

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

# **Der nicht-selektive Kationenkanal TRPC6 in der Lunge des Menschen und bei SARS-CoV-2-Infektion**

**Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Gina Leidinger

geb. am: 30.03.1998 in Saarlouis

Tag der Promotion: 11.12.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Prof. Dr. med. Veit Flockerzi

„Auch der weiteste Weg beginnt mit einem ersten Schritt.“

– Konfuzius –

Meinen lieben Eltern

Antje und Udo

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund und Fragestellung.....	1
1.2 Material und Methoden.....	1
1.3 Ergebnisse und Schlussfolgerung.....	2
<b>2. Summary.....</b>	<b>3</b>
2.1 Background and question.....	3
2.2 Material and methods.....	3
2.3 Results and conclusion.....	4
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
3.1 TRP-Kanäle.....	5
3.1.1 Einteilung und Struktur.....	6
3.1.2 TRPC-Kanäle.....	7
3.1.3 TRPC6-Kanäle.....	7
3.1.4 Klinische Bedeutung von TRPC6.....	8
3.1.5 Die Rolle von TRPC6 bei Erkrankungen der Lunge.....	9
3.2 Der Aufbau der Lunge und des Bronchialsystems.....	11
3.3 Bisherige Erkenntnisse über die Expression von TRPC6 im Lungengewebe	12
3.4 Covid-19 Erkrankung.....	12
3.5 Ziele der Arbeit.....	14
<b>4. Material und Methodik.....</b>	<b>15</b>
4.1 Körperspender.....	15
4.2 Probengewinnung.....	15
4.3 Externe Proben.....	16
4.4 Materialien.....	16
4.4.1 Geräte.....	16
4.4.2 Chemikalien.....	17
4.4.3 Antikörper.....	17
4.4.4 Verbrauchsmaterialien.....	18
4.5 Histologische Aufarbeitung.....	18

4.5.1	Fixierung.....	18
4.5.2	Vakuumpumpe.....	19
4.5.3	Einbetten.....	19
4.5.4	Schneiden.....	19
4.5.5	Färbungen.....	20
4.5.5.1	HE-Färbung.....	20
4.5.5.2	Immunhistochemische Färbung.....	21
4.5.5.2.1	Ablauf der IHC.....	23
4.6	Peptidkontrolle.....	29
4.7	Auswertung.....	30
4.7.1	Allgemeines zur Auswertung.....	30
4.7.2	Auswertungsschema.....	31
4.7.3	Auswertungsprotokoll.....	32
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
5.1	Ergebnisse der Peptidkontrolle.....	34
5.2	TRPC6 Kanäle in gesundem Lungengewebe.....	36
5.2.1	Pleura und subpleurales Bindegewebe.....	36
5.2.2	Gefäße.....	37
5.2.3	Bronchioli.....	40
5.2.4	Alveolen.....	42
5.2.5	Gesamtauswertung der gesunden Lungenproben.....	44
5.2.6	Auswertung des rechten Mittellappens aller Körperspender.....	45
5.2.7	Auswertung aller Lungenlappen an jeweils 2 verschiedenen Körperspendern.....	46
5.3	TRPC6 Kanäle in Covid 19-Lungengewebe.....	48
5.3.1	Pleura und subpleurales Bindegewebe von Covid 19-Patienten.....	48
5.3.2	Lungengefäße von Covid 19-Patienten.....	50
5.3.3	Bronchien von Covid 19-Patienten.....	52
5.3.4	Bronchioli von Covid 19-Patienten.....	54
5.3.5	Alveolen von Covid 19-Patienten.....	55
5.3.6	Gesamtauswertung der Covid-19-Patienten.....	58
5.3.7	Sonstige Pathologien der Covi-19-Patient.....	59
5.4	Vergleich der gesunden Proben mit den Covid-19-Proben.....	61

<b>6. Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>6.1 Diskussion der Methodik.....</b>	<b>62</b>
6.1.1 Patientenkollektiv.....	62
6.1.2 Probenentnahme.....	62
6.1.3 Aufarbeitung der Proben.....	63
6.1.4 Färbeprozess.....	63
6.1.5 Auswertung.....	64
<b>6.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>64</b>
6.2.1 Einordnung der nachgewiesenen TRPC6-Expression im gesunden Lungengewebe.....	64
6.2.2 Einordnung der nachgewiesenen TRPC6-Expression im Rahmen der Covid-19-Erkrankung.....	67
<b>6.3 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>69</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>78</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>79</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, dt.: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAB	Diaminobenzidin
EKG	Elektrokardiographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseshoe peroxidase, dt.: Meerrettichperoxidase
MERS	Middle East Respiratory Syndrom
mRNA	Messenger ribonucleic acid, dt.: Boten-Ribonukleinsäure
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NGS	Normal Goat Serum
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate buffered saline, dt.: phosphatgepufferte Salzlösung
ROC	Receptor-operated channels, dt.: Rezeptor-gesteuerte Kanäle
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrom
SOC	Store-operated channels, dt.: Speicher-gesteuerte Kanäle
sog.	Sogenannte/-r
u.a.	Unter anderem

# **1. Zusammenfassung**

## **1.1 Hintergrund und Fragestellung**

Die Lunge des Menschen erfüllt essenzielle Körperfunktionen. Sie sorgt für einen geregelten Gasaustausch, bei dem der Sauerstoff aus der Atemluft durch die kleinsten Lungenbläschen aufgenommen wird und zu den Endorganen transportiert werden kann. Umgekehrt wird das beim Stoffwechsel anfallende Endprodukt Kohlenstoffdioxid über die Lungen abgeatmet und so außerdem der Säure-Basen-Haushalt des Körpers im Gleichgewicht gehalten. Ist die Integrität der Lunge gestört, beispielsweise durch Erkrankungen wie die erst kürzlich weltweit relevante Covid-19-Erkrankung, kann das schwerwiegende Folgen für die Gesundheit haben. Charakteristika dieser Erkrankung sind Entzündungsreaktionen und Umbauprozesse des physiologischen Lungengewebes.

Es ist bereits aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass die TRPC6-Kanäle, eine Gruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässiger Kationenkanäle, an vielen physiologischen Prozessen im Körper beteiligt sind. Es wurde auch molekulargenetisch festgestellt, dass sie unter anderem bei oben genannten Entzündungsreaktionen und Umbauprozessen, wie Fibrose, eine Rolle spielen. Daher ist es naheliegend, dass TRPC6-Kanäle auch bei der Ausbildung und Aggravation der Coronavirus-Erkrankung von Bedeutung sind.

Ziel dieser Arbeit war es erstmals das Vorhandensein von TRPC6-Kanälen in physiologischem Lungengewebe histologisch nachzuweisen, als auch zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression von TRPC6 bei der Covid-19-Erkrankung im Vergleich zu gesunden Lungen gibt.

## **1.2 Material und Methoden**

Es wurden Gewebeproben aus der Lunge von 13 gesunden Körperspendern und Gewebeproben von 4 Covid-Pneumonien gegenübergestellt.

Die Lungenproben der 13 Körperspender wurden eigenhändig entnommen. Bei 8 der 13 Körperspender wurde aus jedem Lungenlappen eine Probe entnommen, was demnach 5 Proben pro Körperspender ergibt. Bei 5 Körperspendern wurden nur vereinzelte Proben entnommen. Nach der Entnahme wurden die Proben histologisch aufgearbeitet. Dazu wurden sie zunächst in Formalin und PBS überführt, danach entwässert, eingebettet, geschnitten und gefärbt.



Die Proben der 4 Covid-19-Pneumonien wurden vom Institut für allgemeine und spezielle Pathologie der Universität des Saarlandes bereitgestellt.

Bei den durchgeführten Färbungen handelt es sich zum einen um eine standardisierte HE-Färbung, zum anderen um eine spezielle immunhistochemische Antikörperfärbung mittels TRPC6-Antikörper. Anschließend konnten die Schnitte unter einem Lichtmikroskop untersucht und anhand einer Auswertungstabelle ausgewertet werden. Dabei wurde die Stärke der Expression von TRPC6 unterschieden in nicht positiv, wahrscheinlich positiv, eindeutig positiv und stark positiv.

### **1.3 Ergebnisse und Schlussfolgerung**

In gesundem Lungengewebe konnten wie erwartet TRPC6-Kanäle nachgewiesen werden. Sie fanden sich ganz besonders im respiratorischen Flimmerepithel, der glatten Muskulatur der Bronchioli, in den Alveolarsepten sowie in der Wand kleinerer Lungengefäße. Im Vergleich dazu zeigte sich in Covid-19-Lungen eine zum Teil veränderte Expression. Hier wiesen vor allem die entzündlichen Bereiche mit Ödem, pneumonischen Infiltraten und hyalinen Membranen sowie fibrotisch umgebautes Gewebe eine sehr starke TRPC6-Expression auf. Außerdem war die Wand der stauungsbedingt dilatierten kleinsten Kapillaren vermehrt mit TRPC6 angereichert. Im Gegensatz dazu stellten sich die größeren Gefäße und Bronchiolen weniger TRPC6-reich dar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TRPC6-Kanäle zum einen für die physiologische Lungenintegrität wichtig sind, zum anderen aber auch eine Rolle bei pathologischen Vorgängen spielen und eine Entzündung im Rahmen einer SARS-CoV-2-Infektion möglicherweise sogar aggravieren können. Infolgedessen könnten sie zukünftig einen wichtigen Angriffspunkt zur medikamentösen Therapie und Prophylaxe von Lungenschäden darstellen.

## 2. Summary

### 2.1 Background and question

The human lungs are essential for life. It ensures a regulated gas exchange in which the oxygen from the air we breathe is absorbed by the smallest alveoli in the lungs and can be transported to the end organs. Conversely, the end product carbon dioxide produced during metabolism is exhaled through the lungs, thereby keeping the body's acid-base balance in balance. The lungs therefore fulfill important bodily functions. If the integrity of the lungs is disturbed, for example due to diseases such as the recently globally relevant Covid-19 disease, this can have serious consequences for health. The characteristics of this disease are inflammatory reactions and remodeling processes of the physiological lung tissue.

It is already known from previous work that the TRPC6 channels, a group of  $\text{Ca}^{2+}$  permeable cation channels, are involved in many physiological processes in the body. It has also been determined through molecular genetics that they play a role in the above-mentioned inflammatory reactions and remodeling processes, such as fibrosis. Therefore it is obvious that TRPC6 channels are also important in the development and progression of coronavirus disease.

The aim of this work was to histologically demonstrate the presence of TRPC6 channels in physiological lung tissue for the first time and to investigate whether there is a difference in the expression of TRPC6 in Covid-19 disease compared to healthy lungs.

### 2.2 Material and methods

Tissue samples from the lungs of 13 healthy body donors and 4 Covid-19 pneumonias were compared.

The lung samples from the 13 body donors were taken by hand. In 8 of the 13 body donors, a sample was taken from each lung lobe, resulting in 5 samples per body donor. From 5 body donors there were only taken isolated samples. After collection, the samples were processed histologically. To do this, they were first transferred to formalin and PBS, then dehydrated, embedded, sectioned and stained.

The samples from the 4 Covid-19 pneumonias were provided by the Institute for General and Special Pathology at Saarland University.

The stainings carried out were a standardized HE staining and a special immunohistochemical antibody staining using TRPC6 antibodies. The sections could then be examined under a light

microscope and evaluated using an evaluation table. The strength of TRPC6 expression was differentiated into not positive, probably positive, clearly positive and strongly positive.

## **2.3 Results and conclusion**

As expected, TRPC6 channels could be detected in healthy lung tissue. They were found particularly in the respiratory ciliated epithelium, the smooth muscles of the bronchioli, in the alveolar septa and in the wall of smaller pulmonary vessels. In comparison, expression was partially altered in COVID-19 lungs. Here, especially the inflammatory areas with edema, pneumonic infiltrates and hyaline membranes as well as fibrotically remodeled tissue showed very strong TRPC6 expression. In addition, the wall of the smallest capillaries, which were dilated due to congestion, was increasingly enriched with TRPC6. In contrast, the larger vessels and bronchioles were less TRPC6-rich. These results suggest that TRPC6 channels are important for physiological lung integrity, but also play a role in pathological processes and may even aggravate inflammation in the context of Covid-19-Infection. In the future, they could therefore represent an important target for drug therapy and prevention of lung damage.

### **3. Einleitung**

Die transient receptor potential (TRP) Kanäle gehören zu einer Gruppe von Ionenkanälen, die schon seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung sind. So konnten bereits viele wichtige Erkenntnisse über den Aufbau, das Vorkommen und die Funktion der Kanäle gewonnen werden. Dennoch gibt es immer noch einige unbeantwortete Fragen. Diese Arbeit soll einen Schritt dazu beitragen, die Expression der TRPC6-Kanäle in menschlichem Lungengewebe weiter aufzuklären und Aufschluss über die Bedeutung insbesondere im Zusammenhang mit der derzeit relevanten Coronaviruserkrankung bringen. Im Folgenden wird dafür zunächst Grundlegendes zu den TRP-Kanälen sowie ihrer Subfamilie, den TRPC6-Kanälen, erläutert und anschließend auf den Aufbau sowie die Physiologie der Lunge und die pathologischen Veränderungen im Rahmen der Coronavirus-Erkrankung eingegangen.

#### **3.1 TRP-Kanäle**

Die TRP-Kanäle sind eine vielfältige Gruppe von Ionenkanälen mit diversen physiologischen Funktionen. Sie spielen beispielsweise in der Sinnesphysiologie eine bedeutende Rolle, v.a. wenn es um Sehen, Geschmack, Geruchssinn, Hören, Berührungs- und Temperaturempfinden geht [59]. Sie wurden erstmals in den 1960er Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Bei einer mutierten Variante dieser Fruchtfliege konnte festgestellt werden, dass deren Photorezeptoren auf einen Lichtreiz mit einer nur kurz anhaltenden, transienten Depolarisation reagierten. Wohingegen beim Wildtyp so lange eine Depolarisation stattfand, wie der Lichtreiz andauerte [17]. Der Name transient receptor potential (TRP) entstand demnach als phänotypische Beschreibung dieses veränderten Rezeptorverhaltens [17]. Erst einige Jahre später gelang dann die Identifizierung des verantwortlichen Proteins, welches eine Schlüsselrolle zwischen der Photorezeption und der Öffnung lichtsensibler Ionenkanäle zu haben schien [41]. Von diesem Ursprungskanal ausgehend konnten mit der Zeit immer weitere Kanäle dieser Familie detektiert und in 7 verschiedene Subfamilien eingeteilt werden (siehe Abb. 1). Allen gemeinsam ist eine Ähnlichkeit im strukturellen Aufbau. Unterscheiden tun sie sich jedoch insbesondere in ihrer Selektivität und in den unterschiedlichen Wegen der Aktivierung [42].

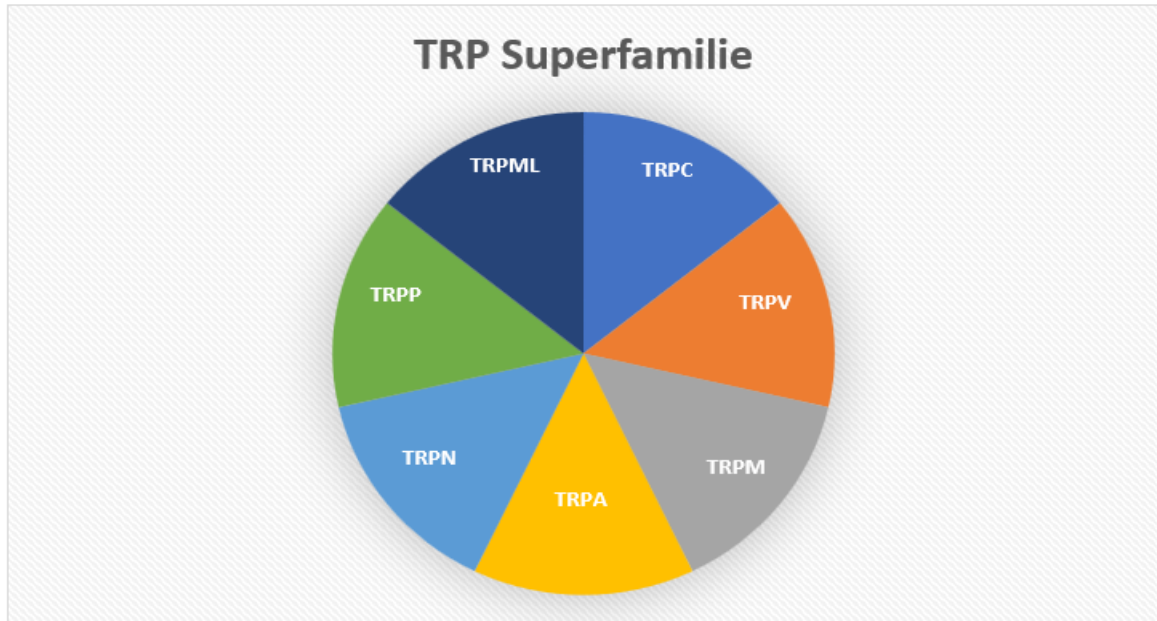


Abbildung 1: Die Zusammensetzung der TRP-Superfamilie

### 3.1.1 Einteilung und Struktur

Die verschiedenen Subfamilien lassen sich in zwei Gruppen einteilen [43]. Die erste Gruppe umfasst TRPC, TRPV, TRPM, TRPA und TRPN. Die zweite Gruppe wird durch TRPP und TRPML gebildet.

Die Kanäle beider Gruppen zeichnen sich durch 6 Transmembrandomänen (vgl. Abb. 2 D1-6) mit einem intrazellulär gelegenen Amino (N)- und Carboxy (C)-Terminus aus. Zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 befindet sich die porenbildende Region. Durch Zusammenlagerungen vier solcher Proteinuntereinheiten entsteht ein funktioneller Kanal mit einer zentral gelegenen Pore, die den Ionendurchstrom ermöglicht [49] (siehe Abb. 2).

Die beiden oben genannten Gruppen unterscheiden sich zum einen in der Aminosäuresequenz ihrer Transmembrandomänen und zum anderen durch eine nur bei den Mitgliedern der zweiten Gruppe vorkommende extrazellulär gelegene Aminosäureschleife zwischen Transmembrandomäne 1 und 2 [43].

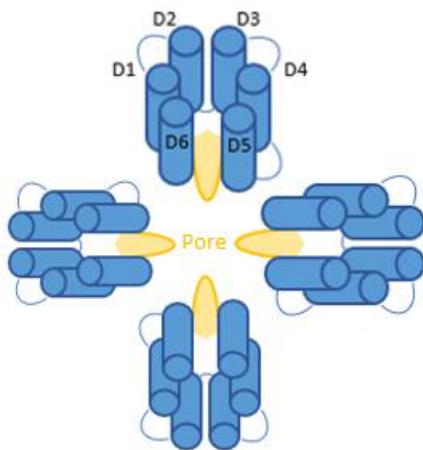


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines funktionellen TRP-Kanals

Die TRPC-Kanäle sind die am frühesten entdeckten Kanäle und werden auch als „classical“ oder „canonical“ TRP-Kanäle bezeichnet. Die Namen der anderen Subfamilien leiten sich von den jeweils zuerst entdeckten Mitgliedern der jeweiligen Gruppe ab [43]: TRPV vom Vanilloid-Rezeptor 1, TRPM von Melastatin, TRPA von Ankyrin, TRPN von NOMPC (no mechanoreceptor potential C), TRPP von Polycystin und TRPML von Mucolipin. Im Folgenden soll speziell auf die Subfamilie der TRPC-Kanäle eingegangen werden, da dieser Familie der TRPC6-Kanal, mit dem sich diese Arbeit befasst, zuzuordnen ist.

### 3.1.2 TRPC-Kanäle

Die TRPC-Kanäle besitzen die größte strukturelle Ähnlichkeit zum *Drosophila* TRP-Kanal. Es sind 7 Vertreter dieser Subfamilie, TRPC1-7, bekannt. Im Menschen kommen jedoch nur 6 dieser Vertreter vor, da es sich bei TRPC2 um ein Pseudogen handelt [68]. Anhand ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz lassen sie sich wiederum in 4 Untergruppen einteilen: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. TRPC1 war der zuerst entdeckte Vertreter und kommt am weitesten verbreitet im menschlichen Körper vor. Die übrigen sind vor allem im zentralen Nervensystem zu finden [43]. Die Aktivierung dieser nicht-selektiven Kationenkanäle erfolgt Phospholipase C gekoppelt [59]. Auf den genauen Ablauf der Aktivierungskaskade wird speziell im folgenden Abschnitt 3.1.3 zum TRPC6 Kanal eingegangen.

### 3.1.3 TRPC6

TRPC6 wurde erstmals 1997 molekulargenetisch aus Zellen eines Mäusehirns mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesen [12]. In derselben Arbeit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass es sich bei TRPC6 um einen G-Protein-gekoppelten Ionenkanal, der für den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verantwortlich ist, handelt. Der Aufbau des TRPC6-Kanals entspricht im Allgemeinen dem der anderen TRP-Kanäle (siehe 3.1.1 Einteilung und Struktur). Nachdem TRPC6

zunächst in Hirn- und Lungengewebe von Mäusen nachgewiesen wurde, kamen mit der Zeit weitere exprimierende Gewebe wie Placenta und Niere hinzu [31]. Außerdem wurde herausgefunden, dass TRPC6 in glatten Muskelzellen unterschiedlichster Gewebe wie Myometrium, Kolon, Magen, Ösophagus, großen und kleinen Gefäßen und der Lunge vorkommt [10].

Die genaue Analyse der Aktivierungskaskaden ist bis heute Gegenstand der Forschung. Es sind bereits verschiedene Wege der Aktivierung beschrieben, jedoch noch nicht gänzlich geklärt.

Im Folgenden soll auf die bedeutendsten Kaskaden eingegangen werden. Zum einen erfolgt die Aktivierung der TRPC6-Kanäle rezeptorgesteuert („receptor-operated channels“ = ROC) durch Diacylglycerin [30]. Dieser Vorgang beginnt mit der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors z.B. durch Hormonbindung. Dadurch wird die Phospholipase C, eine Phosphodiesterase, aktiviert. Es kommt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu den Endprodukten Inositol-1,4,5-Bisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). DAG öffnet dann als second messenger den TRPC6-Kanal. Zum anderen kann das entstandene IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) binden und so die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER bewirken, wodurch die zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ansteigt [23]. Die erschöpfte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration innerhalb des ER, welche durch spezielle Sensoren, die sog. STIM-Proteine, detektiert wird, stellt wiederum ein zusätzliches Signal für die Plasmamembran dar, Ca<sup>2+</sup> reaktiv über die sog. ORAI-Kanäle von extrazellulär nach intrazellulär zu transportieren [58]. Dieser Weg wird als speicherreguliert bezeichnet („store-operated channels“ = SOC). Die Rolle des TRPC6-Kanals innerhalb dieses Weges ist jedoch noch nicht gänzlich erforscht und daher noch umstritten. Letztere Forschungsergebnisse lassen jedoch annehmen, dass ein Zusammenspiel aller drei Kanäle (TRPC6, STIM und ORAI) letztlich für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom verantwortlich ist [39,72].

Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration hat einen bedeutenden Einfluss auf die Zellfunktion [11]. Durch das ubiquitäre Vorkommen der TRPC6-Kanäle spielen sie eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen im Körper. Einige Studien konnten jedoch auch bereits eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen und somit der Krankheitsentstehung darlegen. Diese sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

### **3.1.4 Klinische Bedeutung von TRPC6**

Zum einen konnte TRPC6 in den Podozyten der Niere nachgewiesen werden [50]. Die Podozyten stellen einen Teil der Blut-Harn-Schranke dar und sind damit wichtig für die Filtration des Blutes und den Wasserhaushalt. Es ist bekannt, dass eine Mutation im TRPC6-Gen zur fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) führt [69]. Die FSGS zählt zum Krankheitsbild des nephrotischen Syndroms, das durch eine schwere Proteinurie, Hypalbuminämie und Ödeme gekennzeichnet ist und zur terminalen Niereninsuffizienz führen kann [69].

Zum anderen konnte TRPC6 im hepatobiliären System nachgewiesen werden und es zeigte sich, dass die altersbedingte Degeneration des hepatobiliären Gewebes mit einer breiten, homogenen Expression von TRPC6 zusammenhängt [60].

Darüber hinaus scheint TRPC6 an der Tumorentstehung beteiligt zu sein. Es konnte bei verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression gefunden werden, so z.B. beim Prostatacarcinom [61] und beim Mammacarcinom [27]. Auch bei den Gliomen, einer Klasse der Hirntumore, konnte eine Überexpression nachgewiesen werden und zugleich konnten auch positive Effekte gezeigt werden, wie z.B. die Einleitung des Zellzyklusarrestes durch eine Hemmung der TRPC6-Kanäle [21]. In einem Mausmodell konnte sogar eine Abnahme des Tumolvolumens durch die Hemmung von TRPC6 belegt werden [21]. Dementsprechend scheint die Modulation der TRPC6-Kanäle zukünftig ein möglicher Ansatzpunkt zur Prävention und Behandlung von Krebserkrankung zu sein [21,27,61].

Des Weiteren ist TRPC6 in glatten Muskelzellen von Gefäßen vorzufinden. Hier spielt TRPC6 eine Rolle bei der Vasokonstriktion als Folge eines Anstiegs des intravaskulären Drucks [66]. Dieser physiologisch ablaufende Vorgang wird auch als Bayliss-Effekt bezeichnet und ist wichtig für eine konstante Organdurchblutung bei schwankenden Blutdruckwerten [9]. In der Lunge ist TRPC6 ebenso an einem physiologischen Prozess beteiligt und zwar der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion, auch Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt [63]. Dieser Begriff bezeichnet einen Vorgang, bei dem auf eine alveoläre Hypoxie mit einer Vasokonstriktion der diesen Abschnitt betreffenden Gefäße reagiert wird, sodass das Blut in besser ventilerte Bereiche umgeleitet wird. Damit wird ein optimaler Gasaustausch ermöglicht [53]. In einem Versuch mit TRPC6-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei diesen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen keine hypoxisch vermittelte Vasokonstriktion stattfand. Demzufolge scheint TRPC6 eine relevante Rolle bei der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion zu spielen [63]. Während es sich bei dem zuvor erläuternden Mechanismus um einen nützlichen Effekt zur kurzzeitigen Anpassung an eine Hypoxämie handelt, kann eine globale, lang andauernde Aktivierung dieses Mechanismus auch negative Auswirkungen haben. Ein dauerhaft erhöhter Gefäßwiderstand kann nämlich zu einer manifesten pulmonalen arteriellen Hypertonie führen [53].

### **3.1.5 Die Rolle von TRPC6 bei Erkrankungen der Lunge**

Neben der bereits erwähnten pulmonalen arteriellen Hypertonie ist eine Beteiligung von TRPC6 auch bei anderen Erkrankungen der Lunge bekannt. Eine davon ist die idiopathische Lungenfibrose. Bei dieser Erkrankung kommt es aus unklarer Ursache zu einer Bindegewebszunahme des Lungenparenchyms und dadurch zur Einschränkung des Gasaustausches mit Symptomen wie Dyspnoe und Reizhusten. Der bindegewebige Umbau kommt u.a. durch eine vermehrte Myofibroblastendifferenzierung zustande. Diese Myofibroblasten produzieren große Mengen extrazelluläre Matrix und schädigen dadurch die normale Lungenstruktur [36]. In einer vorherigen



Arbeit konnte anhand eines Mausmodells gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit dem profibrotischen Faktor TGF- $\beta_1$  nur in Wildtyp-Mäusen zu einer vermehrten TRPC6-Expression und damit zusammenhängend einer zunehmenden Ausbildung von Stressfasern und erhöhtem Zellwiderstand kam [29]. TRPC6-defiziente Mäuse hingegen reagierten nach Behandlung mit Bleomycin, welches im Tiermodell zur Induktion einer Lungenfibrose genutzt wird, mit einer geringeren Kollagenbildung und besserer Lungenfunktion als die Wildtyp-Mäuse [29]. Demnach wurde in dieser Arbeit geschlussfolgert, dass TRPC6 an der Differenzierung der Myofibroblasten beteiligt sein muss.

