

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

# **Immunhistochemischer Nachweis von TRPC-6 in peripheren Nerven des Menschen**

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

2025

vorgelegt von: Cedric Jonathan Raming  
geb. am: 05.06.2000 in Münster

**Tag der Promotion:** 20.08.2025

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

**Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

Prof. Dr. Ulrich Boehm

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
1.1	Deutsch	5
1.2	Englisch	5
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Die TRP-Familie	7
2.2	TRPC-Kanäle	8
2.3	TRPC-6	10
2.3.1	TRPC-6 allgemein	10
2.3.2	Aufbau von TRPC-6	10
2.3.3	Regulation und Funktion von TRPC-6	12
2.3.4	Relevanz von TRPC-6 in Nervengewebe	15
2.3.5	TRPC-6 und nicht neuronale Erkrankungen	18
2.4	Aufbau peripherer Nerven	21
2.4.1	N. ulnaris	21
2.4.2	N. ischiadicus	22
2.4.3	Histologie	25
2.5	Ziele der Arbeit	25
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>27</b>
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Chemikalien	28
3.1.3	Antikörper	29
3.1.4	Sonstige Materialien	30
3.2	Methoden	31
3.2.1	Daten der Körperspender	31
3.2.2	Fixierung der Leichen	33
3.2.3	Auswahl der Proben und Probenentnahme	34
3.2.4	Anfertigung histologischer Schnitte	38
3.2.5	HE-Färbung	40
3.2.6	IHC-Färbung	43
3.2.7	Auswertung	51

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1	Überblick	52
4.2	Bildmorphologie	53
4.2.1	HE-Färbung	53
4.2.2	IHC-Färbung	57
4.3	Färbesignal aller Nerven bei allen Spendern	67
4.3.1	Spender 1	67
4.3.2	Spender 2	68
4.3.3	Spender 3	69
4.3.4	Spender 4	70
4.3.5	Spender 5	71
4.3.6	Spender 6	71
4.3.7	Spender 7	72
4.3.8	Spender 8	73
4.4	Färbesignal aller Nerven im Vergleich	74
4.5	Färbesignal aller Spender im Vergleich	75
4.6	Gesamtergebnis	76
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
5.1	Methodendiskussion	77
5.2	Diskussion individueller Faktoren	79
5.3	Zusammenfassung	82
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>102</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>104</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsch

Seit seiner Entdeckung wird TRPC-6 mit einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in unterschiedlichen Geweben in Verbindung gebracht. Er fungiert als nicht selektiver Kationenkanal und gehört zu der Gruppe der TRP-Kanäle. Zunehmend offenbart sich dabei auch seine Bedeutung in der Entstehung von Schmerzüberempfindlichkeit. Dieser Zustand konnte bereits mit einer erhöhten Expression von TRPC-6 in dorsalen Spinalganglien assoziiert werden. Abgesehen davon, dass die meisten Nachweise an Proben tierischen Ursprungs geführt wurden, bleibt weiterhin unklar, ob der Kanal auch abseits der dorsalen Spinalganglien in peripheren Nerven exprimiert wird. Ziel dieser Arbeit war es daher, periphere Nerven von menschlichen Proben auf TRPC-6 zu untersuchen. Dafür wurden sowohl Proben von N. ischiadicus und N. ulnaris an insgesamt acht Körperspendern entnommen und mittels Immunhistochemie analysiert. Dabei wurden sowohl Längsschnitte als auch Querschnitte aus den Proben gewonnen und angefärbt. Insgesamt zeigte sich bei 43 von 48 histologischen Schnitten ein positives Farbsignal. Größere Differenzen zwischen N. ischiadicus und N. ulnaris im Hinblick auf die Anfärbung ließen sich dabei nicht feststellen. Einen geringen Unterschied gab es lediglich in der Anfärbung von Querschnitten und Längsschnitten. Dabei waren die Längsschnitte bei beiden Nerven durchweg etwas besser gefärbt. Stärker ausgeprägt waren hingegen die interindividuellen Unterschiede zwischen den Spendern. Interessanterweise waren dabei die Proben eines Spenders besonders stark gefärbt, der zu Lebzeiten unter einem chronischen Schmerzsyndrom litt. Dies steht im Einklang mit der bisher größtenteils durch Tierversuche gewonnenen Kenntnis, dass der Kanal eine vermehrte Expression bei Schmerzzuständen in dorsalen Spinalganglien zeigt. Zukünftig könnte TRPC-6 somit eine wichtige Rolle als Angriffspunkt in der Schmerztherapie spielen.

## 1.2 Englisch

Since its discovery, TRPC-6 has been associated with a variety of physiological and pathophysiological processes in different tissues. It functions as a non-selective cation channel and belongs to the group of TRP channels. Its importance in the development of pain hypersensitivity is becoming increasingly apparent. This condition has already been associated with increased expression of TRPC-6 in dorsal root ganglia. Apart from the fact that most of the evidence was obtained from samples of animal origin, it remains unclear whether the channel is also expressed in peripheral nerves outside the dorsal root ganglia. The aim of this work was

therefore to examine peripheral nerves from human samples for TRPC-6. For this purpose, samples of both the sciatic and ulnar nerves were taken from a total of eight body donors and analyzed by immunohistochemistry. Both longitudinal and transverse sections were obtained from the samples and stained. In total, 43 of 48 histological sections showed a positive color signal. There were no major differences between the sciatic and ulnar nerve with regard to staining. There was only a slight difference in the staining of transverse and longitudinal sections. The longitudinal sections of both nerves were consistently slightly better colored. However, the inter-individual differences between the donors were more pronounced. Interestingly, the samples of a donor who suffered from chronic pain syndrome during his lifetime were particularly strongly stained. This is consistent with the knowledge gained to date, largely from animal experiments, that the channel shows increased expression in pain conditions in dorsal root ganglia. In the future, TRPC-6 could therefore play an important role as a target in pain therapy.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die TRP-Familie

Der TRPC-6 Kanal gehört zur Gruppe der TRPC-Kanäle, welche sich wiederum der Superfamilie der TRP-Kanäle unterordnen lassen. Die TRP-Superfamilie beinhaltet insgesamt sieben Untergruppen von Kanälen [1]. Die Zugehörigkeit eines Kanals zur TRP-Superfamilie beruht dabei vor allem auf Sequenzhomologie [2]. Den TRP-Kanälen liegt eine Reihe von funktionellen und strukturellen Gemeinsamkeiten zugrunde. Sie sind durchlässig für Kationen und haben einen ähnlichen Aufbau [2].

Der Ursprung der TRP-Kanäle geht zurück auf die Entdeckung einer Auffälligkeit im Elektoretinogramm einer mutierten *Drosophila* im Jahr 1969 [3]. Basierend auf der Abnormalität in diesem Elektoretinogramm in Form eines transienten Rezeptorpotenzials wurde die *Drosophila*-Mutante später als TRP-Mutante bezeichnet [4]. Schließlich wurde die Vermutung nahegelegt, dass der Grund für die Veränderung im Elektoretinogramm dieser *Drosophila*-Mutante das Fehlen eines  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Kanals sein muss [5]. Mit der Zeit wurden immer mehr TRP-Kanäle entdeckt, die letztendlich zu einer großen TRP-Superfamilie zusammengefasst wurden [6].

Die TRP-Superfamilie lässt sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Der ersten Gruppe gehören die fünf Kanaluntergruppen TRPN, TRPV, TRPM, TRPA und auch TRPC an, während die zweite Gruppe durch die Kanaluntergruppen TRPP und TRPML gebildet wird. So ergeben sich die eingangs erwähnten sieben Untergruppen der TRP-Superfamilie [1]. Die TRPN-Kanäle finden sich dabei allerdings nur in Fisch und wirbellosen Tieren [7]. Daher wird oft auch nur von sechs Untergruppen von TRP-Kanälen bei Säugetieren gesprochen [8].

Die TRP-Kanäle bilden funktionelle Tetramere aus, wobei ein Tetramer aus vier Untereinheiten besteht. Dabei können sowohl Homotetramere aus vier gleichen TRP-Kanälen als auch Heterotetramere aus vier verschiedenen TRP-Kanälen gebildet werden. Bei den Heterotetrameren gibt es dabei zum einen Tetramere aus verschiedenen TRP-Kanälen derselben Untergruppe, wie beispielsweise aus TRPC-3 und TRPC-6. Auf der anderen Seite bilden sich sogar Tetramere mit TRP-Kanälen aus verschiedenen Untergruppen der TRP-Superfamilie, wie es zum Beispiel bei TRPC-1 und TRPP-2 der Fall ist. Dadurch können sich die Eigenschaften der Ka-

näle nochmals deutlich unterscheiden, was in einer großen Diversität an unterschiedlichen Funktionen in der TRP-Superfamilie resultiert [9], [10].

Die TRP-Kanäle sind ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), wobei sich zwischen dem fünften und sechsten Protein eine porenbildende Schleife befindet. Diese ist für den Transport von Kationen über die Zellmembran verantwortlich [1], [10]. Die N- und C-Termini der Kanalproteine liegen intrazellulär [2]. Am N-terminalen Ende der Proteine finden sich bei den Kanälen TRPC, TRPV, TRPA und TRPN eine Reihe von Ankyrin-Wiederholungen. Am C-terminalen Ende weisen einige TRP-Kanäle außerdem eine TRP-Domäne auf. Dabei handelt es sich um einen Bereich von ca. 25 Aminosäuren. Die beiden am stärksten konservierten Bereiche dieser TRP-Domäne haben nochmals eigene Bezeichnungen, nämlich TRP-Box 1 und TRP-Box 2. Die Aminosäureabfolge der TRP-Box 1 ist in der Gruppe der TRPC-Kanäle sogar bei allen Kanälen identisch [1]. Die TRP-Box 2 der TRP-Domäne weist die Besonderheit auf, dass sie reich an der Aminosäure Prolin ist [6].

Die eingangs erwähnte grobe Einteilung der TRP-Superfamilie in zwei Gruppen ergibt sich durch den Unterschied, dass die Kanäle TRPP und TRPML der zweiten Gruppe im Gegensatz zur ersten Gruppe eine große Schleife besitzen, die zwischen den ersten zwei Transmembransegmenten lokalisiert ist und diese voneinander trennt [1].

Die Aktivierung der unterschiedlichen Kanäle erfolgt über verschiedene Mechanismen. Dazu gehören unter anderem die Bindung von Liganden, Spannungsunterschiede oder Temperaturunterschiede. Viele TRP-Kanäle haben auch mehrere Aktivierungsmechanismen gleichzeitig [6].

## 2.2 TRPC-Kanäle

Die Untergruppe der TRPC-Kanäle war die erste Gruppe von TRP-Kanälen, die entdeckt wurde und besitzt die größte Ähnlichkeit mit dem ursprünglich entdeckten Kanal der Drosophila-Mutante [1], [11]. Im Jahr 1995 wurde dabei mit TRPC-1 der erste Kanal dieser Gruppe beschrieben [12]. Insgesamt gibt es sieben TRPC-Kanäle, wobei sich einige aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in Untergruppen zusammenfassen lassen: TRPC-1, TRPC-2, TRPC-3/6/7, TRPC-4/5 [1].

Beim Menschen werden bis auf eine Unterform alle TRPC-Kanäle exprimiert. Diese Ausnahme bildet der TRPC-2 Kanal, welcher bei Nagetieren zwar vorkommt, bei Menschen aber als Pseudogen vorliegt [1], [6].

Die verschiedenen TRPC-Kanäle unterscheiden sich in Bezug auf ihre Eigenschaften wie beispielsweise Kationenselektivität, Aktivierungsmechanismen und Expression [1]. Daher soll im Folgenden eine kurze Übersicht über die verschiedenen Untergruppen gegeben werden.

Der TRPC-1 Kanal wird in vielen Geweben exprimiert [6]. Es wird angenommen, dass er keine Homotetramere ausbildet, sondern lediglich Heterotetramere formt. Beispielsweise ist TRPC-1 durch Bildung von Heterotetrameren mit TRPC-4 oder TRPC-5 in der Lage, die Leitfähigkeit dieser Kanäle im Vergleich zu TRPC-4 bzw. TRPC-5 Homotetrameren zu ändern [13].

Die Ausbildung von TRPC-3 findet ebenfalls in verschiedenen Geweben statt. Allerdings ist die Expression im Gehirn besonders hoch. Dabei bildet der Kanal entweder Homotetramere oder Heterotetramere mit anderen TRPC-Kanälen aus. Insbesondere TRPC-6 und TRPC-7 sind dabei häufig involviert [6], [13].

Der TRPC-4 Kanal ist ebenfalls in vielen Geweben vertreten. Neben einer Expression in Endothel und Nebennieren spielt der Kanal vor allem eine Rolle im Gehirn. Dort ist er besonders im limbischen System ausgebildet. Er kann sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere mit TRPC-1 und TRPC-5 ausbilden [6], [13].

Die Expression von TRPC-5 ist im Gehirn am stärksten ausgeprägt [7]. Hier ist der Kanal an Axonwachstum und Neurotransmission beteiligt [13]. Außerdem ist TRPC-5 an der Blutdruckstabilisation beteiligt, indem er in den Barorezeptoren der Aorta bei der Druckwahrnehmung hilft [13]. Der Kanal kann sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere mit TRPC-1 und TRPC-4 ausbilden [6].

TRPC-7 wurde als letzter Kanal der Untergruppe der TRPC-Kanäle entdeckt [6]. Bei Menschen wird er vor allem in den Nieren, der Hypophyse und weiteren Bereichen im Gehirn exprimiert [13]. Der Kanal kann ebenso Homotetramere wie auch Heterotetramere mit TRPC-1, TRPC-3 und TRPC-6 ausbilden [6].

## 2.3 TRPC-6

Da der TRPC-6 Kanal im Zentrum dieser Arbeit steht, soll auf diesen im Folgenden näher eingegangen werden.

