrespondierende Antikörper sichtbar zu machen, also zu demaskieren, ist eine gewisse Renaturierung nötig. Dieser Effekt beruht auf neuen Denaturierungsprozessen und Teilchenbewegungen durch Hitze, wie auch auf der puffernden Eigenschaft des Citrats. Die Wahl der Dauer und Temperatur des Demaskierungsvorganges erfolgten aufgrund mehrerer Versuchsreihen. Je mehr Temperatur und Zeit in diesem Vorgang angewendet wurde, umso mehr Gewebe wurde destruiert und die Proben waren morphologisch schlechter. Je kürzer die Zeit und je niedriger die Temperatur waren, desto wahrscheinlicher blieben Antigene des TRPC6-Kanals durch die Konservierung verborgen, trotz histologisch besseren Ergebnissen. Um die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse zu minimieren, sollten eine maximale Zeit und Temperatur verwendet werden, ohne dass das Gewebe destruiert. Somit liegt hier

ein Spagat zwischen Antigen Freilegung und Gewebsdestruktion vor. Für diese Studie wurden die Proben für 60 Minuten bei 95°C in 1 %igem Citratpuffer demaskiert. Je nach Struktur und Lokalisation (Zellmembran, Zytoplasma, etc.) werden heute unterschiedliche Möglichkeiten der Demaskierung diskutiert [175] [174]. Dieser Schritt sollte in zukünftigen Arbeiten bedacht werden.

### **5.1.5 Blockierung der Proben**

Die Blockierung wird mit 10 %igem NGS als Blockierlösung durchgeführt. Der Zweck der Blockierlösung besteht darin, unspezifische Antigen-Antikörper-Bindungen zu minimieren und damit Hintergrundfärbungen herabzusetzen. Dies ermöglicht in der Auswertung eine bessere Darstellung spezifischer Bindungsgebiete. Des Weiteren werden auch Fc-Teile des Antikörpers blockiert, um eine endogene Bindung zwischen zwei Antikörpern möglichst zu verhindern. Durch eine Vorinkubation der Sekundärantikörper mit dem Serum der Spezies, die den Sekundärantikörper zu Verfügung stellt (Host), sollen diese unspezifischen Bindungen größtenteils vermieden werden [21]. Trotz der Annahme, dass unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen bei menschlichen Geweben, die mit Ziege als Host für sekundäre Antikörper inkubiert werden, so gut wie gar nicht vorkommen, gibt es dennoch unspezifische Bindungen. Diese beruhen vermutlich auf ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen, die bei Nicht-Blockierungen auftreten und noch nicht genau beschrieben sind. Daher wurden in dieser Studie Sekundärantikörper aus Ziegen benutzt und mit dem Serum des Hosts vorinkubiert, obwohl es keine bekannten Antigene gibt, die zu einer Hintergrundfärbung führen könnten [6].

### **5.1.6 Verwendeter Antikörper**

Der hier verwendete primäre Antikörper gegen TRPC6-Kanäle ist ein Knockout-validierter Antikörper. Dieser wurde in seiner Qualität von anderen Forschern mittels Kontrollpeptid getestet [81] [200]. Für diese Arbeit wurde die verwendete Charge der Antikörper ebenfalls mittels Kontrollpeptid auf die Qualität überprüft. Wie die IHC-Ergebnisse zeigen, liegt eine schwächere Färbung des Präparates vor, wenn die Proben zuvor mit einem mit Kontrollpeptid inkubierten Antikörper bearbeitet wurde. Die Qualität der Braunfärbung ist deutlich abgeschwächt im Vergleich zum Präparat, welches ohne Kontrollpeptid gefärbt wurde. Dies deutet auf eine vermehrte Bindung von primären Antikörpern bei der Vorinkubation mit dem Immunogen hin, welche auf der Probe nicht mehr den TRPC6-Kanal binden konnten und in weiteren Schritten abgewaschen wurden. Das bestätigt die Qualität des Antikörpers für diese Versuche. Die mitgeführte Negativkontrolle zeigte ein homogenes, negatives Signal. Die verwendete Antikörperkonzentration von 1:100 wurde vorab durch einen Feldversuch mit verschiedenen Konzentrationen erwählt. Hierbei zeigten sich bei der Konzentration von 1:100 sowohl spezifische Färbemuster als auch wenig Hintergrundfärbung. Die Proteinkonzentration der Antikörperlösung ist mit der des Kaninchenserums, welches für die Negativkontrollen verwendet wurde, vergleichbar. Die gleiche Vorinkubation mit Kontrollpeptid erfolgte ebenfalls bei der Durchführung des Western Blots. Hier bestätigte sich die Qualität des Antikörpers durch ein fehlendes Signal einer Proteinbande bei ca. 110 kDa und vorhandener Aktin-Bande bei 42 kDa zur Probe [98].

### **5.1.7 Inaktivierung der Peroxidase**

Der Zweck dieses Schrittes besteht darin, dass das Wasserstoffperoxid durch irreversible Reaktionen endogene Peroxidasen blockiert. Somit werden Substrate, die als Chromogene

fungieren, nur durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert. Endogene Peroxidasen könnten diesen Farbumschlag ebenfalls bewirken, was die Hintergrundfärbung erhöht und die Sensitivität des Ergebnisses senkt. Die endogenen Peroxidasen können an vielen Stellen in der Färbung ausgeschaltet werden. Wichtig ist hierbei die Konzentration, da in der Literatur Konzentrationen von 0,9 %iger [65] oder gar 0,3 %iger [197] Wasserstoffperoxid-Lösung beschrieben werden. In dieser Arbeit wurde eine 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet [160] [161]. Unter dieser Konzentration blieb das Gewebe morphologisch intakt und es zeigten sich spezifische Braunfärbungen, die den TRPC6-Kanal nachwiesen. Die Hintergrundfärbung ist dabei kaum ausgeprägt.

### **5.1.8 Substrat der Peroxidasereaktion**

Die an den Fc-Teil des sekundären Antikörpers gekoppelte HRP (Horseradish-Peroxidase) katalysiert die Oxidation von Substraten in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Waren diese Substrate Chromogene, erfolgte durch Konformationsänderung ein Farbumschlag in den sichtbaren Bereich. Für die Färbung wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat verwendet. Durch dieses Chromogen zeigte sich eine sichtbare Braunfärbung mit bekanntem leichtem Hintergrund (eine leichte, unspezifische Braunfärbung) als Artefakt. Stichprobenartig wurde auch 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) verwendet. Hierbei wurde die Intensität der spezifischen Färbung mit der Hintergrundfärbung verglichen. Es sollte das optimale Chromogen für diese Gewebe ermittelt werden. Beide Substrate haben sich, auch in Kombination mit HRP, gut in der Färbung humanen Gewebes bewährt. Bei den angefertigten Proben war der Unterschied der Hintergrundfärbung zwischen beiden Substraten (DAB und AEC) kaum zu unterscheiden. In der Literatur gibt es oftmals nur subjektive Argumente für den Einsatz von einem der Substrate. Demnach kann der objektive Zeitansatz in der IHC als Argument für die Benutzung von DAB als Substrat angeführt

werden. In den Stichproben, die mit AEC inkubiert wurden, wurde ein mehr als doppelt so großer Zeitaufwand beobachtet wie bei gleichem Prozedere mit DAB [61] [64].

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Unterschied in den Gefäßabschnitten**

Die Ergebnisse zeigen Unterschiede in den Gefäßabschnitten. So konnten nur in den Nierenarterien- und Aorta-Proben regelhaft TRPC6-Kanäle in der Tunica intima nachgewiesen werden. Zudem gab es Nachweise in Stichproben des Truncus pulmonalis, des Sinus caroticus dextra und der A. carotis communis dextra. Die Tunica media zeigte, bis auf wenige Ausnahmen, in allen Abschnitten keinen TRPC6-Kanal-Nachweis. Ein TRPC6-Kanal-Nachweis in der Tunica media konnte in Stichproben des Truncus pulmonalis und drei der COVID-Proben erfolgen. Die Adventitia zeigt keine klare Linie in den Ergebnissen der Färbung. So konnten in einigen Schnittserien reproduzierbar braune Färbungen der Adventitia gezeigt werden, in andere blieben die Signale jedoch reproduzierbar negativ. Eine Häufung von braungefärbter Adventitia zeigten größere Arterien und Venen im Vergleich zu Kleineren.

### **5.2.2 Tunica intima**

Das Endothel selbst stellte sich in nicht allen Gefäßen als positiv dar. Dies ist hinweisend auf ein unterschiedliches Vorkommen von TRPC6-Kanälen in diversen Gefäßabschnitten. Es kann aber auch eine Verzerrung des Ergebnisses vorliegen. Ursächlich hierfür könnte zum einen sein, dass das Endothel sich durch die Prozesse der Fixierung leicht abgelöst hat. Das kann zu Zellschädigung geführt haben und weiteren Artefakten, die einen durchgehenden Nachweis von TRPC6-Kanälen verhinderten. Genauso gut können abgelöste



Zellen aus dem Stratum subendotheliale oder Reste von Blutzellen (z. B. Erythrozyten oder Leukozyten) eine falsch positive Färbung verursacht haben. Auf menschlichen Erythrozyten ist der TRPC6-Kanal bereits nachgewiesen worden, was sich auch in unseren Ergebnissen nebensächlich widerspiegelt [53]. In Bezug zu Thesen aus Tiermodellen würde ein Vorhandensein von TRPC6-Kanälen im Gefäßendothel der aktuellen Forschungsmeinung entsprechen. So zeigen einige Studien einen für die Zellphysiologie von Endothelzellen signifikanten Kalziumeinstrom über TRPC6- und andere TRP-Kanäle [178] [193] [66]. Durch eine Aktivierung der Synthese von Stickstoffmonoxid könnte der TRPC6-Kanal so zur Gefäßweitstellung beitragen. Stickstoffmonoxid führt zur Vasodilatation und wirkt blutdrucksenkend [51] [186]. So konnte in einer Studie bei TRPC6<sup>-/-</sup>-Mäusen (TRPC6-Knockout-Mäusen) ein höherer systemischer Blutdruck nachgewiesen werden als beim Wildtyp [42]. Dies ist hinweisend auf eine verminderte NO-Freisetzung aus dem Endothel durch fehlende TRPC6-Kanäle.