Eine weitere Erkrankung, an der TRPC6 nachweislich beteiligt ist, ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung („chronic obstructive pulmonary disease“ = COPD). Sie gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen [76]. Zugrunde liegend ist ein chronischer Entzündungsprozess und eine vermehrte Anzahl an Makrophagen [24]. Eine Studie konnte zeigen, dass Alveolarmakrophagen von Patienten mit COPD im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr TRPC6-mRNA exprimierten [25]. Als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD gilt das Rauchen. Die Nikotinexposition führt nachweislich zu einer vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen der Lunge und ist mit einer verstärkten TRPC6-Expression der glatten Muskelzellen assoziiert [28]. In einer neueren Studie konnte TRPC6 sogar als diagnostischer Biomarker für die COPD ausgemacht werden [20].

Darüber hinaus kommt TRPC6 beim Ischämierperfusionschaden der Lunge zum Tragen. Dieser tritt beispielsweise nach Lungentransplantationen oder Lungenarterienembolien auf [64]. Charakteristisch ist eine Ödembildung infolge einer gestörten Endothelfunktion, welche bis zum Organversagen führen kann [18]. Neueren Erkenntnissen aus einem Tierversuch zufolge sind TRPC6-defiziente Mäuse vor einem Ischämierperfusionschaden geschützt. Es zeigte sich unter anderem, dass die Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den TRPC6-defizienten Mäusen auf eine künstlich erzeugte Ischämie mit einem deutlich verminderten Zellwiderstand reagierten [64]. Hier wird die Bedeutung der TRPC6-Kanäle bei der Barrierefunktion des Lungenendothels deutlich.

Es ist also auch denkbar, dass TRPC6-Kanäle an der Ausbildung eines entzündlichen Lungenödems beteiligt sein könnten. Dieses ist insbesondere im Rahmen der Covid-19-Erkrankung von Relevanz [7,70]. Hauptverantwortlich für die Mortalität der Covid-19-Erkrankung ist das akute Atemnotsyndrom („acute respiratory distress syndrom“ = ARDS) als Folge eines entzündlichen Lungenödems [26]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRP-Kanäle einen Einfluss auf die Covid-19-Erkrankung und ihre Symptome wie Fieber, Husten und Schmerzen haben und als potentielle Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten gelten [33], wengleich auch eine neuere Studie aus dem Jahr 2023 bisher keinen signifikanten Nutzen einer Therapie mit einem TRPC6-Inhibitor gezeigt hat [62]. Auf Zellebene wurden Veränderungen wie Pneumozytenhyperplasie, proteinreiche Exsudate, Ausbildung hyaliner Membranen und

mikrovaskuläre Schäden beschrieben [7,26]. Um diese Veränderungen besser nachvollziehen zu können, soll im Folgenden zunächst auf den physiologischen Aufbau der Lunge eingegangen werden.

### **3.2 Der Aufbau der Lunge und des Bronchialsystems**

Die Lunge wird unterteilt in 2 Lungenflügel. Der rechte Lungenflügel untergliedert sich in 3 Lungenlappen (Oberlappen, Mittellappen und Unterlappen), der linke Lungenflügel in 2 Lungenlappen (Ober- und Unterlappen) [57]. Beide Lungenflügel werden von der Pleura visceralis umgeben [57]. Die verschiedenen Lappen lassen sich nochmals in mehrere Segmente unterteilen, welche der Aufteilung des Bronchialsystems entsprechen [8]. Das Bronchialsystem beginnt an der Aufzweigung der Trachea in einen linken und rechten Hauptbronchus. Als weitere Unterteilungen folgen die Lappenbronchien, Segmentbronchien und Subsegmentbronchien, Bronchioli, Bronchioli terminales, Bronchioli respiratorii, Ductus alveolaris und Sacculus alveolaris mit den Alveolen [57]. Bis zu den Bronchioli terminales spricht man vom luftleitenden System, ab den Bronchioli respiratorii vom gasaustauschenden Bereich [75]. Entlang der Aufzweigung des Bronchialsystems verlaufen die Lungengefäße (Aa. pulmonalis und Vv. pulmonalis), welche die systemische Versorgung gewährleisten. Außerdem besitzt die Lunge kleine Gefäße für ihre Eigenversorgung [75].

Histologisch haben die verschiedenen Abschnitte jeweils charakteristische Eigenschaften. Die Bronchien zeichnen sich u.a. durch ihre Knorpelspangen aus und besitzen das höchste Flimmerepithel [8]. Bis zu den Bronchioli respiratorii nimmt die Höhe des Flimmerepithels kontinuierlich ab [8]. Die Bronchioli besitzen auch keine Knorpelanteile mehr [8]. Die Wand der Alveolen ist am feinsten und wird hauptsächlich durch die Pneumozyten ausgekleidet [5]. Es werden zwei Arten von Pneumozyten unterschieden. Pneumozyten Typ 1 sind flache Epithelzellen, die den größten Teil der Alveolarwand ausmachen. Pneumozyten Typ 2 liegen vereinzelt zwischen den Typ 1 Pneumozyten und produzieren das für die Herabsetzung der Oberflächenspannung wichtige Surfactant. Sie sind dicker als die Typ 1 Pneumozyten, da ihr Zellkörper konzentrierter ist [75]. Außerdem im Alveolarraum zu finden sind die Alveolarmakrophagen, die für die Phagozytose von Keimen verantwortlich sind [46].

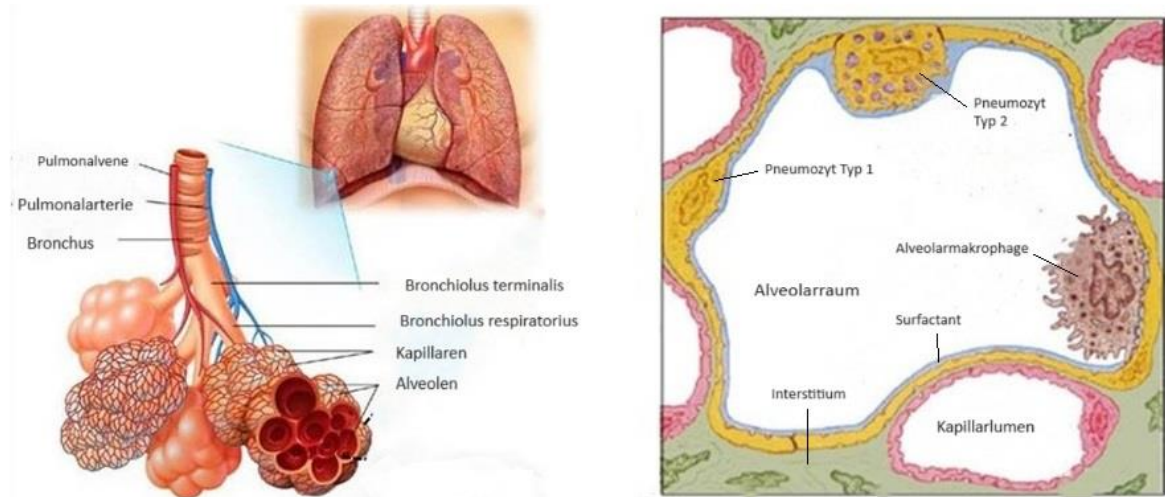


Abbildung 3: Histologie der Lunge (modifiziert nach [15])

### 3.3 Bisherige Erkenntnisse über die Expression von TRPC6 im Lungengewebe

In einer Arbeit aus dem Jahr 2003 wurde die Expression von TRPC und insbesondere auch TRPC6 im menschlichen Lungengewebe bereits untersucht. Hier wurde zum einen mittels RT-PCR das Vorkommen von TRPC6 sowohl in der pulmonalen glatten Muskulatur als auch im Bronchialepithel nachgewiesen [16]. Darüber hinaus gab diese Arbeit bereits erste Auskünfte über die Verteilung von TRPC6 innerhalb dieser Zellen. Hierzu wurde die Konfokalmikroskopie genutzt. Es stellte sich heraus, dass TRPC6 nicht nur im apikalen Teil des Bronchialepithels zu finden ist, also in den cilientragenden Zellen sowie schleimproduzierenden Zellen, sondern auch im Bereich der Basalzellen [16]. Außerdem konnte TRPC6 mRNA bereits in Alveolarmakrophagen detektiert werden [25]. Über die Expression von TRPC6 in den Pneumozyten der Alveolen gibt es derzeit jedoch noch keine Erkenntnisse.

### 3.4 Covid-19 Erkrankung

Die Covid-19 Erkrankung ist eine Infektionserkrankung, die durch das SARS-CoV-2 Coronavirus ausgelöst wird [77]. Erstmals aufgetreten ist sie 2019 in China und hat sich innerhalb kurzer Zeit zu einer weltweiten Pandemie ausgebreitet [52]. Das SARS-CoV-2-Virus zählt zur Familie der Coronaviren, welche v.a. für das Hervorrufen von Erkältungskrankheiten verantwortlich sind [77]. Die Übertragung des Virus erfolgt hauptsächlich aerogen und als Tröpfcheninfektion [77]. Meist präsentiert sich die Krankheit mit allgemeinen Erkältungssymptomen wie Fieber, Husten, Schnupfen und Halsschmerzen [77]. Die Schwere des Verlaufs kann allerdings sehr unterschiedlich sein. Neben gänzlich asymptomatischen Verläufen kommen auch Fälle von tödlich verlaufendem

Lungenversagen vor [34]. Außerdem kann sich die Krankheit neben der Lunge auch auf andere Organe auswirken [77]. Im Gastrointestinalbereich können sich Beschwerden wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Diarrhö äußern [56]. Ein häufiges neurologisches Symptom sind Riechstörungen bis hin zur Anosmie und Geschmacksstörungen. Schwerwiegendere neurologische Manifestationen können aber auch Enzephalopathien, Neuromyopathien und Schlaganfälle sein [78]. Eine kardiale Beteiligung in Form von erhöhten Herzenzymen, EKG-Veränderungen und Auffälligkeiten in der Echokardiographie ist ebenso möglich [22].

In Hinblick auf diese Arbeit ist jedoch vor allem die pulmonale Manifestation von Bedeutung. Hier zeichnen sich schwere Verläufe durch die Ausbildung einer Pneumonie aus [48]. Klinisch zeigen die Patienten zunehmende Dyspnoe, Abfälle der Sauerstoffsättigung und Tachypnoe [48]. Kommt es zum akuten Lungenversagen (Acute respiratory distress syndrom = ARDS) ist meist eine Intubation und maschinelle Beatmung notwendig [34]. Pathophysiologisch kommt es zur Ausbildung eines Lungenödems mit Alveolarkollaps und Hypoxie. Im Rahmen der Inflammation kann zusätzlich ein septischer Schock und Multiorganversagen ausgelöst werden [51].

Histopathologisch konnten bereits charakteristische pulmonale Veränderungen durch die Covid-19-Erkrankung ausgemacht werden. Es zeigten sich eine Konsolidierung des Lungengewebes, Mikrothromben der alveolären Kapillaren, hyaline Membranen und interstitielle Lymphozyteninfiltrate [7]. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigte sich außerdem eine interstitielle Fibrosierung durch Kollagenfaserablagerungen [7]. Die meisten der vorbeschriebenen Veränderungen sind jedoch nicht spezifisch für Covid-19, sie kommen auch im Rahmen anderer viral bedingter Lungenschäden wie z.B. bei Influenza, MERS oder SARS vor [70]. Lediglich im Falle der alveolären Kapillarschädigung konnte bereits festgestellt werden, dass diese bei der Covid-19 Erkrankung ausgeprägter ist. Einer Studie zufolge ist die Ausbildung alveolarkapillärer Mikrothromben 9 mal häufiger bei Covid-19 Patienten als bei Influenza-Patienten [3].

### **3.5 Ziele der Arbeit**

In Hinblick auf die bisherigen Erkenntnisse über das Vorkommen und die Rolle der TRPC6-Kanäle an verschiedenen physiologischen sowie pathophysiologischen Prozessen der Lunge, ist es von Interesse die genaue Lokalisation der Kanäle weiter aufzuklären, um daraus auch mögliche Ansätze für zukünftige Therapien in Bezug auf verschiedene Lungenerkrankungen gewinnen zu können. Die bisherigen Erkenntnisse beruhen überwiegend auf molekulargenetischen Untersuchungen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die TRPC6-Kanäle immunhistochemisch im menschlichen Lungengewebe nachzuweisen. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Sind TRPC6-Kanäle mittels immunhistochemischer Färbung im menschlichen Lungengewebe nachweisbar?
- Innerhalb welcher Strukturen sind TRPC6-Kanäle im humanen Lungengewebe nachweisbar?
- Liegt ein Unterschied in der Expression von TRPC6- Kanälen in gesundem Lungengewebe im Vergleich zu Covid-19-Lungen vor?

## **4. Material und Methodik**

### **4.1 Körperspender**

Die Proben wurden von Körperspendern des Anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes entnommen. Insgesamt handelte es sich um 13 Körperspender, von denen 10 weiblich und 3 männlich waren. Der Altersdurchschnitt lag bei rund 87 Jahren. Die Todesursache war in den meisten Fällen Herz-Kreislauf-Versagen oder eine fortgeschrittene Tumorerkrankung. Zur Konservierung waren alle Körperspender zuvor NEP-fixiert worden. Die durchgeführte Arbeit an den Körperspendern wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Zulassungsnummer 163/20 genehmigt.

Die Körperspende ist für die medizinische Wissenschaft von großer Bedeutung. Indem sich Menschen zu Lebzeiten für eine Spende ihres Körpers nach dem Tod an einem anatomischen Institut entscheiden, tragen sie nicht nur einen wesentlichen Teil zur Aus- und Weiterbildung von Ärzten bei, sondern ermöglichen damit auch die wissenschaftliche Forschung und Gewinnung neuer medizinischer Erkenntnisse. Ein großer Dank gilt daher den Körperspendern sowie ihrer Familien und Freunde. Es wurde allzeit auf einen würdevollen und respektvollen Umgang mit den Körperspendern geachtet.

### **4.2 Probengewinnung**

Die Probengewinnung erfolgte primär über einen gefensternten Zwischenrippenraum auf Höhe der fünften bis sechsten Rippe. Hierzu wurde ein Schnitt an der Oberkante der unteren Rippe entlang des Rippenverlaufs gesetzt. Anschließend wurde stumpf mit den Fingern in die Tiefe präpariert und so Binde- und Muskelgewebe von den Rippen abgehoben. Danach wurde die Interkostalmuskulatur punktuell mit einer stumpfen Präparierschere getunnelt und im nächsten Schritt die Pleura parietalis eröffnet. Es folgte das Tasten mit den Fingern, um ggf. Verwachsungen zu lösen. Daraufhin wurde mit Hilfe einer Rippenschere die obere Rippe medial und lateral in einem Abstand von 4-5cm durchgeschnitten und konnte dann nach oben weggeklappt werden. Die eröffnete Körperhöhle wurde durch Einsetzen zweier Wundhakenspreizer am medialen und lateralen Rand offengehalten. Im nächsten Schritt konnte mit der eigentlichen Probenentnahme begonnen werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die Verwendung von zylindrischen Gewebestücken für die Lunge nicht geeignet ist, da das Gewebe zu weich ist und nicht genügend Widerstand bietet. Daher erfolgte die Entnahme mittels einer chirurgischen Schere. Die Schnitfführung verlief von der Pleura ausgehend senkrecht in die Tiefe. Hierbei wurden von peripher nach zentral pyramidenförmig zulaufende Gewebeproben mit einer viereckigen Grundfläche herausgeschnitten. Die Grundfläche der pyramidenförmigen Gewebeprobe entsprach demnach zur eindeutigen Orientierung immer der Pleura.

### 4.3 Externe Proben

Die Proben der vier Covid-19-Pneumonien wurden vom Institut für allgemeine und spezielle Pathologie der Universität des Saarlandes bereitgestellt. Die Forschung an diesen Proben beruht auf der Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Zulassungsnummer 130/21.

### 4.4 Materialien

Die nachfolgend tabellarisch aufgeführten Materialien wurden für die Durchführung der Arbeit von der Probenentnahme, über die histologische Aufarbeitung bis hin zum Eindecken der Schnitte benötigt. Sie wurden unterteilt in Geräte, Chemikalien, Antikörper und Verbrauchsmaterialien.

#### 4.4.1 Geräte

Geräte/Instrumente	Hersteller
Einbettautomat	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Vakuumpumpe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Paraffingieß器	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlplatte	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Mikrotom	Ref.: RM2025, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wärmeplatte	Kunz Instruments, Stockholm, Schweden
Wärmeschrank	Ref: 51014550; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Wundhakenspreizer	unbekannt
Schere	unbekannt
Küvette	unbekannt
Vortex-Mixer	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Fotomikroskop Nikon ECLIPSE E200	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Kühlanlage für Köperspender	Thalheimer Kühlung GmbH & Co. KG, Ellwangen-Jagst, Deutschland
Einkanalpipetten UHP	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

Tabelle 1: Verwendete Geräte

#### 4.4.2 Chemikalien

<b>Chemikalien/Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Ref.: 1105.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol (70, 80, 90 und 100%)	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
Methylbenzoat	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin (0,1%)	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Citrat-Puffer (pH 6)	Abcam (ab93678)
Aqua dest.	unbekannt
35% Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
10% NGS Blockierlösung	Merck KGaA, Deutschland
ImmPACT (Biozol) DAB EqV	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Kaninchenserum	Ref.: A10547; Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Kontrollpeptid (TRPC6 Blocking Peptid)	Ref.: BLP-CC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien/Lösungen

#### 4.4.3 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-TRPC6-Antikörper	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
HRP-Antikörper (goat serum)	Ref.: A10547; Invitrogen AG, Carlsbad, USA

Tabelle 3: Verwendete Antikörper



#### 4.4.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipettenspitzen	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Skalpelle	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Einbettkassette	Ref.: M512; Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Einbettringe	Ref: M460; Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Objekträger	SuperFrost plus Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dako Pen	Ref.: S200230-2; Agilent, Santa Clara, USA
Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eindeckmedium Roti HistoKit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schere	
Feuchte Kammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotomklingen	DB80, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

## 4.5 Histologische Aufarbeitung

### 4.5.1 Fixierung

Nach der Entnahme wurden die Proben umgehend in Probenröhrchen mit Formalin gegeben. Dort verblieben sie für etwa 24 Stunden. Dieser Schritt dient der Fixierung des Gewebes. Mittels Formalinlösung werden die Proteine denaturiert und somit Veränderungen der Gewebeproben durch metabolische Prozesse wie Fäulnisvorgänge verhindert. Außerdem führt die Fixierung zu einer Verhärtung des Gewebes, was wichtig für das Gelingen des späteren Schneidevorgangs ist [65].

Nach 24 Stunden folgte das Auswaschen der Formalinlösung, indem die Proben in PBS-Puffer überführt wurden. In dieser Lösung konnten die Proben bis zur Durchführung des nächsten Schrittes gelagert werden.

### **4.5.2 Vakuumpumpe**

Um den Schneideprozess zu optimieren wurden die Proben vor dem Einbetten eine Stunde in einem Vakuumschrank aufbewahrt. Mit Hilfe der Vakuumpumpe konnten Luft einschüsse aus dem Lungengewebe entfernt werden.

### **4.5.3 Einbetten**

Um feinste Schnitte der Gewebeproben anfertigen zu können, mussten diese zunächst in Paraffin eingebettet werden. Da Paraffin hydrophob ist, war es nötig, die Proben eingangs zu entwässern. Die Entwässerung erfolgte mittels einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 70%, 80%, 90%), wobei die Proben in jeder Lösung für mehrere Stunden verblieben. Anschließend wurden die Proben in Xylol als Zwischenmedium überführt, um zum einen das alkoholische Lösungsmittel auszuwaschen und zum anderen die Infiltration mit Paraffin zu ermöglichen [54]. Zum eigentlichen Einbetten wurden die Gewebeproben in Einbettförmchen mit heißem Paraffin übergossen und auf einer Kälteplatte zum Aushärten gebracht.

### **4.5.4 Schneiden**

Mithilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Die Paraffinblöckchen wurden zuvor im Kühlschrank gelagert, um ein besseres Schneiden zu ermöglichen. Der Schneidevorgang erfolgte komplett manuell. Zunächst wurde ein Paraffinblöckchen in das Mikrotom eingespannt. Durch Drehen an einer seitlich angebrachten Kurbel, bewegte sich das Blöckchen in vertikaler Richtung. Nun wurde das eingespannte Blöckchen in der horizontalen Ebene immer weiter auf die Klinge am Mikrotomtisch zubewegt. Anhand eines ebenfalls seitlich angebrachten Rädchens erfolgte die Feinjustierung auf die gewünschte Dicke von 5 µm. Vom Mikrotomtisch wurden die Schnitte vorsichtig mit einem feinen, angefeuchteten Pinsel aufgenommen und in ein warmes Wasserbad mit destilliertem Wasser (Temperatur: 36°C) überführt. Dort glätteten sich die Schnitte und konnten bereits auf Risse überprüft und selektiert werden. Im Anschluss konnten die unbeschädigten Schnitte auf einen silanisierten Objektträger gebracht werden. Dazu wurde der Objektträger leicht schräg in das Wasserbad eingetaucht und bis zur Kante des Schnittes herangeführt, wodurch dieser sich der Oberfläche des Objektträgers anschmiegte und dem Wasserbad entnommen werden konnte. Anschließend erfolgte das Trocknen auf einer Wärmeplatte (Temperatur: 32°) und die Lagerung über Nacht im Wärmeschrank.

### 4.5.5 Färben

Zur Darstellung der unterschiedlichen Gewebeelemente wurden 2 verschiedene Färbungen angewandt, zum einen die herkömmliche Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und zum anderen die immunhistochemische Diaminobenzidin-Färbung (DAB-Färbung).

#### 4.5.5.1 HE-Färbung

Mit der HE-Färbung kommen die Zellkerne sowie Zytoplasmaanteile, welche viel endoplasmatisches Retikulum enthalten, blau-violett zur Darstellung, wohingegen andere Zytoplasmaanteile und bindegewebige extrazelluläre Bestandteile rot gefärbt werden [65].

Gefärbt wurde anhand eines festen Schemas, welches bereits in unserem Labor etabliert war.

<b>Entparaffinieren</b>	Xylol	5 min
	Xylol	5 min
	Xylol	5 min
	100% 2-Propanol	5 min
	100% 2-Propanol	5 min
	90% 2-Propanol	5 min
	80% 2-Propanol	5 min
<b>Hämatoxylin-Färbung</b>	Hämatoxylin nach Ehrlich	8 min
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	5 x Eintauchen
<b>Bläuen</b>	Leitungswasser	12 min
<b>Spülen</b>	Destilliertes Wasser	0,5 min
<b>Eosin-Färbung</b>	Eosin (0,1%)	2,5 min
<b>Entwässern</b>	90% 2-Propanol	individuell
	100% 2-Propanol	5 min
	100% 2-Propanol	5 min
	Xylol	5 min
	Xylol	5 min
	Xylol	5 min

Tabelle 5.: Ablauf der HE-Färbung

Vor Gebrauch wurden das Hämatoxylin nach Ehrlich und das 0,1%ige Eosin gefiltert. Außerdem wurden dem Eosin vor Benutzung 2 Tropfen Essigsäure hinzugefügt, was dem „Schärfen“ der Färbung dienen soll [54].

Der erste Schritt der HE-Färbung fand unter dem Abzug statt. Hier war eine Reihe Küvetten mit den verschiedenen Lösungen vorbereitet. In diese wurden jeweils 10 Objektträger in einer speziellen

Halterung nacheinander überführt. Zunächst durchliefen die Proben dreimal hintereinander für jeweils 5 min eine mit Xylol gefüllte Küvette. Im Anschluss wurden sie nacheinander in zweimal 100% Propanol, 90% Propanol und 80% Propanol für ebenfalls je 5 min gegeben. Damit waren die Proben nun entparaffiniert und bereit für den nächsten Färbeschritt.

Hierfür wurden auf einer Arbeitsplatte wiederum das zuvor gefilterte Hämatoxylin und das ebenfalls gefilterte und mit 2 Tropfen Eisessig versehene Eosin in einer Küvette mit Glasdeckel bereitgestellt, ebenso wie eine Küvette mit destilliertem Wasser und eine mit Leitungswasser. Vom 80%igen Propanol wurden die Objektträger nun direkt ins Hämatoxylin überführt. Hier verblieben sie für 8 Minuten. Anschließend wurde die Objektträgerhalterung 4- bis 5-mal in destilliertes Wasser getunkt, bis die überschüssige Farbe entfernt war. Als nächstes erfolgte das Bläuen in Leitungswasser. Hierfür wurde die entsprechende Küvette in ein Waschbecken direkt unter dem Wasserhahn gestellt und so platziert, dass ein leichter Wasserstrahl in einer Ecke der Küvette auftraf. So konnte ein kontinuierlicher Fluss gewährleistet werden, ohne dabei die Schnitte durch zu starken Druck vom Objektträger abzulösen. Daraufhin wurden die Objektträger wiederum für 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 2,5 Minuten in das 0,1%ige Eosin getaucht.

Die letzten Schritte fanden wieder unter dem Abzug statt. Zum Entwässern wurden die Objektträger zunächst so lange in 90%iges Propanol eingetunkt, bis die gewünschte Rotfärbung erreicht war. Danach durchliefen sie in umgekehrter Reihenfolge erst zweimal 100% Propanol und dann dreimal Xylol wieder für jeweils 5 min. Die Zeiten wurden während des gesamten Färbeprozesses mittels Stoppuhr genauestens überwacht.

Nach dem Färbevorgang erfolgte das Eindecken. Hierzu wurde ein Einschlussmittel mithilfe einer Pipette auf den Objektträger gegeben und anschließend ein Deckgläschen aufgebracht. Zur Vermeidung einer Luftblasenbildung war es wichtig, das Deckgläschen mit einer Kante zuerst auf dem Objektträger aufzusetzen und es dann mithilfe einer feinen Nadel langsam über dem Schnitt abzusenken.

#### **4.5.5.2 Immunhistochemische Färbung**

Im Allgemeinen dient die immunhistochemische Färbemethode dem Nachweis bestimmter Gewebsantigene. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines Antikörpers an ein gewünschtes Antigen, wodurch eine zumeist enzymatisch vermittelte Farbreaktion ausgelöst wird, welche letztlich das nachzuweisende Antigen sichtbar macht. Unterschieden werden die direkte von der indirekten Technik. Bei der direkten Technik, vermittelt bereits ein an den Primärantikörper gebundener Marker die enzymatische Farbreaktion. Bei der indirekten Technik bindet zunächst der Primärantikörper spezifisch an das Antigen. Es folgt ein weiterer Schritt, indem ein markierter Sekundärantikörper wiederum an das F<sub>C</sub>-Fragment des Primärantikörpers bindet und somit die

Farbreaktion auslöst. Ein Vorteil der indirekten Methode besteht darin, dass durch die Möglichkeit der Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper ein stärkeres Signal hervorgerufen werden kann [54].

Zur Erzeugung des Farbsignals wird ein Markersystem an den Primär- bzw. Sekundärantikörper gekoppelt. Dies besteht meist aus einem Enzym, wie der sog. Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP), welche auch in diesem Fall verwendet wurde. Das Enzym setzt ein bestimmtes Substrat um, wodurch eine Farbreaktion eintritt. Bei dem hier verwendeten Substrat handelt es sich um Diaminobenzidin (DAB), welches eine Braunfärbung des untersuchten Antigens hervorruft.