### 2.3.1 TRPC-6 allgemein

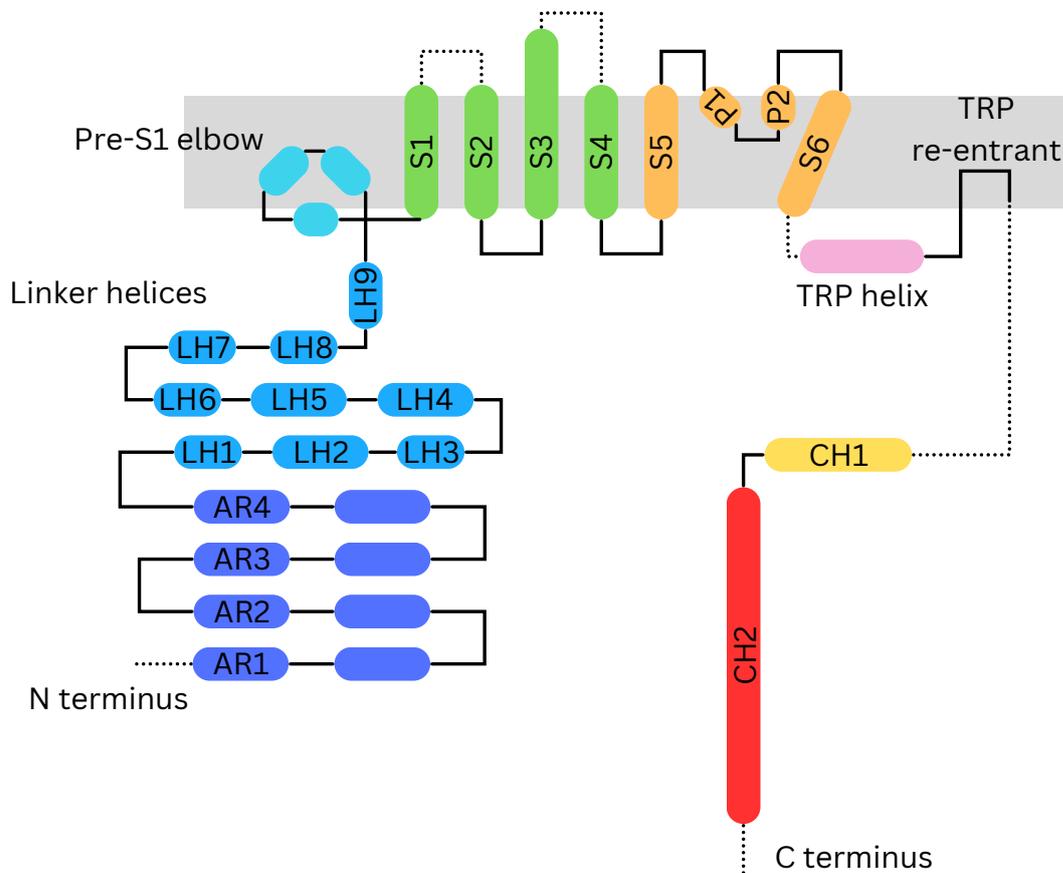
TRPC-6 wurde 1997, nur zwei Jahre nach der Entdeckung von TRPC-1, erstmalig beschrieben [14]. Der Kanal wird in einer Vielzahl von Geweben ausgebildet [15]. Insbesondere in Plazenta, Herz, Lunge, Pankreas und Niere zeigt der Kanal eine vermehrte Expression. Er ist jedoch ebenfalls in weiten Teilen des Gehirns verbreitet [15]. Durchlässig ist der Kanal nichtselektiv für Kationen, wobei die Permeabilität für Calciumionen etwas höher ist als für andere Kationen [6]. Der Kanal bildet sowohl Homotetramere als auch Heterotetramere aus [6]. Dabei dienen vor allem TRPC-3 und TRPC-7 als Partner für die Tetramerbildung [6]. Allerdings kann TRPC-6 auch mit TRPC-1, TRPC-4 und TRPC-5 Heterotetramere bilden. Dafür ist jedoch immer die Anwesenheit von TRPC-1 erforderlich [16].

TRPC-6 spielt eine Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [17]. Dennoch gestaltet sich die Forschung, die vor allem mittels Gen-Knockout und niedermolekularen Modulatoren betrieben wird, schwierig [17]. Dies liegt vor allem in der Verbreitung des Kanals im Körper und der dadurch erschwerten Spezifizierung bestimmter Funktionen begründet [17]. Außerdem wird die Interpretation von Studienergebnissen aufgrund der ausgeprägten Heteromerbildung von TRPC-Kanälen und der damit einhergehenden Funktionsveränderung verkompliziert [17].

### 2.3.2 Aufbau von TRPC-6

Das eingangs beschriebene Grundgerüst der TRP-Kanäle trifft auch auf den Aufbau von TRPC-6 zu. Dennoch soll die Struktur des Kanals hier nochmal gesondert erläutert werden. Durch das neuartige Verfahren der Kryoelektronenmikroskopie gelang es im Jahr 2018 außerdem die dreidimensionale Architektur des TRPC-6 Kanals hochauflösend darzustellen [18], [19]. Wie bei allen Kanälen der TRP-Familie bestehen die Untereinheiten der Tetramere beim TRPC-6 Kanal ebenfalls aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6) [1]. Das fünfte und das sechste Segment stellen dabei die Porendomäne mit einer porenbildenden Schleife dar, die zwischen den beiden Segmenten liegt [13]. Eine Besonderheit bei TRPC-6 und TRPC-3 ist das im Vergleich zu TRPC-4 und TRPC-5 verlängerte dritte Transmembransegment [10]. Diese extrazelluläre Ver-

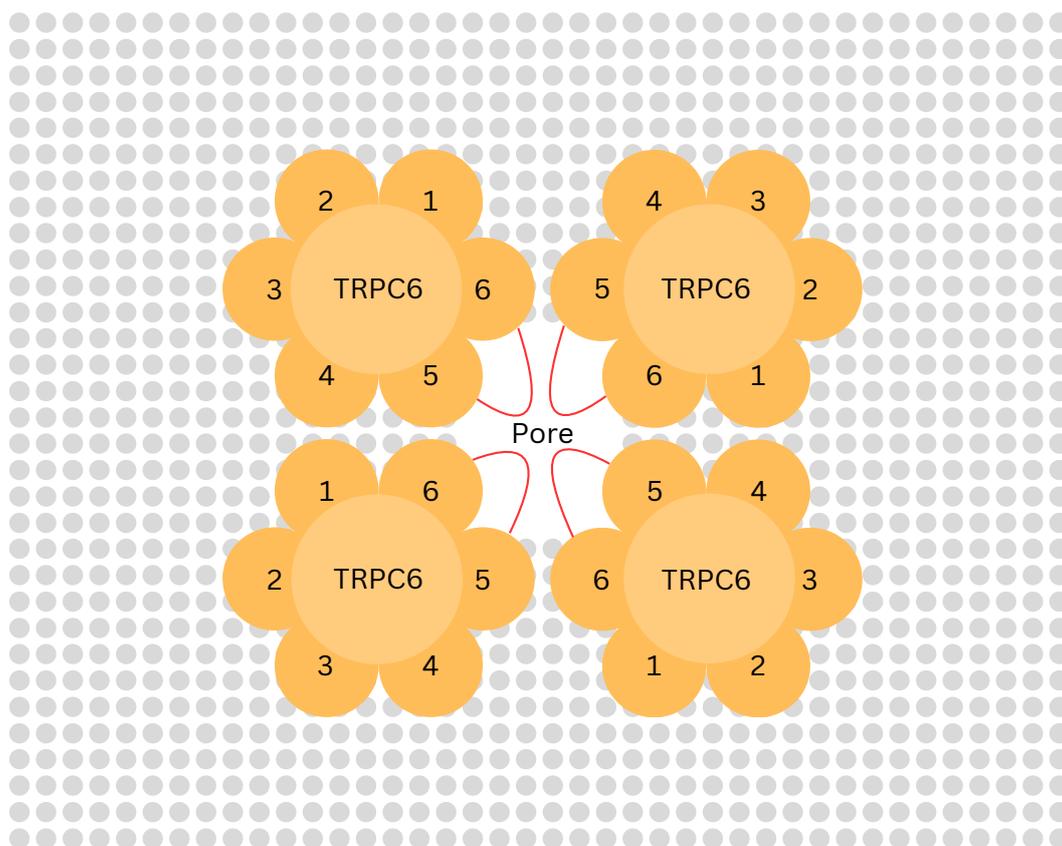
längerung des Segments könnte wichtig für Interaktionen mit extrazellulären Molekülen sein [10].



*Abbildung 1: Aufbau einer TRPC-6 Untereinheit in Anlehnung an Tang et al. [19]*

Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende der Untereinheit liegt intrazellulär [18]. Diese beiden Anteile des Grundgerüsts der TRP-Kanäle unterscheiden sich innerhalb der verschiedenen Kanalgruppen am stärksten [18]. Bei den TRPC-6-Kanälen besteht das Aminoende unmittelbar vor dem ersten Transmembransegment aus einer Region mit drei Helices, die auch pre-S1 elbow und pre-S1 helix genannt werden und noch zum Teil in der Zellmembran eingebettet sind [11]. Vorgeschaltet sind diesem Bereich eine Reihe von neun Linker Helices (LH) die bereits im Zytoplasma liegen [19]. Distal daran schließen sich wiederum vier Ankyrin-Wiederholungen (AR) an [11]. Das Carboxyende hingegen beginnt nach dem sechsten Transmembransegment mit der TRP-Domäne, die bereits anfangs näher beschrieben wurde [6]. An die TRP-Domäne schließt sich die TRP re-entrant helix an, die zum Teil in der Zellmembran eingebettet liegt [13]. Daraufhin folgt die horizontal verlaufende erste C-terminale Helix (CH1), wobei die Aminosäuren zwischen TRP re-entrant helix und CH1 ungeordnet verlaufen [19]. Daran knüpft distal dann die vertikal verlaufende zweite C-terminale Helix (CH2) an [19].

Wenn sich vier Untereinheiten zu einem Tetramer zusammenlagern, bilden sich zwei Schichten aus und man kann von einer intrazellulären zytoplasmatischen Domäne und von einer Transmembrandomäne sprechen [19]. Die zytoplasmatische Domäne hat eine Form, die einem Dom ähnelt, dessen Spitze nach intrazellulär zeigt [18]. Die Spitze wird dabei durch die vier gebündelten vertikal verlaufenden CH2-Bereiche gebildet. Die horizontal verlaufenden CH1-Bereiche liegen immer zwischen zwei benachbarten Untereinheiten der Tetramerstruktur und verbinden diese miteinander. Beide Teile der C-terminalen Helix sorgen in der dreidimensionalen Struktur somit für mehr Stabilität [20].



*Abbildung 2: Homotetramerstruktur von TRPC-6 - Ansicht von oben auf die Zellmembran*

### 2.3.3 Regulation und Funktion von TRPC-6

Die Regulation des TRPC-6 Kanals erfolgt vor allem durch verschiedene Mechanismen, die in Verbindung mit dem Phospholipase C (PLC) Signalweg stehen [17]. Dieser Signalweg wird entweder durch  $G_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen eingeleitet [13]. Die Aktivierung  $G_q$ -Protein-gekoppelter Rezeptoren stimuliert dabei die Phospholipase  $C\beta$ , wohingegen Rezeptortyrosinkinasen bei Aktivierung die Phospholipase  $C\gamma$  stimulieren [17]. Bei Stimulation spaltet Phospholipase C das Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bis-

phosphat (PIP<sub>2</sub>) in die beiden Stoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) [1]. IP<sub>3</sub> bindet daraufhin an Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und sorgt dadurch für eine intrazelluläre Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Zelle [1]. Hier herrscht im Ruhezustand nämlich eine deutlich höhere Calciumkonzentration als im Zytoplasma, wobei der Gradient durch die sogenannte SERCA-Pumpe aufrechterhalten wird [21]. DAG wiederum aktiviert den TRPC-6 Kanal direkt und führt so zu einem Calciumeinstrom [22]. Darüber hinaus aktiviert DAG zusammen mit Calciumionen die Proteinkinase C (PKC) [23]. Die PKC phosphoryliert daraufhin TRPC-6, wodurch der Kanal inhibiert wird [23], [24]. Hierbei könnte es sich daher um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln [23]. Außerdem führt die Aktivierung des PLC Signalweges im Rahmen der Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub> zu einem Abfall von PIP<sub>2</sub> [25]. Es wird angenommen, dass die sinkende Konzentration an PIP<sub>2</sub> zur Inaktivierung des TRPC-6 Kanals führt, wobei es sich ebenfalls um eine negative Rückkopplung handeln könnte [25]. Calciumionen können über sogenannte calcium-binding-sites (CBS) auch selbst an den TRPC-6 Kanal binden und die Kanalaktivität in komplexer Weise beeinflussen [26].