Das Stratum subendotheliale weist deutlich reproduzierbar und spezifisch lokalisierte positive Signale in Nierenarterien und Aorten auf. Dies belegen die gleichen Färbemuster in 9 von 13 Fällen bei Nierenarterien, regelhaft klar begrenzt durch die Membrana elastica interna, welche sich selbst artifiziell verändert, aber deutlich darstellt. In den Aortenproben zeigten sich in 5 von 6 Fällen ebenfalls subendothelial deutlich positive Signale. Dahingegen ist hier die Abgrenzung zur Tunica media unschärfer als bei den Nierenarterien.

Ein Zellbestandteil dieser Schicht sind bindegewebsproduzierende Fibroblasten [104]. Bereits in mehreren Versuchen konnte der TRPC6-Kanal auf der Oberfläche von Fibroblasten nachgewiesen werden [224]. Diese Ergebnisse würden die bisherigen Annahmen der Forschung bestätigen, dass einige humane Fibroblasten in vivo den TRPC6-Kanal an ihrer Oberfläche besitzen.

Sehr häufig finden in der Pathogenese der Atherosklerose in dieser Schicht Veränderungen statt. Fibrotisches Remodeling kann durch eine Überaktivierung von Fibroblasten entstehen [213] [93] [146]. Eine Fibroblastendifferenzierung durch den TRPC6-Kanal über Angiotensin-II und anderen Zytokinen konnte in Studien am Mausmodell bereits belegt werden. Hier zeigte sich eine Aktivierung des TRPC6-Kanals auf Fibroblasten bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu TRPC6<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Zugabe von Angiotensin-II [51] [34]. Dadurch könnte eine Überaktivierung des TRPC6-Kanals auf Fibroblasten zu Stenosen in Gefäßabschnitten führen. Dies würde die vermehrte Expression von TRPC6-Kanälen bei IPAH-Patienten erklären [220] [219]. Zudem könnte ein Beitrag des TRPC6-Kanals zu vielen weiteren Krankheiten möglich sein, in denen die Atherosklerose ätiologisch beteiligt ist [72]. Gerade durch Veränderungen der Nierenarterien wäre die Entstehung einer Nierenarterienstenose mit konsekutiver renaler Hypertonie möglich [47] [18]. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die durch Minderperfusion der Niere das Renin-Angiotensin-Aldosteron System triggert und eine systemische Blutdruckerhöhung zur Folge hat [99].

In Bezug zu Studien, welche den TRPC6-Kanal sowohl in menschlichen Koronararterien als auch Herzmuskelzellen nachgewiesen haben, ist es denkbar, dass der TRPC6-Kanal an der Entstehung von KHK und Herzhypertrophie mitwirkt [218] [87].

### **5.2.3 Tunica media**

Die Ergebnisse in der Tunica media zeigen in der absoluten Mehrheit aller ausgewerteten Gefäßabschnitten kein positives Signal. Somit konnten in 39 von 40 Fällen keinerlei Braunfärbung als positives Signal für den TRPC6-Kanal nachgewiesen werden. Einzig eine Stichprobe des Truncus pulmonalis zeigte signifikante Braunfärbungen. Zudem zeigten drei

COVID-Proben Färbungen in der Media. Die COVID-Proben wurden jedoch isoliert ausgewertet und werden gesondert diskutiert.

In der Regel konnte der TRPC6-Kanal mittels IHC somit nicht in der Tunica media nachgewiesen werden. Die Tunica Media beinhaltet hauptsächlich glatte Muskelzellen [131]. Diese Ergebnisse widersprechen der aktuellen Annahmen der Forschung, dass der TRPC6-Kanal auf humanen glatten Muskelzellen in Gefäßen vorhanden ist. Dafür sprechen Studienergebnisse, welche einen relevanten Kalziueinstrom in glatten Gefäßmuskelzellen bei Ratten beschreiben [233]. Dieser Einstrom sorgt für eine Kontraktion in den Muskelzellen und führt zu einer Vasokonstriktion mit konsekutiver Erhöhung des Blutdrucks [137]. Der sympathischen Einfluss auf die Gefäßstellung soll ebenfalls durch den TRPC6-Kanal moduliert werden. So zeigen sich relevante Kalziueinströme in Versuchen, in denen die Auswirkungen des  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoren zur Vermittlung einer Vasokonstriktion über Transmitter mit TRPC6-Liganden verglichen wurden [85] [171]. Es scheint so, als würde der  $\alpha$ 1-Adrenorezeptor vermittelte Kalziueinstrom eine Hochregulation der TRPC6-Kanaldichte auf Zellmembranen bewirken [102]. Der physiologische Bayliss-Effekt spricht ebenfalls für eine mechanosensitive Komponente, die eine Konstriktion der Gefäßmuskelzellen durch TRPC6-Kanäle vermitteln könnte [181] [86].

Für ein richtig negatives Ergebnis dieser Arbeit und somit für ein Fehlen des TRPC6-Kanals an der Zelloberfläche von Gefäßmuskelzellen sprechen Studienergebnisse, die bei TRPC6<sup>-/-</sup>-Mäusen einen höheren Blutdruck aufweisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [42]. Dies ist erklärbar durch eine verminderte vasodilative Wirkung aufgrund einer niedrigeren NO-Freisetzung aus dem Endothel und einem relativ geringen Einfluss des TRPC6-Kanals auf die glatte Muskulatur.

Zu beachten ist, dass keine dieser Studien Situationen in Menschen in vivo abbilden. Der Großteil dieser Annahmen beruht auf Forschungsergebnissen in Tiermodellen mit Mäusen und Ratten [167] [91] oder Zellkulturen mit humanen embryonalen Zellen, sogenannten HEK-Zellen [59]. Diese Forschungen sind ein wichtiger Bestandteil da häufig Parallelen in der Physiologie und Pathophysiologie zum Menschen gezogen werden können. Im Sinne der translationalen Forschung müssen die Grundlagen der Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen überprüft werden. Denn Gewebe kann sich in bspw. Mäusen anders verhalten als im Menschen [152]. Daher ist die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet unerlässlich und der Nachweis des TRPC6-Kanals ein wichtiger Baustein.

Für diesen Abschnitt kann zusammengefasst werden, dass es vorher noch keinen systematischen Nachweis von TRPC6-Kanälen in Proben gab, welche direkt aus Menschen entnommen wurden. Dies wird erschwert durch die komplexe Arbeit mit Körperspendern und limitierten Probenanzahl in einem dafür bestimmten Zeitraum. Als erste Arbeit in diesem Bereich sind die Ergebnisse hinweisend auf das Nichtvorhandensein von TRPC6-Kanälen in menschlichen Gefäßmuskelzellen, was konträr zur aktuellen Forschungsmeinung ist. Es sind weitere Untersuchungen vonnöten um dieses Ergebnis zu verifizieren oder zu widerlegen.

#### **5.2.4 Tunica adventitia**

Die Adventitia ist von allen bewerteten Schichten die mit den meisten Artefakten. Das lockere Bindegewebe, welches die Adventitia zum Großteil bildet, ermöglicht ihre Verankerung und Verschiebbarkeit im Gewebe. Sie kann durch die Präparation bei der Entnahme von verschiedenen mechanischen Reizen zerstört worden sein. Bei weiteren Prozessen kann diese Schicht durch chemische Reize progradient zerstört bzw. abgelöst werden. Bereits in den HE-Schnitten zeigten sich teilweise große Artefakte. Eine Streuung

anderer Gewebearten bzw. Zellen in die Adventitia ist nicht auszuschließen, wie bspw. versprengtes Fettgewebe. So können neben ortsständigen Fibroblasten auch Makrophagen, Erythrozyten, Leukozyten oder andere Zellen eingewandert sein. Die Ergebnisse zeigen in manchen Schnitten klare positive Färbungen von gut erhaltenen Entitäten, bspw. Vasa vasorum mit Erythrozyten. Diese Ergebnisse waren reproduzierbar und daher lässt sich hier die Vermutung anstellen, dass Vasa vasorum TRPC6-Kanäle in ihrem Wandaufbau beinhalten. Als Nebenbefund konnte man ein Vorhandensein des TRPC6-Kanals auf Erythrozyten bestätigen. Waren die Entitäten nicht mehr gut und deutlich erhalten, zeigt auch die gesamte Adventitia ein homogen positives Signal. In einigen Schnitten waren homogene, unspezifische Färbungen, in denen das Gewebe der Adventitia nicht genau identifiziert werden konnte, zu finden. Summa summarum ist der Großteil der Ergebnisse zu unspezifisch und einzelne spezifische positive Signale sollten nur als grober Hinweis für den Proteinnachweis des TRPC6-Kanals gelten. Zukünftig sollten andere Verfahren in Betracht gezogen werden, um die Zellen in der Adventitia zu identifizieren, die einen positiven Proteinnachweis von TRPC6-Kanälen zeigen. So könnten mittels Immunfluoreszenzfärbung die positiven Signale für einen TRPC6-Proteinnachweis mittels spezifischer Zellantikörper (bspw. gegen Fibroblasten Subtypen) besser dargestellt werden.