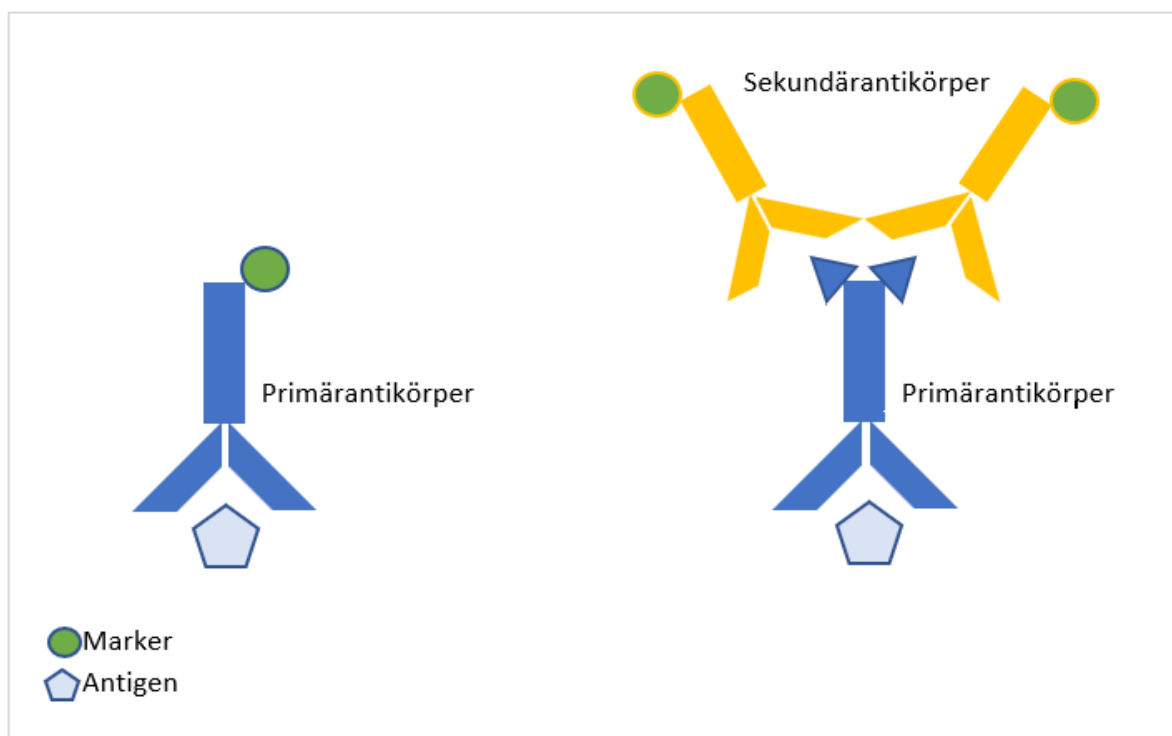


Abbildung 4: Direkte und indirekte IHC-Technik

#### 4.5.5.2.1 Ablauf der IHC

Auch die immunhistochemische Färbung erfolgte nach einem bereits in unserem Labor etablierten, festen Schema (siehe Tab. 6). Der Färbevorgang ließ sich in 2 Abschnitte unterteilen, welche an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt wurden. Wie bei der HE-Färbung konnten pro Färbevorgang insgesamt 10 Objektträger gefärbt werden. Bei 9 der 10 Objektträger handelte es sich um Positivkontrollen, während ein Objektträger als Negativkontrolle diente.

Als Vorbereitung für den ersten Tag wurde eine Citratpufferlösung frisch angesetzt. Hierzu wurden 247,5 ml destilliertes Wasser mit 2,5 ml Citratpuffer versetzt. Anschließend wurde die angesetzte Lösung in einer Küvette mit Deckel im Wärmeschrank auf 95 °C vorgewärmt.

Im ersten Schritt erfolgte das Entparaffinieren. Dieser Schritt lief ähnlich dem Entparaffinierungsvorgang der HE-Färbung ab. Auch hier durchliefen die Gewebeprobe zunächst dreimal in Folge für jeweils 5 Minuten eine Küvette mit Xylol. Im Anschluss daran folgten jeweils zwei Küvetten mit 100% 2-Propanol und jeweils eine Küvette mit 90%- und 80% 2-Propanol für je 5 Minuten. Zusätzlich wurde in diesem Fall eine Küvette mit 70% 2-Propanol und eine Küvette mit destilliertem Wasser für ebenso je 5 Minuten durchlaufen.

Als nächstes fand die Antigen-Demaskierung statt. Dieser Schritt ist notwendig, da es während der Fixierung durch die Denaturierung der Proteine zu strukturellen Veränderungen kommen kann, welche das gesuchte Antigen maskieren [32]. Die Lösung der entstandenen Proteinverbindungen gelang mittels Hitze. Hierfür wurden die Proben in eine Küvette mit dem zuvor frisch angesetzten Citratpuffer gegeben und dann für eine Stunde bei 95°C im Wärmeschrank aufbewahrt. Nach Ablauf der 60 Minuten konnten die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. Im Anschluss wurden sie eine Minute mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Objektträger einzeln aus der Küvette genommen und die Gewebsschnitte großzügig mit einem Fettstift umrandet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die später auf den Schnitt pipettierten Lösungen nicht vom Objektträger laufen, sondern auf dem Schnitt verbleiben.

Bevor sich der nächste Schritt, das Blockieren, anschließen konnte, musste zuvor eine Feuchtkammer vorbereitet werden. Hierzu fanden spezielle Boxen mit Deckel und Einkerbungen zur Platzierung von 10 Objektträgern Verwendung. In diese wurden mit Leitungswasser befeuchtete Papiertücher gelegt. Zum Blockieren wurde fertig angesetztes 10%iges Normal Goat Serum (NGS) in PBS verwendet. Es dient der Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers an das Gewebe. Auf jeden Objektträger wurden ca. 70 µl NGS-Lösung pipettiert. Anschließend verblieben die Objektträger für eine Stunde in der geschlossenen Feuchtkammer, um eine Austrocknung während des Inkubationsvorgangs zu vermeiden.

Nachdem die Schnitte eine Stunde mit der Blockierungslösung inkubiert wurden, schloss sich die Färbung mit dem Primärantikörper an. Dieser ist ein aus Kaninchen gewonnener Antikörper, der

spezifisch an TRPC6-Kanäle bindet. Vorbereitend wurde zum einen Anti-TRPC6 mit NGS in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt. Hierfür wurde der im Gefrierfach gelagerte und im Verhältnis 1:50 vorverdünnte TRPC6-Antikörper mit derselben Menge NGS versetzt, um eine 1:100 verdünnte fertige Antikörperlösung zu erhalten. Zum anderen wurde für die Negativkontrolle Kaninchenserum mit einer Verdünnung von 1:500 vorbereitet. Dazu wurde eine ebenfalls im Gefrierschrank gelagerte Stocklösung mit der 499-fachen Menge PBS versetzt. Beide Lösungen wurden anschließend für ein paar Sekunden im Vortexer vermischt.

Rechenbeispiel:

Anti-TRPC6:

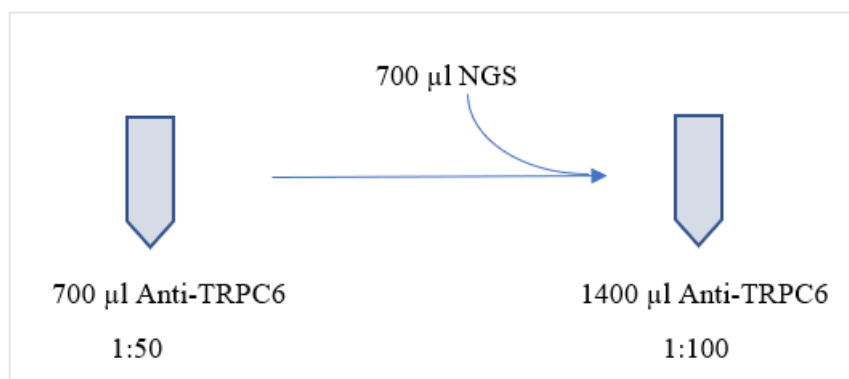


Abbildung 5: Rechenbeispiel zur Verdünnung von Anti-TRPC6

Kaninchenserum:

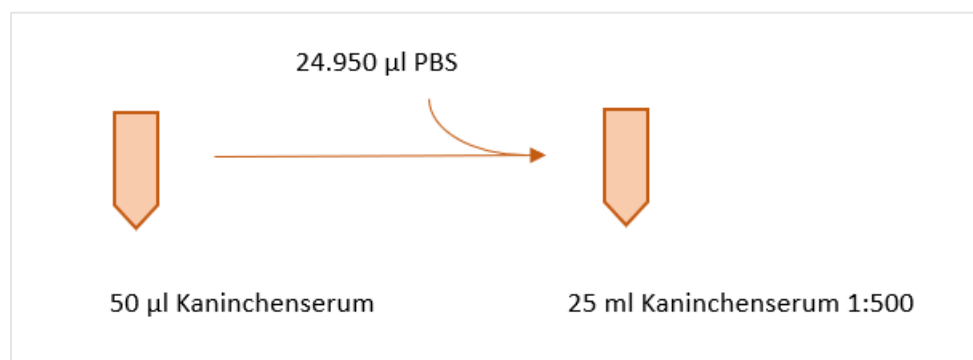


Abbildung 6: Rechenbeispiel zur Verdünnung des Kaninchenserums

Pro Schnitt stand somit eine Menge von ca. 70 µl Anti-TRPC6 zu Verfügung. Die Menge des angefertigten Kaninchenserums reichte für mehrere Färbevorgänge und konnte bis zu zwei Monate im Kühlschrank gelagert werden.

Die zuvor in der Feuchtkammer inkubierten Schnitte wurden nacheinander herausgenommen und die Blockierungslösung auf ein sauberes Tuch abgeklopft. Im nächsten Schritt konnte dann die Primärantikörperlösung auf die Schnitte pipettiert werden. Dabei wurden pro Färbedurchgang jeweils 9 Schnitte mit Anti-TRPC6 als Positivkontrolle und 1 Schnitt als Negativkontrolle mit Kaninchenserum inkubiert. Die Schnitte verblieben nun über Nacht bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer.

Der nächste Färbetag begann mit der Peroxidase-Inaktivierung. Diese ist notwendig, da im untersuchten Gewebe natürlicherweise Peroxidasen vorkommen, welche ein falsch positives Ergebnis hervorrufen könnten. Denn die endogenen Peroxidasen können ebenso wie die verwendete horseradish peroxidase zu einer Umsetzung des Chromogens DAB führen. Um dies also zu verhindern, wurde 3%iges Wasserstoffperoxid verwendet [6], welches zuvor frisch angesetzt wurde. Zunächst musste die Primärantikörperlösung von den Schnitten abgeklopft werden. Dann wurden die Objektträger zweimal in Folge für je zwei Minuten in eine Küvette mit PBS überführt. Im Anschluss wurden die Objektträger wieder in die Feuchtkammer gelegt und das 3%ige Wasserstoffperoxid direkt auf den Schnitt pipettiert. Nach 10 Minuten konnte das Wasserstoffperoxid vom Schnitt geklopft werden und es erfolgte ein erneutes Waschen in PBS für zweimal zwei Minuten.

Einen weiteren wichtigen Baustein der IHC-Färbung stellt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper dar. Bei diesem handelte es sich um einen aus Ziegen gewonnenen Antikörper, welcher spezifisch an den Primärantikörper bindet und an den eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, welche die Farbreaktion katalysiert. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Diese wurde in zwei Verdünnungsschritten erreicht. Im ersten Schritt wurden 20 µl des Sekundärantikörpers mit 980 µl NGS vermischt, sodass eine 1:50 Verdünnung entstand. Im zweiten Schritt wurden 100 µl des 1:50 verdünnten Sekundärantikörpers 10fach weiterverdünnt, indem 900 µl NGS zugegeben wurden. Das Ergebnis war 1 ml des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:500.



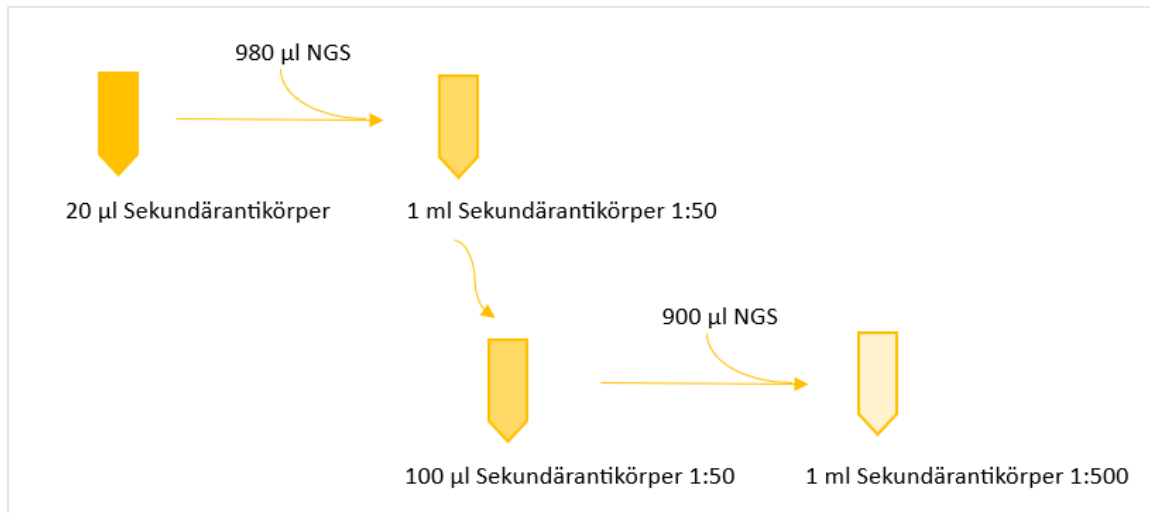


Abbildung 7: Rechenbeispiel zur Verdünnung des Sekundärantikörpers

Die Sekundärantikörperlösung konnte dann auf alle zehn Schnitte in der Feuchtkammer pipettiert werden und verblieb für eine Stunde. Daraufhin wurde die Lösung wiederum von den Schnitten geklopft und es erfolgte ein vollständiges Abwaschen des überschüssigen Sekundärantikörpers in PBS für zweimal zwei Minuten.

Unmittelbar folgend schloss sich die DAB-Färbung an. Da DAB aufgrund seiner Kanzerogenität als Gefahrstoff einzuordnen ist, galten bei diesem Arbeitsschritt besondere Vorsichtsmaßnahmen wie z.B. das Tragen spezieller Chemikalienschutzhandschuhe und das sichere Entsorgen als Sonderabfall. Genutzt wurde eine DAB-Lösung der Firma Biozol, welche aus zwei einzelnen Reagenzien bestand, die, im gleichen Volumen zusammengeführt, ihre eigentliche Wirkweise entfalteten. Da ca. 700 µl DAB-Lösung benötigt wurden, wurden 350 µl von Reagenz 1 mit 350 µl von Reagenz 2 in einem Eppendorfgefäß zusammengeführt. Anschließend wurde unter einem Lichtmikroskop ca. 70 µl DAB-Lösung direkt auf den Schnitt pipettiert und eine Stoppuhr gestartet. Aufgrund der Umsetzung des DAB durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kam es langsam zur immer deutlicheren Braunfärbung, welche unter dem Mikroskop bewertet werden konnte. Die Dauer der Inkubation mit dem DAB musste für alle Schnitte identisch sein. Sie betrug in diesem Fall 10 Minuten. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben in eine Küvette mit PBS getaucht.

Als letzter Schritt erfolgte die Gegenfärbung. Sie dient der generellen Sichtbarmachung der Gewebsstrukturen. Hierzu wurden die Proben zuerst für eine Minute in eine Küvette mit destilliertem Wasser gestellt und anschließend kurz in Hämatoxylin nach Ehrlich getaucht. Dann folgte ein vier- bis fünfmaliges Dippen in destilliertes Wasser sowie das Bläuen in Leitungswasser für 4 Minuten. Zuletzt wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%-, 80%,

90%- und 100%-Propanol sowie Xylol für je 5 Minuten entwässert. Hierbei wurde 100%-Propanol zweimal, Xylol dreimal aufeinanderfolgend durchlaufen.

Am Ende wurden die Proben, wie bereits bei der HE-Färbung erläutert, eingedeckt.







<b>Entparaffinieren</b>	Xylol	5 min
	Xylol	5 min
	Xylol	5 min
	100% 2-Propanol	5 min
	100% 2-Propanol	5 min
	90% 2-Propanol	5 min
	80% 2-Propanol	5 min
	70% 2-Propanol	5 min
	Destilliertes Wasser	5 min
<b>Demaskierung</b>	Citratpuffer (95°C)	60 min
	Citratpuffer (RT)	30 min
	PBS	1 min
<b>Blockierung</b>	10% NGS in PBS	60 min
<b>Primärantikörper</b>		
	Anti-TRPC6 (1:100)	24 h
	Kaninchenserum (1:500)	
<b>Peroxidase-Inaktivierung</b>		
PBS	2 min	
PBS	2 min	
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min	
PBS	2 min	
PBS	2 min	
<b>Sekundärantikörper</b>		
	HRP-Antikörper (1:500)	60 min
	HRP-Antikörper (1:500)	
<b>Waschen</b>		
PBS	2 min	
PBS	2 min	
<b>DAB-Färbung</b>		
	DAB-Lösung	ca. 10 min
	DAB-Lösung	
<b>Stoppen der Reaktion</b>		
PBS		
<b>Gegenfärbung</b>		
Destilliertes Wasser	1 min	
Hämatoxylin	1 s	
Leitungswasser	4 min	
<b>Entwässern</b>		
70% 2-Propanol	5 min	
80% 2-Propanol	5 min	
90% 2-Propanol	5 min	
100% 2-Propanol	5 min	
100% 2-Propanol	5 min	
Xylol	5 min	
Xylol	5 min	
Xylol	5 min	

Tabelle 6: Ablauf der immunhistochemischen DAB-Färbung

## 4.6 Peptidkontrolle

Die Peptidkontrolle dient der Qualitätssicherung des Antikörpers. Sie stellt sicher, dass der verwendete Antikörper spezifisch an das gesuchte Antigen, den TRPC6-Kanal, bindet. Das Prinzip beruht darauf, dass ein speziell angefertigtes Peptid, welches dem gesuchten Antigen, dem TRPC6-Kanal, entspricht, den verwendeten Antikörper bindet und somit blockiert, wodurch bei der IHC-Färbung ein geringeres Signal als bei der Positivkontrolle entsteht.

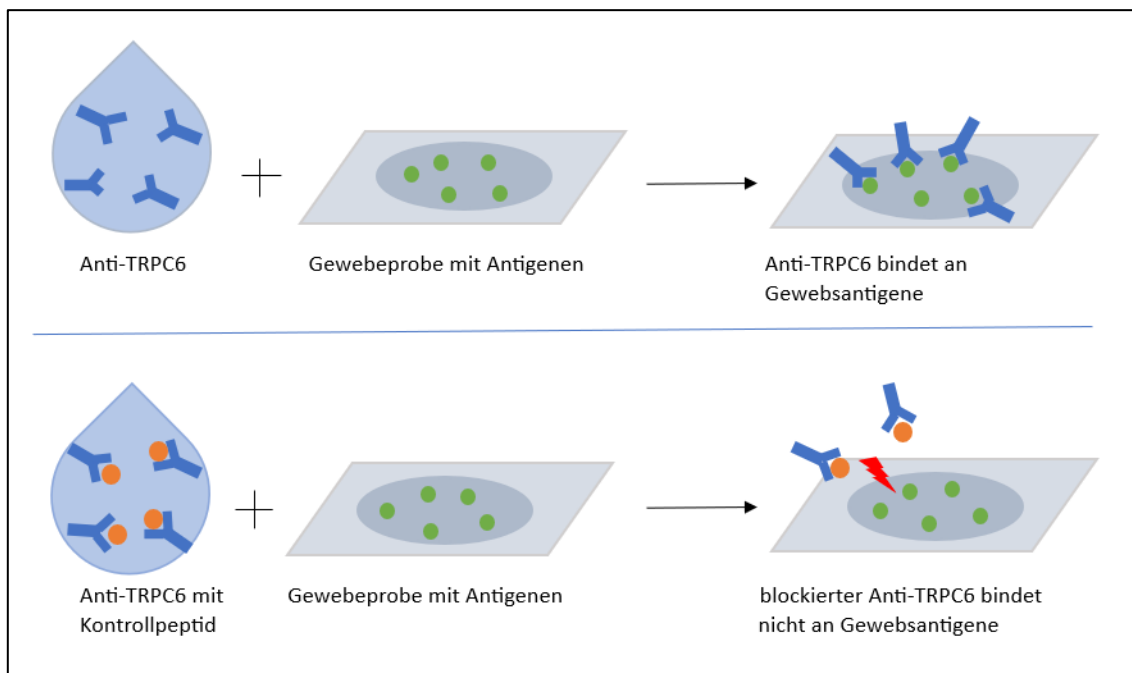


Abbildung 8: Peptidkontrolle schematisch

Zur Durchführung der Peptidkontrolle wurde eine Probe aus einer Färbereihe ausgewählt, welche zuvor ein eindeutig positives Ergebnis erzeugt hat. Das eindeutig positive Ergebnis konnte dann am Ende mit dem Ergebnis der Peptidkontrolle verglichen werden. Die Vorbereitung fand einen Tag vor der eigentlichen IHC-Färbung statt. Von dem im Gefrierfach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten, pulverigen Kontrollpeptid wurden  $40\ \mu\text{g}$  in einem Eppendorfgefäß mit  $20\ \mu\text{l}$  PBS aufgelöst. Die Probe wurde vorsichtig geschwenkt, bis alle Peptidkristalle aufgelöst waren. Zusätzlich wurde eine Antikörperlösung mit der gleichen Verdünnung (1:100) wie bei den anderen Färbevorgängen zuvor hergestellt. Anschließend wurde gerade so viel von der Antikörperlösung zu der Lösung mit dem Kontrollpeptid gegeben, dass ein Volumen entstand, das genau für einen Schnitt ausreichte. Die fertige Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die IHC-Färbung lief, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, ab. Es wurde lediglich beim Schritt der Inkubation mit dem Primärantikörper anstelle der Anti-TRPC6-Lösung die einen Tag zuvor angesetzte Kontrolllösung auf den Schnitt pipettiert.

## 4.7 Auswertung

### 4.7.1 Allgemeines zur Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte eigenständig in systematischer Weise. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden die Präparate stichprobenartig durch eine auf dem Gebiet der Histologie erfahrene Person begutachtet und die Ergebnisse bestätigt.

In die Auswertung der gesunden Lungenproben gingen insgesamt 20 Präparate von 12 verschiedenen Körperspendern mit ein. Entsprechend eines Kreuzschemas wurden von zwei Körperspendern alle fünf Lungenlappen mittels IHC gefärbt. Zusätzlich wurde der rechte Mittellappen bei allen 12 Körperspendern vergleichend untersucht.

Seite/ Lappen Spender	links	links	rechts	rechts	rechts
	OL	UL	OL	ML	UL
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

Tabelle 7: Übersicht der ausgewählten Lungenproben der Körperspender

*Die braun markierten Felder zeigen die Proben an, welche zur IHC verwendet wurden.*

*Abkürzungen: OL = Oberlappen, UL = Unterlappen, ML = Mittellappen*

Die Auswertung der Covid-19-Proben umfasste insgesamt 11 Proben von 4 verschiedenen Verstorbenen mit Covid-19-Pneumonie. Hierbei wurde jeweils von allen 4 Verstorbenen der rechte Unterlappen untersucht, sowie jeweils vereinzelt mindestens eine weitere Probe eines anderen Lungenlappen. Von Covid-Probe Nr. 4 gab es 2 verschiedene Schnitte des rechten Unterlappen.

Seite/ Lappen	links	links	rechts	rechts	rechts
Covid-Proben					
	OL	UL	OL	ML	UL
1					
2					
3					
4					

Tabelle 8: Übersicht der Proben der Covid-19-Pneumonien

Die braun markierten Felder zeigen die Proben an, welche zur IHC verwendet wurden. In diesem Falle entsprechen die Proben, an welchen die IHC Färbung durchgeführt wurde, allen vorhandenen Proben.

Abkürzungen: OL = Oberlappen, UL = Unterlappen, ML = Mittellappen

Die in dieser Arbeit enthaltenen Bilder wurden mithilfe eines Fotomikroskops aufgenommen und zeigen repräsentative Präparatausschnitte.

#### 4.7.2 Auswertungsschema

Bei der Auswertung der Proben ging es um die Ausprägung der Färbung. Eine Braunfärbung bedeutete das Vorhandensein von TRPC6, wohingegen keine Braunfärbung das Nichtvorhandensein von TRPC6 anzeigte. Außerdem wurde die Intensität der Braunfärbung beurteilt und in unterschiedliche Abstufungen eingeteilt. Die Beurteilung der Farbintensität ist folgender Tabelle zu entnehmen:

BEWERTUNG	INTENSITÄT DER BRAUNFÄRBUNG
0	nicht positiv = keine Braunfärbung
(+)	wahrscheinlich positiv = angedeutete Braunfärbung
+	positiv = helle Braunfärbung
++	stark positiv = kräftige Braunfärbung

Tabelle 9: Auswertungsschema

### 4.7.3 Auswertungsprotokoll

Datum: \_\_\_\_\_

Auswertungsbogen

Journal-Nr.: \_\_\_\_\_ Seite: \_\_\_\_\_ Lappen: \_\_\_\_\_

Struktur	Pleura	subpleurales Bindegewebe	kleine Gefäße		Gefäßinhalt	Bronchien	Bronchiolen	Alveolen / Alveolarsepten	Pneumozyten Typ 1	Pneumozyten Typ 2
			Endothel	Media						
Intensität (Anteil)										

0: nicht positiv, (+): wahrscheinlich positiv, +: eindeutig positiv, ++: stark positiv

Notizen

---



---



---



---



---

Abbildung 9: Auswertungsprotokoll

Es wurden verschiedene Anteile des Lungengewebes im gesamten Schnitt beurteilt. Zum einen wurde die Pleura und das subpleurale Bindegewebe auf das Vorhandensein von TRPC6 untersucht. Zum anderen wurden kleine Gefäße beurteilt. Hierbei wurde nochmals separat das Gefäßendothel von der Gefäßmedia unterschieden. Bei den Covid-Proben wurde zudem die Adventitia mitbeurteilt. Auch der Gefäßinhalt wurde betrachtet. Darüber hinaus von großer Bedeutung war die Untersuchung der Alveolarsepten mit Pneumozyten Typ 1 und 2 sowie den Alveolarmakrophagen. Außerdem flossen die Bronchiolen und Bronchien mit in die Auswertung, wobei letztere in den gesunden Lungenproben nicht mit angeschnitten waren.



## 5. Ergebnisse

### 5.1 Ergebnis der Peptidkontrolle

Die Peptidkontrolle konnte die Spezifität des TRPC6-Antikörpers bestätigen. Sowohl die Alveolarsepten mit den Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten als auch die Gefäße und Bronchiolen zeigen in der Positivkontrolle eine starke Braunfärbung [++]. In der Peptidkontrolle ist die Braunfärbung jedoch deutlich schwächer [+] bis fraglich [(+)] ausgeprägt. Die Negativkontrolle zeigt lediglich eine schwache bläuliche Färbung [0] entsprechend dem Nichtvorhandensein von TRPC6.