Ein weiteres Protein, welches eine Rolle in der Regulation von TRPC-6 zu spielen scheint, ist das stromal interaction molecule 1 (STIM1) [13]. Dabei handelt es sich um einen Calciumsensor, der im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und Informationen über die dortige Calciumkonzentration an Calciumkanäle in der Zellmembran weiterleitet [27]. Wenn es über die weiter oben beschriebene Kaskade beispielsweise zu einem IP<sub>3</sub>-vermittelten Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum kommt, ist die Calciumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum erniedrigt [13]. Es kommt dann zu einer Konformationsänderung von STIM1 und einer Verlagerung des Proteins an periphere Stellen des endoplasmatischen Retikulums, die der Zellmembran nahe anliegen [21]. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer Aktivierung von Kanälen der Zellmembran und somit einem Calciumeinstrom in das Zellinnere, um die Calciumreserven aufrecht zu erhalten [13]. Der Vorgang ist also direkt von dem Calciumspeicher im endoplasmatischen Retikulum abhängig und wird daher auch store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) genannt [13]. Dieser steht im Gegensatz zu dem oben erläuterten sogenannten receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry (ROCE), der über die Aktivierung von G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen eingeleitet wird [13]. Die speicherabhängigen Calciumeinströme (SOCE) kann man nochmal in I<sub>CRAC</sub> und I<sub>SOC</sub> differenzieren, wobei I<sub>CRAC</sub> durch sehr calciumselektive Orai-Kanäle und I<sub>SOC</sub> am wahrscheinlichsten durch nichtselektive TRPC-Kanäle vermittelt wird [27], [28]. Inwieweit genau TRPC-Kanäle

Teil dieses Mechanismus sind, ist allerdings nicht abschließend geklärt [13]. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass wenigstens einige der Kanäle auch durch STIM1 reguliert werden [13]. Nach Identifikation der Stim Orai activating region (SOAR), einer Aminosäuresequenz von STIM1 zur Aktivierung der Orai-Proteine, konnte gezeigt werden, dass STIM1 die Kanäle TRPC-1, TRPC-4 und TRPC-5 über diese Region ebenfalls direkt aktivieren kann [28]. TRPC-6 konnte hierüber in der gleichen Versuchsreihe allerdings nicht aktiviert werden [28]. In Anbetracht gegensätzlicher Studien, die eine Aktivierung von TRPC-6 durch STIM1 nahelegen, ist dies ein überraschendes Ergebnis [28], [29]. Eine denkbare Erklärung für diese Differenzen ist die bereits erläuterte Heteromerbildung von TRPC-6 [28]. Da in der Versuchsreihe lediglich mit Homotetrameren gearbeitet wurde, besteht die Möglichkeit, dass Heteromere des Kanals mit anderer Konformation durchaus durch STIM1 aktiviert werden können [28]. Neben einer möglichen STIM1-vermittelten Aktivierung von TRPC-Kanälen wurde im Fall von TRPC-6 gezeigt, dass STIM1 zu einer Translokation des Kanals von der Zellmembran in die Membran des endoplasmatischen Retikulums führt [27].

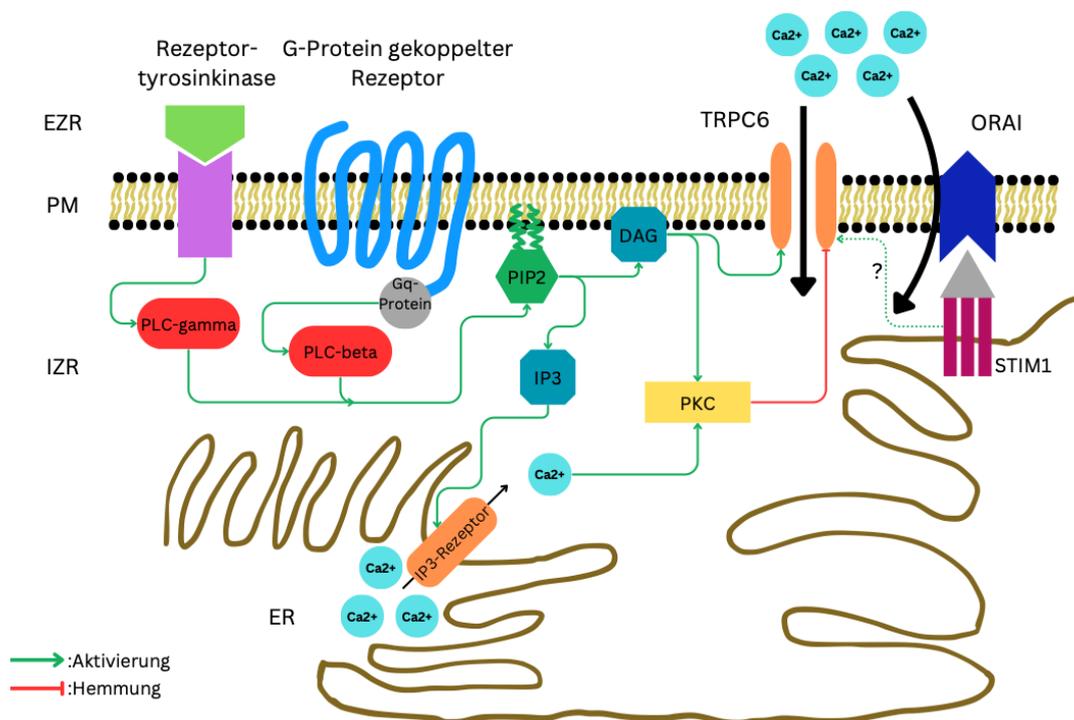


Abbildung 3: Schema der TRPC-6 Regulation - ROCE (links) und SOCE (rechts)

Für den SOCE speziell in Neuronen wurde ein weiterer interessanter möglicher Mechanismus entdeckt [30]. Der Natrium-Calcium-Austauscher NCX1 ist ein Antiporter, der normalerweise mithilfe des Natriumgradienten Calciumionen aus der Zelle heraustransportiert [31]. Kommt es

jedoch zu einer intrazellulären Ansammlung von Natrium, wird dieser Calciumtransport verringert [31]. Steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration weiter an, kann es sogar dazu kommen, dass der Natrium-Calcium-Austauscher in einen sogenannten „reverse mode“ übergeht und dann in entgegengesetzter Richtung funktioniert [31]. Dabei kommt es dann zu einem Calciumeinstrom, während Natriumionen nach extrazellulär transportiert werden [31]. Es konnte gezeigt werden, dass STIM1 einen Einfluss auf die Aktivität von NCX1 hat und dieser daher mit hoher Wahrscheinlichkeit am SOCE in kortikalen Neuronen beteiligt ist [30]. TRPC-6 könnte dabei ebenfalls Teil dieses Prozesses sein [30]. Im Rahmen einer Calciumdepletion aus dem endoplasmatischen Retikulum konnte experimentell nämlich eine erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration nachgewiesen werden [30]. Dies konnte bei fehlendem STIM1 oder ausgeschaltetem TRPC-6 Kanal allerdings nicht beobachtet werden [30]. Das wiederum legt die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung von TRPC-6 durch STIM1 über den nichtselektiven Kationeneinstrom zu einer Zunahme der lokalen intrazellulären Natriumkonzentration führt [30]. Dadurch würde der NCX1 in den „reverse mode“ übergehen und könnte somit zum SOCE beitragen [30].

Die Hauptfunktion von TRPC-Kanälen besteht in der Übersetzung extrazellulärer Signale in einen nichtselektiven Kationeneinstrom von Natrium- und Calciumionen [17]. Zusätzlich kommt es im Rahmen des PLC-Signalweges auch ohne TRPC-Kanäle zu einer IP<sub>3</sub>-vermittelten Calciumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum nach intrazellulär [17]. TRPC-Kanäle könnten jedoch zu einer Aufrechterhaltung und Verlängerung der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration beitragen [17]. Calcium hat dabei eine wichtige Funktion als second messenger [17]. In exzitatorischen Zellen, zu denen auch Neuronen gehören, könnte es durch den Kationeneinstrom durch TRPC-Kanäle außerdem zu einer Aktivierung zusätzlicher spannungsgesteuerter Calciumkanäle kommen, wodurch TRPC-Kanäle einen wichtigen Einfluss auf die Modulation von Aktionspotenzialen haben könnten [17].

### **2.3.4 Relevanz von TRPC-6 in Nervengewebe**

In Nervengewebe konnten bereits einige Vorgänge identifiziert werden, bei denen TRPC-6 eine wesentliche Funktion innehat.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass TRPC-6 eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Dynamik spielt [32]. Man unterscheidet dabei zum einen mitochondriale Spaltung und zum anderen mitochondriale Fusion, wobei diese Prozesse essenziell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion sind [33]. Eine übermäßige Spaltung führt dabei zur Apoptose, wo-

hingegen eine übermäßige Fusion eine Zellnekrose begünstigt [32]. Die mitochondriale Dynamik wird über verschiedene Moleküle reguliert, von denen das dynamin-related-protein 1 (DRP1) besonders relevant ist [33]. Durch Phosphorylierung am Serin 616 des DRP1 wird die mitochondriale Spaltung gefördert [33]. Die Phosphorylierung kann hierbei durch verschiedene Kinasen wie zum Beispiel die extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) erfolgen [33]. Bei der Regulation dieser Kinase wiederum scheint TRPC-6 eine entscheidende Rolle zu spielen [32]. Die Stilllegung von TRPC-6 bei Ratten führte in einer Studie nach einem Status epilepticus nämlich zu einer massiven Degeneration von Körnerzellen des Gyrus dentatus [34]. Im Bereich des Hippocampus wird TRPC-6 bei Ratten hier mit am stärksten exprimiert, wobei diese Zellen normalerweise sehr resistent gegen Neuronenschäden durch einen Status epilepticus sind [35]. Der genaue Mechanismus konnte zunächst nicht geklärt werden [32]. Durch weitere Forschung konnte jedoch herausgefunden werden, dass die Ausschaltung von TRPC-6 eine verminderte Phosphorylierung der ERK1/2 zur Folge hat, was wiederum in einer verminderten Phosphorylierung von DRP1 am Serin 616 resultiert [32]. Daraus folgt eine übermäßige Fusion der Mitochondrien mit massiver Zelldegeneration [32]. Demonstriert wurden diese Prozesse ebenfalls an Körnerzellen des Gyrus dentatus bei Ratten nach einem Status epilepticus [32]. Daher könnte TRPC-6 einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt für neurologische Erkrankungen darstellen, die mit einer Fehlfunktion der mitochondrialen Dynamik einhergehen [17].

Des Weiteren scheint TRPC-6 eine wichtige Rolle als Angriffspunkt bei ischämischer Hirnschädigung, wie einem Schlaganfall, zu spielen [36]. Hierbei kommt es aufgrund von Minderperfusion zu einer Beeinträchtigung der vaskulären Autoregulation sowie der Blut-Hirnschranke und zu einem Zusammenbruch der Energieversorgung der Zellen, was schließlich einen Zelluntergang nach sich zieht [36]. Durch die fehlende Energieversorgung der Zellen versagt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und es kommt zur Zelldepolarisation und Glutamatfreisetzung [36]. Die Glutamatfreisetzung führt wiederum zu einem NMDA-Rezeptor vermittelten Calciumeinstrom in die Zellen [36]. Die Calciumüberladung der Zellen ist dabei ein wichtiger Faktor bei Ischämie-Reperfusionsschädigungen im Gehirn [17]. TRPC-6 wird nach ischämischer Hirnschädigung auf Neuronen weniger exprimiert und scheint demnach auch eine Bedeutung bei den pathophysiologischen Vorgängen zu haben [37]. Bei pharmakologischer Aufrechterhaltung der TRPC-6 Expression kommt es zu einer kleineren Hirnschädigung nach Ischämie als normal, was für eine protektive Rolle von TRPC-6 spricht [37]. Eine wichtige Bedeutung kommt dabei dem Transkriptionsfaktor cAMP-response-element-binding protein

(CREB) zu, welches nach TRPC-6 Aktivierung vermehrt phosphoryliert wird und so die Neuronen vor dem Zelluntergang schützt [36]. Es gibt allerdings auch Studien, die eine erhöhte Expression von TRPC-6 mit einem erhöhten bzw. einen TRPC-6 Knockdown mit einem geringeren neuronalen Schaden nach Ischämie assoziieren [36], [38]. Auch wenn die Klärung der genauen Funktion von TRPC-6 bei ischämischer Hirnschädigung noch weiterer Forschung bedarf, steht fest, dass der Kanal hierbei eine wichtige Funktion einnimmt und einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt [36].

Eine Fehlregulation der Calciumhomöostase ist nicht nur bei ischämischer Hirnschädigung ein wichtiger pathophysiologischer Vorgang, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen [39]. So steht zum Beispiel eine gestörte Calciumhomöostase im Zusammenhang mit Anzeichen von Alzheimer auf molekularer Ebene im Sinne einer  $\beta$ -Amyloid Akkumulation [40]. Die TRPC-6 Expression ist bei Alzheimer Erkrankung deutlich verringert [39]. Eine pharmakologische Aktivierung von TRPC-6 mittels Hyperforin führt bei der Erkrankung hingegen zu einer reduzierten Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid im Gehirn [40]. Grund dafür könnte eine TRPC-6 vermittelte Unterbindung der Spaltung des Amyloid precursor protein sein [39]. Für Tetrahydrohyperforin, ein Derivat des Hyperforins, konnte am Mausmodell bereits eine neuroprotektive Wirkung bei Alzheimer gezeigt werden [13].

Für Hyperforin konnte außerdem eine antidepressive Wirkung gezeigt werden [13]. Es wirkt als nichtselektiver Neurotransmitter-Wiederaufnahmehemmer und sorgt für einen Anstieg von unter anderem Serotonin, Noradrenalin und Dopamin im synaptischen Spalt [41]. Es wird angenommen, dass die Hyperforin vermittelte Aktivierung von TRPC-6 über eine vermehrte Durchlässigkeit für Natriumionen zu einem verringerten Natriumgradienten führt [11]. Dieser Gradient ist wichtig für die Wiederaufnahme von Neurotransmittern, sodass Hyperforin in diesem Fall die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt verhindert [41].

TRPC-6 spielt aber nicht nur eine Rolle in der Therapie, sondern auch in der Genese von psychiatrischen Erkrankungen [39]. Eine reduzierte Funktion von TRPC-6 führte in Studien zu einer veränderten neuronalen Entwicklung und Funktion [39]. Es konnten bereits signifikante Zusammenhänge zwischen TRPC-6 Mutationen und dem Auftreten von Autismus-Spektrum-Störungen gezeigt werden [39]. Auch im Tiermodell führte ein Knockout von TRPC-6 zu Verhaltensänderungen, die Anzeichen von Autismus beim Menschen ähneln [39]. Die Bedeutung von TRPC-6 für die neuronale Entwicklung wird in erster Linie auf das bereits angesprochene

cAMP-response-element-binding protein (CREB) zurückgeführt [41]. Es wird durch den Calciumstrom phosphoryliert und reguliert viele Gene [41].