### **5.2.5 Physiologie und Pathophysiologie des TRPC6-Kanals in Gefäßen**

Anhand der einzeln diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit, in Zusammenschau mit aktuellen Forschungsergebnissen, lässt sich die Beteiligung des TRPC6-Kanals an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in Gefäßen zusammenfassen. Als Bestandteil von Endothelzellen kann der TRPC6-Kanal über einen signifikanten Kalziumeinstrom die Synthese von Stickstoffmonoxid anregen [186]. Hierbei kommt es durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zur Vasodilatation [39]. Ebenso kann über einen

Kalziumeinstrom die Erhöhung der endothelialen Permeabilität als Teil des physiologischen Entzündungsprozesses (bspw. durch Histamin) zum Einstrom von Blutbestandteilen in Gewebe führen [193]. Ein pathologisch veränderter TRPC6-Kanal könnte damit zur endothelialen Dysfunktion beitragen. Im Stratum subendotheliale und der Adventitia wäre es möglich, Fibroblasten physiologisch durch TRPC6-Kanäle zu aktivieren [224]. Fibroblasten und ihre Subtypen sind in Gefäßen an der Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix bspw. durch elastische Fasern beteiligt [68]. Diese sind gerade bei Arterien im höherem Druckgebiet (Aorta und Aorten nahe Gefäße) wichtig, um die Dehnbarkeit der Gefäße zu gewährleisten. Eine Beteiligung des TRPC6-Kanals als Teil der Wundheilung, bspw. bei Gefäßverletzungen, ist somit denkbar [34]. Eine über den TRPC6-Kanal vermittelte Fibroblasten-Aktivität kann somit pathophysiologisch an der Atherosklerose durch fibrotisches Remodeling beteiligt sein [213] [72]. Zudem kann eine Fibroblasten-Überaktivität u. a. zur Nierenarterienstenose als seltene Ursache für sekundäre Hypertonie führen [47]. Ebenso deutet die erwähnte erhöhte TRPC6-Expression bei IPAH Patienten auf eine höhere Aktivität und damit auf eine ätiologische Beteiligung des TRPC6-Kanals bei dieser Krankheit hin [220].

In den beobachteten Gefäßabschnitten scheint der TRPC6-Kanal in der Tunica media nicht an der durch Kalzium-Calmodulin vermittelten Vasokonstriktion beteiligt zu sein. Diese beschreibt einen Kalziumeinstrom, welcher über Calmodulin die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase aktiviert und konsekutiv Myosin phosphoryliert, an welches Aktin andocken kann. Dies führt in glatten Gefäßmuskelzellen zur Vasokonstriktion [19] und deutet als Folge auf eine geringere Relevanz der sympathisch vermittelten Vasokonstriktion durch den TRPC6-Kanal hin.

### 5.2.6 Literaturvergleich

Aktuelle Forschungen aus Tiermodellen und mit HEK-Zellen, gehen von TRPC6-Kanälen in der Tunica intima aus. Besonders Endothelzellen [178], Fibro- [225] und Myofibroblasten [76] sollen den TRPC6-Kanal an ihrer Oberfläche besitzen. Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit können diese Daten bestätigen. Darüber hinaus gibt es durch verschiedene Proteinnachweise des TRPC6-Kanals Hinweise auf unterschiedliche Ausprägungen, je nach Gefäßabschnitt.

In der Tunica media konnte in dieser Arbeit in lediglich einem von 40 Fällen ein signifikanter Nachweis des TRPC6-Kanals gezeigt werden. Dies ist hinweisend auf ein Fehlen von TRPC6-Kanälen auf glatten Muskelzellen in den Gefäßabschnitten, welche in der vorliegenden Beobachtung berücksichtigt wurden. Dieses Ergebnis steht konträr zur aktuellen Forschungsmeinung, die von einem Vorhandensein des TRPC6-Kanals vor allem auf glatten Gefäßmuskelzellen ausgeht. Viele dieser Ergebnisse berufen sich auf Nachweise der TRPC6-Kanal-mRNA durch RT-PCR Verfahren, Zellkulturen [59] oder Tiermodellen [167]. Das Verfahren selbst ist sehr genau in dem Nachweis von mRNA, jedoch besagt eine vorhandene mRNA noch nicht explizit, dass der Kanal tatsächlich und in welchem Maße auf der Zelloberfläche eingebaut wird [67]. Andere Ergebnisse berufen sich auf Zellkulturen mit HEK-Zellen oder gezüchteten glatten Gefäßmuskelzellen. Auch diese Studien belegen ein Vorhandensein des TRPC6-Kanals in vitro, jedoch können in vivo aufgrund vieler systemischer und lokaler Gegebenheiten und Wechselwirkungen die Expressionen ganz anders sein [22]. Systematisch aus Menschen entnommene und untersuchte Gefäßproben gibt es bis dato nicht. An dieser Stelle zeigt sich die Notwendigkeit weitere Grundlagenforschung über den Nachweis des TRPC6-Kanals in menschlichen Gefäßen, um die Ergebnisse dieser Studie zu belegen oder widerlegen.



Die Adventitia ist in der Forschung nur sehr wenig beschrieben in Bezug zum Vorhandensein des TRPC6-Kanals. Diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass der TRPC6-Kanal auf Zellen in der Adventitia exprimiert wird. So zeigt sich in der Adventitia in 22 von 40 Fällen ein zumindest signifikanter Nachweis. Die braungefärbten Entitäten, die sehr gut erkannt werden konnten, waren Vasa vasorum mit enthaltenen Erythrozyten. Dabei gilt es zu bedenken, dass die Wahrscheinlichkeit ein Vasa vasorum zu finden in größeren Arterien auch höher ist als in kleineren Arterien bzw. in Venen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass je größer ein Gefäß ist, desto wahrscheinlicher kann in der Adventitia der TRPC6-Kanal nachgewiesen werden. Wie in der Diskussion zur Adventitia bereits dargelegt, ist es gut vorstellbar, dass es dort ebenfalls Zellen wie bspw. Fibroblasten gibt, welche den TRPC6-Kanal exprimieren. Vermutlich ist aufgrund der scheinbar geringeren klinischen Relevanz diesem Thema bisher kaum Aufmerksamkeit zugekommen.

### **5.2.7 Nicht bewertete Ergebnisse**

Nicht in die Bewertung eingeflossen sind Präparate in denen sich deutliche Pathologien zeigten. Zum einen da eventuell eine Pathologie den Nachweis von TRPC6-Kanälen verändern könnte. Zum anderen könnten entzündliche Zellinfiltrate die Ergebnisse verzerren.

Jedoch sollen einzelne Beobachtungen nicht unerwähnt bleiben: Große Plaques in der Aorta abdominalis wurden aus Interesse immunhistochemisch gefärbt und zeigten in zwei von zwei Fällen homogen, deutlich positive Signale der Plaques und des Umliegenden Gewebes. Auch eine Probe der A. radialis enthielt exzentrische Plaques, die IHC gefärbt das gleiche Bild zeigten. Alle anderen Proben der A. radialis die keine Plaques aufwiesen, keinen TRPC6-Kanal-Nachweis im Stratum subendotheliale. Das könnte hinweisend auf die

---

Beteiligung des TRPC6-Kanals an der Entstehung von atherosklerotischen Plaques sein und würde sich mit den anderen Erkenntnissen dieser Diskussion decken.

### **5.2.8 COVID-Proben**

Im Vergleich zu non-COVID Proben konnten in 3 von 18 Fällen bei COVID-Proben Ergebnisse beobachtet werden, die es bei allen 40 non-COVID-Proben nicht gab. Es imponierten signifikante Braunfärbung in der Tunica media, welche sich herdförmig angeordnet darstellten (siehe Abbildungen 46 und 49). Dieses Färbemuster konnte in der gesamten Studie nur in diesen drei Fällen ausgemacht werden. Bei zwei der Gefäßabschnitten handelt es sich um die Aorta abdominalis und thoracica des Probanden C1. Es wurde jeweils eine korrespondierende Negativkontrolle mitgeführt. Diese konnten keinerlei Anzeichen einer Braunfärbung an diesen Stellen zeigen. Auch HE-Färbungen gaben keine Hinweise auf mögliche falsch positive Signale aufgrund veränderter Integrität der Proben. Auf dem Totenschein des Patienten wurde als Todesursache „infektiös getriggertes kardial führendes Herz-Kreislaufversagen bei globaler Herzhypertrophie und viraler Pneumonie“ vermerkt.

Gleiche Herde finden sich auch in der Tunica media der Aorta abdominalis in Proband C4, wobei auch hier keine Auffälligkeiten bezogen auf die HE-Färbung und die Negativkontrolle beobachtbar waren. Eine fraglich positive Färbung war ebenfalls in der Aorta thoracica des gleichen Probanden auszumachen. Dabei sind in beiden Präparaten die braunen Herde nur teilweise in den Proben zu entdecken und schwächer ausgeprägt als bei dem Probanden C1. Die Todesursache bei Proband 4 ist laut Totenschein „dekompensierte Herzinsuffizienz bei NYHA IV“. Die hier vorliegenden Färbemuster sind hinweisend auf ein verändertes Vorkommen von TRPC6-Kanälen in Gefäßen durch COVID-19 bzw. starke inflammatorische Reize.