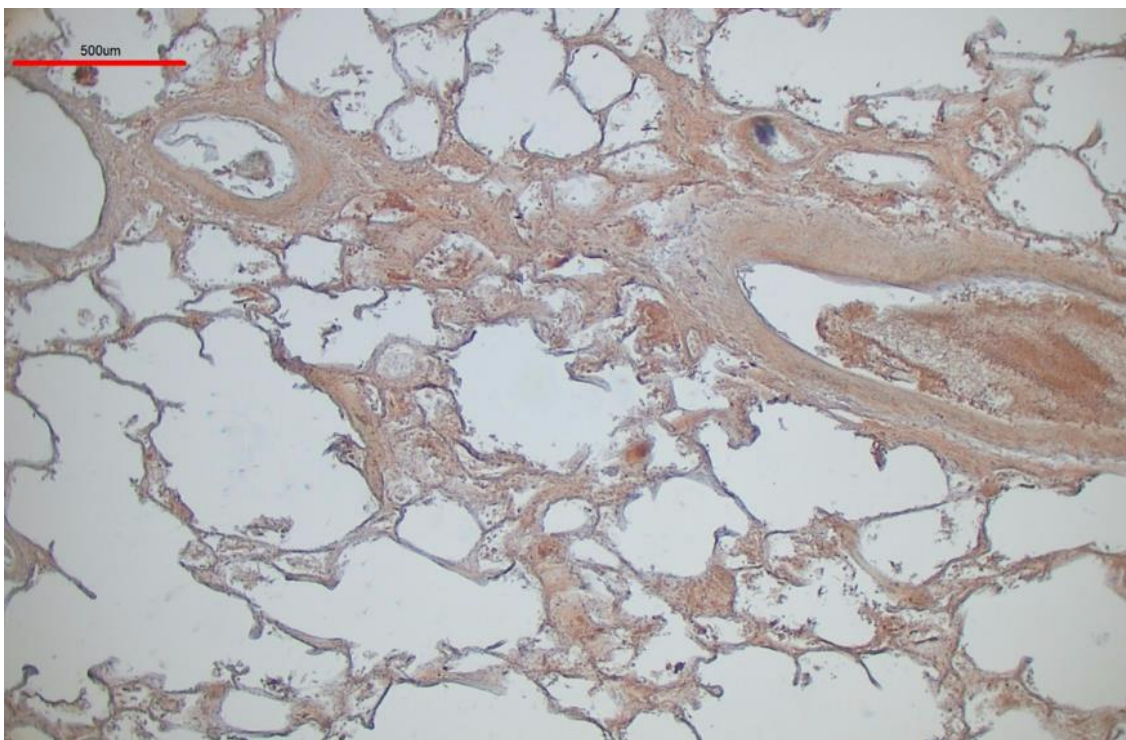


Abbildung 10: Positivkontrolle

*Starke Braunfärbung [++] des Bronchiolus (oben links), des Gefäßes (rechte Bildmitte) sowie der Alveolen.*

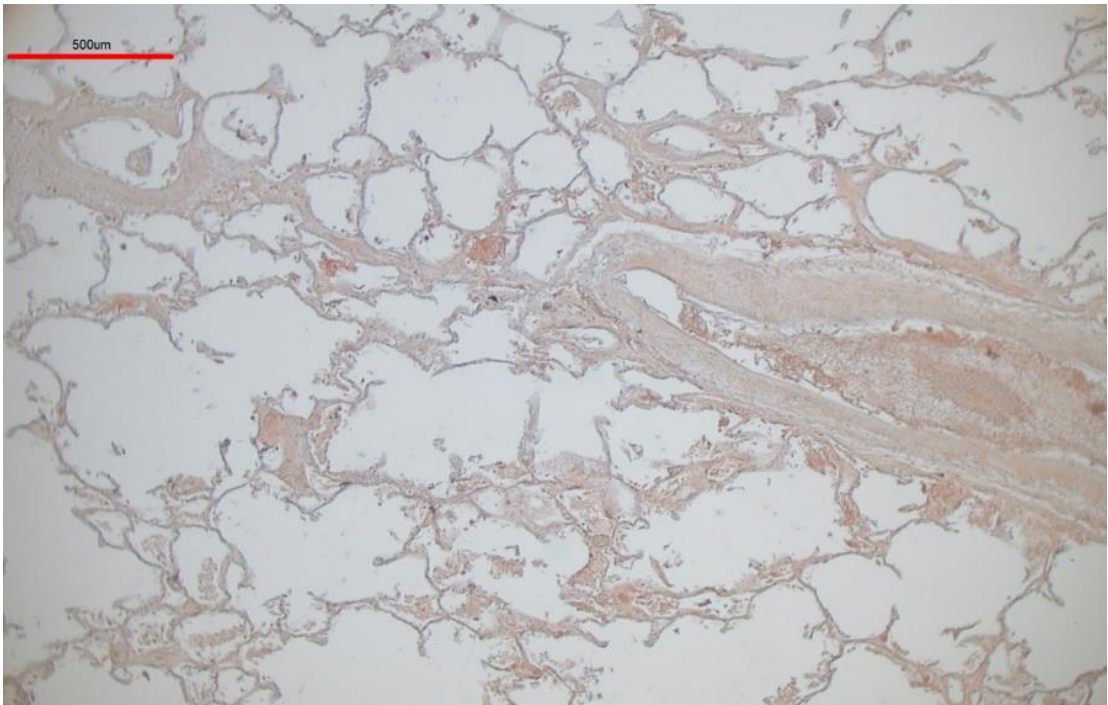


Abbildung 11: Peptidkontrolle

*Schwache Braunfärbung [+] des Bronchiolus (oben links), des Gefäßes (rechte Bildmitte) sowie der Alveolen.*

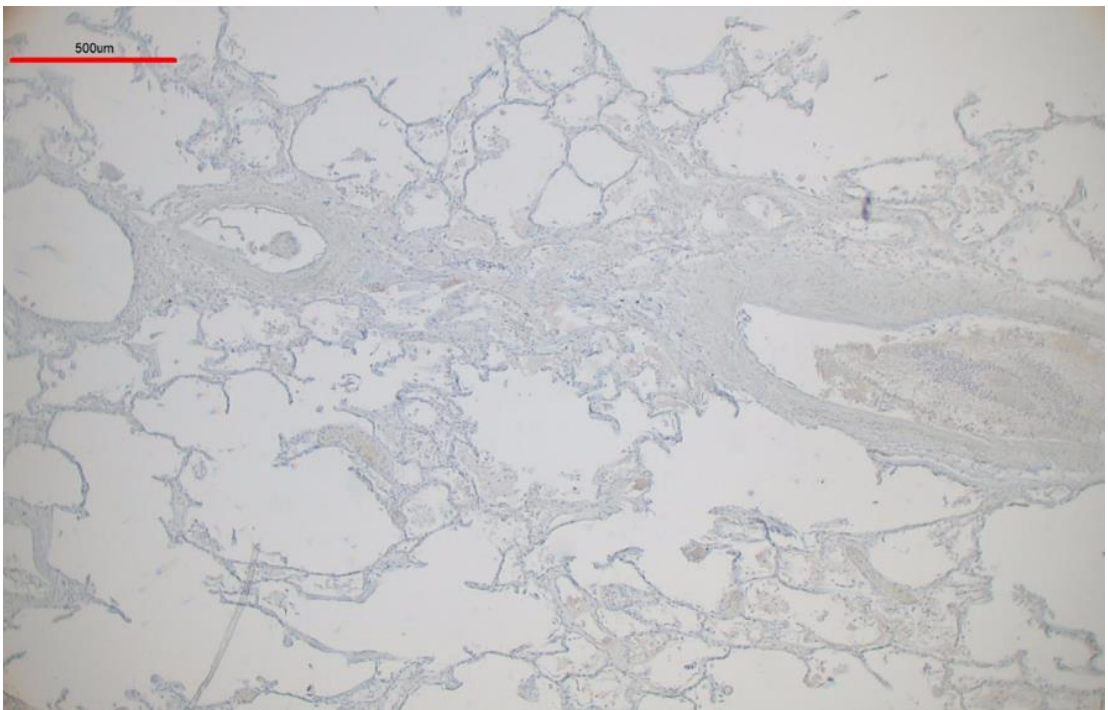


Abbildung 12: Negativkontrolle

*Keine Braunfärbung [0] des Bronchiolus (oben links), des Gefäßes (rechte Bildmitte) sowie der Alveolen.*

## 5.2 Ergebnisse der gesunden Lungenproben

### 5.2.1 Pleura und subpleurales Bindegewebe

Die Pleura und das subpleurale Bindegewebe zeigten sich von allen untersuchten Gewebsstrukturen bezüglich ihrer Anfärbung am variabelsten. In genau der Hälfte der Proben war keine Braunfärbung ersichtlich. In 20% der Fälle war die Pleura fraglich positiv, in 30% der Fälle eindeutig positiv. Abbildung 13 zeigt beispielhaft einen Pleuraabschnitt mit eindeutigem Nachweis von TRPC6.

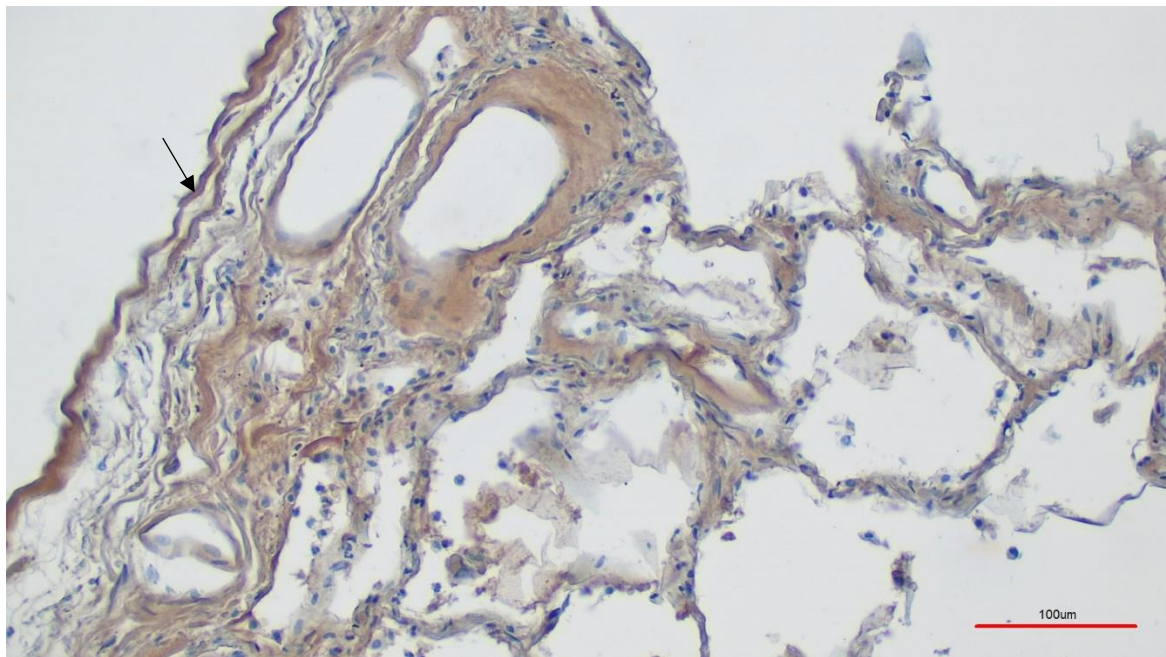


Abbildung 13: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe in IHC-Färbung

20x Vergrößerung

*Die Pleura pulmonalis (schwarzer Pfeil) zeigt sich hier eindeutig braun gefärbt. Das subpleurale Bindegewebe erscheint etwas schwächer braun gefärbt.*



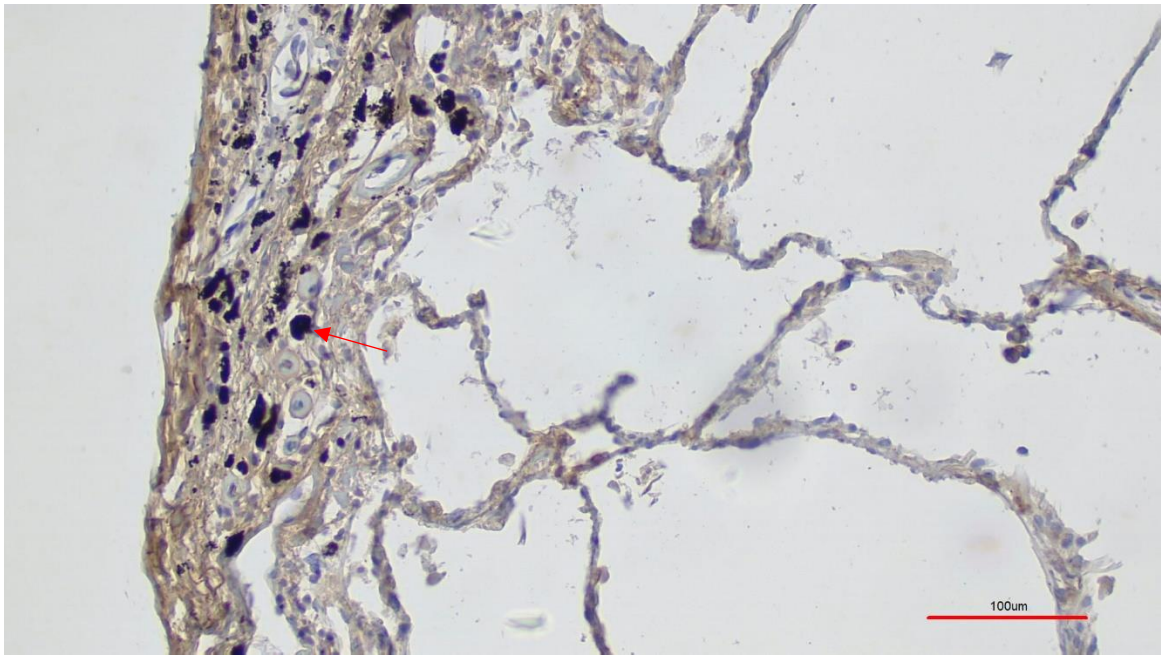


Abbildung 14: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe mit Ablagerungen von anthrakotischem Pigment (roter Pfeil) in IHC-Färbung, 20x Vergrößerung  
*Die Pleura pulmonalis hier mit starker Braunfärbung.*

### 5.2.2 Gefäße

Bei der Betrachtung der Gefäße wurde zwischen Gefäßendothel, Gefäßmedia und Gefäßinhalt unterschieden. Hier stellte sich heraus, dass das Gefäßendothel in der Hälfte der Fälle kein TRPC6 nachwies. Die Gefäßmedia war hingegen in allen mittels IHC gefärbten Proben positiv bis sogar stark positiv für TRPC6. Ebenso wies auch der Gefäßinhalt durchgehend eine eindeutige Braunfärbung auf. Auf Seite 38 zeigen die Abbildungen 15 und 16 eine Gegenüberstellung eines Gefäßes und eines begleitenden Bronchiolus sowohl in der IHC-Färbung als auch in der Negativkontrolle.

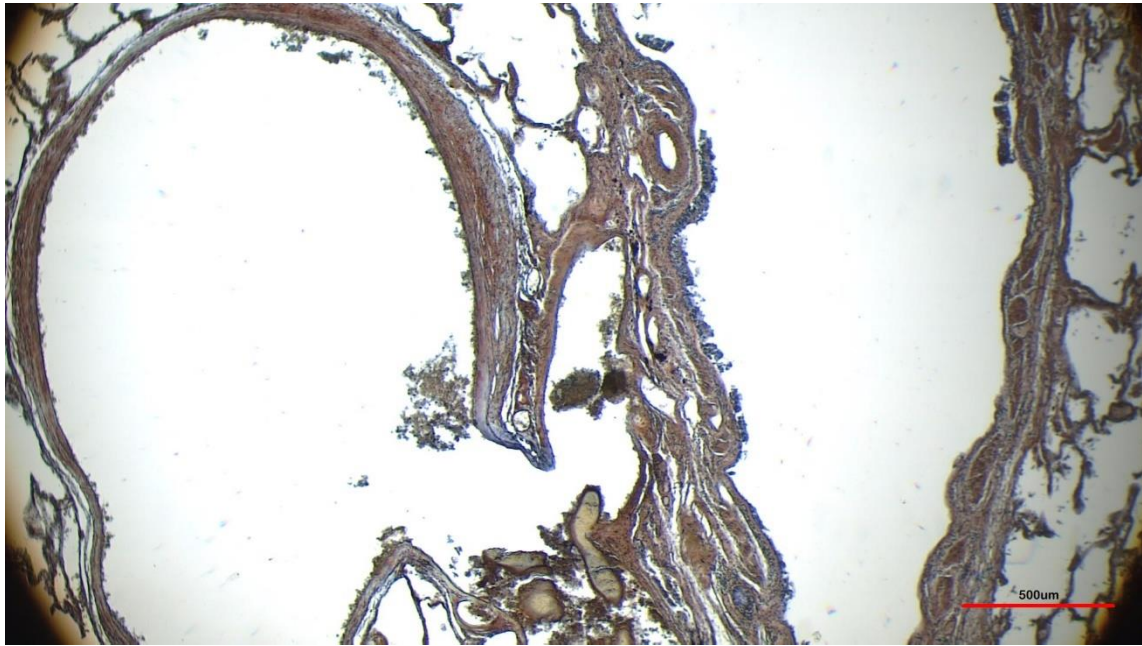


Abbildung 15: Gefäß (links) und begleitender Bronchiolus (rechts) in der IHC-Färbung  
4x Vergrößerung

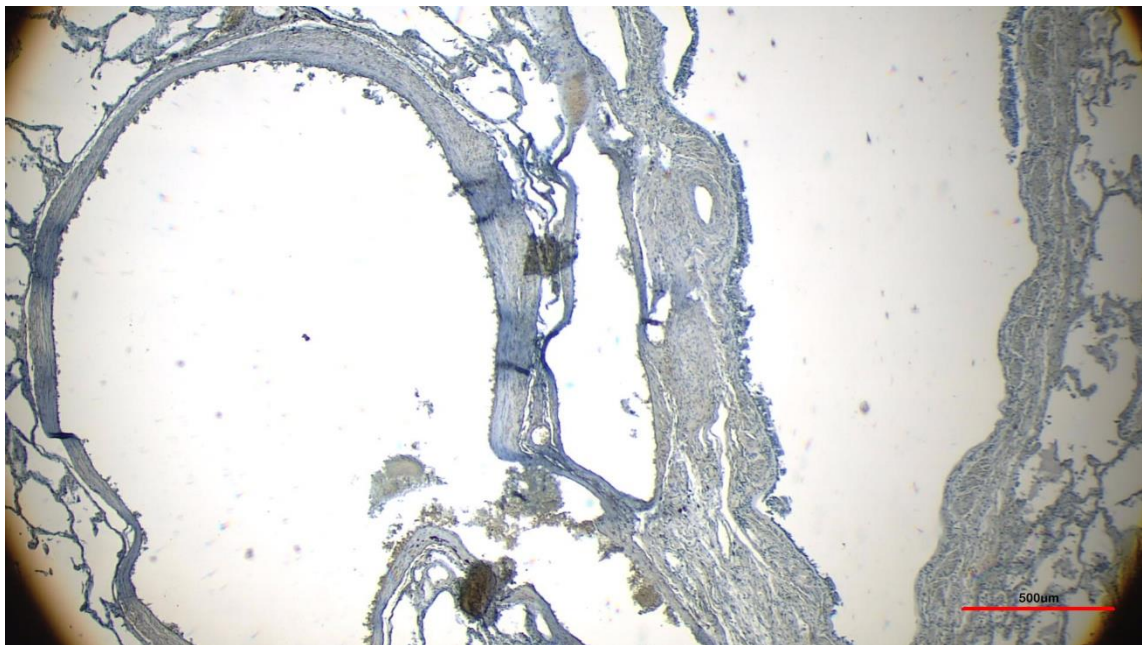


Abbildung 16: Gefäß (links) und begleitender Bronchiolus (rechts) in der Negativkontrolle  
4x Vergrößerung



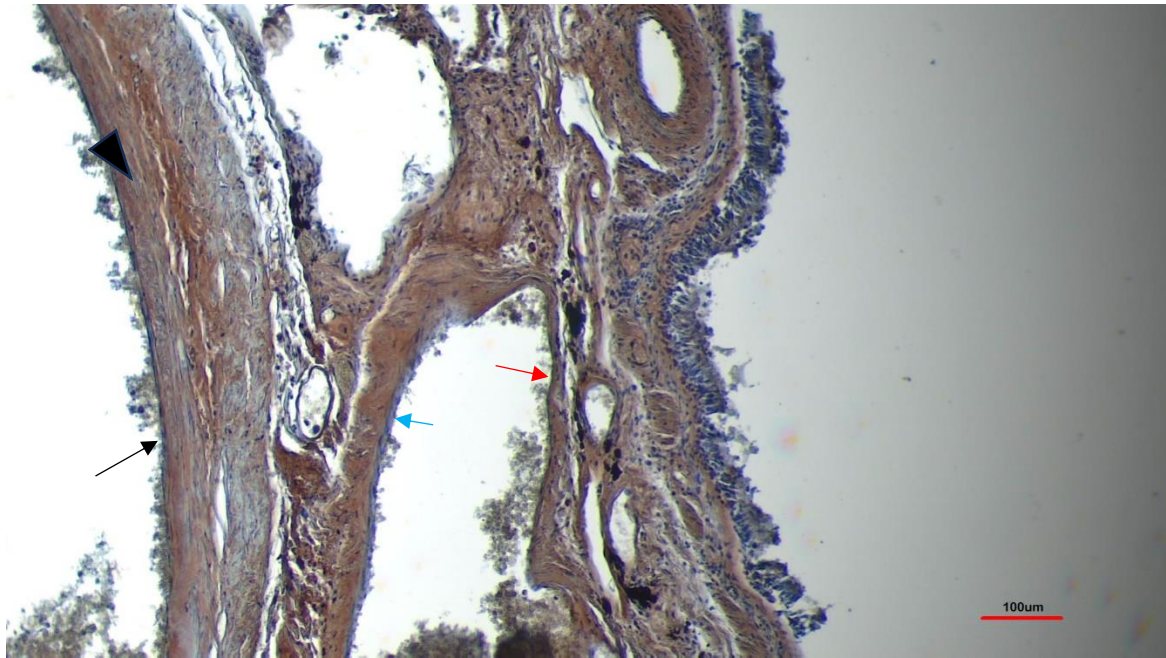


Abbildung 17: Anschnitt der Gefäßwand (links) und des begleitenden Bronchiolus (rechts) in der IHC-Färbung, 10x Vergrößerung

*Der dünne schwarze Pfeil deutet auf das braun gefärbte Gefäßendothel. Darunter liegend findet sich die ebenfalls kräftig angefärbte Media (dicke Pfeilspitze). Mittig im Bild findet sich ein weiteres kleineres Gefäß mit teils negativ (blauer Pfeil) und teils positiv (roter Pfeil) angefärbten Endothel. Der Gefäßinhalt erscheint hier schwach positiv.*

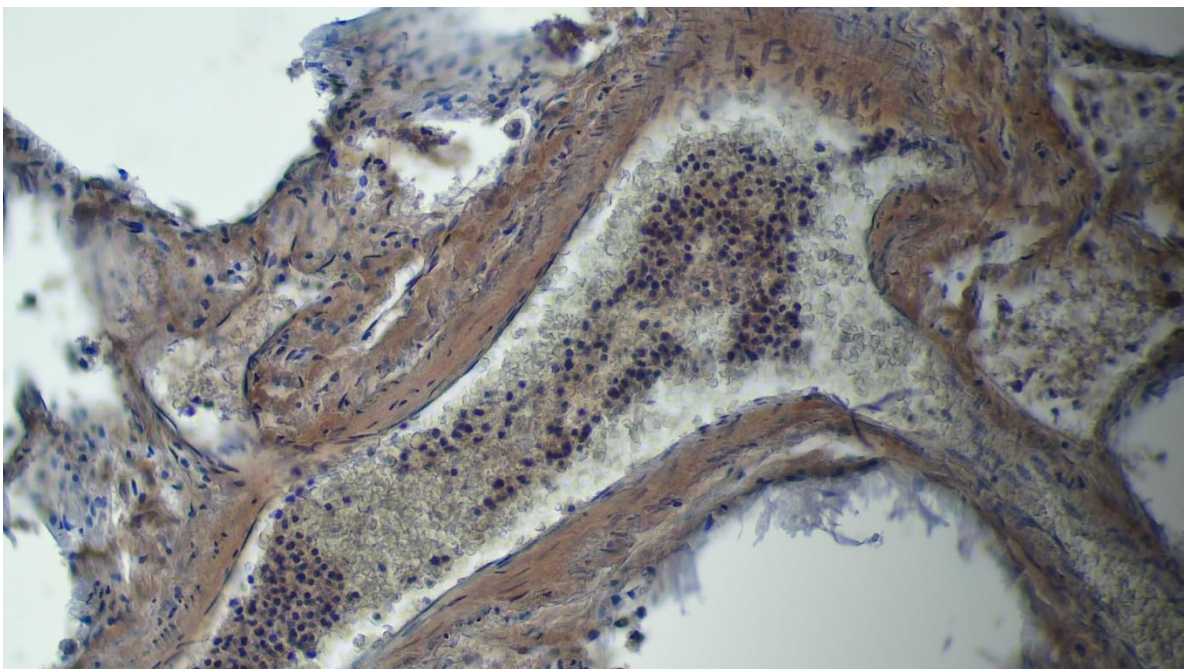


Abbildung 18: Gefäß in IHC-Färbung, 20x Vergrößerung

### 5.2.3 Bronchioli

Der Nachweis von TRPC6 war in allen Proben positiv. Sowohl das Flimmerepithel als auch die Schicht aus glatter Muskulatur zeigten eine eindeutige Braunfärbung im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe auch Abbildung 15-17). Beim Flimmerepithel erkennt man die intensive Braunfärbung v.a. im apikalen Anteil, während der basale Teil zunächst blau erscheint. Bei genauerer Betrachtung erkennt man jedoch auch im basalen Bereich des Flimmerepithels um die blau gefärbten Zellkerne herum eine Braunfärbung (siehe Abbildung 20).