Außerdem scheinen TRPC-6 und TRPC-3 wichtig für die Vermittlung von Sensibilität und das Hörvermögen zu sein [42]. Die Kanäle konnten nämlich in Spinalganglien und in Haarzellen der Cochlea nachgewiesen werden, wobei ein Knockdown beider Kanäle zu einer Beeinträchtigung von Sensibilität und Hörvermögen führte [42]. Unter der Annahme, dass die Heteromerbildung der TRPC-Kanäle eine Kompensationsmöglichkeit für die Funktion der Sensibilität darstellt, wurde noch eine Studie mit der gleichzeitigen Ausschaltung von TRPC-1/3/5 und 6 angeschlossen [43]. Hierbei zeigte sich, wie bereits vermutet, ein noch größeres Sensibilitätsdefizit [43].

Neben der Wahrnehmung von Sensibilität scheint TRPC-6 auch an der Vermittlung von Hyperalgesie und Nozizeption beteiligt zu sein [44], [45]. Eine Studie wurde dabei an normoglykämischen Ratten durchgeführt [44]. Bei einer anderen Studie wurde den Ratten zuerst ein Diabetes induziert [45]. Bereits die Hyperglykämie führte zu einer vermehrten TRPC-6 Expression in den Spinalganglien [45]. Die nachfolgende Gabe von Natriumhydrogensulfid zur Induktion einer Hyperalgesie führte zu einem weiteren Anstieg der TRPC-6 Expression in den Spinalganglien [45]. TRPC-6 scheint ebenfalls von Mikroglia exprimiert zu werden, deren Überaktivität eine bedeutende Rolle in der Genese von neuropathischen Schmerzen spielt [46]. Durch die intrathekale Gabe von Larixylacetat, einem selektiven TRPC-6 Inhibitor, konnte bei Ratten die durch neuropathische Schmerzen bedingte mechanische Hypersensitivität und die Kälteallodynie unterdrückt werden [46]. Unter anderem war dafür die Herabregulation von TRPC-6 in Mikroglia verantwortlich [46]. Larixylacetat könnte daher einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von neuropathischen Schmerzen darstellen [46].

Auch für grundlegende Mechanismen, wie synaptische Plastizität, hat TRPC-6 eine wichtige Relevanz [47]. Anhand dieser Auflistung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge, an denen TRPC-6 beteiligt ist, wird bereits ersichtlich, welche Bedeutung dem Kanal zukommt.

### **2.3.5 TRPC-6 und nicht neuronale Erkrankungen**

Zusätzlich zu seiner Relevanz in Nervengewebe spielt TRPC-6 auch eine wichtige pathophysiologische Rolle in anderen Bereichen des Körpers.

In Bezug auf die Niere stehen Mutationen von TRPC-6 beispielsweise im Zusammenhang mit fokal segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) [13]. Die Erkrankung führt zu einer gestörten Filterfunktion der Niere und dadurch zu einer Proteinurie [13]. Normalerweise wird TRPC-6 von Podozyten exprimiert [11]. Die Podozyten bilden zusammen mit der Schlitzmembran einen wichtigen Teil der glomerulären Filtrationsbarriere [48]. Diese ist bei FSGS beeinträchtigt [13]. Bei den Mutationen, die in FSGS resultieren, sind sowohl gain-of-function- als auch loss-of-function-Mutationen beschrieben [13]. Daraus lässt sich schließen, dass ein vermehrter Calciumeinstrom über TRPC-6 in die Podozyten zwar die Nierenfunktion schädigt, eine gewisse Aktivität von TRPC-6 allerdings trotzdem notwendig für eine normale Funktion der Podozyten sein könnte [17].

Auch bei diabetischer Nephropathie kommt TRPC-6 eine Bedeutung im Sinne einer vermehrten Expression in Podozyten zu [39]. Ein Knockdown von TRPC-6 hat hier eine schützende Wirkung auf die Podozyten bei diabetischer Nierenerkrankung [17]. In Blutgefäßen von Diabetespatienten hingegen ist die Expression von TRPC-6 herunterreguliert [11].

Im Herzen spielt TRPC-6 ebenfalls eine wichtige Rolle [39]. Vor allem an der Genese einer Myokardhypertrophie scheint der Kanal beteiligt zu sein, da er hier deutlich stärker exprimiert wird als normalerweise [49]. Eine Hypertrophie ist bedingt durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, welche infolge von vermehrter Druck- oder Volumenbelastung des Herzens auftritt [17]. Entscheidend für diesen Prozess ist ein Signalweg, der über die Dephosphorylierung des nuclear factor of activated T cells (NFAT) zu einer Aktivierung von Hypertrophiegenen führt [50]. Verantwortlich für die Dephosphorylierung ist dabei Calcineurin, welches selbst durch eine länger vorliegende erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert wird [50], [51]. Die erhöhte Calciumkonzentration ist dabei TRPC-3 und TRPC-6 vermittelt [51]. Zum einen kann eine myokardiale Dehnung einen Anstieg des Calciumspiegels nach sich ziehen [39]. Zum anderen können auch Faktoren wie Angiotensin II über Aktivierung von G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu einer erhöhten Calciumkonzentration führen und so eine Hypertrophie stimulieren [50]. An beiden Signalwegen sind TRPC-3 und TRPC-6 dabei beteiligt, wobei der Signalweg über die G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptoren bereits weiter oben beschrieben wurde [51]. TRPC-6 könnte somit ein möglicher Angriffspunkt für kardioprotektive Medikamente sein [39]. Ein TRPC-6 Inhibitor konnte im Tierversuch bereits für eine verbesserte Herzfunktion nach längerer Drucküberlastung sorgen [13]. In Bezug auf das Herz konnte außerdem gezeigt werden, dass TRPC-6 nach Myokardinfarkt bei Ratten überexprimiert

wird [39]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke von TRPC-6 in Koronarien mit deren Kontraktilität korreliert [17].

Bei Lungenerkrankungen kommt TRPC-6 ebenso eine gewisse Bedeutung zu [39]. Der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) liegt pathophysiologisch sowohl eine vermehrte Proliferation glatter Muskelzellen in den Atemwegen sowie eine vermehrte calciumabhängige Aktivierung von Alveolarmakrophagen zugrunde [39]. Die TRPC-6 Expression in den Alveolarmakrophagen ist bei COPD-Patienten dabei deutlich höher als normal [11]. Auch bei Patienten mit COVID-19 war die Expression von TRPC-6 in den Infiltraten, inflammatorisch verändertem Gewebe und fibrotischen Lungenanteilen erhöht [39]. Bei Lungenödem scheint der Kanal ebenfalls eine Rolle zu spielen [11]. Ein weiterer Mechanismus, an dem TRPC-6 beteiligt zu sein scheint, ist die hypoxische Vasokonstriktion in der Lunge [39]. Dieser physiologische Prozess wird auch Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt [52]. Er ist wichtig, um das Blut in der Lunge anstatt in minderbelüftete Bereiche in Bereiche mit normaler Sauerstoffkonzentration zu leiten [17]. Entscheidend dafür ist eine vermehrte Proliferation und Kontraktion von glatten Muskelzellen in der Lunge [39]. Dabei kommt es zu einem vermehrten Calciumeinstrom über TRPC-6 in die glatten Muskelzellen [39]. Hält die Hypoxie an, kommt es zusätzlich zu einer vermehrten Expression von TRPC-6 in den Zellen [39]. Auch bei idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertension könnte der Kanal eine wichtige Funktion haben [52]. Hierbei kommt es zu einem Umbau der Lungengefäße und zu einer Proliferation von pulmonalerarteriellen glatten Muskelzellen [52]. Die TRPC-6 Expression in der Lunge ist bei dieser Krankheit deutlich erhöht [52]. Durch Inhibition der Genexpression von TRPC-6 konnte die Proliferation dieser pulmonalerarteriellen glatten Muskelzellen deutlich verringert werden [52].

Zuletzt könnte TRPC-6 auch einen wichtigen Angriffspunkt in der Tumorthherapie darstellen [17]. Insbesondere bei Brustkrebs spielt der Kanal eine wichtige Rolle, was aufgrund der Wichtigkeit der Calciumsignalwege bei dieser Tumorentität wenig verwunderlich ist [39]. Auch bei Prostatakrebs ist der Kanal von Bedeutung, da ein erhöhter Calciumeinstrom über TRPC-6 für eine schnellere Proliferation von Prostatakrebszellen sorgt [39]. Durch eine Ausschaltung des Kanals konnte dies unterbunden werden [39]. Außerdem konnte durch eine Vitamin-D Supplementation diese durch TRPC-6 vermittelte calciumbedingte Progression der Krebszellen reduziert werden [13]. Der Kanal wird weiterhin mit einer Reihe von anderen Tumorarten wie beispielsweise Malignomen von Niere, Ösophagus, Lunge oder Ovarien in Verbindung gebracht [39].

## 2.4 Aufbau peripherer Nerven

Die peripheren Nerven bilden sich ausgehend von Fasern des zentralen Nervensystems und lassen sich in Hirnnerven und Spinalnerven unterteilen, welche sich wiederum weiter in kleinere Äste verzweigen [53]. Der Aufbau dieser peripheren Nerven ist jedoch in fast allen Bereichen des Körpers ähnlich [53]. Da sich diese Arbeit mit dem N. ulnaris und dem N. ischiadicus als repräsentative Vertreter der peripheren Nerven befasst, soll nun als Nächstes auf die Anatomie und den Verlauf dieser beiden Nerven eingegangen werden.

### 2.4.1 N. ulnaris

Der Verlauf des N. ulnaris wurde detailliert von Schünke et al. [54] und Möll et al. [55] beschrieben und lässt sich wie folgt darstellen. Es ist ein Nerv der oberen Extremität, der einen Endast des Plexus brachialis darstellt. Dabei handelt es sich um ein Nervengeflecht, das sich vor allem aus den ventralen Ästen der Spinalnerven von den Rückenmarkssegmenten C5 - Th1 zusammensetzt. Diese auch Rr. ventrales genannten Nerven vereinigen sich zunächst lateral der hinteren Skalenuslücke zu drei Primärsträngen. Man unterscheidet hier einen Truncus superior (C5 und C6), Truncus medius (C7) und Truncus inferior (C8 - Th1). Dorsal der Clavicula teilen diese sich wiederum in drei vordere und drei hintere Divisiones auf, welche sich schließlich dorsal des M. pectoralis minor zu drei Sekundärsträngen vereinigen. Diese werden auch Faszikel genannt. Je nach Lage zu ihrer Leitstruktur, der A. axillaris, unterscheidet man hier Fasciculus lateralis, medialis und posterior. Anhand der abgehenden Äste lässt sich der Plexus brachialis zusätzlich in eine Pars supraclavicularis und eine Pars infraclavicularis unterteilen. Bei der Pars supraclavicularis handelt es sich um vier Nerven, die direkt aus den ventralen Ästen der Spinalnerven oder den Trunci entspringen (N. dorsalis scapulae, N. thoracicus longus, N. suprascapularis, N. subclavius). Bei der Pars infraclavicularis hingegen unterscheidet man die abgehenden Nerven nochmals in kurze und lange Äste. Die kurzen Äste verlassen den Plexus brachialis bereits auf Höhe der Faszikel (N. subscapularis, N. thoracodorsalis, Nn. pectorales medialis und lateralis, N. cutaneus brachii medialis, N. cutaneus antebrachii medialis, Nn. intercostobrachiales), während es sich bei den langen Ästen um die Endaufzweigungen der Faszikel handelt (N. musculocutaneus, N. axillaris, N. radialis, N. medianus, N. ulnaris).

Da es sich bei dem relevanten Nerv für diese Arbeit um den N. ulnaris handelt, soll dessen weiterer Verlauf zusätzlich explizit erläutert werden. Der N. ulnaris enthält Anteile der Rückenmarkssegmente C8 - Th1 und geht aus dem Fasciculus medialis hervor. Zunächst zieht er im Sulcus bicipitalis medialis des Oberarms, bevor er das Septum intermusculare mediale durch-

bricht und die Flexorenloge verlässt. Anschließend verläuft er in der Extensorenloge bis zum Sulcus n. ulnaris auf der medialen Seite des Ellenbogengelenks. Hier ist er zwischen Epicondylus medialis des Humerus und Olecranon der Ulna oberflächlich gut tastbar. Im weiteren Verlauf tritt er zwischen den beiden Köpfen des M. flexor carpi ulnaris hindurch. Dieser dient als Leitstruktur, da der N. ulnaris unter dem genannten Muskel bis zum Handgelenk zieht. Auf seinem Weg gibt er noch direkte Äste zur Innervation des M. flexor carpi ulnaris sowie dem ulnaren Anteil des M. flexor digitorum profundus ab. Außerdem gibt er noch einen R. palmaris zur sensiblen Innervation der ulnaren Hohlhand und einen R. dorsalis zur sensiblen Innervation der Streckseite der ulnaren Finger ab, bevor er auf dem Retinaculum musculorum flexorum am Handgelenk durch die Guyon-Loge zieht. Hier teilt sich der N. ulnaris in einen zur Palmarfläche verlaufenden R. superficialis und einen R. profundus, der gemeinsam mit dem Arcus palmaris profundus in die Tiefe der Hohlhand zieht. Der R. superficialis ist vor allem für die sensible Innervation der Beugeseite der ulnaren Finger verantwortlich und hat lediglich einen motorischen Ast, mit dem er den M. palmaris brevis innerviert. Der R. profundus hingegen ist ein rein motorischer Ast und ist für die Innervation von M. abductor digiti minimi, M. flexor digiti minimi brevis, M. opponens digiti minimi, Mm. lumbricales III und IV, Mm. interossei palmares und dorsales, M. adductor pollicis und M. flexor pollicis brevis (Caput profundum) verantwortlich.