In der Gesamtschau der Ergebnisse kann angeführt werden, dass proinflammatorische Prozesse die Ausprägung des TRPC6-Kanals in Bezug auf Lokalisation bzw. Expression zu verändern scheinen. Darauf weisen die Herdbefunde in der Tunica media hin. Diese Studie gibt bis dato einmalige Daten über den Proteinnachweis von TRPC6-Kanälen bei Patienten mit Viruserkrankungen, die eine fakultative Pathologie in Gefäßen auslösen können. Darüber hinaus kann nur gemutmaßt werden, welche Rolle speziell COVID-19 als Viruserkrankung hier spielt. An dieser Stelle müssen definitiv weitere Studien erfolgen, um eine Korrelation zwischen den hier beschriebenen Befunden und COVID-19 zu festigen. Eine mögliche Erklärung für die Kausalität einer solchen Korrelation geben die bereits erwähnten Studien, die eine vermehrte Expression von TRPC6-Kanälen durch NFκB nachgewiesen haben [209] [210]. Zu bedenken gilt jedoch, dass es sich um einen Zufallsbefund handeln könnte, ohne jegliche Assoziation mit der akuten viralen Erkrankung selbst. Es könnten auch andere Vorerkrankungen des Probanden zu diesen beobachteten Veränderungen geführt haben.

### **5.3 Ausblick in die Zukunft**

Da der TRPC6-Kanal eine tragende Rolle in der Entstehung für verschiedene Krankheiten des Herzkreislauf Systems haben könnte, stellt eine pharmakologische Modulation einen realistischen Therapieansatz für die Zukunft dar. Weitere zellphysiologische Untersuchungen in vitro und später auch in vivo am Menschen müssen folgen. Nach aktuellen Erkenntnissen kann, je nach Krankheitsentität, sowohl eine Aktivierung als auch eine Blockade des Kanals eine sinnvolle Option sein.

Die Agonisierung bzw. Antagonisierung als Möglichkeit der pharmakologischen Modulation hat sich bereits in vielen Studien bereits bestätigt. Pharmakologischer Agonist

könnte das Zellmembran permeable DAG Analogon, OAG, sein. Es hat eine direkt aktivierende Wirkung auf den TRPC6-Kanal (siehe Abbildung 5) [78]. Dessen Selektivität müsste für einen Einsatz als spezifischer Agonist noch weiter überprüft werden. Es gibt deutliche Hinweise auf einen agonistischen Zusammenhang der Wirkung von Angiotensin-II auf den TRPC6-Kanal. Zum einen scheint ein Teil der durch Angiotensin-II ausgelösten Vasokonstriktion auf einer Aktivierung der PLC über den Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT1-Rezeptor) zu liegen. Dies legt eine konsekutiver TRPC6-Kanal-Aktivierung nahe [167]. Zum anderen bedingt die Angiotensin-II-Wirkung auf Zellen eine vermehrte Expression des TRPC6-Kanals [139].

Pharmakologisch möglicher Antagonist könnte bspw. das Larixylacetat [199] sein. Es zeigte eine durch TRPC6-Kanal-Blockade verminderte endotheliale Dysfunktion in Aorten von Ratten [25]. Jüngst beweist sich auch der oral verfügbare und selektive Antagonist, BI-749327 (BI = bioavailable), als eine mögliche Option [114]. Weitere Studien legen einen Zusammenhang zwischen den endogen vorkommenden natriuretischen Peptiden ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) und BNP (brain natriuretic peptide) mit der TRPC6-Aktivität nahe. ANP und BNP zeigen eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des TRPC6-Kanals im Mausmodell [95]. Somit könnte über die Regulierung von ANP und BNP indirekt die Aktivität des TRPC6-Kanals beeinflusst werden. Dies erfolgt bspw. über den Nephrylisin-Inhibitor Sacubitril, welcher den ANP-Abbau hemmt [37].

Eine sinnvolle Aktivierung des TRPC6-Kanals könnte bei Patienten mit arterieller Hypertonie vorliegen. So führt ein endothelial vermittelter Kalziumeinstrom zu einer Aktivierung der NO-Synthese mit konsekutiver NO-Freisetzung führen. Dies hat in glatten Muskelzellen der Tunica media eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und damit die Vasodilatation zur Folge [60]. Durch die Weitstellung der Gefäße sinkt der Druck im

Stromgebiet. Somit könnten TRPC6-Kanal-Agonisten, neben bspw. Kalziumantagonisten, eine weitere Therapieoption für diese Patientengruppe sein.

Da die Expression des TRPC6-Kanals in verschiedenen Gefäßabschnitten auch verschieden ausgeprägt zu sein scheint, könnten über den gleichen Mechanismus nur selektiv manche Gefäßabschnitte angesprochen werden. Einen Nutzen würden bspw. Patienten mit erektiler Dysfunktion haben, die eine Alternative zu Phosphodiesterase-V-Hemmern bekommen könnten [15]. Voraussetzung wäre, dass die Dichte an TRPC6-Kanälen im Stromgebiet der blutversorgenden Arterien für den Schwellkörper des Penis am Endothel möglichst größer ist als in anderen Bereichen.

Bei Krankheiten, die eine Verdickung der Gefäßwand und ggfs. daraus resultierend eine Einengung des Lumens erfahren, kann eine Antagonisierung des TRPC6-Kanals eine vielversprechende Therapieoption sein. Eine mögliche Indikation für eine Therapie bieten dabei atherosklerotischer Veränderungen. Durch Blockade des TRPC6-Kanals ist eine verminderte Aktivität von Fibroblasten möglich. Somit würde zum einen die Fibroblastenproliferation reduziert und die Progredienz einer Fibrose des Gefäßes verlangsamt werden. Die natürliche Elastizität arterieller Gefäße bliebe damit länger erhalten und Krankheiten, die sich auf dem Boden der Atherosklerose bilden, sind in ihrer Entstehung verlangsamt. Zum anderen spielt in der Genese der Atherosklerose auch die Einlagerung bestimmter Lipide, wie Cholesterin, eine wichtige Rolle. Gelangen diese Lipide durch bspw. LDL-Cholesterin (Low-Density-Lipoprotein) in die Gefäßwand, können sie dort von Cholinesterasen gespalten werden und das Cholesterin wird freigesetzt. Hier wird es von Makrophagen phagozytiert und es bilden sich sogenannten Schaumzellen aus, welche einen Lipidkern bilden und damit die Gefäßwand verdicken. An der Freisetzung des Cholesterins ist die Fibroblastenaktivität über eigene Cholinesterasen ebenfalls beteiligt [105]. Somit könnte eine Antagonisierung des TRPC6-Kanals über verminderte Aktivität von

Fibroblasten und damit der Cholinesterase zu einer Verlangsamung der Bildung von Schaumzellen bedeuten und damit die Progredienz der Atherosklerose verlangsamen.

In der Pathogenese der Atherosklerose findet sich darüber hinaus eine entzündliche Komponente. Die Bindungsstelle für NF $\kappa$ B an TRPC6-Kanälen, das bei inflammatorischen Prozessen vermehrt gebildet wird, ist hinweisend auf eine erhöhte Aktivität des TRPC6-Kanals bei Entzündungsprozessen [116,227]. Zudem ist die endotheliale Dysfunktion ein wesentlicher Bestandteil in der Entstehung von vasokonstriktiven und prothrombogenen Prozessen [62]. Diese Prozesse könnten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und KHK spielen. Von einer präemptive Therapie könnten vor allem Patienten mit Risikofaktoren für Schlaganfälle und Herzinfarkte profitieren [72].

Wie in der Einleitung bereits dargelegt ist der TRPC6-Kanal bei Patienten mit IPAH übermäßig exprimiert [220] [219]. In der Entstehung der IPAH ist vor allem eine Gefäßwandproliferation, die auch als Fibrose beschrieben werden kann, ursächlich. Durch eine Blockierung des TRPC6-Kanals könnte hier eine weitere Einengung der Gefäßwand verhindert werden und der pulmonalarterielle Druck damit nicht weiter erhöht werden. Dies könnte wieder auf der niedrigeren Fibroblastenaktivität beruhen [89]. Die Antagonisierung des TRPC6-Kanals zu Verminderung von Fibrose im Herzen bspw. ist bereits nachgewiesen worden [114].

Der gleiche Mechanismus kann letztendlich auch bei Patienten mit NAST eine weitere Therapieoption bieten. Da diese Arbeit ein Vorhandensein des TRPC6-Kanals im Stratum subendotheliale nahelegt und letzterer mutmaßlich eine Expression auf Fibroblasten zeigen könnte, würde auch hier eine verminderte Fibroblastenproliferation zu keiner weiteren Einengung der Nierenarterien führen. Im weiteren Verlauf wäre die Aktivität des RAAS damit weniger ausgeprägt und eine renale Hypertonie in ihrer Progredienz verlangsamt. Doch auch eine Agonisierung des Kanals an Endothelzellen könnte eine Vasodilatation über

endotheliale NO-Freisetzung hervorrufen und damit die Durchblutung in den Nierenarterien verbessern. Welcher Mechanismus hier tatsächlich vorliegt, kann nur gemutmaßt werden.

Darüber hinaus könnte sich ein TRPC6-Antagonismus als Co-Medikation unter Bleomycin (ein bei manchen Krebserkrankungen eingesetztes Chemotherapeutikum) Therapie als sinnvoll darstellen, wie aktuelle Studienergebnisse suggerieren. Bleomycin zeigt als unerwünschte Arzneimittelwirkung pulmonale Fibrosen [38]. Es ließ sich eine weniger ausgeprägte pulmonale Fibrose im Mausmodell nach Ausschalten von TRPC6-Kanälen nachweisen [77].

Es bleibt abzuwarten, wie schnell weitere anatomische und physiologische Forschungsergebnisse bezüglich der TRPC6-Kanäle im menschlichen Körper gewonnen werden können. Es sind weitere Studien zum TRPC6-Nachweis in Gefäßen mit größeren Fallzahlen und ggfs. anderen Methoden vonnöten, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen oder widerlegen. Der TRPC6-Kanal scheint ein guter Kandidat für eine pharmakologische Therapieoption für Patienten mit Atherosklerose oder IPAH zu sein. Darüber hinaus ist eine Erforschung andere TRP-Kanäle im Hinblick auf die gleiche Thematik sehr interessant, wobei der Nachweis im menschlichen Gewebe und physiologische Forschung an Tiermodellen oder Zellkulturen im Vordergrund stehen sollten.