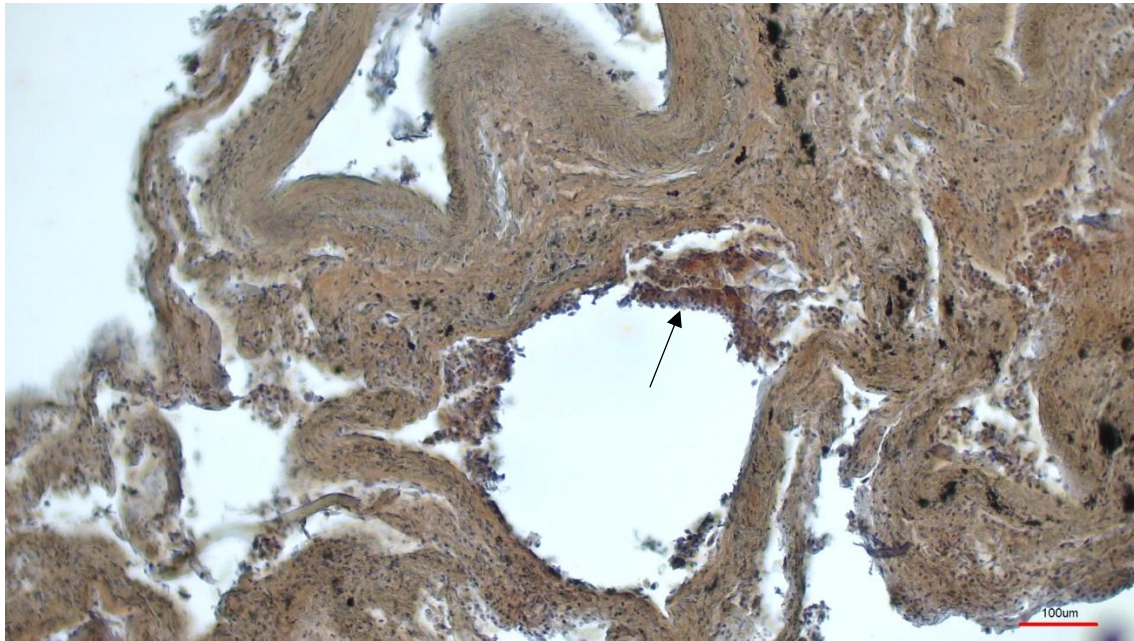


Abbildung 19: Bronchiolus mit teils abgelöstem Flimmerepithel in IHC-Färbung  
10x Vergrößerung

*Der Pfeil deutet auf das braungefärbte Flimmerepithel. Rundherum erkennt man die ebenso deutlich braungefärbten glatten Muskelzellen und peribronchiolären Fasern.*



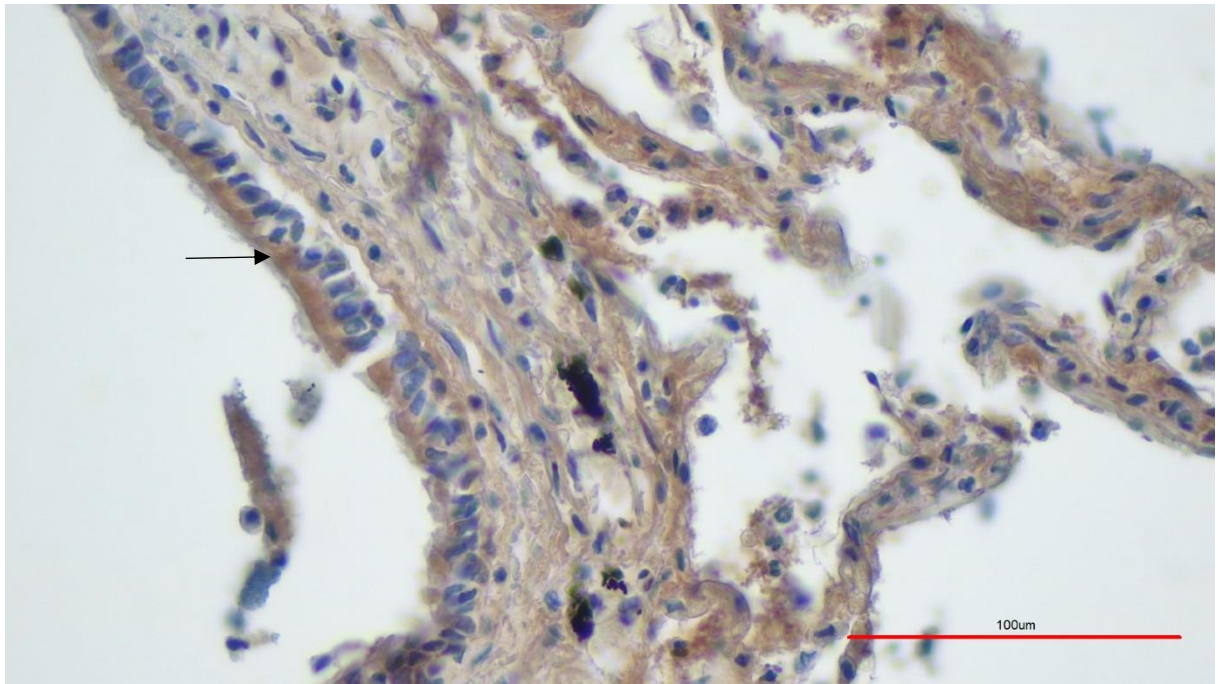


Abbildung 20: Anschnitt eines Bronchiolus mit Flimmerepithel in IHC-Färbung  
40x Vergrößerung

*Intensive Braunfärbung des apikalen Anteils des Flimmerepithels (Pfeil), aber auch bei genauerer Betrachtung des basalen Anteils*



## 5.2.4 Alveolen

Die einzelnen Alveolen werden durch die Alveolarsepten voneinander getrennt. Sie enthalten die Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten. Für die Typ 1 Pneumozyten konnte in 65% der Proben ein sicher positives Ergebnis detektiert werden. Zählt man auch die wahrscheinlich positiv gefärbten Proben hinzu, wären es 75%. Die Typ 2 Pneumozyten waren in 70% der Proben sicher positiv gefärbt, unter Hinzunahme der wahrscheinlich positiv gefärbten Proben wären es sogar 90%.

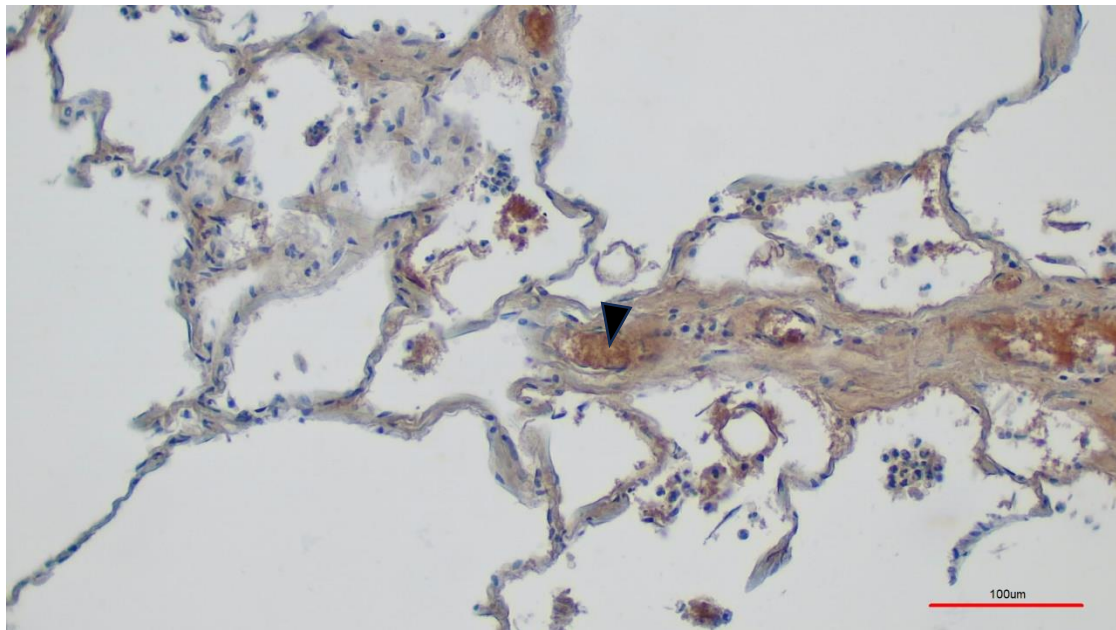


Abbildung 21: Alveolen und Blutkapillaren in IHC-Färbung, 20x Vergrößerung  
*Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 in den Alveolarsepten und Kapillaren der Interalveolarsepten (Pfeilspitze)*

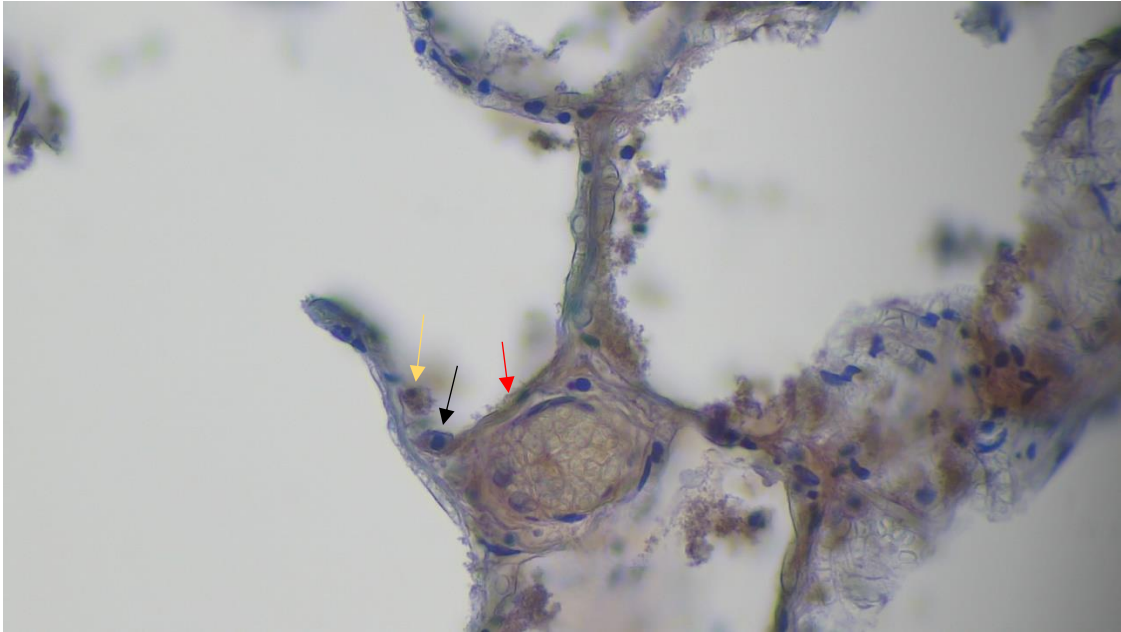


Abbildung 22: Alveolen mit Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten in IHC-Färbung, 40x Vergrößerung  
*Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 in Typ 1 (roter Pfeil) und Typ 2 (schwarzer Pfeil) Pneumozyten. Zudem zeigt sich ein kleiner Alveolarmakrophage (gelber Pfeil).*

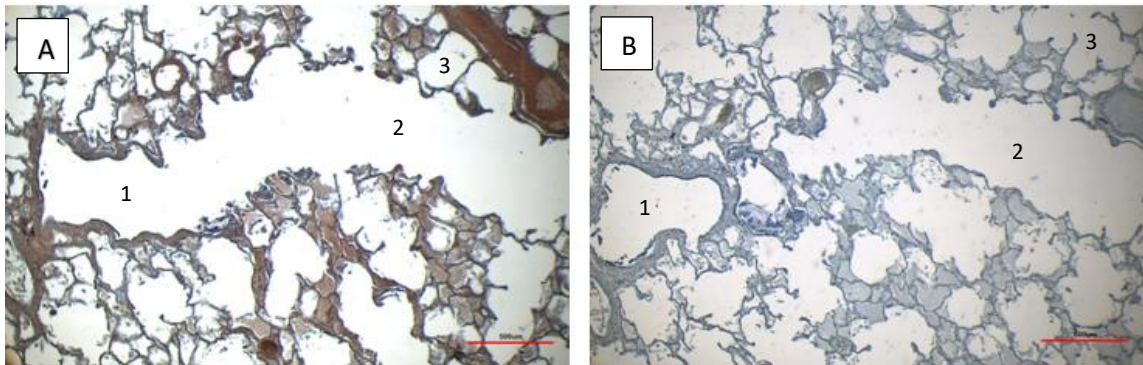


Abbildung 23: Gegenüberstellung von Positiv-(A) und Negativkontrolle (B) eines Bronchiolus respiratorius mit Übergang über den Ductus alveolaris in die Alveolen, 4x Vergrößerung  
*1=Bronchiolus respiratorius, 2=Ductus alveolaris, 3=Alveole*

### 5.2.5 Gesamtauswertung der gesunden Lungenproben

In die Gesamtauswertung gingen alle 20 Lungenproben ein, die der immunhistochemischen Färbung unterzogen worden sind. Die Ergebnisse des in Kapitel 4.7.3. aufgeführten Auswertungsprotokolls, welches für jede der Proben angewandt wurde, wurden in folgende Grafik übernommen.

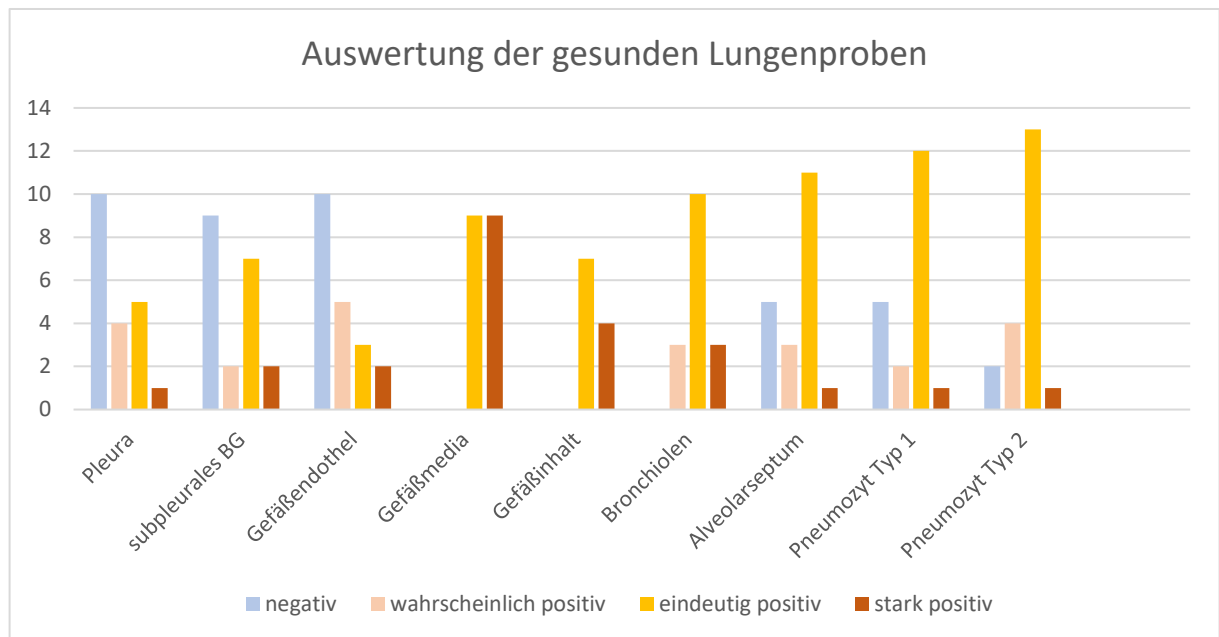


Abbildung 24: Gesamtauswertung aller gesunden Lungenproben in absoluten Zahlen

## 5.2.6 Auswertung des rechten Mittellappens aller Körperspender

Zur vergleichenden Betrachtung des gleichen Lungenlappens an allen Körperspendern wurde der rechte Mittellappen ausgewählt. Bei der Auswertung zeigt sich ein sehr ähnliches Verteilungsmuster wie in der Gesamtauswertung. Die Ergebnisse stimmen also weitestgehend überein.

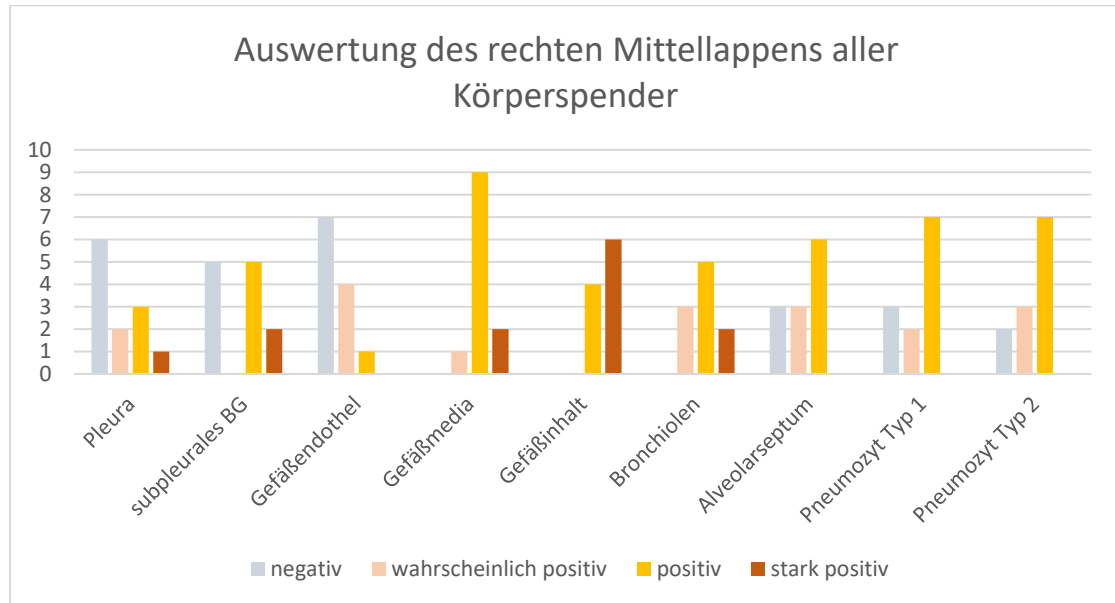


Abbildung 25: Isolierte Auswertung des rechten Mittellappens an allen Körperspendern

### 5.2.7 Auswertung aller Lungenlappen an jeweils 2 verschiedenen Körperspendern

Beim Vergleich beider Körperspender fällt auf, dass bei Körperspender 12 (siehe Abbildung 27) alle Strukturen häufiger positiv bis stark positiv für TRPC6 waren als bei Körperspender 4. Somit erscheint der TRPC6-Nachweis in den jeweiligen Strukturen bei diesem Körperspender eindeutiger. Bei Körperspender 4 (siehe Abbildung 26) zeigte sich v.a. die Pleura und das subpleurale Bindegewebe deutlich häufiger negativ. Auch im Bereich der Alveolen ist der Anteil nur fraglich positiver Proben größer als bei Körperspender 12, wo die Alveolen inklusive der Pneumozyten einen eindeutigen TRPC6 Nachweis liefern. Im Falle der Gefäßmedia, des Gefäßinhaltes und der Bronchiolen überwog wie auch in der Gesamtauswertung der Anteil positiv gefärbter Proben. Bei beiden Körperspendern ließ sich jedoch keine lappenabhängige Expression der TRPC6-Kanäle feststellen.

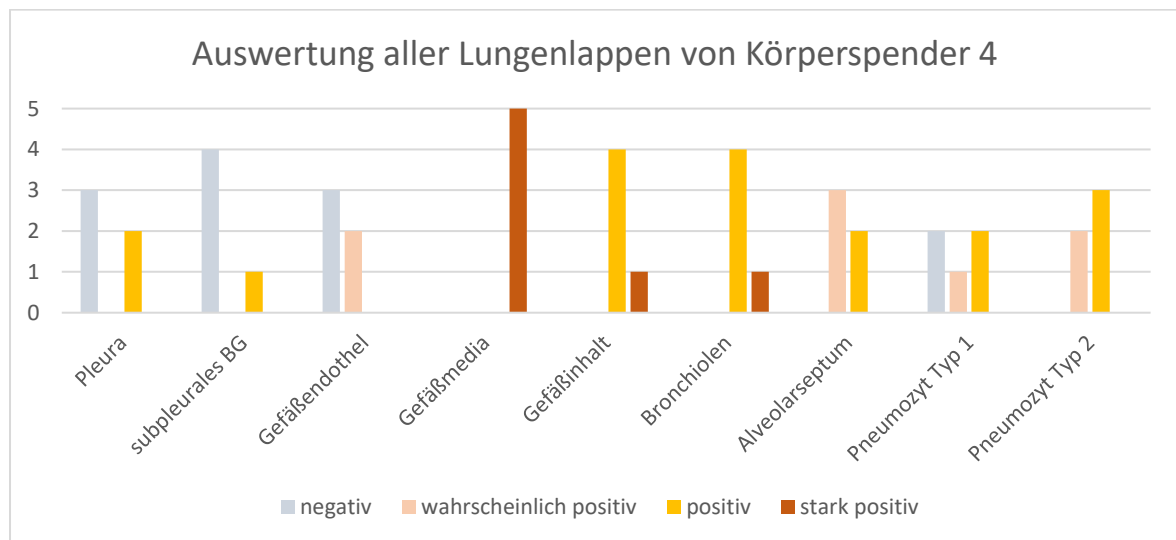


Abbildung 26: Isolierte Auswertung aller 5 Lungenlappen an Körperspender 4 (weiblich)

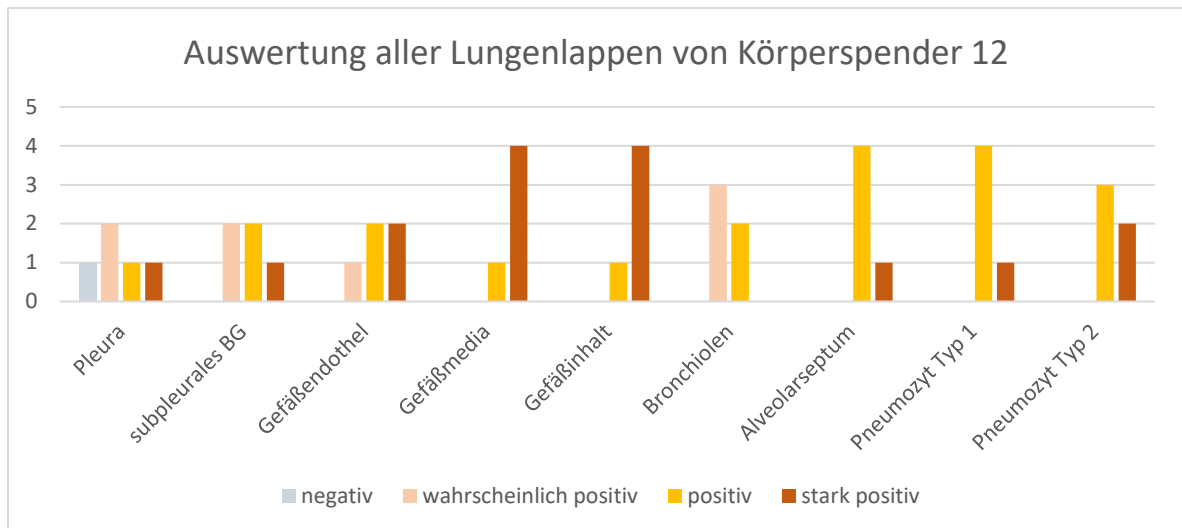


Abbildung 27: Isolierte Auswertung aller 5 Lungenlappen an Körperspender 12 (männlich)

### 5.3. TRPC6-Kanäle in Covid-19-Lungengewebe

#### 5.3.1 Pleura und subpleurales Bindegewebe von Covid-19-Patienten

Die Pleura war bei allen Proben nicht braun angefärbt (siehe Abbildung 28 und 29), es konnte also kein TRPC6 nachgewiesen werden. Eine Probe enthielt keinen Anschnitt der Pleura sowie des subpleuralen Bindegewebes, sodass in der Gesamtauswertung nur 10 statt der insgesamt 11 ausgewerteten Proben aufgeführt sind. Das subpleurale Bindegewebe wies in 50% der Fälle keine Braunfärbung auf, nur in 20% der Fälle war eine Braunfärbung wie in Abbildung 29 zu sehen.

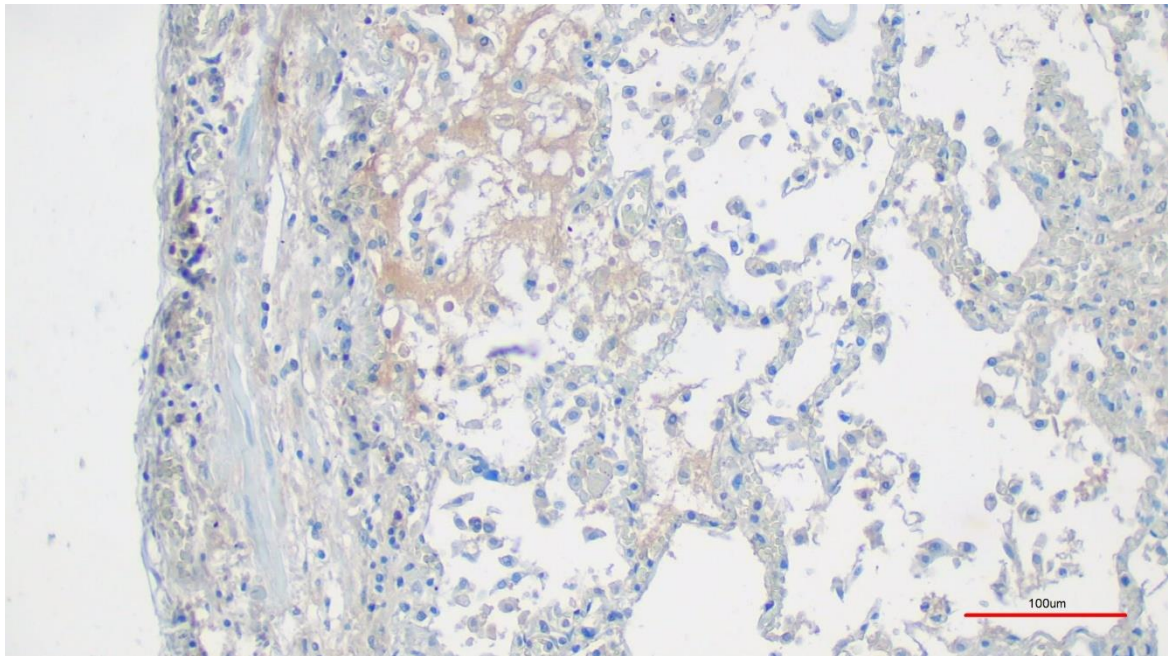


Abbildung 28: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe von Covid-Probe Nr. 4

IHC-Färbung, 10x Vergrößerung

*Die Pleura und das subpleurale Bindegewebe (linker Bildrand, hier vertikal verlaufend) zeigen sich bläulich (= kein TRPC6-Nachweis).*



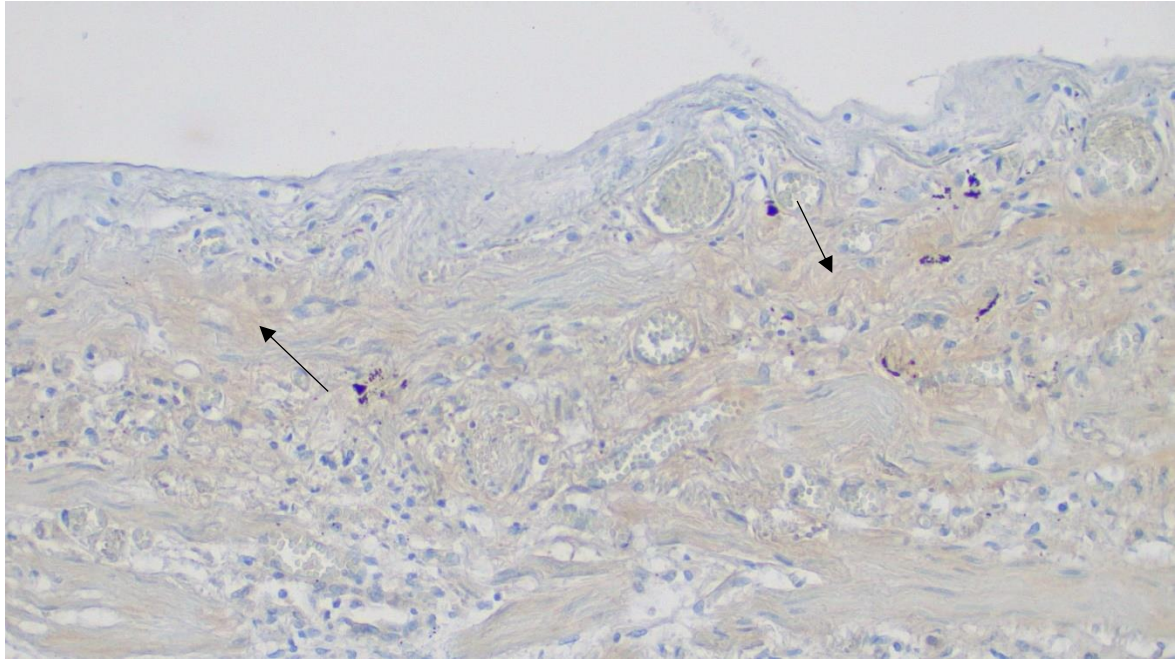


Abbildung 29: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe von Covid-Probe Nr.3

IHC-Färbung, 20x Vergrößerung

*Die Pleura (oberer Bildrand, hier horizontal verlaufend) zeigt eindeutig keinen TRPC6-Nachweis.*

*Das subpleurale Bindegewebe hingegen ist leicht braun gefärbt = TRPC6 Nachweis (Pfeile).*



### 5.3.2 Lungengefäße von Covid-19-Patienten

Bei der Auswertung der Covid-19-Proben wurde zusätzlich zum Endothel und der Tunica media auch die Tunica adventitia mit ausgewertet, da sich hier aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung der Wandschichten eine eindeutige Dreischichtung darstellte. Das Endothel war in 82% der Fälle nicht angefärbt (Abbildung 31). Die Media zeigt sich nur in 3 von 11 Fällen als eindeutig positiv. In 4 von 11 Fällen war nur eine angedeutete Braunfärbung zu erkennen und ebenso häufig war sie gänzlich ohne Braunfärbung zu sehen. Die Adventitia hingegen wies bei allen Schnitten eine Braunfärbung auf, in 90% der Fälle sogar eine starke Braunfärbung.