#### **2.4.2 N. ischiadicus**

Auch die Anatomie des N. ischiadicus wurde durch Schünke et al. [56] und Moll et al. [57] genaustens dargelegt und wird im Folgenden erläutert. Es ist ein Nerv der unteren Extremität, der aus dem Plexus sacralis hervorgeht. Dieser ist Teil des größeren Plexus lumbosacralis, der in erster Linie für die nervale Innervation der unteren Extremität verantwortlich ist. Der Plexus lumbosacralis wiederum lässt sich in einen Plexus lumbalis und einen Plexus sacralis unterteilen. Der Plexus lumbalis setzt sich aus den Rr. ventrales der Spinalnerven Th12 - L4 zusammen, wohingegen der Plexus sacralis seine Nerven aus den ventralen Ästen der Rückenmarkssegmente L5 - S1 bezieht. Zusätzlich gibt es einen Verbindungsast, der Faseranteile von L4 zum Plexus sacralis hinzuführt. Dieser wird auch Truncus lumbosacralis genannt. Der Plexus lumbalis teilt sich schlussendlich in sechs Nerven auf, die vor allem zur Bauchwand und Oberschenkelvorderseite ziehen. Dabei handelt es sich um den N. iliohypogastricus, N. ilioinguinalis, N. genitofemoralis, N. cutaneus femoris lateralis, N. obturatorius und N. femoralis. Der Plexus sacralis hingegen verläuft ausgehend vom Os sacrum auf dem M. piriformis und zieht mit seinen Endästen entweder oberhalb oder unterhalb von diesem Muskel auf die Oberschen-

kelrückseite. Vorher gibt er noch einige direkte Äste an die *Mm. gemelli*, den *M. obturatorius internus*, *M. quadratus lumborum* und den *M. piriformis* selbst ab. Insgesamt gehen fünf Nerven aus dem Plexus sacralis hervor. Der *N. gluteus superior* tritt als einziger Nerv oberhalb des *M. piriformis* durch das Foramen suprapiriforme und versorgt dort den *M. gluteus medius* und *minimus*, sowie den *M. tensor fasciae latae*. Alle anderen Nerven des Plexus sacralis ziehen durch das Foramen infrapiriforme unterhalb des *M. piriformis* und gelangen so auf die Oberschenkelrückseite. Während der *N. gluteus inferior* dort nach seinem Durchtritt den *M. gluteus maximus* versorgt, zieht der *N. pudendus* einmal dorsal der Spina ischiadica entlang und verläuft dann im Alcock-Kanal, einer Fasienduplikatur des *M. obturatorius internus*, wieder nach ventral, um dort motorisch die Beckenbodenmuskulatur und sensorisch den Intimbereich zu innervieren. Lediglich der *N. ischiadicus* und der *N. cutaneus femoris posterior*, der im weiteren Verlauf die Rückseite des Oberschenkels sensibel versorgt, ziehen nach ihrem Durchtritt durch das Foramen infrapiriforme nach kaudal.

Da im Hinblick auf die untere Extremität im Fall dieser Studie der *N. ischiadicus* von Relevanz ist, soll dessen Verlauf an dieser Stelle auch gesondert herausgearbeitet werden. Nach seinem Durchtritt durch das Foramen infrapiriforme verläuft der *N. ischiadicus* zunächst unter dem *M. gluteus maximus* und zieht zwischen dem Tuber ischiadicum und dem Trochanter major des Femurs nach kaudal. Danach zieht er unter dem *M. biceps femoris* hindurch und gelangt schließlich in die Fossa poplitea. Während seines Verlaufs bis zur Kniekehle teilt sich der *N. ischiadicus* in einen *N. tibialis* und einen *N. fibularis communis* auf. Die Höhe dieser Aufteilung ist jedoch von Mensch zu Mensch variabel. Die Nervenfasern dieser beiden Nerven liegen meistens schon vorher getrennt vor, teilen sich jedoch eine Bindegewebshülle, sodass sie makroskopisch nicht voneinander differenziert werden können. Bereits im Oberschenkelbereich innervieren Äste des Tibialisanteils des *N. ischiadicus* den *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, Teile des *M. adductor magnus* und das Caput longum des *M. biceps femoris*, während der Fibularisanteil hier lediglich das Caput breve des *M. biceps femoris* innerviert.

Nach der Aufteilung des *N. ischiadicus* verläuft der *N. tibialis* zunächst oberhalb von *V. und A. poplitea* durch die Kniekehle und zieht dann unter den *M. gastrocnemius*, an den er motorische Äste abgibt. Außerdem innerviert er den *M. popliteus*, *M. plantaris* sowie den *M. soleus*, bevor er durch den Arcus tendineus musculi solei in die tiefe Flexorenloge eintritt. Hier versorgt er den *M. flexor hallucis longus*, *M. flexor digitorum longus* sowie den *M. tibialis posterior* mit motorischen Ästen und zieht in Begleitung der *A. tibialis posterior* bis hinter den Malleolus medialis. Hier tritt er durch den Tarsaltunnel und teilt sich dabei in einen *N. plantaris medialis*

und lateralis auf. Der N. plantaris lateralis zieht im weiteren Verlauf gemeinsam mit der A. plantaris lateralis unter dem M. flexor digitorum brevis zur Fußaußenseite. Analog zur Innervation der Handmuskulatur versorgt er hier den M. adductor hallucis, das Caput laterale des M. flexor hallucis brevis, den M. abductor digiti minimi, den M. flexor digiti minimi brevis, den M. opponens digiti minimi, die Mm. interossei plantares und dorsales sowie die Mm. lumbricales III und IV. Zusätzlich innerviert der N. plantaris lateralis am Fuß noch den M. quadratus plantae. Der N. plantaris medialis verläuft unter dem M. abductor hallucis zur medialen Fußsohle, wo er das Caput mediale des M. flexor hallucis brevis, den M. flexor digitorum brevis, den M. abductor hallucis und die Mm. lumbricales I und II motorisch innerviert.

Der N. fibularis communis zieht nach der Aufteilung des N. ischiadicus nach lateral und verläuft am medialen Rand des M. biceps femoris entlang durch die Kniekehle bis zum Fibulaköpfchen. Dort umläuft er das Collum fibulae, um nach ventral zu gelangen und tritt schließlich in den M. fibularis longus. Hier teilt sich der Nerv in einen N. fibularis superficialis und einen N. fibularis profundus auf. Der N. fibularis superficialis bleibt in der Fibularisloge und zieht nach kaudal. Auf seinem Weg innerviert er sowohl den M. fibularis longus als auch den M. fibularis brevis motorisch. Schließlich tritt er im Bereich des unteren Unterschenkels durch die Fascia cruris nach außen, um zum Fußrücken zu ziehen. Der N. fibularis profundus hingegen tritt direkt nach der Aufteilung durch das Septum intermusculare cruris anterior in die Extensorenloge. Hier innerviert er den M. tibialis anterior, den M. extensor hallucis longus und den M. extensor digitorum longus motorisch. Der Nerv zieht gemeinsam mit der A. tibialis anterior zwischen M. extensor hallucis longus und M. tibialis anterior nach kaudal. Dort gelangt er ebenfalls zum Fußrücken, wo er mit der A. dorsalis pedis verläuft und zusätzlich den M. extensor hallucis brevis und den M. extensor digitorum brevis versorgt.

Neben der motorischen Versorgung der oben genannten Muskeln, spielt der N. ischiadicus auch eine wichtige Rolle bei der sensiblen Innervation der unteren Extremität. Sowohl der N. tibialis als auch der N. fibularis communis geben auf Höhe der Kniekehle einen sensiblen Ast ab. Beim N. tibialis handelt es sich dabei um den N. cutaneus surae medialis und beim N. fibularis communis um den N. cutaneus surae lateralis. Diese beiden Nervenäste vereinigen sich schließlich über einen R. communicans zum N. suralis, der zusammen mit der V. saphena parva verläuft und zum lateralen Fußrand zieht. Die verschiedenen Äste sind für die sensible Innervation von Unterschenkelrück- und außenseite sowie lateralem Fuß- und Fersenrand verantwortlich. Der N. tibialis ist mit seinen Endästen weiterhin für die sensible Versorgung der Fußsohle verantwortlich. Die Innervation des Großteils des Fußrückens hingegen erfolgt durch den N. fibularis

superficialis. Lediglich der erste Interdigitalraum wird durch den N. fibularis profundus sensibel versorgt.

### 2.4.3 Histologie

Ähnlich wie bei anderen Organen, lassen sich im Fall von peripheren Nerven Stroma und Parenchym unterscheiden [53]. Das Parenchym besteht dabei aus Nervenfasern, welche sich aus den Axonen und den Myelinscheiden, die die Axone ummanteln, zusammensetzen [58]. Das Myelin wird im peripheren Nervensystem dabei von Schwann-Zellen produziert [59]. Je nachdem, ob die Axone von Myelinscheiden umgeben sind oder nicht, unterscheidet man zwischen myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern [60]. Das Stroma der peripheren Nerven besteht vor allem aus Bindegewebe, das die Fasern umgibt [53]. Die einzelnen Nervenfasern sind dabei zunächst in Endoneurium eingebettet [58]. Dieses wiederum wird von Perineurium umgeben, das die Nervenfasern in mehrere Nervenfaserbündel unterteilt [58]. Die äußerste Schicht bildet dann das Epineurium, in dem auch Blutgefäße verlaufen, die die Nerven versorgen [53].

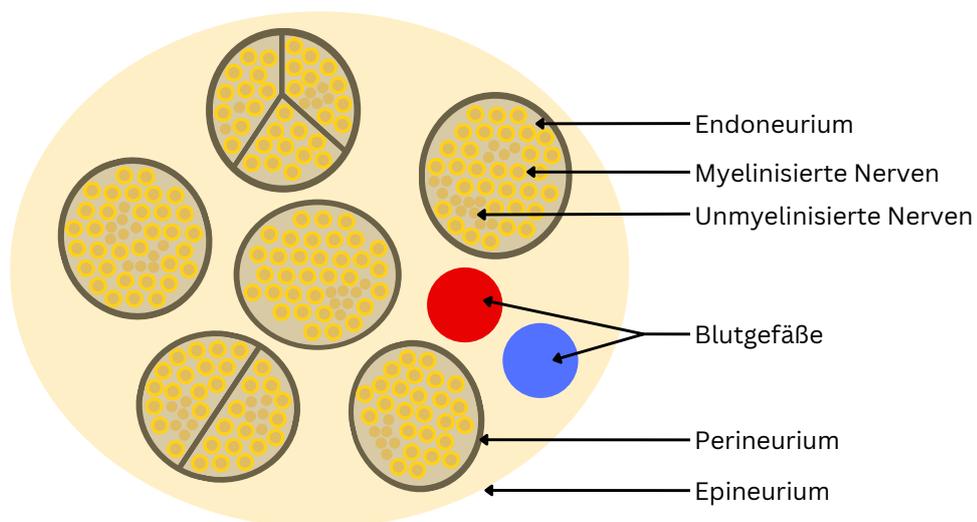


Abbildung 4: Querschnitt Nerv

## 2.5 Ziele der Arbeit

Wie bereits erwähnt, wird TRPC-6 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert [15]. Im Hinblick auf das Nervengewebe wurde der Kanal bereits in einer Vielzahl von Regionen des zentralen Nervensystems nachgewiesen [37]. In Bezug auf das periphere Nervensystem konnte bereits gezeigt werden, dass TRPC-6 in dorsalen Spinalganglien exprimiert wird [61]. Bisher gibt es

jedoch keine wissenschaftliche Arbeit zum Vorkommen von TRPC-6 in den peripheren Nerven. Diese bestehen zwar unter anderem aus den Axonfortsätzen der sensorischen Neuronen der Spinalganglien, beinhalten jedoch auch motorische Nervenfasern von Neuronen aus dem Rückenmark [53].

Ein weiterer Schwachpunkt in der bisherigen Datenlage liegt darin begründet, dass die meisten Nachweise von TRPC-6 an Tieren wie beispielsweise Ratten erfolgt sind [45], [46], [62], [63]. Auch wenn im Fall der dorsalen Spinalganglien tatsächlich schon mal menschliche Proben analysiert wurden [64], ist die Arbeit mit humanem Gewebe aufgrund der erschwerten Verfügbarkeit deutlich seltener und daher nur vereinzelt vorhanden.

Zudem stützen sich die Nachweise von TRPC-6 häufig auf Methoden wie PCR und Western Blot [15], [44]. Die Immunhistochemie bietet hingegen den Vorteil, dass man anhand des histologischen Schnitts Rückschlüsse auf die Lokalisation des zu untersuchenden Antigens im jeweiligen Gewebe ziehen kann [65].

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, den Nachweis von TRPC-6 in menschlichen peripheren Nerven zu erbringen. Als Methode soll dabei die Immunhistochemie dienen, um auf mögliche Differenzen in der Kanalexpression in verschiedenen Gewebeabschnitten eingehen zu können. Als zentrale Fragestellung dieser Studie können dabei folgende Unterpunkte formuliert werden:

1. Ist TRPC-6 mittels Immunhistochemie in menschlichen peripheren Nerven nachweisbar?
2. Gibt es Unterschiede in der Kanalexpression im Hinblick auf bestimmte Gewebeabschnitte?
3. Gibt es Unterschiede in der Kanalexpression zwischen den ausgewählten Nerven?