Diese Ergebnisse sollen im Sinne des translationalen Konzepts zur Erforschung des TRPC6-Kanals dienen. In der Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen aus Tiermodellen oder Zellkulturen auf den Menschen scheint sich zu bestätigen, dass der TRPC6-Kanal in menschlichen Gefäßen vorhanden ist. Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der TRPC6-Kanal in größeren Arterien im Vergleich zu kleineren Arterien oder Venen eine übergeordnete Rolle zu spielen scheint. Zudem können die Ergebnisse die Annahme der Forschung eines Vorhandenseins des TRPC6-Kanals in der Tunica intima bekräftigen.



Dahingegen deutet ein verminderter Nachweis des TRPC6-Kanals in der Tunica media in den Ergebnissen auf weniger Relevanz des TRPC6-Kanals für glatte Gefäßmuskelzellen hin. In der Hoffnung dass ein Grundstein für eine systematische anatomische Untersuchung mit dieser Arbeit gelegt wurde, darf man gespannt in die Zukunft blicken.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur von TRP-Kanälen.....	10
Abbildung 2: Heterotetramerbildung eines funktionellen TRP-Kanals.....	11
Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum von TRP-Kanälen.....	15
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines TRPC6-Kanals.....	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung eines TRPC6-Kanals.....	20
Abbildung 6: Schematisch dargestellte Beispiele für die häufigsten Entnahmeorte.....	40
Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer IHC-Färbung.....	49
Abbildung 8: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	58
Abbildung 9: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	61
Abbildung 10: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin, nach Präinkubation mit Kontrollpeptiden.....	62
Abbildung 11: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 7) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	63
Abbildung 12: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	66

Abbildung 13: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. renalis dextra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	67
Abbildung 14: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. renalis sinistra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	68
Abbildung 15: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. renalis sinistra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	69
Abbildung 16: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. thoracica interna dextra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	70
Abbildung 17: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. thoracica interna dextra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ...	71
Abbildung 18: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. thoracica interna sinistra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	72
Abbildung 19: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. thoracica interna sinistra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ...	73
Abbildung 20: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates ( <i>A. radialis dextra</i> , Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	74

Abbildung 21: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. radialis dextra, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	75
Abbildung 22: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	76
Abbildung 23: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	77
Abbildung 24: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (V. cava inferior, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	78
Abbildung 25: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (V. cava inferior, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	79
Abbildung 26: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (V. jugularis interna sinistra, Spender 6) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	80
Abbildung 27: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (V. jugularis interna sinistra, Spender 6) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ...	81
Abbildung 28: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	84

Abbildung 29: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	85
Abbildung 30: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	86
Abbildung 31: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	87
Abbildung 32: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	88
Abbildung 33: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 5) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	89
Abbildung 34: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 5) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	90
Abbildung 35: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	91
Abbildung 36: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	92

Abbildung 37: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis dextra, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	93
Abbildung 38: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (A. renalis sinistra, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	94
Abbildung 39: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	96
Abbildung 40: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	97
Abbildung 41: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 7) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	98
Abbildung 42: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 8) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	99
Abbildung 43: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender 9) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	100
Abbildung 44: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	103

Abbildung 45: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C1) mit immunhistochemischer Kontrolle nach Inkubation mit Kaninchenserum (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin.	104
Abbildung 46: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C1) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	105
Abbildung 47: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C2) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	106
Abbildung 48: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C3) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	107
Abbildung 49: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C4) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	108
Abbildung 50: Mikrofotografie eines repräsentativen Präparates (Gefäßabschnitt 6, Spender C5) mit immunhistochemischem Nachweis von TRPC6-Kanälen (als bräunlicher Niederschlag entwickelt mit DAB) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin. ....	109
Abbildung 51: Ergebnisse des TRPC6-Kanal-Nachweises in einzelnen Gefäßwandschichten bei non-COVID-Proben als Balkendiagramm .....	113
Abbildung 52: Ergebnisse des TRPC6-Kanal Nachweises in einzelnen Gefäßwandschichten bei COVID-Proben als Balkendiagramm.....	116
Abbildung 53: Ergebnis des Western Blots .....	117

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper .....	27
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	29
Tabelle 3: Verwendete Materialien .....	30
Tabelle 4: Verwendete Geräte .....	32
Tabelle 5: Liste der non-COVID-Spender .....	36
Tabelle 6: Liste COVID-Körperspender .....	37
Tabelle 7: Probenauswahl und Entnahmeorte .....	40
Tabelle 8: Ablauf der Einbettung .....	45
Tabelle 9: Ablauf der HE-Färbung .....	47
Tabelle 10: Auswertungsschema .....	56
Tabelle 11: Übersicht der Inhalte einzelner Gefäßwandschichten .....	57
Tabelle 12: Rohdaten non-COVID-Proben .....	112
Tabelle 13: Rohdaten COVID-Proben .....	115



## 8 Literaturverzeichnis

1. Aaslid R, Lindegaard KF, Sorteberg W, Nornes H (1989) Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke* 20:45–52
2. Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *The FASEB Journal* 23:297–328
3. Acar C, Ramsheyi A, Pagny JY, Jebara V, Barrier P, Fabiani N, Deloche A, Guermontprez JL, Carpentier A, Barner HB, Brodman RF, Da Costa FDA, Mandke N V., Jegaden O (1998) The radial artery for coronary artery bypass grafting: Clinical and angiographic results at five years. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 116:981–989
4. Adams DJ, Barakeh J, Laskey R, Van Breemen C (1989) Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *The FASEB Journal* 3:2389–2400
5. 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
6. Alexander EL, Sanders SK (1977) F(ab')<sub>2</sub> Reagents Are not Required If Goat, Rather Than Rabbit, Antibodies Are Used to Detect Human Surface Immunoglobulin. *The Journal of Immunology* 119:
7. Allbritton NL, Meyer T (1993) Localized calcium spikes and propagating calcium waves. *Cell Calcium* 14:691–697
8. Amberg GC, Navedo MF (2013) Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation* 20:281–289

9. B B, D C (2014) Glomerular diseases: FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:626–632
10. Bach G (2005) Mucolipin 1: Endocytosis and cation channel - A review. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 451:313–317
11. Bai Y, Yu X, Chen H, Horne D, White R, Wu X, Lee P, Gu Y, Ghimire-Rijal S, Lin DCH, Huang X (2020) Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *Elife* 9:1–18
12. Battifora H, Kopinski M (1986) The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 34:1095–1100
13. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:517–529
14. Bonacchi M, Prifti E, Maiani M, Frati G, Giunti G, Di Eusanio M, Di Eusanio G, Leacche M (2006) Perioperative and clinical-angiographic late outcome of total arterial myocardial revascularization according to different composite original graft techniques. *Heart and Vessels* 21:69–77
15. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP (2006) Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 147:S252–S257
16. 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 G(q) class of g protein. *Journal of Biological Chemistry* 272:29672–29680
17. Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L (1999) Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14955–14960
18. Boutari C, Georgiou E, Sachinidis A, Katsimardou A, Christou K, Piperidou A, Karagiannis A (2019) Renovascular Hypertension: Novel Insights. *Current Hypertension Reviews* 16:24–29
  19. Braun AP, Schulman H (1995) THE MULTIFUNCTIONAL CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE: From Form to Function. *Annu Rev Physiol* 57:417–462
  20. Bröker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Chi VN, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weißgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Köhr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *The EMBO Journal* 36:2770–2789
  21. Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M (2011) Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: Fallacies and facts. *Scientific Reports* 1:1–6
  22. Calabria AR, Shusta E v. (2008) A genomic comparison of in vivo and in vitro brain microvascular endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28:135–148
  23. Castelnovo L, Capelli F, Tamburello A, Faggioli PM, Mazzone A (2020) Symmetric cutaneous vasculitis in COVID-19 pneumonia. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 34:e362–e363
  24. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1–23

25. Chen X, Taylor-Nguyen NN, Riley AM, Herring BP, White FA, Obukhov AG (2019) The TRPC6 inhibitor, larixyl acetate, is effective in protecting against traumatic brain injury-induced systemic endothelial dysfunction. *Journal of Neuroinflammation* 16:1–13
26. Chen X, Sooch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 2020, Vol 9, Page 1983 9:1983
27. Chevesich J, Kreuz AJ, Montell C (1997) Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron* 18:95–105
28. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S (2020) The COVID-19 pandemic. <https://doi.org/10.1080/1040836320201783198> 57:365–388
29. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2:387–396
30. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151:369–374
31. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant [30]. *Nature* 224:285–287
32. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7:301
33. Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkentin JD (2012) A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo. *Developmental Cell* 23:705–715

34. Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L, Molkenin JD (2012) A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell* 23:705–715
35. Deegens JKJ, Steenbergen EJ, Wetzels JFM (2008) r E V i E W review on diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis.
36. DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, Putney JW (2009) TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *The Journal of Physiology* 587:2275–2298
37. D’Elia E, Iacovoni A, Vaduganathan M, Lorini FL, Perlini S, Senni M (2017) Neprilysin inhibition in heart failure: mechanisms and substrates beyond modulating natriuretic peptides. *European Journal of Heart Failure* 19:710–717
38. della Latta V, Cecchetti A, del Ry S, Morales MA (2015) Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research* 97:122–130
39. Derbyshire ER, Marletta MA (2012) Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-050410-100030> 81:533–559
40. Desai ND, Cohen EA, Naylor CD, Fremes SE (2004) A Randomized Comparison of Radial-Artery and Saphenous-Vein Coronary Bypass Grafts. *New England Journal of Medicine* 351:2302–2309
41. D’Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D’Urso M, Ciccodicola A (1998) Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22. *Cytogenetic and Genome Research* 83:46–47

42. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovska G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005) Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> Mice. *Molecular and Cellular Biology* 25:6980–6989
43. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovska G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005) Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> Mice. *Molecular and Cellular Biology* 25:6980–6989
44. Dryer SE, Reiser J (2010) TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. <https://doi.org/10.1152/ajprenal002982010> 299:689–701
45. Du W, Huang J, Yao H, Zhou K, Duan B, Wang Y (2010) Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *Journal of Clinical Investigation* 120:3480–3492
46. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998) Down-Regulation of the Novel Gene Melastatin Correlates with Potential for Melanoma Metastasis. *Cancer Research* 58:
47. Elliott WJ (2008) Renovascular Hypertension: An Update. *The Journal of Clinical Hypertension* 10:522–533
48. Estacion M, Li S, Sinkins WG, Gosling M, Bahra P, Poll C, Westwick J, Schilling WP (2004) Activation of Human TRPC6 Channels by Receptor Stimulation \*. *Journal of Biological Chemistry* 279:22047–22056
49. Fan C, Choi W, Sun W, Du J, Lu W (2018) Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *Elife* 7:

50. Firth AL, Remillard C V., Yuan JXJ (2007) TRP channels in hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772:895–906
51. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Lüscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A (2012) The Assessment of Endothelial Function. *Circulation* 126:753–767
52. Fleig A, Penner R (2004) The TRPM ion channel subfamily: Molecular, biophysical and functional features. *Trends in Pharmacological Sciences* 25:633–639
53. Föllner M, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM (2008) TRPC6 Contributes to the Ca<sup>2+</sup> Leak of Human Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 21:183–192
54. Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N (2011) Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respiratory Research* 2011 12:1 12:1–10
55. G H, L W, RF S (2019) TRPC Channels in Proteinuric Kidney Diseases. *Cells* 9:
56. García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sánchez E, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *Journal of Neuroscience* 24:5307–5314
57. Gavriatopoulou M, Korompoki E, Fotiou D, Ntanasis-Stathopoulos I, Psaltopoulou T, Kastiris E, Terpos E, Dimopoulos MA (2020) Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clinical and Experimental Medicine* 2020 20:4 20:493–506
58. Ghosh D, Syed AU, Prada MP, Nystoriak MA, Santana LF, Nieves-Cintrón M, Navedo MF (2017) *Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle*. Academic Press Inc.

59. Gibon J, Tu P, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2011) The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favours the intracellular accumulation of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808:2807–2818
60. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ (2012) Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. *The Journal of Clinical Hypertension* 14:198–205
61. Glass G, Papin JA, Mandell JW (2009) SIMPLE: A sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 57:899–905
62. Godo S, Shimokawa H (2017) Endothelial Functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37:e108–e114
63. Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *Journal of Biological Chemistry* 277:48303–48310
64. Gonda K, Watanabe M, Tada H, Miyashita M, Takahashi-Aoyama Y, Kamei T, Ishida T, Usami S, Hirakawa H, Kakugawa Y, Hamanaka Y, Yoshida R, Furuta A, Okada H, Goda H, Negishi H, Takanashi K, Takahashi M, Ozaki Y, Yoshihara Y, Nakano Y, Ohuchi N (2017) Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness. *Scientific Reports* 7:1–13
65. Gray SE, Kay E, Leader M, Mabruk M (2006) Analysis of p16 expression and allelic imbalance / loss of heterozygosity of 9p21 in cutaneous squamous cell carcinomas. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10:778–788
66. Greenberg HZE, Carlton-Carew SRE, Zargaran AK, Jahan KS, Birnbaumer L, Albert AP (2019) Heteromeric TRPV4/TRPC1 channels mediate calcium-sensing receptor-



- induced relaxations and nitric oxide production in mesenteric arteries: comparative study using wild-type and TRPC1<sup>-/-</sup> mice. <https://doi.org/10.1080/1933695020191673131>  
13:410–423
67. 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 Biochimica et Biophysica Sinica* 40:426–436
  68. Halper J, Kjaer M (2014) Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. 31–47
  69. Hanafi R, Roger P-A, Perin B, Kuchcinski G, Deleval N, Dallery F, Michel D, Hacein-Bey L, Pruvo J-P, Outteryck O, Constans J-M (2020) COVID-19 Neurologic Complication with CNS Vasculitis-Like Pattern. *American Journal of Neuroradiology* 41:1384–1387
  70. Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651
  71. Hardie RC (2003) Regulation of TRP Channels via Lipid Second Messengers. *Annual Review of Physiology* 65:735–759
  72. Harraz OF, Jensen LJ (2021) Vascular calcium signalling and ageing. *The Journal of Physiology*
  73. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JXJ, Humbert M (2009) Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 54:S10–S19

74. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, Merdji H, Clere-Jehl R, Schenck M, Fagot Gandet F, Fafi-Kremer S, Castelain V, Schneider F, Grunebaum L, Anglés-Cano E, Sattler L, Mertes P-M, Meziani F (2020) High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Medicine* 2020 46:6 46:1089–1098
75. Hernández-Fernández F, Sandoval Valencia H, Barbella-Aponte RA, Collado-Jiménez R, Ayo-Martín Ó, Barrena C, Molina-Nuevo JD, García-García J, Lozano-Setién E, Alcahut-Rodríguez C, Martínez-Martín Á, Sánchez-López A, Segura T (2020) Cerebrovascular disease in patients with COVID-19: neuroimaging, histological and clinical description. *Brain* 143:3089–3103
76. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, Zwicklenpflug W, Flockerzi V, Storch U, Yildirim AÖ, Gudermann T, Königshoff M, Dietrich A (2017) Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863:560–568
77. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, Zwicklenpflug W, Flockerzi V, Storch U, Yildirim AÖ, Gudermann T, Königshoff M, Dietrich A (2017) Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863:560–568
78. 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

79. 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
80. Hoppe UC (2010) Mitochondrial calcium channels. *FEBS Letters* 584:1975–1981
81. 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 and Disease* 9:
82. Huang CL (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *Journal of the American Society of Nephrology* 15:1690–1699
83. Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology* 8:1003–1010
84. Iba T, Connors JM, Levy JH (2020) The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflammation Research* 2020 69:12 69:1181–1189
85. Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel. *Circulation Research* 88:325–332
86. Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y, Ito Y (2009) Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/Diacylglycerol and phospholipase A<sub>2</sub>/ $\omega$ -hydroxylase/ 20-HETE pathways. *Circulation Research* 104:1399–1409

87. 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
88. 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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00159.2021> 321:L1161–L1182
89. Jouen-Tachoire TRH, Tucker SJ, Tammaro P (2021) Ion channels as convergence points in the pathology of pulmonary arterial hypertension. *Biochemical Society Transactions* 49:1855–1865
90. Jung S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2002) TRCP6 is a candidate channel involved in receptor stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282:
91. Jung S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2001> 282:
92. Kaske S, Krasteva G, König P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, Chubanov V (2007) TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience* 8:49
93. Kay HR, Korn ME, Flemma RJ, Tector AJ, Lepley D (1976) Atherosclerosis of the Internal Mammary Artery. *The Annals of Thoracic Surgery* 21:504–507
94. Khazaei M, Moien-afshari F, Laher I (2008) Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology* 15:49–67

95. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jian Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, Nakao K (2010) Inhibition of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Antihypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. *Circulation Research* 106:1849–1860
96. Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Molecular Cell* 4:423–429
97. Kiselyov K, Colletti GA, Terwilliger A, Ketchum K, Lyons CWP, Quinn J, Muallem S (2011) TRPML: Transporters of metals in lysosomes essential for cell survival? *Cell Calcium* 50:288–294
98. 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. *Journal of Biological Chemistry* 288:36598–36609
99. Klassen PS, Svetkey LP (2000) Diagnosis and management of renovascular hypertension. *Cardiology in Review* 8:17–29
100. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A (2008) Capsaicin (TRPV1 Agonist) Therapy for Pain Relief. *The Clinical Journal of Pain* 24:142–154
101. Koch GLE (1990) The endoplasmic reticulum and calcium storage. *BioEssays* 12:527–531
102. Kong F, Ma L, Zou L, Meng K, Ji T, Zhang L, Zhang R, Jiao J (2015) Alpha1-Adrenergic Receptor Activation Stimulates Calcium Entry and Proliferation via TRPC6 Channels in Cultured Human Mesangial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36:1928–1938

103. Köttgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber TB, Schermer B, Kramer-Zucker A, Höpker K, Simmen KC, Tschucke CC, Sandford R, Kim E, Thomas G, Walz G (2005) Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *The EMBO Journal* 24:705–716
104. Kramer RH, Fuh GM, Bensch KG, Karasek MA (1985) Synthesis of extracellular matrix glycoproteins by cultured microvascular endothelial cells isolated from the dermis of neonatal and adult skin. *Journal of Cellular Physiology* 123:1–9
105. Kutty KM, Murphy DM, O'Donnell J, Chu MI (1979) Cholinesterase in the atherosclerotic intima and in fibroblast cultures. *Experientia* 1978 35:3 35:377–378
106. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP (2006) TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* 50:277–289
107. Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007) Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular Cell* 25:491–503
108. Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S (2009) Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* 42:201–246
109. 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. *Journal of Biological Chemistry* 285:38666–38673
110. Leuner K, Kazanski V, Muller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007) Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal* 21:4101–4111