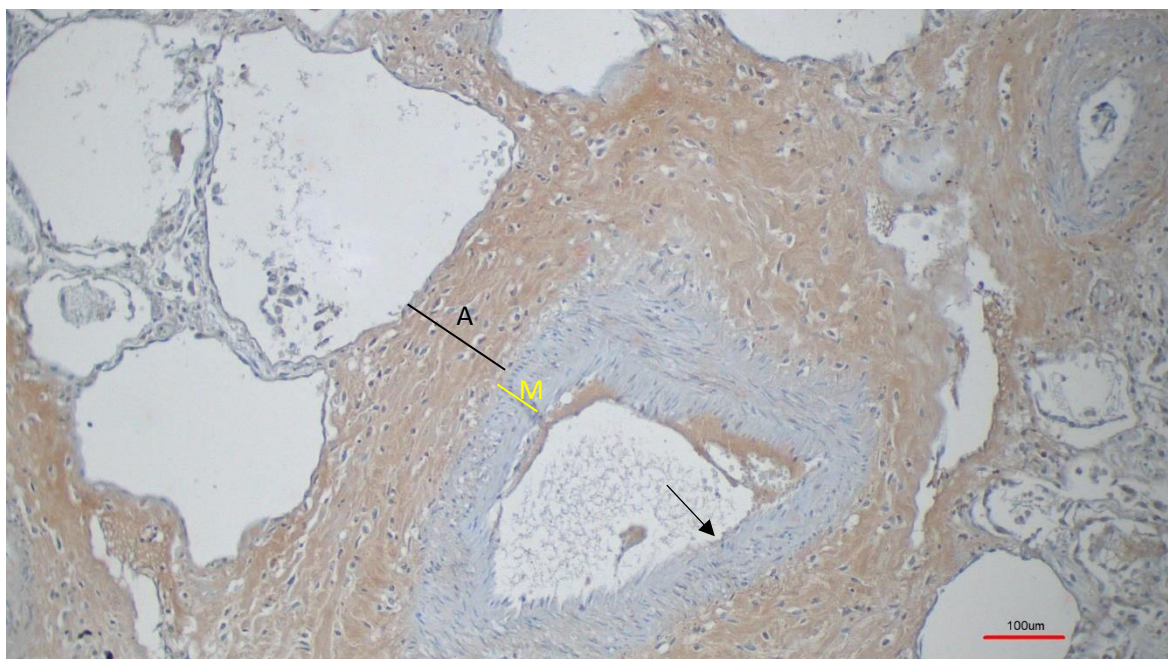


Abbildung 30: Lungenarterie, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung

*Media (M) und Endothel (Pfeil) ohne Braunfärbung, Adventitia (A) mit starker Braunfärbung. Die Adventitia wirkt verbreitert.*

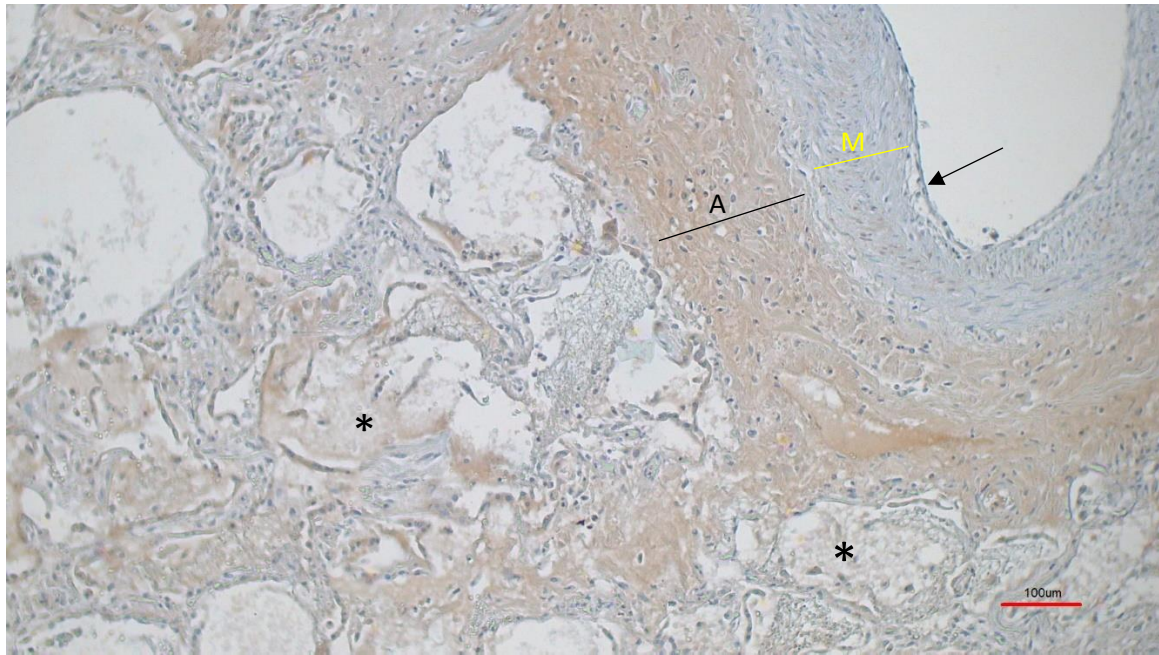


Abbildung 31: Anschnitt einer Lungenarterie, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung  
*Pulmonalarterie (rechte, obere Bildecke) mit Endothel (Pfeil), Media (M) und Adventitia (A).  
Endothel und Media: kein TRPC6-Nachweis; Adventitia: deutlicher TRPC6-Nachweis  
Zusätzlich sieht man sekretgefüllte Alveolen, passend zu einem alveolären Lungenödem (\*).*

### 5.3.3 Bronchien von Covid-19-Patienten

Bronchien waren nur in 4 der 11 Proben enthalten. In allen der 4 Proben zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Einmal wurde die Färbung als negativ bewertet, in den übrigen Fällen war die Braunfärbung unterschiedlich stark ausgeprägt (von angedeutet positiv, über positiv bis stark positiv). Abbildung 32 und 33 zeigen einen Bronchus mit Nachweis einer TRPC6-Expression.

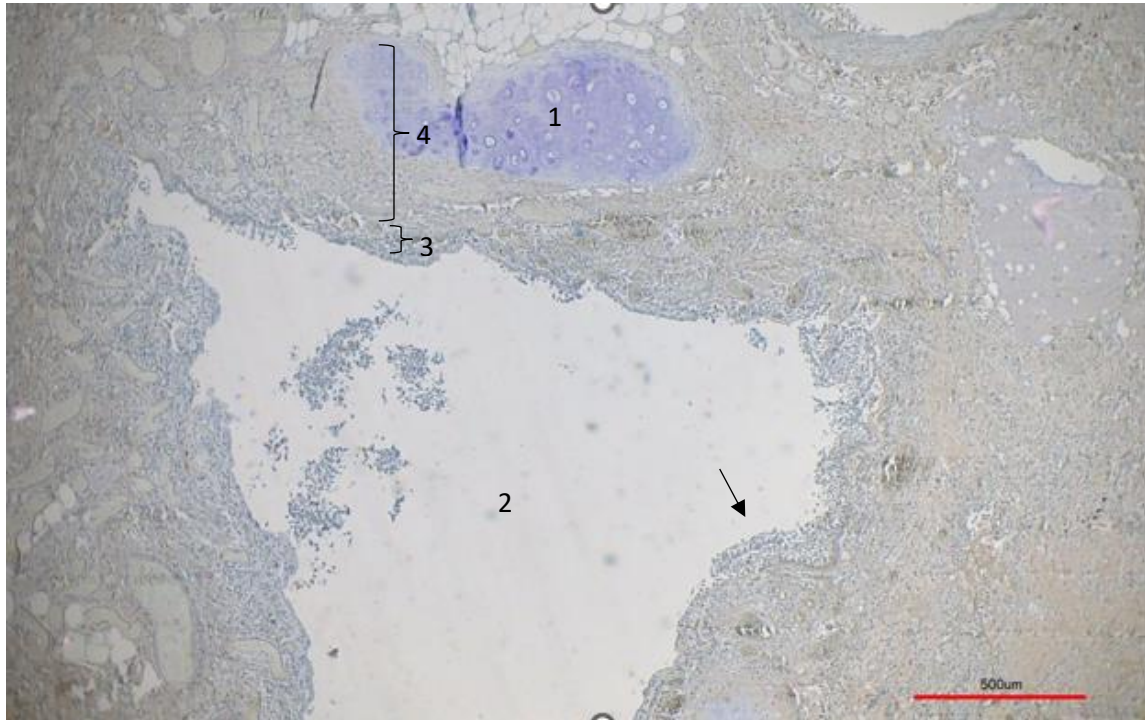


Abbildung 32: Bronchus, IHC-Färbung, 4x Vergrößerung

*1=Knorpel, 2= Lumen des Bronchus, 3=Tunica mucosa, 4= Tunica fibromusculocartilaginea  
Der Pfeil deutet auf das respiratorische Epithel. Bis auf die Knorpelstruktur zeigt die Tunica fibromusculocartilaginea eine zarte Braunfärbung.*



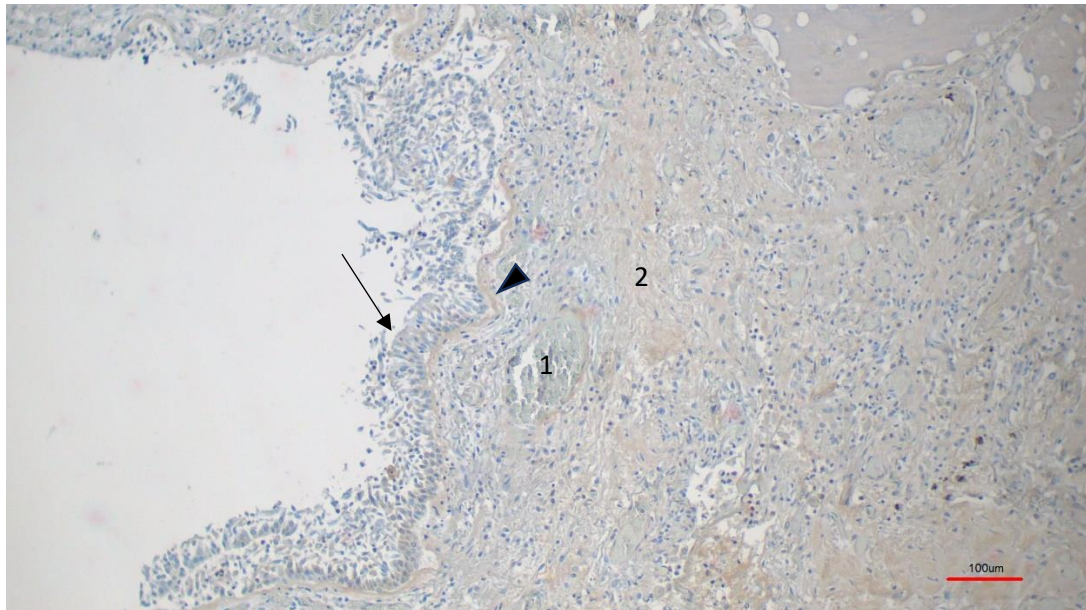


Abbildung 33: Bronchus Nahaufnahme, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung

*1=Kapillarlumen, 2=glatte Muskulatur*

*Der Pfeil zeigt auf das braungefärbte respiratorische Epithel. Die Pfeilspitze markiert die ebenfalls intensiv braungefärbte Basalmembran. Die Kapillarwand sowie die glatte Muskulatur zeigen sich ebenfalls positiv gefärbt.*

### 5.3.4 Bronchioli von Covid-19-Patienten

In den Bronchioli der Covid-19-Proben war ähnlich wie in den Proben der Körperspender eine Braunfärbung sowohl im Epithel als auch in der glatten Muskulatur nachweisbar.

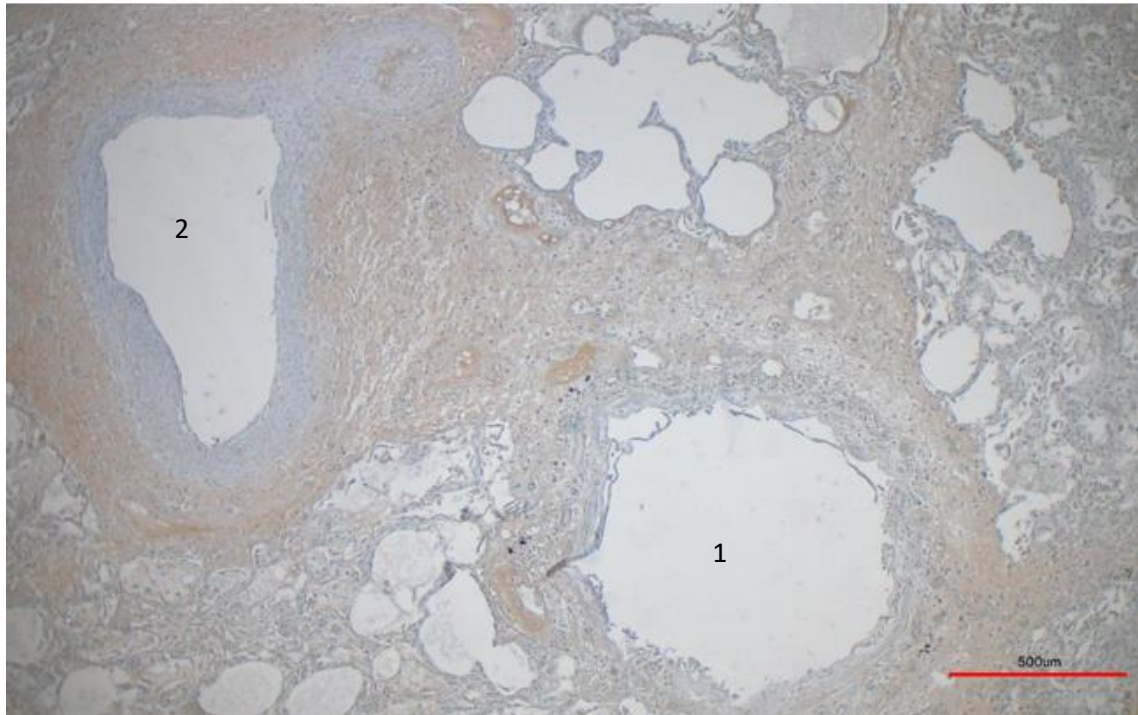


Abbildung 34: Bronchiolus und begleitende Lungenarterie, IHC-Färbung, 4x Vergrößerung  
*1=Lumen des Bronchiolus, 2=Gefäßlumen*

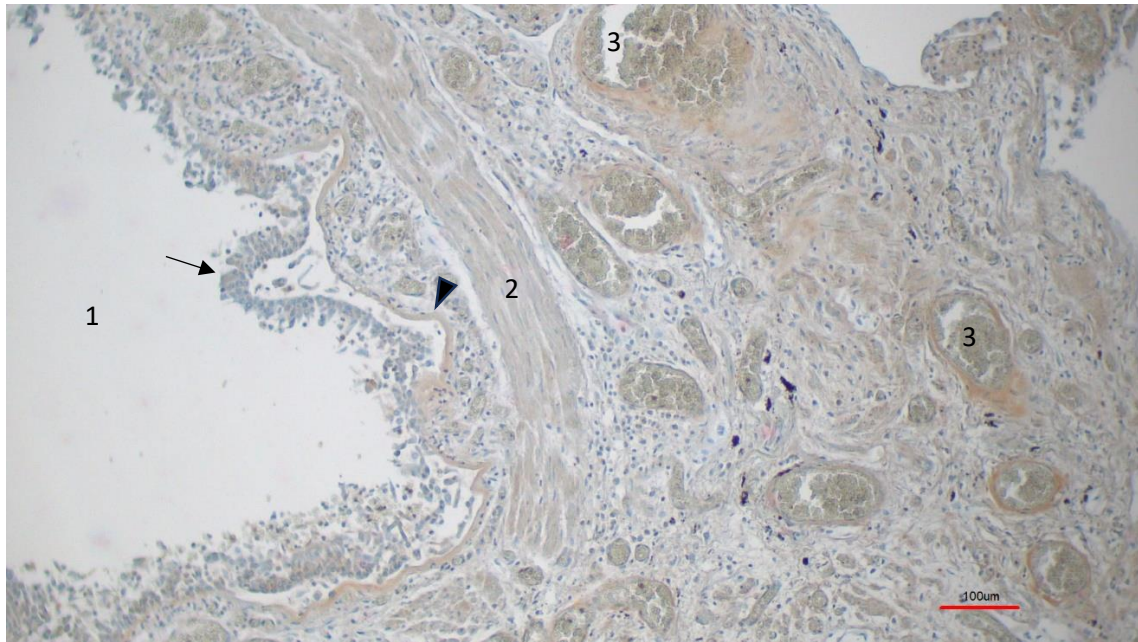


Abbildung 35: Wand eines Bronchiolus, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung

*1=Lumen des Bronchiolus, 2=glatte Muskulatur, 3=Kapillarlumen; Der Pfeil weist auf das respiratorische Epithel, die dicke Pfeilspitze auf die Basallamina. Alle markierten Strukturen zeigen einen TRPC6-Nachweis.*

### 5.3.5 Alveolen von Covid-19-Patienten

Bei der Betrachtung der Alveolen zeigte sich eine sehr variable Färbung. Auch innerhalb einer Probe gab es häufig Unterschiede in der Braunfärbung. So waren in manchen Proben sowohl positiv gefärbte Alveolarsepten zu finden, als auch Bereiche mit negativen Alveolarsepten. Ein sicherer immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 in den Alveolarsepten sowie Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten gelang in einem Drittel der Fälle. Ein weiteres Drittel stellte sich mit einer angedeuteten Braunfärbung dar, dementsprechend wurden diese Proben als wahrscheinlich positiv kategorisiert.

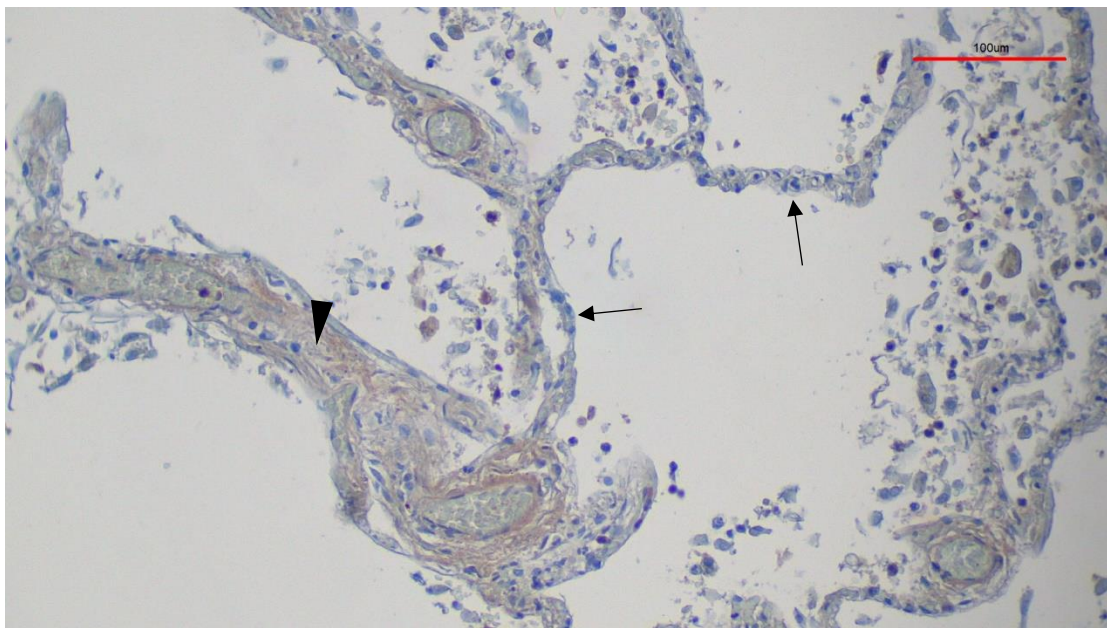


Abbildung 36: Alveolarsepten aneinander angrenzender Alveolen, IHC-Färbung

40x Vergrößerung

*Nicht geschädigte Alveolarsepten (Pfeile) ohne Braunfärbung. Fibrotisch verdickte Alveolarsepten (Pfeilspitze) mit Braunfärbung.*



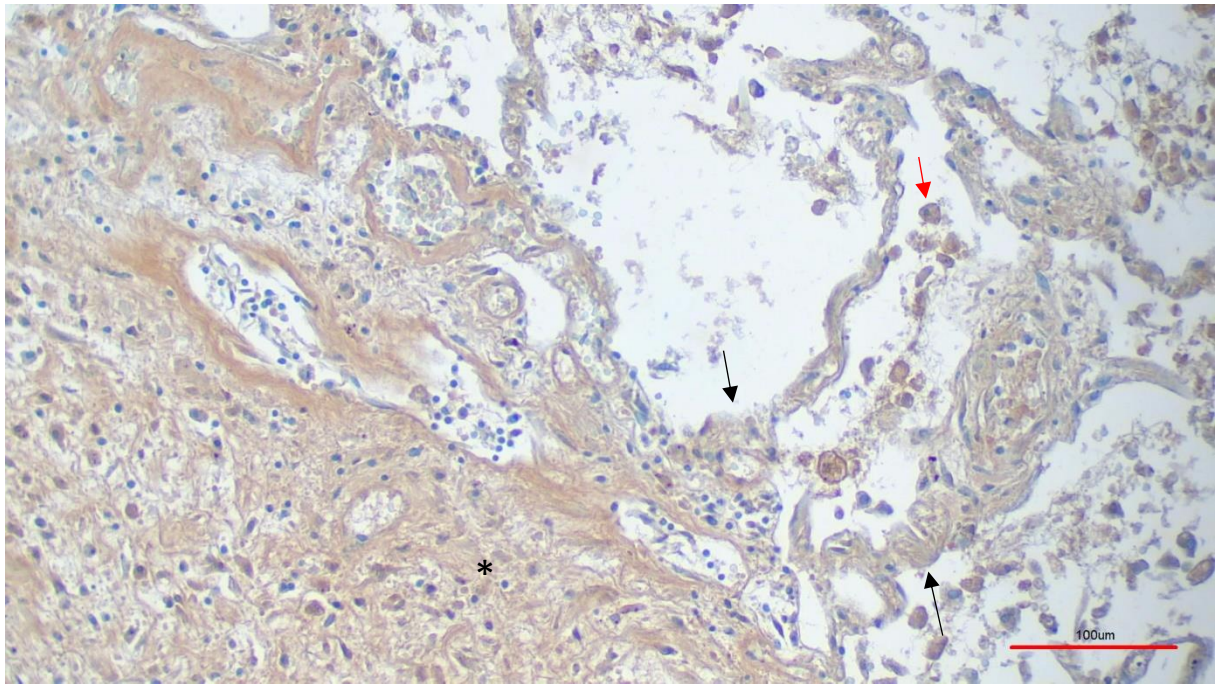


Abbildung 37: Bindegewebig verbreiterte Alveolarsepten (Pfeile), sowie fibrotischer Umbau(\*)  
 IHC-Färbung, 10x Vergrößerung  
*roter Pfeil=Alveolarmakrophage*

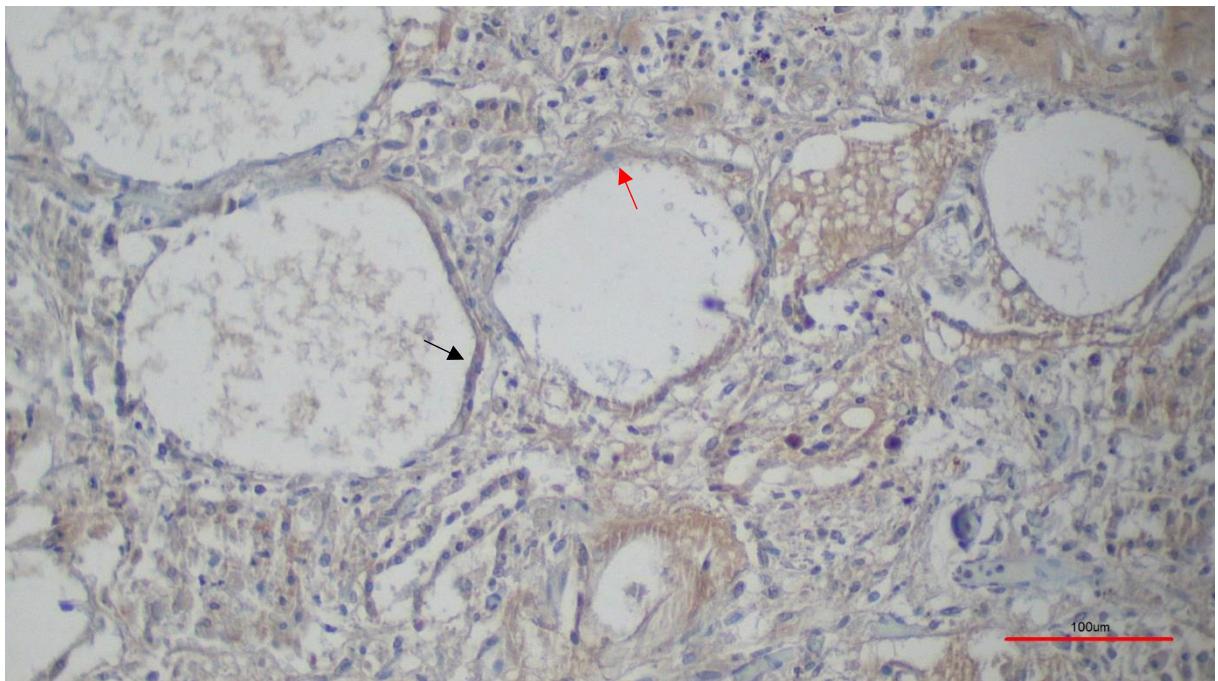


Abbildung 38: Dystelektatische Alveolen, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung  
*Immunhistochemischer Nachweis von TRPC6 in Pneumozyten vom Typ 1 (schwarzer Pfeil) und Typ 2 (roter Pfeil)*



### 5.3.6 Gesamtauswertung der Covid 19-Proben

Die in den Einzelkapiteln zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden in folgendem Diagramm visualisiert.