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

*Tabelle 1: Verwendete Geräte*

Gerät	Hersteller
Karussell Gewebeeinbettautomat MTP	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin Ausgießstation (MPS/P1)	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Kühlplatte (MPS/C)	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Paraffin-Streckbad	Ref.: 1052; Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Objektträgerwärmeplatte W10	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrotom (Microm RM 2025)	Heidelberg Instruments, Heidelberg, Deutschland
Digitaler Inkubator VWR INCU-Line IL 56	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärme-/Trockenschrank VT6025	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
UHP-Einkanalpipetten	VWR International, Pennsylvania, USA
Vortexmischer	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Lichtmikroskop Leica	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien

*Tabelle 2: Verwendete Chemikalien*

Chemikalie	Hersteller
NEP-Lösung nach Weigner	Ref.: 27796; Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	Ref.: 27244; Otto Fischar GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland
Roti®fair 10 x PBS 7.4	Ref.: 1105.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol 97 %	Ref.: 700212; Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Menthylbenzoat 99 %	Acros Organics B.V.B.A., New Jersey, USA
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxylin nach Ehrlich	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Eosin 0,1 %	Zentrales Chemikalienlager Universität des Saarlandes (ZChL), Saarbrücken, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Citrat-Puffer	Ref.: ab93678; Abcam, Cambridge, Großbritannien
NGS	Ref.: G6767; Sigma Aldrich, Zentr. ChL.
Kaninchenserum	Life Technologies, Carlsbad, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAB	Ref.: SK-4103; Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 3.1.3 Antikörper

*Tabelle 3: Verwendete Antikörper*

Material	Hersteller
Primärantikörper (Anti-TRPC-6 Antibody)	Ref.: ACC017; Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Sekundärantikörper (Anti-rabbit HRP)	Ref.: A10547; Invitrogen, Carlsbad, USA

### 3.1.4 Sonstige Materialien

*Tabelle 4: Sonstige verwendete Materialien*

Material	Hersteller
Sterile Skalpellklingen Nr.22	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Anatomische Pinzette 14,5 cm	Schreiber Instrumente GmbH, Fridingen, Deutschland
Chirurgische Pinzette 13,5 cm	Schreiber Instrumente GmbH, Fridingen, Deutschland
Inzisionsschere Gerade 13 cm	Schreiber Instrumente GmbH, Fridingen, Deutschland
Feilchenfeld Splitterpinzette 11,5 cm	Schreiber Instrumente GmbH, Fridingen, Deutschland
Sektionsnadel PM/S-1	Ref.: 14.69.41; Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland
Einbettkassetten	Ref.: M512; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Einbettringe	Ref.: M460; Simport Scientific Inc., Bernard-Pilon Beloeil, Kanada
Mikrotomklingen	Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Ref.: 1110022A; Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland

Material	Hersteller
Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Filterpapiere	Ref.: 534018; Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eindeckmedium Roti-HistoKitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DakoPen Fettstift	Ref.: S200230-2; Agilent, Glostrup, Dänemark
Feuchtekammer	Ref.: 21049-B; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland

## 3.2 Methoden

Alle der im folgenden Abschnitt beschriebenen Handlungen mit Ausnahme der Leichenfixierung wurden in Eigenregie durchgeführt.

### 3.2.1 Daten der Körperspender

Die Entnahme der Proben erfolgte an fixierten Körperspendern des anatomischen Instituts in Homburg. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Nerven an insgesamt acht fixierten Präparaten entnommen. Die nachfolgenden Tabellen sollen eine Übersicht über verschiedene Daten der Körperspender geben.

*Tabelle 5: Übersicht über die Körperspender*

Spender	Alter	Tage bis Fixierung	Geschlecht
1	79	1	weiblich
2	89	6	weiblich
3	90	2	weiblich
4	91	1	weiblich
5	95	2	weiblich
6	104	2	weiblich
7	86	2	weiblich
8	97	2	weiblich

*Tabelle 6: Gesundheitsdaten der Körperspender*

Spender	Vorerkrankungen	Todesursache
1	Arterielle Hypertonie, Zustand nach Begleiturosepsis	Multiorganversagen durch respiratorische Globalinsuffizienz durch Tumoranämie durch Plasmazelleukämie
2		Exsikkose durch Nierenversagen durch Immobilitätssyndrom durch Subduralhämatom links
3	Koronare Herzerkrankung, Zustand nach Schrittmacherimplantation	Verbrauchskoagulopathie bei Verdacht auf Mesenterialarterienembolie durch Vorhofflimmern durch Angiosklerose

Spender	Vorerkrankungen	Todesursache
4	Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus Typ 2	Hochgradige Aortenklappenstenose
5		Akute Gastroenteritis bzw. Exsikkose, Herzinsuffizienz, dadurch Verschlechterung des Allgemeinzustandes bzw. Multiorganversagen
6	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	Kardiale Rhythmusstörung, Verdacht auf Tachyarrhythmia absoluta und Herzinsuffizienz bei koronarer Herzerkrankung
7		Pneumonie durch hydropische Dekompensation bei chronischer Niereninsuffizienz
8	Chronisches Schmerzsyndrom, Herzinsuffizienz, Aorten- und Mitralklappeninsuffizienz	Multiorganversagen durch Zustand nach Ablatio mammae durch Mammakarzinom rechts

### 3.2.2 Fixierung der Leichen

Bei den Körperspendern handelte es sich in diesem Fall ausschließlich um Präparate, die mittels NEP fixiert wurden. Der genaue Fixiervorgang soll im Folgenden näher erläutert werden.

Nach Eintreffen eines neuen Körperspenders erfolgte zunächst die vollständige Entkleidung und ein Wiegen des Leichnams. Daran schloss sich eine umfassende Rasur der Behaarung von Kopf und Körper an. Um eine spätere Identifizierung der Körperspender zu gewährleisten, wurden außerdem kleine Schildchen mit einer Journalnummer versehen und an mehreren Stellen am Körper angebracht. Die Zusammensetzung der Fixationslösung für die anschließende NEP-Fixierung kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 7: NEP-Fixierung nach Weigner

Stoffname	Gewichtsprozent
Ethanol	25 - <35
Polyethylenglykol	10 - <25
Formaldehyd	0,1 - <1
Methanol	0,1 - <1
Demineralisiertes Wasser	Vom Hersteller nicht näher definiert
Nitrit-Pökelsalz	Vom Hersteller nicht näher definiert

Insgesamt wurden für eine Fixierung zwischen 10 l und 15 l der oben genannten Lösung benötigt. Zunächst wurde dafür die rechte A. femoralis freigelegt. Dann wurden Venenkanülen sowohl kranial als auch kaudal in das Gefäß eingeführt und mithilfe von Klemmen fixiert. Die anschließende Injektion der Lösung erfolgte bei einem Druck von 1,5 - 2,0 bar. Zum Schluss wurden noch Nachinjektionen an der oberen und unteren Extremität sowie der Regio glutealis, Regio nuchae und der Finger- und Zehenbeeren vorgenommen. Nachdem die innere Fixierung abgeschlossen war, erfolgte die äußere Fixierung. Dafür wurden die Körperspender für mindestens vier Monate in eine 3 - 5-prozentige Formalinlösung verbracht. Danach wurden sie luft- und wasserdicht verschweißt und so bis zur Anwendung aufbewahrt.

### 3.2.3 Auswahl der Proben und Probenentnahme

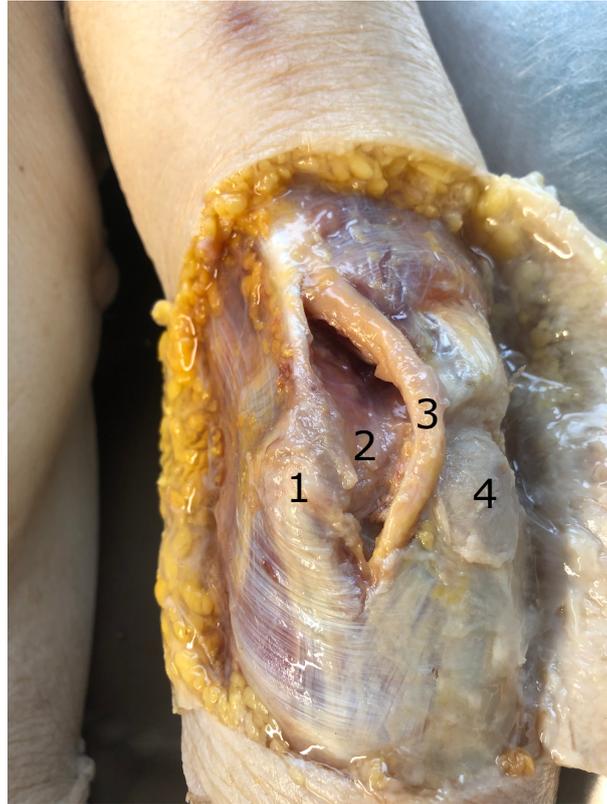
Um eine repräsentative Probenentnahme für den Nachweis von TRPC-6-Kanälen in peripherem Nervengewebe zu gewährleisten, wurde sowohl ein Nerv der oberen Extremität als auch ein Nerv der unteren Extremität ausgewählt. Bei der oberen Extremität handelte es sich dabei um den N. ulnaris und bei der unteren Extremität um den N. ischiadicus.

Insgesamt wurden Proben von acht Körperspendern entnommen. Dabei wurden jeweils beide Nerven rechtsseitig an einer ausgewählten Entnahmestelle bei allen Körperspendern entnommen. Zusätzlich wurden die beiden Nerven viermal linksseitig entnommen, um einen Seitenvergleich zu erhalten.

Als Entnahmestelle wurde für den N. ulnaris der Sulcus nervi ulnaris im Bereich des Ellenbogens gewählt, da dieser anatomisch relativ leicht zugänglich ist. Für den N. ischiadicus fiel die Entscheidung für die Entnahmestelle auf den Bereich proximal der Aufteilung in N. tibialis und N. fibularis. Dabei wurde immer ein größeres Stück Nerv entnommen, welches dann an einem separaten Arbeitstisch in vier kleinere ca. 1 cm lange Teile zerlegt wurde. Diese wurden daraufhin in zwei kleine Plastik Käfige verbracht, wobei einer für die Nervenlängs- und einer für die Nervenquerschnitte bestimmt war. Hierbei waren jeweils zwei Proben pro Käfig vorgesehen, um im Falle einer Nichtverwertbarkeit eine Probe als Rücklage zu haben. Die Käfige wurden vorher bereits mit Journalnummer des Körperspenders, Art des entnommenen Nervs, Entnahmeseite und geplanter histologischer Schnitthanfertigung beschriftet, um eine Probenverwechslung zum späteren Zeitpunkt zu vermeiden. Um eine gute Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden die Proben immer nach demselben Vorgehen und an der gleichen Stelle herauspräpariert. Dieses Vorgehen wird im Folgenden näher beschrieben.

Sowohl für die Präparation des N. ulnaris als auch für die Entnahme des N. ischiadicus war eine Bauchlagerung der Körperspender erforderlich.

Für die Präparation des N. ulnaris wurde zunächst das Olecranon getastet. Anschließend wurde ein etwa 10 cm langer vertikal verlaufender Hautschnitt gelegt. Die Inzision wurde ungefähr 5 cm proximal des Olecranons begonnen, verlief über den genannten Knochenpunkt und endete ca. 5 cm distal von diesem. Dadurch wurde die Gefahr einer Verletzung des N. ulnaris, der medial des Olecranons verläuft, minimiert. Als Nächstes wurden die Schnittländer erweitert und die Haut vorsichtig vom Fettgewebe getrennt. Dieses wurde im nächsten Schritt entfernt, sodass die darunterliegenden Faszien zum Vorschein kamen. Daraufhin wurde der N. ulnaris im Sulcus nervi ulnaris getastet und in Richtung des Olecranon geschoben. So konnte man medial des Nervs die Faszien und Muskeln eröffnen, ohne Gefahr zu laufen den N. ulnaris zu verletzen. Wenn man schließlich den N. ulnaris dargestellt hatte, wurde er vorsichtig aus dem Sulcus herausgelöst und noch von Fettgewebe befreit. Außerdem wurde er sowohl nach kranial verfolgt als auch kaudal bis zu seinem Durchtritt zwischen dem Caput humerale und Caput ulnare des M. flexor carpi ulnaris dargestellt, um ein angemessen großes Stück entnehmen zu können.



*Abbildung 5: Präparation N. ulnaris*

*Ansicht eines rechten Arms von dorsal vor Probenentnahme. Der bereits etwas herausgelöste N. ulnaris (3) verläuft zwischen dem Epicondylus medialis (1) und dem Olecranon (4) durch den Sulcus nervi ulnaris (2).*

Bei der Präparation des N. ischiadicus wurde als erstes die Glutealfalte aufgesucht. Von hier aus erfolgte ein mittiger Sagittalschnitt nach kaudal bis etwa 5 cm über die Kniekehle hinaus. Anschließend erfolgte am oberen und unteren Schnittpunkt eine weitere quer verlaufende Inzision über den gesamten hinteren Oberschenkel. Als Nächstes wurde die Haut vom darunter liegenden Fettgewebe separiert und buchartig zu beiden Seiten aufgeklappt. Das nun sichtbare Unterhautfettgewebe wurde dann grob entfernt, sodass die darunter liegende dorsale Oberschenkelfaszie zum Vorschein kam. Hier erfolgte erneut eine sagittale Inzision über die Länge des gesamten Oberschenkels mit anschließender T-förmiger Schnittführung, wie es schon bei der Haut der Fall war. Sie wurde mittels Inzisionsschere vorgenommen, um das darunter liegende Gewebe zu schonen. Danach wurde die Haut ebenfalls zu beiden Seiten hin aufgeklappt. Der Blick fiel nun auf die dorsale Oberschenkelmuskulatur. Außerdem waren je nach Körperfettverhältnissen der Körperspender in der Fossa poplitea bereits Anteile des N. ischiadicus oder sogar der A. und V. poplitea sichtbar. Hier wurde dann überschüssiges Fettgewebe entfernt, um die Äste des N. ischiadicus als am oberflächlichsten laufende Strukturen darzustellen. Von der Kniekehle ausgehend wurde der N. ischiadicus nach kranial verfolgt, bis man die Stelle

seiner Aufteilung in N. fibularis communis und N. tibialis sehen konnte. Dazu war es nötig, die eng aneinander liegenden Muskelbäuche der ischiocruralen Muskulatur mit den Händen auseinander zu trennen. Das Caput longum des M. biceps femoris wurde nach lateral und der M. semimembranosus mit darauf liegendem M. semitendinosus nach medial verlagert, sodass man in der Mitte des dorsalen Oberschenkels den N. ischiadicus darstellen konnte. Oberhalb der Aufteilung wurde der Nerv dann noch etwas nach kranial hin freipräpariert, um schließlich ein ausreichend großes Stück Nervengewebe entnehmen zu können.