111. Li W, Chen X, Riley AM, Hiatt SC, Temm CJ, Beli E, Long X, Chakraborty S, Alloosh M, White FA, Grant MB, Sturek M, Obukhov AG (2017) Long-term spironolactone treatment reduces coronary TRPC expression, vasoconstriction, and atherosclerosis in metabolic syndrome pigs. *Basic Research in Cardiology* 2017 112:5 112:1–20
112. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4682–4687
113. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3202–3206
114. 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
115. Lipp P, Niggli E (1998) Fundamental calcium release events revealed by two-photon excitation photolysis of caged calcium in guinea-pig cardiac myocytes. *The Journal of Physiology* 508:801–809
116. Liu N, Zhuang Y, Zhou Z, Zhao J, Chen Q, Zheng J (2017) NF- $\kappa$ B dependent up-regulation of TRPC6 by A $\beta$  in BV-2 microglia cells increases COX-2 expression and contributes to hippocampus neuron damage. *Neuroscience Letters* 651:1–8

117. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2015) Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage edition. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
118. Lyubchenko T, Woodward H, Veo KD, Burns N, Nijmeh H, Liubchenko GA, Stenmark KR, Gerasimovskaya E V. (2011) P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>13</sub> purinergic receptors mediate Ca<sup>2+</sup> signaling and proliferative responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300:C266–C275
119. Maier T, Follmann M, Hessler G, Kleemann H-W, Hachtel S, Fuchs B, Weissmann N, Linz W, Schmidt T, Löhn M, Schroeter K, Wang L, Rütten H, Strübing C (2015) Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *British Journal of Pharmacology* 172:3650–3660
120. 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. *Frontiers in Immunology* 0:707
121. Mazzotta F, Troccoli T, Bonifazi E (2020) A new vasculitis at the time of COVID-19. *European Journal of Pediatric Dermatology* 30:75–78
122. McGonagle D, Bridgewood C, Ramanan A V., Meaney JFM, Watad A (2021) COVID-19 vasculitis and novel vasculitis mimics. *The Lancet Rheumatology* 3:e224–e233
123. Meents JE, Ciotu CI, Fischer MJM (2019) Trpa1: A molecular view. *Journal of Neurophysiology* 121:427–443
124. Michaely P, Bennett V (1993) The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *Journal of Biological Chemistry* 268:22703–22709



125. Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews* 82:429–472
126. Moccia F, Tanzi F, Munaron L (2014) Endothelial Remodelling and Intracellular Calcium Machinery. *Current Molecular Medicine* 14:457–480
127. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323
128. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell* 9:229–231
129. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595–598
130. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005:
131. Mozafari H, Zhou C, Gu L (2019) Mechanical contribution of vascular smooth muscle cells in the tunica media of artery. *Nanotechnology Reviews* 8:50–60
132. Mukerji N, Damodaran T v., Winn MP (2007) TRPC6 and FSGS: The latest TRP channelopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772:859–868
133. Mulier M, Vriens J, Voets T (2017) TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium* 66:19–24
134. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J (2005) Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience* 25:4052–4061

135. Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F (2020) Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca<sup>2+</sup> Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Frontiers in Physiology* 10:1618
136. Neher E (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389–399
137. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB (1990) Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. <https://doi.org/10.1152/ajpcell19902591C3> 259:
138. Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S (1994) Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 16:279–288
139. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JGJ, Flesche J, Van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJM, De Boer RA, Möller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JFM, Berden JHM, Reiser J, Faul C, Van Der Vlag J (2011) Angiotensin II Contributes to Podocyte Injury by Increasing TRPC6 Expression via an NFAT-Mediated Positive Feedback Signaling Pathway. *The American Journal of Pathology* 179:1719
140. Nilius B (2003) From TRPs to SOCs, CCEs, and CRACs: Consensus and controversies. *Cell Calcium* 33:293–298
141. Nilius B (2004) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels: still elusive! *Sci STKE* 2004:
142. Nilius B, Owsianik G, Voets T (2008) Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *EMBO Journal* 27:2809–2816
143. Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 12:1–11

144. Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Oda S, Tanaka T, Nishiyama K, Nishimura A, Birnbaumer L, Mori Y, Nishida M (2019) TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN. *The FASEB Journal* 33:9785–9796
145. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *Journal of Biological Chemistry* 273:10279–10287
146. Orr AW, Sanders JM, Bevard M, Coleman E, Sarembock IJ, Schwartz MA (2005) The subendothelial extracellular matrix modulates NF- $\kappa$ B activation by flow a potential role in atherosclerosis. *Journal of Cell Biology* 169:191–202
147. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460:72–81
148. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annual Review of Physiology* 68:685–717
149. Parekh AB, Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews* 85:757–810
150. PC E, GE R, JC M, TJ G, E O, Z S, D N, IE H, M F, J W, C W, ML B-P, M B (2020) Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res* 116:2177–2184
151. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38:233–252

152. Perlman RL (2016) Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2016:170–176
153. Phillips AM, Bull A, Kelly LE (1992) Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8:631–642
154. Polat OK, Uno M, Maruyama T, Tran HN, Imamura K, Wong CF, Sakaguchi R, Ariyoshi M, Itsuki K, Ichikawa J, Morii T, Shirakawa M, Inoue R, Asanuma K, Reiser J, Tochio H, Mori Y, Mori MX (2019) Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes. *Journal of the American Society of Nephrology* 30:1587–1603
155. Pollard CA, Morran MP, Nestor-Kalinowski AL (2020) The COVID-19 pandemic: a global health crisis. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.000892020> 52:549–557
156. Porfidia A, Pola R (2020) Venous thromboembolism in COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18:1516–1517
157. Pradhan P, Rajesh N, Badhe B, Ilanchezian K, Manimehalai D, Jyothish A (2019) A novel approach to decalcification in histopathology laboratory: An adaptation from the Hammersmith protocol. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 62:423
158. Putney JW (2005) Physiological mechanisms of TRPC activation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 451:29–34
159. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R (2020) The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology* 0:1446
160. Ramos-Vara JA (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 42:405–426

161. Ranieri G, Grammatica L, Patruno R, Zito AF, Valerio P, Iacobellis S, Gadaleta C, Gasparini G, Ribatti D (2007) A possible role of thymidine phosphorylase expression and 5-fluorouracil increased sensitivity in oropharyngeal cancer patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11:362–368
162. Rimmelink M, De Mendonça R, D’Haene N, De Clercq S, Verocq C, Lebrun L, Lavis P, Racu M-L, Trépant A-L, Maris C, Rorive S, Goffard J-C, De Witte O, Peluso L, Vincent J-L, Decaestecker C, Taccone FS, Salmon I (2020) Unspecific post-mortem findings despite multiorgan viral spread in COVID-19 patients. *Critical Care* 2020 24:1 24:1–10
163. 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. *Molecular Brain Research* 109:95–104
164. Rohacs T, Nilius B (2007) Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 455:157–168
165. Rohacs T (2013) Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Advances in Biological Regulation* 53:341–355
166. Sadeghipour A, Babaheidarian P (2019) Making formalin-fixed, paraffin embedded blocks. Humana Press Inc.
167. Saleh SN, Albert AP, Peppiatt CM, Large WA (2006) Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *The Journal of Physiology* 577:479–495
168. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dahal BK, Vater A, Klussmann S, Ghofrani HA, Weissmann N, Klepetko W, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2012) *Immune and Inflammatory Cell*

- Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0335OC> 186:897–908
169. Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *Journal of Biological Chemistry* 275:17517–17526
  170. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* 2011 8:8 8:443–455
  171. Schilling WP (2001) TRP Proteins. *Circulation Research* 88:256–259
  172. Schmidt J (2019) Weltweit häufigste Todesursache: Überholt Krebs kardiovaskuläre Erkrankungen? *CardioVasc* 2019 19:5 19:11–11
  173. Scutelnic A, Heldner MR (2020) Vascular Events, Vascular Disease and Vascular Risk Factors—Strongly Intertwined with COVID-19. *Current Treatment Options in Neurology* 2020 22:11 22:1–16
  174. Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR (1995) Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 43:193–201
  175. Shi SR, Cote RJ, Chaiwun B, Young LL, Shi Y, Hawes D, Chen T, Taylor CR (1998) Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections. *Applied Immunohistochemistry* 6:89–96
  176. Siddiqi HK, Libby P, Ridker PM (2021) COVID-19 – A vascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* 31:1–5

177. Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T (2003) NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* (1979) 301:96–99
178. Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D (2007) *Gαq*-TRPC6-mediated Ca<sup>2+</sup> Entry Induces RhoA Activation and Resultant Endothelial Cell Shape Change in Response to Thrombin \*. *Journal of Biological Chemistry* 282:7833–7843
179. Smith KA, Voiriot G, Tang H, Fraidenburg DR, Song S, Yamamura H, Yamamura A, Guo Q, Wan J, Pohl NM, Tauseef M, Bodmer R, Ocorr K, Thistlethwaite PA, Haddad GG, Powell FL, Makino A, Mehta D, Yuan JX-J (2015) Notch Activation of Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Development of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2014-0235OC> 53:355–367
180. Soni NO (2017) TRPC 6 as A Molecular Target in Diabetic Nephropathy. *Int J Life Sci Scienti Res* 3:1311–1314
181. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL (2006) A common mechanism underlies stretch activation and activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16586–16591
182. Sternweis PC, Smrcka A V. (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 17:502–506
183. Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry* 278:39014–39019
184. T M, JD H, R N, S S, H H, N D, S F, D T, N W, H P, S B, JD L, G C, M T, KD M, A T (2020) Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology* 77:198–209

185. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews* 79:1089–1125
186. Takahashi N, Kozai D, Mori Y (2012) TRP channels: Sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Frontiers in Physiology* 3 AUG:324
187. Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX (2001) Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors on the Carboxyl Termini of Trp Channels. *Journal of Biological Chemistry* 276:21303–21310
188. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Research* 28:746–755
189. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA (2018) A review of artifacts in histopathology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 22:279
190. Teilmann SC, Byskov AG, Pedersen PA, Wheatley DN, Pazour GJ, Christensen ST (2005) Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Molecular Reproduction and Development* 71:444–452
191. Teng J, Loukin SH, Anishkin A, Kung C (2015) L596-W733 bond between the start of the S4-S5 linker and the TRP box stabilizes the closed state of TRPV4 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:3386–3391
192. Thodeti CK, Paruchuri S, Meszaros JG (2013) A TRP to cardiac fibroblast differentiation. <http://dx.doi.org/104161/chan24328> 7:211–214



193. Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB (2006) Ca<sup>2+</sup> signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* 13:693–708
194. Todaka H, Taniguchi J, Satoh JI, Mizuno A, Suzuki M (2004) Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry* 279:35133–35138
195. Trebak M, Vazquez G, Bird GSJ, Putney JW (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33:451–461
196. Tsuruda PR, Julius D, Minor DL (2006) Coiled Coils Direct Assembly of a Cold-Activated TRP Channel. *Neuron* 51:201–212
197. Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigartyo CAK, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergström K, Brumer H, Cerjan D, Ekström M, Elobeid A, Eriksson C, Fagerberg L, Falk R, Fall J, Forsberg M, Björklund MG, Gumbel K, Halimi A, Hallin I, Hamsten C, Hansson M, Hedhammar M, Hercules G, Kampf C, Larsson K, Lindskog M, Lodewyckx W, Lund J, Lundeberg J, Magnusson K, Malm E, Nilsson P, Ödling J, Oksvold P, Olsson I, Öster E, Ottosson J, Paavilainen L, Persson A, Rimini R, Rockberg J, Runeson M, Sivertsson Å, Sköllermo A, Steen J, Stenvall M, Sterky F, Strömberg S, Sundberg M, Tegel H, Tourle S, Wahlund E, Waldén A, Wan J, Wernérus H, Westberg J, Wester K, Wrethagen U, Xu LL, Hober S, Pontén F (2005) A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* 4:1920–1932
198. Urban N, Hill K, Wang L, Kuebler WM, Schaefer M (2012) Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell Calcium* 51:194–206

199. Urban N, Wang L, Kwiek S, Rademann J, Kuebler WM, Schaefer M (2016) Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Molecular Pharmacology* 89:197–213
200. Urban N, Neuser S, Hentschel A, Köhling S, Rademann J, Schaefer M (2017) Pharmacological inhibition of focal segmental glomerulosclerosis-related, gain of function mutants of TRPC6 channels by semi-synthetic derivatives of larixol. *British Journal of Pharmacology* 174:4099–4122
201. Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW (2004) The mammalian TRPC cation channels. Elsevier
202. Voelkel NF (1986) Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American Review of Respiratory Disease* 133:1186–1195
203. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430:748–754
204. Voets T, Nilius B (2009) TRPCs, GPCRs and the Bayliss effect. *The EMBO Journal* 28:4–5
205. Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:396–401
206. Vriese AS de, Sethi S, Nath KA, Glassock RJ, Fervenza FC (2018) Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. *Journal of the American Society of Nephrology* 29:759–774

207. Weigner J (2011) Der Präparator - Biologie - Medizin - Geowissenschaften - Museumstechnik - Forschung. 57:34–53
208. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circulation Research* 90:248–250
209. Wichmann D, Sperhake J-P, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schröder AS, Burdelski C, Heer G de, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Brederke-Wiedling H, Weerth A de, Paschen H-R, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Püschel K, Kluge S (2020) Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. <https://doi.org/107326/M20-2003> 173:268–277
210. 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* (1979) 308:1801–1804
211. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (1998) Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93:177–188
212. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the Mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological Reviews* 62:381–404
213. Xu Q, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G (1990) Immunology of atherosclerosis: Cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clinical Immunology and Immunopathology* 56:344–359

214. Yan Z, Zhang W, He Y, Gorczyca D, Xiang Y, Cheng LE, Meltzer S, Jan LY, Jan YN (2013) *Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation. *Nature* 493:221–225
215. Yang F, Zheng J (2017) Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein and Cell* 8:169–177
216. Yeromin A V., Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443:226–229
217. Yildirim E, Dietrich A, Birnbaumer L (2003) The mouse C-type transient receptor potential 2 (TRPC2) channel: Alternative splicing and calmodulin binding to its N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2220–2225
218. Yip H, Chan W-Y, Leung P-C, Kwan H-Y, Liu C, Huang Y, Michel V, Yew DT-W, Yao X (2004) Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochemistry and Cell Biology* 2004 122:6 122:553–561
219. Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, Yuan JX-J (2003) PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. <https://doi.org/10.1152/ajpcell001252002> 284:
220. Yu Y, Fantozzi I, Remillard C v., Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX-J (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:13861–13866
221. Yu Y, Keller SH, Remillard C v., Safrina O, Nicholson A, Zhang SL, Jiang W, Vangala N, Landsberg JW, Wang J-Y, Thistlethwaite PA, Channick RN, Robbins IM, Loyd JE, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT, Cahalan MD, Rubin LJ, Yuan JX-J (2009)

- A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the TRPC6 Gene Promoter Associated With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 119:2313–2322
222. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology* 9:636–645
223. Yuan JP, Min SK, Zeng W, Dong MS, Huang G, Worley PF, Muallem S (2009) TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels* 3:18995841
224. Yue L, Xie J, Nattel S (2011) Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 89:744–753
225. Yue L, Xie J, Nattel S (2011) Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 89:744–753
226. Zeevi DA, Frumkin A, Bach G (2007) TRPML and lysosomal function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1772:851–858
227. Zhang HT, Wang WW, Ren LH, Zhao XX, Wang ZH, Zhuang DL, Bai YN (2016) The mTORC2/Akt/NFκB Pathway-Mediated Activation of TRPC6 Participates in Adriamycin-Induced Podocyte Apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 40:1079–1093
228. Zhang Y, Lu W, Yang K, Xu L, Lai N, Tian L, Jiang Q, Duan X, Chen M, Wang J (2013) Bone morphogenetic protein 2 decreases TRPC expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 304:833–843

229. Zhang Y, Lu W, Yang K, Xu L, Lai N, Tian L, Jiang Q, Duan X, Chen M, Wang J (2013) Bone morphogenetic protein 2 decreases TRPC expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 304:833–843
230. Zhang Y, Qin W, Zhang L, Wu X, Du N, Hu Y, Li X, Shen N, Xiao D, Zhang H, Li Z, Zhang Y, Yang H, Gao F, Du Z, Xu C, Yang B (2015) MicroRNA-26a prevents endothelial cell apoptosis by directly targeting TRPC6 in the setting of atherosclerosis. *Scientific Reports* 2015 5:1 5:1–10
231. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F, Shi Z-L (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020 579:7798 579:270–273
232. Zou Z qing, Xu J, Li L, Han Y shan (2015) Down-regulation of SENCER promotes smooth muscle cells proliferation and migration in db/db mice through up-regulation of FoxO1 and TRPC6. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74:35–41
233. Zulian A, Baryshnikov SG, Linde CI, Hamlyn JM, Ferrari P, Golovina VA (2010) Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299:624–633

## 9 Publikationen

1. Abdinghoff J, Servello D, Jacobs T, Beckmann A, Tschernig T (2022) Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry. Biomedical Reports 16:1–11
2. 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
3. Servello D, Abdinghoff J, Grissmer A, Tschernig T (2022) Transient receptor potential channel 6 in human skeletal muscle fibers: Investigation in fresh and conserved tissue samples. Biomedical Reports 17:1–6

# 10 Danksagung

Als erstes 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 unmittelbare und kurzfristige Hilfe bei jeglichen Problemen und Fragen von ganzem Herzen bedanken. Du hast es immer geschafft die richtigen Worte zu wählen und mich motiviert und neugierig bei der Arbeit zu halten.

Ein ebenfalls sehr wichtiger Partner für mich war mein Mitdoktorand und Freund Tobias Jacobs. Unzählige Stunden im Präpariersaal, im Labor und in Nachbesprechungen haben uns häufig gemeinsam zum Lachen, aber auch gelegentlich zum Verzweifeln gebracht.

Ein großer Dank gebührt auch Sektionsassistentin Frau Irina Scheck und Sektionsassistent Herrn Ronny Dollwett für organisatorische und praktische Hilfe zu jeder Zeit.

Auch möchte ich mich oftmals bei Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier und ihrem Team, allen voran Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann, bedanken, für die umfangreiche Unterstützung bei Problemen oder neuen Verfahren.

Für die Möglichkeit und Unterstützung zur Erforschung der COVID-Proben möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. med. Rainer Bohle und Dr. med. Fidelis Flockerzi bedanken. Sie ermöglichten mir eine Ausweitung der Forschung auch zu Pandemiezeiten.



Ebenfalls möchte ich mich bei den Sekretärinnen Frau Helga Meyer, Frau Barbara Michahelles und Frau Kerstin Simon für die gute Zusammenarbeit in Fragen zu Recherche und Archiv bedanken.

In voller Demut möchte ich mich bei den Körperspendern und deren Hinterbliebenen bedanken. Ohne Ihre Entscheidung und dem Verständnis der Angehörigen zur zweckgebundenen Körperspende wäre nicht nur diese Arbeit, sondern die gesamte Ausbildung von Medizinern und die medizinische Forschung in dieser Qualität nicht möglich.

Natürlich wäre diese Arbeit ohne den Rückhalt meiner Familie und Freunde, allen voran meinen Eltern Dirk und Manuela sowie meiner Freundin Laura, nicht möglich gewesen. Ihr habt mich in allen Lebenslagen und bei allen Problemen bedingungslos unterstützt.

Euch allen, und einigen die noch unerwähnt blieben, ist die Fertigstellung dieser Arbeit zu verdanken. Eure Unterstützung bedeutete mir sehr viel!

# **11 Lebenslauf**

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



Tag der Promotion: 24.01.2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Prof. Dr. Dr. Frank Zufall