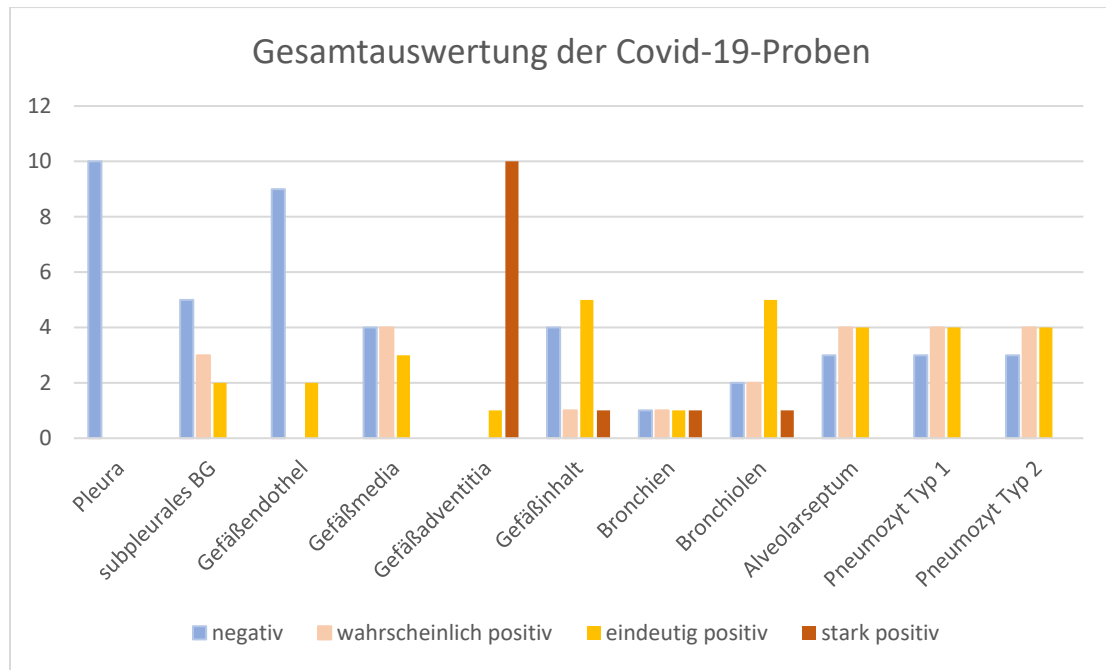


Abbildung 39: Gesamtauswertung aller Covid-19-Proben in absoluten Zahlen

### 5.3.7 Sonstige Pathologien der Covid-19-Patienten

Neben den Unterschieden in der TRPC6-Expression der grundlegenden Strukturen des Lungengewebes, welche im Folgekapitel gesondert beschrieben werden, zeigten sich am Lungengewebe der Covid-19-Patienten zusätzlich noch besondere Auffälligkeiten. Zum einen fielen die zahlreichen dilatierten Kapillaren ins Auge, deren Wand eine ausgeprägte TRPC6-Expression aufwies (Abbildung 40). Sie waren v.a. im Bereich der Alveolarsepten zu finden. Darüber hinaus war das Lungengewebe der Covid-19-Patienten von reichlich fibrotischem Gewebe durchzogen. Sowohl die Alveolarsepten zeigten sich durch Bindegewebe verbreitert (Abbildung 36), als auch die Gefäße und Bronchiolen waren von viel bindegewebigen Fasern ummauert (Abbildung 30 und 34). Auch zwischen den Alveolen lagen verteilt flächenhafte Bereiche fibrotischen Umbaus (Abbildung 41). All diese fibrotisch veränderten Areale waren gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Braunfärbung. Darüber hinaus stellten sich auch die entzündlich veränderten Bereiche mit begleitender Ödembildung positiv gefärbt dar (Abbildung 31 und 42). Eine weitere typische Veränderung sind die hyalinen Membranen als Ausdruck eines ARDS. Auch sie zeigten eine markante TRPC6-Expression (Abbildung 42).

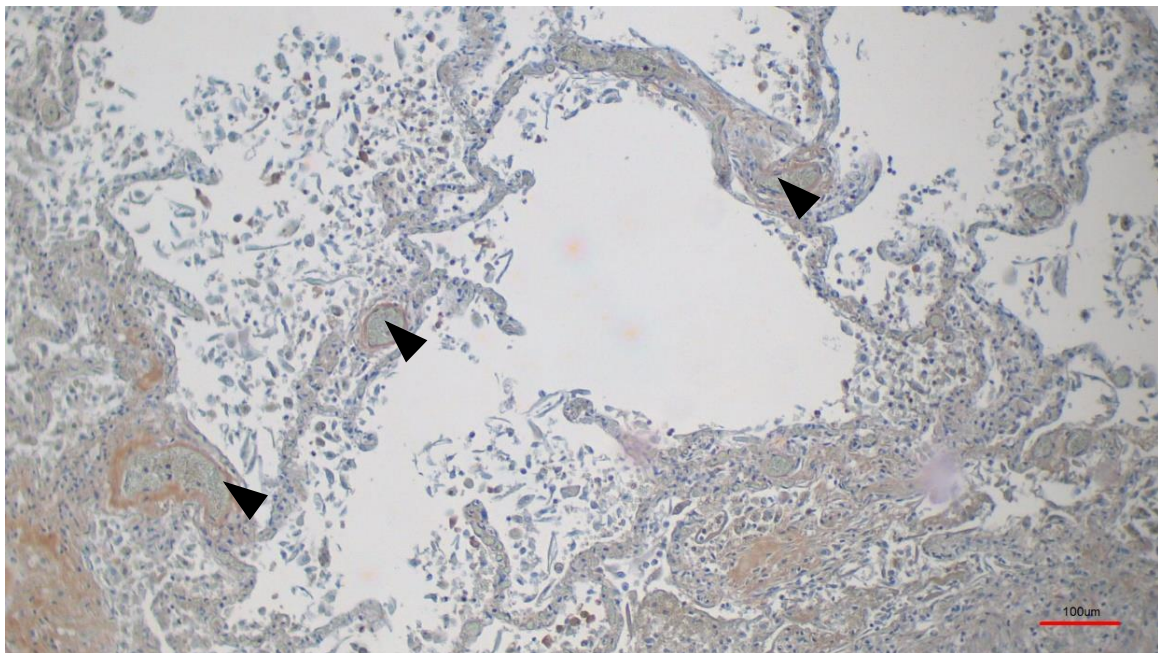


Abbildung 40: Dilatierte Kapillaren eines Covid 19-Patienten, IHC-Färbung, 20x Vergrößerung  
*Die dilatierten Kapillaren zeigen eine intensive Braunfärbung (Pfeilspitzen).*

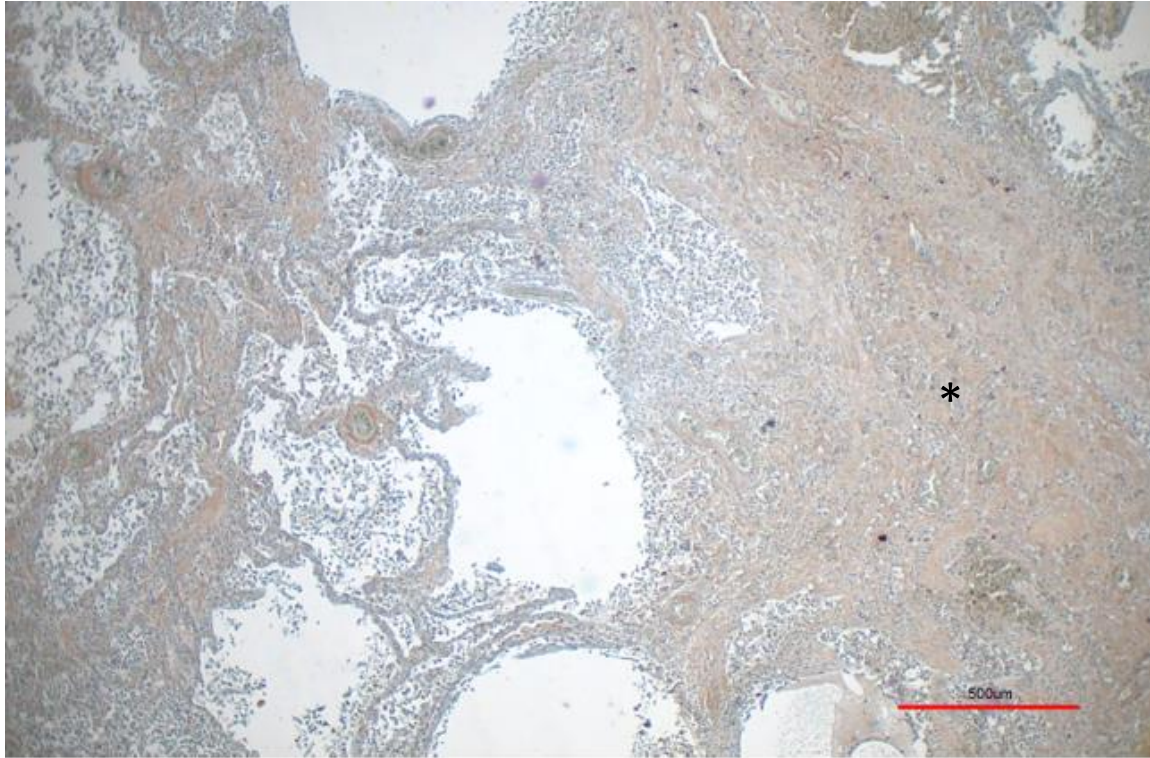


Abbildung 41: Ausgeprägte Fibrose und Lymphozyteninfiltration eines Covid 19-Patienten  
 IHC-Färbung, 4x Vergrößerung  
*Zellarmer Bereich mit ausgeprägter Fibrosierung (\*), welcher sich stark braun zeigt.*

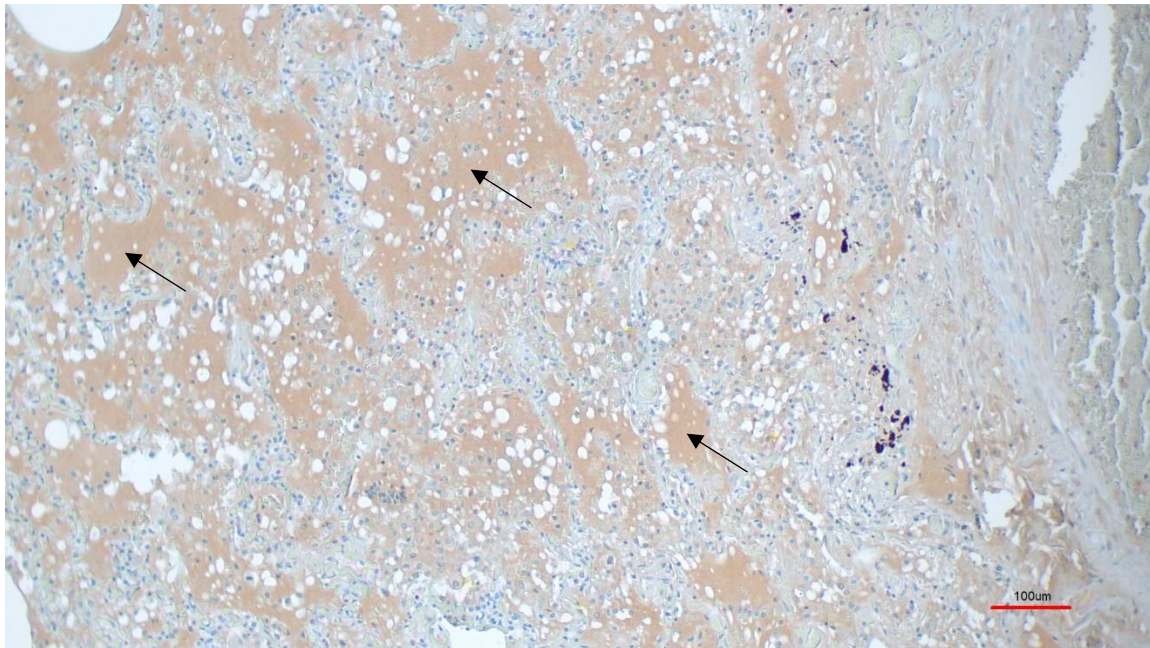


Abbildung 42: Hyaline Membranen eines Covid 19-Patienten, IHC-Färbung, 10x Vergrößerung  
*Die hyalinen Membranen (beispielhaft mit Pfeilen markiert) weisen eine intensive Braunfärbung auf.*



## 5.4. Vergleich der gesunden Proben mit den Covid-19-Proben

Vergleicht man die Proben der lungengesunden Körperspender mit denen der Covid-19-Patienten fallen mehrere Unterschiede auf. Die Pleura der Covid-19-Patienten war in allen Fällen ohne Braunfärbung, wohingegen die der gesunden Körperspender noch in der Hälfte der Fälle ein positives Ergebnis zeigte (siehe Abbildung 13, 14, 28 und 29). Auch das subpleurale Bindegewebe war bei den Covid-19-Patienten seltener braun gefärbt. In Bezug auf die Lungengefäße zeigte sich ein beachtlicher Unterschied. Während die Tunica media der größeren Gefäße der normalen Proben in allen Schnitten eindeutig positiv gefärbt war, zeigte die Tunica media der Covid-19-Proben eine auffallend weniger starke bis gar keine Braunfärbung (siehe Abbildung 17, 18, 30 und 31). In Bezug auf das Endothel der Gefäße zeigte sich bei den Covid-19-Proben ebenfalls häufiger ein negatives Ergebnis. Die Bronchioli waren in beiden untersuchten Gruppen meistens braun gefärbt, bei den Covid-19-Proben schien die Intensität der Braunfärbung jedoch sowohl im Epithel als auch in der glatten Muskulatur schwächer zu sein (Abbildung 19, 20, 34 und 35). Beim Vergleich der Alveolarsepten und Pneumozyten fiel auf, dass diese mit ca. 60% in den Proben der Körperspender häufiger positiv waren als mit ca. 36 % in denen der Covid-19-Patienten (siehe Abbildung 21, 22, 36 und 37). Mögliche Erklärungen und Ursachen für die gezeigten Ergebnisse und Unterschiede werden in Kapitel 6 diskutiert.

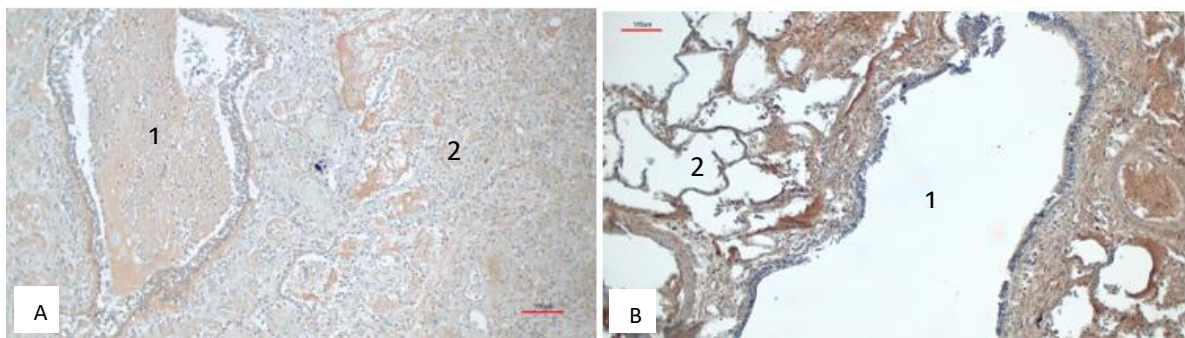


Abbildung 43: Gegenüberstellung einer Covid-19-Pneumonie (A) und gesundem Lungengewebe (B) in IHC-Färbung, beide 10x Vergrößerung

*Auf beiden Bildern erkennt man einen angeschnittenen Bronchiolus (1=Lumen des Bronchiolus) und umgebendes alveoläres Lungengewebe (2).*

## **6. Diskussion**

Ziel der Arbeit war es, einen immunhistochemischen Nachweis der TRPC6-Expression in verschiedenen Strukturen des menschlichen Lungengewebes zu liefern. Darüber hinaus wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der TRPC6-Expression im Rahmen der Covid-19-Erkrankung gibt. Dieser Nachweis konnte erbracht werden. Es gibt im Zuge des experimentellen Vorgehens in dieser Arbeit jedoch einige kritische Aspekte, auf die nachfolgend genauer eingegangen wird.

### **6.1 Diskussion der Methodik**

#### **6.1.1 Patientenkollektiv**

Die Zahl der Körperspender, welche in die Auswertung eingingen, war mit 12 Körperspendern überschaubar. Die Covid-19-Proben stammten von 4 verschiedenen Patienten. Hier zeigt sich die erste Limitation der Arbeit darin, dass es sich lediglich um eine Untersuchung an einem kleinen Patientenkollektiv handelte. Die Ergebnisse sind daher als vorläufig zu betrachten und bedürfen weiteren Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv. Dennoch konnten bei einigen pulmonalen Strukturen, wie z.B. der Pleura, der Gefäßmedia und den Bronchiolen sowie den pathologischen Covid-19-Veränderungen, auch an dieser übersichtlichen Patientenzahl bereits eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse der Alveolarsepten und Pneumozyten gilt es insbesondere bei den durch Covid-19 geschädigten Lungen durch weitere Untersuchungen zu verifizieren.

#### **6.1.2 Probenentnahme**

Die Probenentnahme lief standardisiert, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, ab. Durch die Art des gewählten Zugangs war eine sichere Entnahme der Proben aus den jeweiligen Lungenlappen immer möglich. Aufgrund der weichen, nachgiebigen Struktur der Lunge war eine Entnahme mittels herkömmlicher Biopsie-Stanze nicht möglich. Die Proben wurden deshalb mittels Schere aus dem Lungengewebe herausgeschnitten. Hierdurch unterschieden sich die Proben leicht in Form und Größe, was für die Anfertigung und Auswertung der Schnitte jedoch unbedeutend war. Durch die pyramidenartige Probenform war die pleurale Seite der Proben auch immer sicher identifizierbar. Es ergaben sich jedoch durch Unterschiede in der Konsistenz der Lungen zum Teil Schwierigkeiten bei der Probenentnahme. Obwohl anamnestisch keine bekannten Lungenerkrankungen bei den Körperspendern vorlagen, waren manche Lungen in ihrer Konsistenz sehr derb, andere wiederum

äußerst feucht-schwammig. Auch hier ergaben sich jedoch im weiteren Aufarbeitungsprozess keine Probleme.

### **6.1.3 Aufarbeitung der Proben**

Die ersten drei Schritte der Probenaufarbeitung (Fixierung, Vakuumpumpe und Einbetten) stellen in meinen Augen keine für das Endergebnis relevanten fehleranfälligen Prozesse dar. Das Schneiden der Paraffinblöcke mithilfe des Mikrotoms hingegen ist ein Teilschritt, der zunächst ausgiebig in unterschiedlicher Weise getestet werden musste, um das beste Schneideergebnis mit möglichst erhaltener Lungenstruktur zu erzielen. Aufgrund der lockeren Struktur des Lungengewebes zeigten sich durch das Schneiden häufig bereits makroskopisch Gewebedefekte. Diese Schnitte wurden jedoch selektiert, sodass nur die Schnitte mit intakter Gewebsstruktur zur Auswertung ausgewählt wurden. Dennoch fiel v.a. bei der Betrachtung der Bronchioli auf, dass das Flimmerepithel, höchstwahrscheinlich dem Aufarbeitungsprozess geschuldet, häufig zum Teil losgelöst von der Basalmembran im Lumen des Bronchiolus lag. Trotzdem war auch so eine Bewertung der Braunfärbung immer sicher möglich.

### **6.1.4 Färbeprozess**

Für die immunhistochemische Färbung musste im Voraus zum eigentlichen Färbeprozess zunächst in mehreren Testreihen die richtige Antikörperverdünnung eruiert werden. Im Falle einer zu starken Verdünnung hätte sich die eigentlich vorhandene Zielstruktur nämlich möglicherweise nicht anfärben lassen. Bei einer zu geringen Verdünnung hätte es zu unerwünschten unspezifischen Hintergrundeffekten kommen können. Letztlich wurde eine passende Verdünnung von 1:100 gefunden und für jeden Färbvorgang gleichermaßen verwendet. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Qualität der Färbung war die jeweilige Inkubationszeit in den verschiedenen Medien. Mittels einer Stoppuhr wurden die Zeiten möglichst genau überwacht. Trotzdem ist es möglich, dass es zu kleinen Unterschieden in der Inkubationszeit gekommen sein könnte, welche beispielsweise Einfluss auf die Intensität der Färbung haben könnten. Darüber hinaus könnten Verunreinigungen der unterschiedlichen Medien potenziell einen Einfluss auf das Ergebnis genommen haben. Um dies möglichst zu vermeiden, wurden Medien, welche für mehrere Färbedurchgänge genutzt werden konnten, regelmäßig ausgewechselt.

### **6.1.5 Auswertung**

Die Auswertung der Proben war eine subjektive Beurteilung der Strukturen und ihrer Farbintensität. Es ist nicht auszuschließen, dass gewisse Farbintensitäten interindividuell unterschiedlich beurteilt werden würden. Zu Kontrollzwecken wurden die Proben ebenfalls durch eine auf dem Fachgebiet der Histologie und Pathologie erfahrenen Person stichprobenartig begutachtet. Eine gänzlich objektive Auswertung war jedoch nicht möglich.

Es ist zu beachten, dass es sich bei dieser Forschungsarbeit um einen deskriptiven, semiquantitativen Ansatz handelt. Sie kann einen Überblick zum untersuchten Thema geben und Anregungen zu weiteren quantitativen Untersuchungen schaffen. Statistische Analysen waren jedoch in diesem Fall nicht sinnvoll und könnten Gegenstand zukünftiger Studien sein.

## **6.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **6.2.1 Einordnung der nachgewiesenen TRPC6-Expression im gesunden Lungengewebe**

Es gibt bereits einige in der Literatur beschriebene Erkenntnisse über das Vorkommen der TRPC6-Kanäle. Die meisten Daten stammen allerdings aus Tiermodellen und molekulargenetischen Untersuchungen. Bisher gibt es nur sehr wenige immunhistochemische Untersuchungen an menschlichem Lungengewebe. Eine gänzliche Untersuchung aller verschiedenen Lungenstrukturen fehlt. Diese Arbeit stellt eine erste systematische immunhistochemische Untersuchung des menschlichen Lungengewebes dar.

In dieser Arbeit konnte eine eindeutige TRPC6-Expression in der Tunica media der kleinen Lungengefäße gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit dem bisherigen Wissen, dass die TRPC6-Kanäle eine relevante Rolle bei der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) spielen [63]. Getestet wurde dies in einem Mausmodell. Es zeigte sich, dass in TRPC6 defizienten Mäusen keine HPV stattfand [63]. Sie ist jedoch ein wichtiger physiologischer Mechanismus zur Vermeidung hypoxämischer Zustände durch Umverteilung des Blutvolumens. Da dieser Mechanismus bewiesen TRPC6-vermittelt stattfindet, ist also ein entsprechender TRPC6-Nachweis in der glatten Muskulatur gesunder Lungengefäße zum bisherigen Wissen passend. Außerdem wurden TRPC6-Kanäle zum Vergleich auch bereits in der glatten Muskulatur kleiner Zerebralarterien nachgewiesen [66,71] und ihre Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus belegt [66]. Eine dieser Arbeit sehr ähnliche Studie von Abdinghoff et al., in welcher ebenfalls an Körperspendern Nierenarterien und die Aorta untersucht wurden, zeigte hingegen keinen Nachweis von TRPC6 in der Tunica media. In derselben Arbeit stellte sich jedoch auch heraus, dass der

Truncus pulmonalis, als einziges der untersuchten Gefäße eine TRPC6-positive Tunica media besaß [1]. Diese Gefäße sind jedoch aufgrund ihrer Größe und größeren Wanddicke differenziert von den hier untersuchten deutlich kleineren und zarteren Lungengefäßen zu betrachten.

Das Gefäßendothel zeigte in der Hälfte aller Fälle keine Braunfärbung. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Abdinghoff et al. überein. Dort wurde zwar nicht das Endothel isoliert betrachtet, sondern die Tunica intima als Ganzes, allerdings war auch hier nur in der Hälfte der Proben eine TRPC6-Expression nachweisbar [1]. Unklar bleibt, ob es sich bei den braun gefärbten Proben um falsch Positive handelt, oder bei den nicht angefärbten Proben um falsch Negative. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse durch einen teilweise im Aufarbeitungsprozess entstandenen Endothelschaden bedingt. Dagegen spricht, dass auch am Bronchialepithel, wo ein sichtbarer Schaden durch teilweise Ablösung des Epithels stattgefunden hat, ein eindeutiges Ergebnis vorlag. Dennoch könnten sich etwaige Schäden an verschiedenen Geweben auch unterschiedlich auswirken. In der Literatur wurde TRPC6 bereits im Endothel von Koronararterien, Zerebralarterien sowie Arteriolen molekulargenetisch beschrieben [71]. Außerdem ist eine Beteiligung von TRPC6 an verschiedenen, die Permeabilität des Endothels betreffenden Prozessen bekannt [37,55,64]. Relevant sind die Kanäle beispielsweise bei der Ausbildung eines Hypoxie-induzierten Lungenödems, welches durch eine Endotheldysfunktion entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass TRPC6-defiziente Mäuse vor einem solchen Lungenödem geschützt sind [64]. All diese bereits bekannten Informationen über die Expression von TRPC6 in endothelialen Zellen unterstützen den auch in dieser Arbeit beobachteten Nachweis von TRPC6 im Gefäßendothel.

Die Pleura pulmonalis zeigte kein einheitliches Ergebnis. In 50% der Fälle war in der Pleura und dem subpleuralen Bindegewebe kein TRPC6-Nachweis möglich. In 30% war ein eindeutig positives Signal für TRPC6 auszumachen und in 20% war der Nachweis fraglich. In der Literatur finden sich für die TRPC6-Expression in der Pleura pulmonalis keine Angaben. Zu ihrer Funktion ist bekannt, dass sie als Teil der zweiblättrigen Pleura eine Verschiebeschicht zwischen Lunge und Thorax darstellt [74]. Sie besteht aus einer Mesothelzellschicht, die die Serosaflüssigkeit produziert. Darunter befindet sich eine dünne bindegewebige Schicht mit kleinen Blut- und Lymphgefäßen sowie elastischen Fasern, welche eine Anpassung der Pleura an die In- und Expiration ermöglichen [45]. Inwiefern TRP-Kanäle bei diesen Prozessen eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt und benötigt weiterer Forschung.

Ein eindeutiger TRPC6-Nachweis konnte für die Bronchioli erbracht werden. Hier zeigte sich in allen untersuchten Schnitten eine Braunfärbung. Diese betraf sowohl das Flimmerepithel als auch die glatte Muskulatur der Bronchioli. Auch in diesem Falle sind die Ergebnisse mit bisherigen Erkenntnissen übereinstimmend. Die wichtigste Studie, die hier zum Vergleich herangezogen werden kann, stammt aus dem Jahr 2004. Corteling et al. konnten mittels RT-PCR und Konfokalmikroskopie einen Nachweis von TRPC6 im Bronchialepithel und der



Bronchialmuskulatur erbringen [16]. Darüber hinaus beschrieben sie die Expression von TRPC6 im Bronchialepithel noch genauer, und zwar sowohl im apikalen als auch im basalen Teil der Epithelzellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit. Welche Funktionen die TRPC6-Kanäle im Bronchialepithel erfüllen, ist nicht vollkommen geklärt. Sie scheinen u.a. bei Entzündungsprozessen eine Rolle zu spielen. Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass TRPC6-Kanäle an der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-vermittelten Entzündungsreaktion in Bronchialepithelzellen beteiligt sind [73]. Darüber hinaus wurde die Rolle von TRPC6 bei der Ozon-vermittelten Entzündungsreaktion im Bronchialepithel untersucht. Hier konnte in TRPC6-defizienten Mäusen eine verminderte Rekrutierung von Neutrophilen ausgemacht werden [14]. Da das Bronchialepithel, als erster Kontaktpunkt für aerogene Noxen im Bronchialsystem, auch in dieser Arbeit eine starke TRPC6 Expression gezeigt hat, ist anzunehmen, dass TRPC6 für die Barrierefunktion des Respirationstraktes von Bedeutung sein könnte.