*Abbildung 6: Präparation N. ischiadicus*

*Ansicht eines linken Oberschenkels von dorsal vor Probenentnahme. Der N. ischiadicus (1) teilt sich von kranial kommend auf in N. fibularis (2) und N. tibialis (3). Lateral davon liegt der lange Kopf des M. biceps femoris (4) und medial davon die restlichen Anteile der ischiocruralen Muskulatur (5) bestehend aus M. semimembranosus und M. semitendinosus.*

Im Anschluss an jede Präparation wurden die Entnahmestellen mittels Nahtmaterial verschlossen, um die Körperspender in einem möglichst pietätvollen Zustand zu hinterlassen.

### 3.2.4 Anfertigung histologischer Schnitte

Nach der Entnahme wurden die Proben in den Plastikkäfigen bei 4 °C im Kühlschrank in einer 4-prozentigen Formaldehydlösung über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden sie dann in PBS überführt und darin ebenfalls bei 4 °C für mindestens weitere 24 Stunden gelagert. Für die Einbettung in Paraffin wurden die Proben dann zunächst für 3 Stunden in eine Box unter fließendes Leitungswasser und anschließend in eine 70-prozentige 2-Propanol-Lösung verbracht, wo sie weitere 3 Stunden verblieben. Daraufhin schloss sich die automatische Gewebeeinbettung im sogenannten Karussell Gewebeeinbettter an. Dabei handelt es sich um ein Gerät, das die Proben nach Einstellung des richtigen Programms automatisiert von Lösung zu Lösung befördert, sodass man die Präparate nicht jedes Mal von Hand überführen muss. Das ausgewählte Programm hatte eine Dauer von 17 Stunden und 30 Minuten. Dabei verweilten die Proben zunächst für 3 Stunden in 70-prozentiger 2-Propanol-Lösung und darauffolgend für jeweils 1,5 Stunden in 80-prozentiger und dann in 90-prozentiger 2-Propanol-Lösung. Danach verblieben sie zweimal für jeweils 1,5 Stunden in 100-prozentiger 2-Propanol-Lösung. Dieser Vorgang diente der Entwässerung. Nachfolgend kamen die Proben dreimal nacheinander für je 1,5 Stunden in Methylbenzoat und zum Schluss noch zweimal für je 2 Stunden in Paraffin. Dadurch wurden die Räume im Gewebe, die vorher von Wasser eingenommen waren, mit Paraffin aufgefüllt. Der genaue Ablauf kann nochmals anhand der nachfolgenden Tabelle rekapituliert werden.

*Tabelle 8: Übersicht über die Stationen am Gewebeeinbettautomat*

Station	Lösung	Verweildauer in Stunden
1.	70% 2-Propanol	3
2.	80% 2-Propanol	1,5
3.	90% 2-Propanol	1,5
4.	100% 2-Propanol	1,5
5.	100% 2-Propanol	1,5
6.	Methylbenzoat	1,5

Station	Lösung	Verweildauer in Stunden
7.	Methylbenzoat	1,5
8.	Methylbenzoat	1,5
9.	Paraffin	2
10.	Paraffin	2

Nachdem der Automat durchgelaufen war, schloss sich nun das Ausgießen der Präparate in Paraffinblöckchen an. Dies wurde an einer Ausgießstation durchgeführt. Die Proben sollten nach Durchlauf durch das Karussell zeitnah weiterverarbeitet werden. Daher musste man die Ausgießstation bereits vorher anschalten, da sich das Paraffin darin erst verflüssigen musste. Zur besseren Organisation dieses Ablaufs wurde deshalb eine Zeitschaltuhr verwendet. Die Kassetten mit den einliegenden Proben wurden nun aus dem Gewebereinbettomat in einen Behälter mit flüssigem Paraffin überführt, wo sie bis zum Ausgießen verblieben. Nacheinander wurden die Proben entnommen und in Blöckchen gegossen. Dafür wurde zunächst der Boden eines Ausgießförmchens mit Paraffin bedeckt. Im Anschluss daran wurde das Präparat mithilfe von zwei Präpariernadeln mittig in dem Förmchen platziert. Hierbei war es wichtig, auf die richtige Ausrichtung zu achten, da dies den Anschnitt der späteren histologischen Schnitte bestimmte. Für die Längsschnitte musste der Nerv dabei flach in dem Förmchen liegen, wohingegen er für einen Querschnitt aufrecht hingestellt werden musste. Daraufhin wurde das Förmchen kurz auf eine Kälteplatte gestellt, um das Präparat in seiner Position zu fixieren. Dann wurde ein Einbettring aufgesetzt, auf dem der Präparatname und die Journalnummer des Körperspenders vermerkt wurde. Durch ein Loch in der Mitte des Einbettrings wurde das Förmchen nun sukzessive mit Paraffin aufgefüllt und zwischendrin immer wieder auf eine Kälteplatte gestellt. Wenn das Förmchen samt Einbettring vollständig mit Paraffin ausgefüllt war, wurde es schließlich so lange auf die Kälteplatte verbracht, bis das Paraffin ausgehärtet war. Die fertigen Paraffinblöckchen wurden zum Schluss in einer Box im Kühlschrank gelagert, um die Bedingungen für die nachfolgende Schnitthanfertigung zu optimieren.

Für die sich anschließende Anfertigung histologischer Schnitte aus den zuvor gefertigten Paraffinblöckchen wurde ein Mikrotom benutzt. Zu Beginn wurde ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad bereitgestellt, dessen Temperatur mittels Thermometer überwacht wurde. Außerdem

wurde eine nebenstehende Heizplatte eingeschaltet, die ebenfalls eine Temperatur von 37 °C hatte. Nach der Vorbereitung begann die Schnittanfertigung. Dazu wurde immer ein Paraffinblöckchen aus der Box im Kühlschrank entnommen und in das Mikrotom eingespannt. Mithilfe einer über dem Mikrotom angebrachten Lupe wurden nun Klinge und Paraffinblöckchen passend zueinander ausgerichtet. Zunächst wurde die Schnittdicke etwas größer gewählt, um das überschüssige Paraffin zu entfernen. Wenn das Gewebe in den Schnitten erkennbar war, wurde die Schnittdicke auf 7 µm eingestellt und mit der eigentlichen Schnittanfertigung begonnen. Zwischendurch wurde die Mikrotomklinge mit einem in Ethanol getränkten Tupfer von überschüssigem Paraffinwachs befreit. Zusätzlich erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Klingewechsel, um möglichst optimale Schnittbedingungen zu schaffen. Sobald ein Schnitt verwertbar schien, wurde er mithilfe von Pinsel und Präpariernadel von der Auflagefläche des Mikrotoms abgelöst und in das vorbereitete Wasserbad verbracht. Dadurch wurden die Schnittflächen geglättet. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels vorher beschrifteter Objektträger aufgefischt und zum weiteren Trocknen auf die vorgeheizte Wärmeplatte gelegt. Dabei wurden von einem Paraffinblöckchen insgesamt vier Schnitte auf herkömmliche Objektträger und sechs Schnitte auf spezielle Adhäsionsobjektträger verbracht. Die gewöhnlichen Objektträger dienten dabei der HE-Färbung, während die Adhäsionsobjektträger aufgrund ihrer besseren Haftung für die IHC-Färbung verwendet wurden. Außerdem wurden aus logistischen und praktischen Gründen jeweils Längs- und Querschnitt eines Präparats auf denselben Objektträger verbracht. Dabei ließ man die Längsschnitte auf den Objektträgern erst kurz auf der Wärmeplatte trocknen, bevor man beim Mikrotom auf das Paraffinblöckchen mit dem Präparat im Querschnitt wechselte. Dann wurden wieder zehn Schnitte angefertigt, die auf dieselben Objektträger verbracht wurden und erneut zum Trocknen auf die Wärmeplatte gelegt wurden. So ergaben sich pro entnommenem Nerv also zehn Objektträger, auf denen jeweils Längs- und Querschnitt des Präparats nebeneinander lagen. Diese wurden im Anschluss in eine Küvette gestellt und über Nacht zum weiteren Trocknen in einem Wärmeschrank platziert. Am nächsten Tag wurden dann die Objektträger entnommen und in einen Präparatekasten verbracht, in dem sie bis zur weiteren Verarbeitung vor Staub geschützt bei Raumtemperatur lagerten.

### **3.2.5 HE-Färbung**

Die HE-Färbung ist eine histologische Standardfärbung, bei der mit zwei Farbstoffen verschiedene Gewebeanteile dargestellt werden. Das Hämatoxylin dient dabei als basischer Farbstoff und färbt saure (anionische) Komponenten wie DNA und RNA an, die daher auch als basophil bezeichnet werden [66]. Diese Zellbestandteile, zu denen vor allem der Zellkern und die Ribo-

somen zählen, werden durch das Hämatoxylin blau eingefärbt [67]. Als saurer Farbstoff wird das Eosin verwendet, welches folglich die basischen (kationischen) Anteile einfärbt [66]. Diese werden deshalb auch azidophil genannt und entsprechen vor allem dem Zytoplasma und den Mitochondrien [66]. Sie werden durch das Eosin rot dargestellt [67].

In diesem Fall diente die HE-Färbung als Übersichtsfärbung, um die Gewebequalität einer Schnittserie zu beurteilen, bevor man diese der IHC-Färbung zuführte. Dafür nahm man sich für jeden Färbevorgang insgesamt zehn Objektträger von verschiedenen Schnittserien. Dabei war darauf zu achten, dass man einen der vier herkömmlichen Objektträger einer Schnittserie nutzte, da die Adhäsionsobjektträger für die IHC-Färbung vorgesehen waren.

Zu Beginn stellte man die Objektträger mit den Präparaten in eine Halterung. Diese wurde anschließend von Lösung zu Lösung überführt. Der erste Teil des Färbevorgangs fand dabei unter einem Abzug statt. Hierbei wurden die Präparate zunächst jeweils für 5 Minuten in drei unterschiedliche Küvetten mit Xylol gestellt. Dieser Vorgang diente dem Entparaffinieren, um das Gewebe überhaupt erst für den Färbevorgang zugänglich zu machen [68]. Anschließend erfolgte die langsame Rehydrierung des Gewebes durch eine absteigende Alkoholreihe. Dies war nötig, da es sich bei den Farbstoffen um wässrige Lösungen handelt und so die Aufnahme der Farbstoffe in das Gewebe erleichtert wird [69]. Dafür ließ man die Objektträger jeweils für 5 Minuten in zwei Gefäßen mit 100-prozentiger 2-Propanol-Lösung ruhen. Daraufhin wurden sie zuerst für 5 Minuten in 90-prozentige und danach für 5 Minuten in 80-prozentige 2-Propanol-Lösung überführt.

Während der Verweildauer der Objektträger in den unterschiedlichen Lösungen wurden die nächsten Schritte des Färbungsprozesses vorbereitet. Dies fand außerhalb des Abzuges statt. Insgesamt wurden dafür fünf Küvetten bereitgestellt. Zwei der Gefäße wurden mit destilliertem Wasser und ein Gefäß mit Leitungswasser befüllt. Die beiden anderen Küvetten waren für die Farbkomponenten Hämatoxylin und Eosin vorgesehen. Um ein möglichst homogenes Färbungsmuster zu erhalten, wurden diese beiden Lösungen vorher noch filtriert. Zuerst wurde die Küvette mit Hämatoxylin befüllt. Dafür wurde über der Küvette ein Trichter mit einliegendem Filterpapier eingespannt, durch den das Hämatoxylin schließlich schrittweise eingegossen wurde. Mit der demselben Prinzip folgenden Filtration des Eosins wartete man jedoch noch ab, bis die Objektträger in die Küvette mit Leitungswasser verbracht worden waren. Dies lag darin begründet, dass dem Eosin zusätzlich zwei Tropfen Eisessig zugeführt wurden. Dabei handelt

es sich um einen flüchtigen Stoff, sodass man seinem Entweichen durch die späte Filtration und einem direkt danach folgenden Auflegen eines Deckels entgegenwirken wollte.

Nachdem die 5 Minuten in 80-prozentiger 2-Propanol-Lösung verstrichen waren, wurden die Objektträger samt Küvette aus dem Abzug geholt und anschließend für 8 Minuten in das Hämatoxylin überführt. Danach wurde durch Dippen in das erste Gefäß mit destilliertem Wasser die überschüssige Farbe entfernt. Daraufhin wurden die Präparate in die Küvette mit Leitungswasser verbracht. Diese wurde im Anschluss für 12 Minuten unter einen laufenden Wasserhahn gestellt. Der Prozess wird auch als Bläuen bezeichnet. Durch das Stellen unter fließendes Leitungswasser wird der pH-Wert deutlich angehoben, was einen Farbwechsel von Rotbraun zur typischen Blaufärbung bewirkt und zusätzlich den Farbstoff aufgrund von schlechterer Löslichkeit im Gewebe fixiert [70]. In dieser Zeit erfolgte dann die oben erläuterte Filtration des Eosins. Danach wurden die Präparate noch für 30 Sekunden in dem zweiten vorbereiteten Gefäß mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie für eine Dauer von 2,5 Minuten in die Eosin-Lösung mit dem hinzugefügten Eisessig gestellt wurden. Die durch den Eisessig bedingte leichte Ansäuerung der Lösung sorgt für den Abbruch des alkalischen Bläuens und führt so zu einer besseren Farbkontrastierung [70].