Im Bereich der Alveolen konnte in mehr als 60% der Fälle ein positives Ergebnis nachgewiesen werden. Die Alveolarsepten inklusive der Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten zeigten eine eindeutige TRPC6-Expression. Die Intensität der Braunfärbung war bei beiden Pneumozyten-Typen identisch. Darüber hinaus zeigten sich auch die feinen Kapillaren der Alveolarsepten inklusive ihres Gefäßinhaltes braun gefärbt. Außerdem konnte exemplarisch ein TRPC6-Nachweis in Alveolarmakrophagen gezeigt werden. Von diesen Zellen am meisten erforscht in Bezug auf das Vorkommen von TRPC6 sind die Alveolarmakrophagen. In ihnen gelang der Nachweis von TRPC6 molekulargenetisch bereits im Jahr 2010 [25]. Außerdem konnte in der Arbeit von Finney-Hayward et al. eine vermehrte TRPC6-Expression in Alveolarmakrophagen von Patienten mit COPD im Vergleich zu gesunden Patienten ausgemacht werden [25]. Bezüglich der Expression von TRPC6 in Alveolarsepten und Pneumozyten gibt es in der Literatur bisher keine Studien, die zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden könnten. Es konnte lediglich bereits TRPA1, ein anderer Vertreter der TRP-Familie, in Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden [35,44]. TRPA1 gilt als Vermittler für Thermosensorik und Nozizeption und spielt in neuronalem Gewebe eine Rolle als Hypoxie-Sensor [35]. Außerdem scheint TRPA1 an Entzündungsprozessen im Lungenepithel beteiligt zu sein [40]. Einen Nachweis von TRPC6 im Alveolarepithel konnten wir in dieser Arbeit liefern. Um die Funktion von TRPC6 im Alveolarepithel zu klären, bedarf es jedoch weiterer Forschung.

## **6.2.2 Einordnung der nachgewiesenen TRPC6-Expression im Rahmen der Covid-19-Erkrankung**

Zunächst soll auf die regulären Strukturen des Lungengewebes eingegangen werden. Die Pleura pulmonalis zeigte sich im Gegensatz zum gesunden Lungengewebe eindeutig ohne TRPC6-Nachweis. Lediglich im subpleuralen Bindegewebe ergab sich in 20% der Fälle ein TRPC6-Nachweis. Um herauszufinden, inwiefern diese verminderte Expression von TRPC6 in der Pleura pulmonalis für die Covid-19-Erkrankung von Bedeutung sein könnte, benötigt es weiterer Forschung.

Ein beachtlicher Unterschied fiel bei der Betrachtung der großen Lungengefäße auf. Wie in Kapitel 5.4 beschrieben, wies die Tunica media der Covid-19-Proben keine bis kaum TRPC6-Expression auf, wohingegen die Tunica media der gesunden Lungenproben in allen Fällen eine starke TRPC6-Expression zeigte. Wie diese Mindereexpression in der Tunica media zustande kommt, ist noch fraglich. Da die TRPC6-Kanäle allerdings wie im vorherigen Kapitel beschrieben, an physiologisch wichtigen Prozessen wie der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion beteiligt sind [63], lässt sich vermuten, dass ein Fehlen dieser regulierenden Mechanismen sich negativ auf die Ventilation auswirken kann. Insbesondere im Rahmen einer Ventilationsstörung bei Pneumonie kann eine fehlende Blutumverteilung von schlecht ventilierten Bereichen zu gut ventilierten Bereichen eine Hypoxie aggravieren. Hinzu kommt, dass die Adventitia, welche hauptsächlich aus Bindegewebe besteht, eine starke TRPC6-Expression aufwies. Es macht den Eindruck, als ummauere sie das Gefäß (vergleiche Abb. 30). Möglicherweise ist auch hier ein fibrotischer Umbau denkbar, welcher sich ebenso negativ auf die Kontraktilität der Gefäße auswirken könnte.

Die Bronchien der Covid-19-Patienten zeigten sich in ihrer TRPC6-Expression sehr unterschiedlich. Daher lässt sich hier keine eindeutige Aussage zur Expression treffen. Da auch nur in 4 von 11 Covid-19-Proben Anschnitte eines Bronchus enthalten waren, sind weitere Untersuchungen an einem größeren Patienten- bzw. Probenkollektiv notwendig, um das Ergebnis zu verifizieren. Die Bronchioli der Covid-19-Proben zeigten hingegen eine eindeutige TRPC6-Expression sowohl im Bronchialepithel als auch in der glatten Muskulatur der Bronchioli. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, wird vermutet, dass TRPC6 im Bronchialepithel an Entzündungsprozessen beteiligt ist. Eine vermehrte Expression im Sinne einer stärkeren Aktivität im Rahmen des Covid-19-bedingten Entzündungsprozesses konnte jedoch nicht beobachtet werden. Entsprechend der Beschreibungen in der Literatur ist allerdings auch bekannt, dass sich die ausgeprägten Pathologien im Lungengewebe von Covid-19-Patienten v.a. im Alveolarbereich finden und nicht im Bereich der Bronchioli [7,19].

In den Alveolen war ein sicherer TRPC6-Nachweis nur in knapp 36 % der Fälle möglich. Das ist deutlich weniger als im gesunden Lungengewebe mit 60%. Generell gab es jedoch auch innerhalb

eines Präparates deutliche Unterschiede, von Alveolarsepten ohne TRPC6-Expression bis Alveolarsepten mit starker TRPC6-Expression. Dies könnte ein Ausdruck der Dysregulation der physiologischen Alveolarfunktion sein.

Bezüglich der Pathologien der Covid-19-Proben lässt sich festhalten, dass sich die bereits bekannten histologischen Veränderungen bei einer Covid-19-Erkrankung in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt haben. Hierzu zählen eine Konsolidierung des Parenchyms, ein alveoläres Ödem, die Ausbildung hyaliner Membranen, interstitielle Lymphozyteninfiltration, entzündliche Infiltrate und fibrotischer Umbau [7]. All diese Veränderungen sind charakteristisch für das akute Atemnotsyndrom.

Bei der Betrachtung der Covid-19-Proben fiel eine überaus starke TRPC6-Expression v.a. im Bereich von fibrotischem Gewebe auf. Diese Feststellung passt zu den Erkenntnissen aus der Literatur, wo TRPC6 in einem Mausmodell bereits als Mediator bei der Ausbildung einer Lungenfibrose beschrieben wurde [29]. Auch unsere Daten legen nahe, dass TRPC6 an der Ausbildung der Lungenfibrose beteiligt sein muss. Die Lungenfibrose kann sowohl als kurzfristige als auch als langfristige Komplikation der Covid-19-Erkrankung auftreten [4]. Sie ist eine ernst zu nehmende Komplikation, da sie die Lungenfunktion langfristig einschränken kann [47]. Daher besteht ein großes Interesse an medikamentösen Therapiemöglichkeiten. Neben der Therapie mit antiviralen Wirkstoffen, spielen auch Antifibrotika eine Rolle. In Tiermodellen konnte die Wirksamkeit von Antifibrotika wie Nintedanib bereits belegt werden [67]. Auch an Covid-19-Patienten gibt es bereits mehrere Untersuchungen, die die Wirksamkeit des Antifibrotikums Pirfenidon zeigen [2]. Es handelt sich bei diesen Untersuchungen jedoch lediglich um kleinere Fallserien, sodass es noch größere Studien benötigt. Im April 2024 wurde eine Übersichtsarbeit zur Pharmakotherapie der Post-Covid-19-Fibrose veröffentlicht. Hier wurde u.a. zusammengefasst, dass nur in einer von drei Publikationen eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion durch Antifibrotika, in dem Fall Nintedanib, gezeigt werden konnte [13]. Auch in dieser Übersichtsarbeit wurde geschlussfolgert, dass es weiterer Forschung benötigt. Ein möglicher Ansatzpunkt könnten zukünftig auch die TRPC6-Kanäle sein.

Darüber hinaus war eine sehr starke TRPC6-Expression in Bereichen mit intraalveolärem Lungenödem und innerhalb der hyalinen Membranen als Zeichen des diffusen Alveolarschadens zu beobachten. Aus Tierversuchen ist bekannt, dass TRPC6 die Gefäßpermeabilität beeinflusst und so an der Ausbildung eines Ischämie-induzierten Lungenödems beteiligt ist [64]. Diese Annahme wird durch die zahlreichen dilatierten Kapillaren, deren Wand eine auffallend starke TRPC6-Expression aufwies, noch zusätzlich unterstützt. TRPC6 ist folglich in dieser Hinsicht ein interessanter Angriffspunkt zur Vermeidung eines Lungenödems. So wurde sich in einer Studie bereits mit der Wirksamkeit eines TRPC6-Blockers befasst und in vitro gezeigt, dass durch dessen Einsatz ein Ischämierperfusionschaden mit Ödembildung verhindert werden kann [24].

### **6.3. Zusammenfassung und Ausblick**

Es lässt sich abschließend festhalten, dass TRPC6 histologisch in gesundem Lungengewebe nachgewiesen werden konnte. Dies gilt insbesondere für das respiratorische Flimmerepithel, die glatten Muskelzellen der Bronchioli, die Wand kleiner Lungengefäße und die Alveolarsepten. Außerdem konnte an den Covid-19-Proben gezeigt werden, dass insbesondere Bereiche, welche für das akute Atemnotsyndrom histologisch kennzeichnend sind, eine starke TRPC6-Expression aufweisen. Demnach ist anzunehmen, dass TRPC6 ein vielversprechender Modulator der beteiligten Pathomechanismen sein könnte und somit einen möglichen medikamentösen Angriffspunkt in der Behandlung der Covid-19-Erkrankung darstellt. Hierzu gibt es bereits eine Studie, die den Nutzen eines TRPC6-Inhibitors an Covid-19-Patienten im Vergleich zu einer Placebogruppe untersucht hat. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich des Outcomes der Patienten [38]. Warum das Ergebnis trotz der zuvor angenommenen Wirksamkeit des TRPC6-Inhibitors negativ ausfiel, könnte verschiedene Gründe haben und bleibt letztlich offen. Trotz des fehlenden Wirksamkeitsnachweis in dieser einen Studie bleibt der TRPC6-Kanal ein potenzieller Angriffspunkt für medikamentöse Therapien von Lungenerkrankungen, auch unabhängig von Covid-19, und sollte in weiteren Studien tiefergehend untersucht werden.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Zusammensetzung der TRP-Superfamilie.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines funktionellen TRP-Kanals .....	7
Abbildung 3: Histologie der Lunge.....	12
Abbildung 4: Direkte und indirekte IHC-Technik.....	22
Abbildung 5: Rechenbeispiel zur Verdünnung von Anti-TRPC6.....	24
Abbildung 6: Rechenbeispiel zur Verdünnung des Kaninchenserums.....	24
Abbildung 7: Rechenbeispiel zur Verdünnung des Sekundärantikörpers.....	26
Abbildung 8: Peptidkontrolle schematisch.....	29
Abbildung 9: Auswertungsprotokoll.....	32
Abbildung 10: Positivkontrolle.....	34
Abbildung 11: Peptidkontrolle.....	35
Abbildung 12: Negativkontrolle.....	35
Abbildung 13: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe in IHC-Färbung.....	36
Abbildung 14: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe mit Ablagerungen von anthrakotischem Pigment in IHC-Färbung.....	37
Abbildung 15: Gefäß und begleitender Bronchiolus in der IHC-Färbung.....	38
Abbildung 16: Gefäß und begleitender Bronchiolus in der Negativkontrolle.....	38
Abbildung 17: Anschnitt der Gefäßwand und des begleitenden Bronchiolus, IHC-Färbung.....	39
Abbildung 18: Gefäß in IHC-Färbung.....	39
Abbildung 19: Bronchiolus mit teils abgelöstem Flimmerepithel in IHC-Färbung.....	40
Abbildung 20: Anschnitt eines Bronchiolus mit Flimmerepithel in IHC-Färbung.....	41
Abbildung 21: Alveolen und Blutkapillaren in IHC-Färbung.....	42
Abbildung 22: Alveolen mit Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten in IHC-Färbung.....	43
Abbildung 23: Gegenüberstellung von Positiv-(A) und Negativkontrolle (B) eines Bronchiolus respiratorius mit Übergang über den Ductus alveolaris in die Alveolen.....	43
Abbildung 24: Gesamtauswertung aller gesunden Lungenproben in absoluten Zahlen.....	44
Abbildung 25: Isolierte Auswertung des rechten Mittellappens an allen Körperspendern.....	45
Abbildung 26: Isolierte Auswertung aller 5 Lungenlappen an Körperspender 4.....	46
Abbildung 27: Isolierte Auswertung aller 5 Lungenlappen an Körperspender 12.....	47
Abbildung 28: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe von Covid-Probe Nr. 4, IHC-Färbung.....	48
Abbildung 29: Pleura pulmonalis und subpleurales Bindegewebe von Covid-Probe Nr.3, IHC-Färbung.....	49
Abbildung 30: Lungenarterie, IHC-Färbung.....	50
Abbildung 31: Anschnitt einer Lungenarterie, IHC-Färbung.....	51

Abbildung 32: Bronchus, IHC-Färbung.....	52
Abbildung 33: Bronchus Nahaufnahme, IHC-Färbung.....	53
Abbildung 34: Bronchiolus und begleitende Lungenarterie, IHC-Färbung.....	54
Abbildung 35: Wand eines Bronchiolus, IHC-Färbung.....	55
Abbildung 36: Alveolarsepten aneinander angrenzender Alveolen, IHC-Färbung.....	56
Abbildung 37: Bindegewebig verbreiterte Alveolarsepten, sowie fibrotischer Umbau, IHC-Färbung.....	57
Abbildung 38: Dystelektatische Alveolen, IHC-Färbung.....	57
Abbildung 39: Gesamtauswertung aller Covid-19-Proben in absoluten Zahlen.....	58
Abbildung 40: Dilatierte Kapillaren eines Covid 19-Patienten, IHC-Färbung.....	59
Abbildung 41: Ausgeprägte Fibrose und Lymphozyteninfiltration eines Covid 19-Patienten IHC-Färbung.....	60
Abbildung 42: Hyaline Membranen eines Covid 19-Patienten, IHC-Färbung.....	60
Abbildung 43: Gegenüberstellung einer Covid-19-Pneumonie (A) und gesunden Lungengewebe (B) in IHC-Färbung.....	61

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	16
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien/Lösungen.....	17
Tabelle 3: Verwendete Antikörper.....	17
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 5: Ablauf der HE-Färbung.....	20
Tabelle 6: Ablauf der immunhistochemischen DAB-Färbung.....	28
Tabelle 7: Übersicht der ausgewählten Lungenproben der Körperspender.....	30
Tabelle 8: Übersicht der Proben der Covid 19-Pneumonien.....	31
Tabelle 9: Auswertungsschema.....	31

## 9. Literaturverzeichnis

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. *Biomed Rep* 16:1–11
2. Acat M, Yildiz Gulhan P, Oner S, Turan MK (2021) Comparison of pirfenidone and corticosteroid treatments at the COVID-19 pneumonia with the guide of artificial intelligence supported thoracic computed tomography. *Int J Clin Pract* 75:e14961
3. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D (2020) Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 383:120–128
4. Alrajhi N (2023) Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: An ongoing concern. *Ann Thorac Med* 18:173–181
5. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T, Löwe B (2018) *Innere Medizin*. 4., überarbeitete Auflage edition. Thieme, Stuttgart
6. Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, García-Cánovas F (1990) Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1038:85–89
7. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches (2020) Pathologie der schweren COVID-19-bedingten Lungenschädigung. URL: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/214667/Pathologie-der-schweren-COVID-19-bedingten-Lungenschaedigung>
8. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D (2020) *Anatomie*. 5., korrigierte Auflage edition. Thieme, Stuttgart
9. Bayliss WM (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28:220–231
10. Beech D, Muraki K, Flemming R (2004) Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol* 559:685–706
11. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21
12. Boulay G, Zhu M, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and Expression of a Novel Mammalian Homolog of *Drosophila* Transient Receptor Potential (Trp) Involved in Calcium Entry Secondary to Activation of Receptors Coupled by the Gq Class of G Protein. *J Biol Chem* 272:29672–80
13. Butranova O, Baybulatova E, Zyryanov S, Kustov Y (2024) Effects of pharmacotherapy on post-COVID-19 pulmonary fibrosis: Systemic review. *BIO Web Conf* 100:01010
14. Chen Q-Z, Zhou Y-B, Zhou L-F, Fu Z-D, Wu Y-S, Chen Y, Li S-N, Huang J-R, Li J-H (2019) TRPC6 modulates adhesion of neutrophils to airway epithelial cells via NF-κB activation and ICAM-1 expression with ozone exposure. *Exp Cell Res* 377:56–66



15. Chézeau L (2018) Étude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane.
16. Corteling R, Li S, Giddings J, Westwick J, Poll C, Hall I (2004) Expression of Transient Receptor Potential C6 and Related Transient Receptor Potential Family Members in Human Airway Smooth Muscle and Lung Tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:145–54
17. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224:285–287
18. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S (2003) Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 167:490–511
19. Dettmeyer R, Lasczkowski G, Weber A, Wolter T, Kernbach-Wighton G (2020) Histopathologische Befunde bei therapiert und nichttherapiert SARS-CoV-2-Infektion – Bericht über 3 Autopsien. *Rechtsmed Berl Ger* 30:336–343
20. Dhong K-R, Lee J-H, Yoon Y-R, Park H (2023) Identification of TRPC6 as a Novel Diagnostic Biomarker of PM-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Machine Learning Models. *Genes* 14:284
21. Ding X, He Z, Zhou K, Cheng J, Yao H, Lu D, Cai R, Jin Y, Dong B, Xu Y, Wang Y (2010) Essential Role of TRPC6 Channels in G2/M Phase Transition and Development of Human Glioma. *J Natl Cancer Inst* 102:1052–68
22. Doyen D, Dupland P, Morand L, Fourrier E, Saccheri C, Buscot M, Hyvernats H, Ferrari E, Bernardin G, Cariou A, Mira J-P, Jamme M, Dellamonica J, Jozwiak M (2021) Characteristics of Cardiac Injury in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *CHEST* 159:1974–1985
23. 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\*. *J Biol Chem* 279:22047–22056
24. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG (1995) Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1666–1672
25. Finney-Hayward TK, Popa MO, Bahra P, Li S, Poll CT, Gosling M, Nicholson AG, Russell REK, Kon OM, Jarai G, Westwick J, Barnes PJ, Donnelly LE (2010) Expression of Transient Receptor Potential C6 Channels in Human Lung Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:296–304
26. Guihur A, Rebeaud ME, Fauvet B, Tiwari S, Weiss YG, Goloubinoff P (2020) Moderate Fever Cycles as a Potential Mechanism to Protect the Respiratory System in COVID-19 Patients. *Front Med* 7:564170
27. Guilbert A, Dhennin-Duthille I, El Hiani Y, Haren N, Khorsi H, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H (2008) Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer* 8:125
28. Hao Q, Zhao K, Xie R, Wei J, Gu W, Fei Z (2020) Core Role of TRPC6 Channels in Regulating Airway Re-modelling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cell Biology* URL: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.01.16.908699>

29. Hofmann K (2018) Molekulare Analyse des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer pulmonalen Fibrose. Ludwig-Maximilians-Universität München URL: <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21782/>
30. 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
31. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med* 78:14–25
32. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH (2019) An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1897:299–311
33. Jaffal SM, Abbas MA (2021) TRP channels in COVID-19 disease: Potential targets for prevention and treatment. *Chem Biol Interact* 345:109567
34. Jonigk D, Werlein C, Lee P, Kauczor H, Laenger F, Ackermann M (2022) Pulmonale und systemische Pathologie bei COVID-19. *Dtsch Arztebl Int* 119:
35. Kannler M TRPA1-Kationenkanäle: Expression und Funktion als Sauerstoffsensoren in Epithelzellen des respiratorischen Systems.
36. King T, Pardo A, Selman M (2011) Idiopathic Pulmonary fibrosis. *Lancet* 378:1949–61
37. Leung P-C, Cheng K-T, Liu C, Cheung W-T, Kwan H-Y, Lau K-L, Huang Y, Yao X (2006) Mechanism of non-capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in response to bradykinin in vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 43:367–376
38. Levy E, Meyer NJ (2023) Failure of TRPC6 inhibition to prevent COVID-19 deterioration: more questions than answers. *Thorax* 78:741–742
39. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu M, Armstrong D, Birnbaumer L (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2895–900
40. Luostarinen S, Hämäläinen M, Hatano N, Muraki K, Moilanen E (2021) The Inflammatory Regulation of TRPA1 Expression in Human A549 Lung Epithelial Cells. *Pulm Pharmacol Ther* 70:102059
41. Montell C, Rubin G (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* TRP locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–23
42. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels R, Bruford E, Caterina M, Clapham D, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg A, Schultz G, Shimizu N, Zhu M (2002) A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Mol Cell* 9:229–31
43. Montell C (2005) The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2005:re3
44. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Joshi N (2011) Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res* 31:350–358
45. Müller K-M (2004) Pleura: Non-neoplastic Disorders. *Pneumologie* 58:516–524

46. Naeem A, Rai SN, Pierre L (2024) Histology, Alveolar Macrophages. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/>
47. Oberhofer E (2022) Lungenfibrose nach COVID-19. *MMW Fortschr Med* 164:18
48. Pfeifer M, Hamer OW (2020) COVID-19-Pneumonie. *Gastroenterol* 15:457–470
49. Ramsey I, Delling M, Clapham D (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–47
50. Reiser J, Polu K, Möller C, Kenlan P, Altintas M, Wei C, Faul C, Gandomi M LCGC, Stephanie, Villegas I, Avila-Casad C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith P, Clapham D, Pollak M (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 37:739–44
51. Reske AW (2018) Pathophysiologie des Lungenversagens. *Gottschaldt U Reske AW Pathophysiol Lungenversagens* 249–264
52. Schilling J, Tolksdorf K, Marquis A, Faber M, Pfoch T, Buda S, Haas W, Schuler E, Altmann D, Grote U, Diercke M (2021) Die verschiedenen Phasen der COVID-19-Pandemie in Deutschland: Eine deskriptive Analyse von Januar 2020 bis Februar 2021. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 64:1093–1106
53. Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N (2016) Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J* 47:288–303
54. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, Herausgeber (2019) Bancroft's theory and practice of histological techniques. Eighth edition edition. Elsevier, Amsterdam
55. Tauseef M, Knezevic N, Chava KR, Smith M, Sukriti S, Gianaris N, Obukhov AG, Vogel SM, Schraufnagel DE, Dietrich A, Birnbaumer L, Malik AB, Mehta D (2012) TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J Exp Med* 209:1953–1968
56. Tian Y, Rong L, Nian W, He Y (2020) Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther* 51:843–851
57. Ulfing N (2019) *Kurzlehrbuch Histologie*. 5., unveränderte Auflage edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
58. Várnai P, Hunyady L, Balla T (2009) STIM AND ORAI, THE LONG AWAITED CONSTITUENTS OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY. *Trends Pharmacol Sci* 30:118–128
59. Venkatachalam K, Montell C (2007) Trp channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417
60. Walz M, Tschernig T, Schmidt P, Federspiel J (2022) TRPC6-protein expression in the elderly and in liver disease. *Ann Anat - Anat Anz* 245:152016
61. Wang D, Li X, Liu J, Li J, Li L-J, Qiu M-X (2014) Effects of TRPC6 on invasibility of low-differentiated prostate cancer cells. *Asian Pac J Trop Med* 7:44–47
62. Ware LB, Soleymanlou N, McAuley DF, Estrada V, Diaz GA, Lacamera P, Kaste R, Choi W, Gupta A, Welte T (2023) TRPC6 inhibitor (BI 764198) to reduce risk and severity of ARDS due to COVID-19: a phase II randomised controlled trial. *Thorax* 78:816–824

63. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrescu R, Olschewski A, Storch U, Schnitzler M, Ghofrani H, Schermuly R, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2007) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19093–8
64. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause K-H, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HHHW, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA, Dietrich A (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia–reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun* 3:649
65. Welsch U, Deller T (2014) *Lehrbuch Histologie: mit 49 Tabellen*. 4. Aufl edition. Elsevier, Urban & Fischer, München
66. Welsh D, Morielli A, Nelson M, Brayden J (2002) Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90:248–50
67. Wenkuang Y, Chen W-C, Su VY-F, Shen H-C, Wu H-H, Chen H, Yang K-Y (2022) Nintedanib Inhibits Endothelial Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via Focal Adhesion Kinase Activity Reduction. *Int J Mol Sci* 23:8193
68. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652–9656
69. Winn M, Conlon P, Lynn K, Farrington M, Creazzo T, Hawkins A, Daskalakis N, Kwan S, Ebersviller S, Burchette J, Pericak-Vance M, Howell D, Vance J, Rosenberg P (2005) Medicine: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308:1801–4
70. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y, Bai C, Gao T, Song J, Xia P, Dong J, Zhao J, Wang F-S (2020) Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 8:420
71. 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. *Histochem Cell Biol* 122:553–561
72. Yuan JP, Kim MS, Zeng W, Shin DM, Huang G, Worley PF, Muallem S (2009) TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels* 3:221–225
73. Zhou L-F, Chen Q-Z, Yang C-T, Fu Z-D, Zhao S-T, Chen Y, Li S-N, Liao L, Zhou Y-B, Huang J-R, Li J-H (2018) TRPC6 contributes to LPS-induced inflammation through ERK1/2 and p38 pathways in bronchial epithelial cells. *Am J Physiol-Cell Physiol* 314:C278–C288
74. (2006) *Anatomie. 2: Brusteingeweide, Baueingeweide, Beckeneingeweide*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
75. (2015) *Prometheus. Innere Organe: 122 Tabellen*. 4., überarb. und erw. Aufl edition. Thieme, Stuttgart New York
76. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. URL: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>

77. RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Steckbrief.html?nn=13490888#doc13776792bodyText8](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html?nn=13490888#doc13776792bodyText8)
78. DGN One | Leitlinie Details. URL: <https://dgn.org/leitlinie/neurologische-manifestationen-bei-covid-19>

## **10. Publikationen**

Leidinger G, Flockerzi F, Hohneck J, Bohle RM, Fieguth A, Tschernig T. TRPC6 is altered in COVID-19 pneumonia. *Chem Biol Interact.* 2022 Aug 1;362:109982.

## 11. Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater und Leiter der Prosektur Prof. Dr. Thomas Tschernig, der diese Promotion erst möglich gemacht hat. Ich danke ihm für die grandiose Betreuung, stetige Unterstützung bei Fragen oder Problemen und auch seine Geduld. Ich bin sehr dankbar, für die wertvollen Erfahrungen während meiner praktischen Arbeit in der Prosektur und dem Labor. Die Arbeit an den Körperspendern war etwas ganz Besonderes, daher gilt auch Ihnen mein größter Dank.

Außerdem danke ich Irina Scheck, Sektionsassistentin in der Prosektur, für die tatkräftige Unterstützung v.a. im Labor, sei es durch Bereitstellen der Arbeitsmaterialien oder durch ihre positive Art und die anregenden Gespräche.

Ebenso danke ich dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie für die Bereitstellung der Covid-19-Lungenproben.

Ein Dankeschön gilt auch meinen Freundinnen Maria, Laura und Vivien, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mich auf dem Weg motiviert haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Freundin und Kollegin Lisa für das Korrekturlesen bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Ketevan Seibert, die mich auf den letzten Metern nochmal sehr motiviert hat.

Auch meinem Freund Sammy möchte ich v.a. für den mentalen Beistand danken. Ich bin froh, dass du mich immer wieder aufgefangen und unterstützt hast, auch wenn ich mal nicht weiterwusste. Unser gemeinsames Leid hat den ganzen Weg doch etwas leichter gemacht.

Ich möchte meinen Eltern den größten Dank aussprechen, da sie mir das Studium der Humanmedizin überhaupt ermöglicht haben. Ihr seid meine größten Unterstützer und standet auf diesem Weg immer hinter mir. Dafür bin ich euch unglaublich dankbar!



## **12. Lebenslauf**

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