Die letzten Arbeitsschritte erfolgten wieder unter dem Abzug. Als die 2,5 Minuten verstrichen waren, wurden die Objektträger in eine 90-prozentige 2-Propanol-Lösung überführt und so lange darin belassen, bis eine angemessene Rotfärbung erkennbar wurde. Dieser Vorgang wird auch als Differenzierung bezeichnet und erfolgt, da die Färbung mit Eosin regressiv verläuft [70]. Danach kamen die Präparate noch für jeweils 5 Minuten in zwei verschiedene Küvetten mit 100-prozentiger 2-Propanol-Lösung. Durch diesen Schritt wurde das Gewebe wieder dehydriert [71]. Anschließend wurden sie noch nacheinander in drei unterschiedliche Gefäße mit Xylol verbracht, wo sie jeweils für 5 Minuten verblieben.

Nach Ablauf der Zeit war der Färbeprozess abgeschlossen und es erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Deckgläsern. Dafür wurden die Objektträger nach und nach einzeln aus der Küvette herausgenommen und vorsichtig das überschüssige Xylol entfernt. Dann erfolgte die Aufbringung einer geringen Menge von dem histologischen Einschlussmittel auf den Objektträger mittels Pipette. Nachfolgend wurde ein Deckglas genommen und mithilfe von Sonden vorsichtig auf die Präparate abgesenkt, um Luftblasen möglichst zu vermeiden. Als die Eindeckung aller Präparate abgeschlossen war, wurden diese in eine Mappe verbracht und über

Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Am nächsten Tag konnte dann die histologische Beurteilung unter dem Mikroskop erfolgen.

Die folgende Grafik dient nochmals der Übersicht über den oben beschriebenen Färbeporgang.

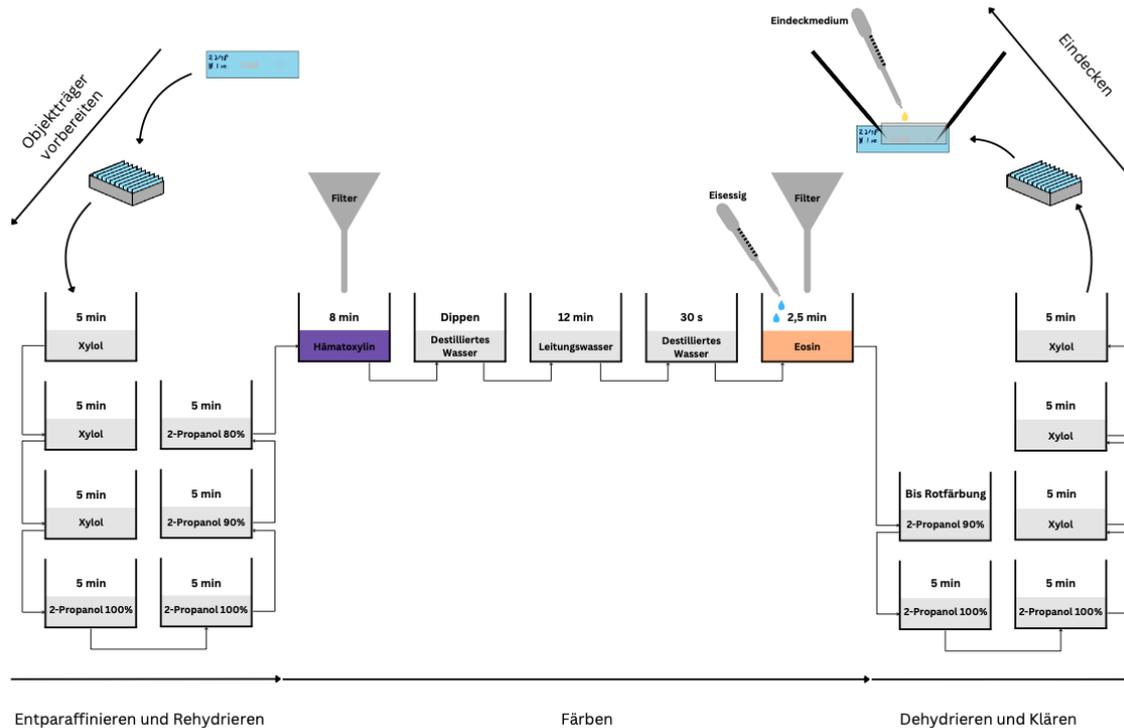
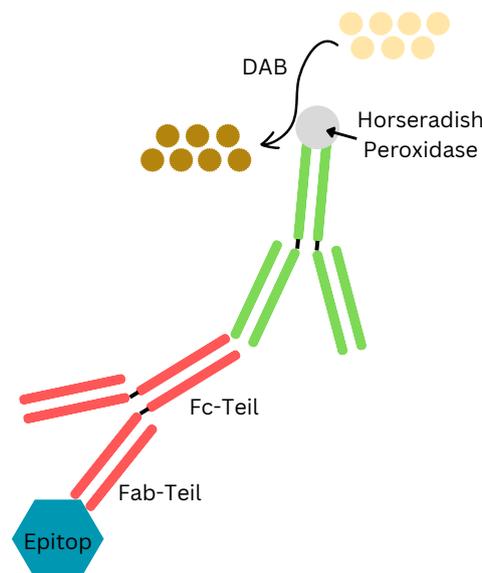


Abbildung 7: Ablauf HE-Färbung

### 3.2.6 IHC-Färbung

Die immunhistochemische Färbung ist eine weitverbreitete Methode zum Nachweis bestimmter Moleküle in verschiedenen Geweben [65]. Das grundlegende Prinzip beruht dabei auf der Bindung eines Antikörpers an ein bestimmtes Antigen, welches nachgewiesen werden soll [72]. Zunächst erfolgt dafür nach Entparaffinierung der Schnitte eine Antigendemaskierung. Dies ist notwendig, um potenzielle Querverbindungen zwischen Proteinen im Gewebe aufzuheben, die durch die Fixierung entstehen können [73]. Aufgrund der recht widrigen Bedingungen bei diesem Schritt, liegen die Präparate für eine IHC-Färbung meist auf Adhäsiv-Objektträgern [74]. Als nächster Schritt schließt sich zur Vermeidung von übermäßiger unspezifischer Färbung die Blockierung der Schnitte an [75]. Daraufhin werden die Proben mit einem Primärantikörper inkubiert. Für diese Studie wurde dabei ein indirektes Verfahren gewählt. Hierfür wird zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet [74]. Dieser bindet zunächst mit seinem Fab-Teil an das zu detektierende Antigen [72]. In einem zweiten Schritt werden die Schnitte dann mit einem Sekundärantikörper inkubiert [74]. Dieser ist markiert und kann nun wiederum mit

seinem  $F_{ab}$ -Teil an den  $F_c$ -Teil der Primärantikörper binden [72]. Im Fall dieser Arbeit handelte es sich bei der Markierung um eine an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Peroxidasen wie diese gehören dabei zu den am häufigsten eingesetzten Enzymen und sorgen nach Zugabe eines Chromogens für eine Farbveränderung des Gewebes [72]. Hier wurde als Chromogen DAB verwendet, welches durch Reaktion mit der Meerrettichperoxidase eine charakteristische Braunfärbung hervorruft [72]. Um einer möglichen unspezifischen Färbung durch die Reaktion von DAB mit endogenen Peroxidasen vorzubeugen, werden die Schnitte außerdem zwischen der Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper mit Wasserstoffperoxid behandelt [76]. Zur besseren Darstellung der Gewebemorphologie und Kontrastierung erfolgt zum Schluss noch eine Gegenfärbung der Proben, wobei, wie auch in diesem Fall, häufig Hämatoxylin eingesetzt wird [74].



*Abbildung 8: Schema IHC - Primärantikörper (rot) und Sekundärantikörper (grün)*

Für den Nachweis der TRPC-6-Kanäle im Nervengewebe wurde eine solche IHC-Färbung angefertigt. Bevor eine Schnittserie jedoch der immunhistochemischen Färbung zugeführt werden konnte, erfolgte eine Beurteilung der Gewebemorphologie mittels Lichtmikroskop anhand der HE-gefärbten Proben. Wenn hier keine größeren Gewebeschäden festgestellt wurden, konnte mit der IHC-Färbung fortgefahren werden.

Zu Beginn wurden analog zur HE-Färbung wieder Objektträger verschiedener Schnittserien für die Färbung ausgewählt. Allerdings waren es in diesem Fall nur neun Objektträger, die ange-

färbt werden konnten, da es bei jedem Färbevorgang einen Schnitt gab, der als Negativkontrolle diente. Dieser wurde mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Um bei dem ersten Färbevorgang zusätzlich die Sicherheit einer richtigen Durchführung zu gewährleisten, wurde hierbei auch ein Nervenanschnitt als Positivkontrolle ausgewählt, der in der HE-Färbung einen Gefäßanschnitt im Epineurium enthielt. In Gefäßen konnte der TRPC-6 Kanal mit dieser Methode nämlich bereits nachgewiesen werden [77].

Die IHC-Färbung erforderte einen Zeitaufwand von zwei aufeinander folgenden Tagen. Die Vorbereitungen und Arbeitsschritte jedes Tages sollen nun im Weiteren separat erklärt werden.

### **Tag 1:**

Zunächst wurde eine 1-prozentige Citrat-Pufferlösung frisch angesetzt. Dazu wurden 5 ml Citrat-Puffer mit 495 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde in eine Küvette gegeben, mit einem Deckel versehen und daraufhin bei 95 °C in einen Wärmeschrank gestellt.

Anschließend wurde wie auch bei der HE-Färbung mit dem Entparaffinieren und der Rehydrierung der Schnitte begonnen. Die dafür notwendigen Arbeitsschritte erfolgten wieder unter dem Abzug. Zuerst wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 Minuten in Xylol gestellt. Daran schloss sich die absteigende Alkoholreihe mit zweimal 5 Minuten in 100-prozentiger, 5 Minuten in 90-prozentiger und 5 Minuten in 80-prozentiger 2-Propanol-Lösung an. Im Unterschied zur HE-Färbung wurden die Proben danach jedoch auch noch für 5 Minuten in eine Küvette mit 70-prozentiger 2-Propanol-Lösung und anschließend für 5 Minuten in destilliertes Wasser gestellt.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben dann in die bereits vorgewärmte Citrat-Pufferlösung überführt und mit Deckel für 60 Minuten im Wärmeschrank belassen. Anschließend nahm man die Küvette mit den Objektträgern heraus, entfernte den Deckel und ließ sie 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen.

In dieser Zeit bereitete man die nächsten Schritte vor. Dafür wurde zunächst 10-prozentiges NGS aus dem Gefrierfach geholt und bei Raumtemperatur auftauen gelassen. Dann wurde eine Küvette mit PBS gefüllt. Außerdem wurde eine Feuchtekammer vorbereitet. Dabei handelt es sich um einen Kasten, in dem zehn Objektträger Platz haben und worin zwei mit Leitungswasser getränkte Papiertücher ausgelegt wurden.

Nach den verstrichenen 30 Minuten wurden die Proben dann für 1 Minute in PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie mittels Pinzette einzeln aus der Lösung genommen und auf einem Tuch gut abgeklopft, um möglichst wenig Flüssigkeitsrückstände zu haben. Dann wurden sowohl der Längs- als auch der Querschnitt mit einem Fettstift umrandet und die Objektträger schließlich in die Feuchtekkammer gelegt. Diese Umrandung diente dazu ein Verlaufen der später auf den Schnitt applizierten Substanzen und somit ein Austrocknen des Schnittes zu verhindern. Im Anschluss wurde das mittlerweile flüssige NGS vorsichtig auf die Schnitte pipettiert. Nachdem alle Objektträger in die Feuchtekkammer verbracht und mit NGS versehen waren, wurde sie verschlossen und die Schnitte darin für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde dann die Antikörperlösung mit dem Primärantikörper gegen TRPC-6 vorbereitet. Dieser wurde im Gefrierschrank gelagert und musste daher erstmal aufgetaut werden. Dafür nahm man sechs der 150 µl des Primärantikörpers fassenden Mikroreaktionsgefäße heraus und ließ sie bei Raumtemperatur stehen. Die Verdünnung des Antikörpers lag bei 1:50. Für die IHC-Färbung wurde jedoch eine Verdünnung von 1:100 angestrebt. Daher mischte man ihn immer mit der äquivalenten Menge an NGS. Dieses musste, falls es beim oben erläuterten Arbeitsschritt verbraucht wurde, ebenfalls neu aufgetaut werden. Für die Anfertigung der Antikörperlösung nahm man sich schließlich zwei große 1,5 ml fassende Eppendorf-Gefäße und befüllte sie mit insgesamt jeweils 600 µl Primärantikörper in der Verdünnung 1:50 und 600 µl NGS. So erhielt man die gewünschte Verdünnung von 1:100. Die Gefäße wurden anschließend noch beschriftet und mit dem Vortexmischer gemischt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie dann im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Negativkontrolle wurde eine Lösung mit Kaninchenserum der Verdünnung 1:500 angefertigt. Das Kaninchenserum lagerte so wie der Primärantikörper 1:50 verdünnt im Gefrierfach und wurde zum gleichen Zeitpunkt herausgeholt. Um die gewünschte Verdünnung zu erreichen, wurden 24,95 ml PBS mit 50 µl des Kaninchenserums auf 25 ml aufgefüllt und mit dem Vortexgerät vermischt. Da diese Lösung über mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden konnte, musste sie im Laufe der Versuche nur einmal angefertigt werden. Zu diesem Zweck wurde sie zusätzlich zur Beschriftung mit einem Datum versehen.

Nachdem 1 Stunde vergangen war, wurden die Objektträger schrittweise aus der Feuchtekkammer genommen, ordentlich auf einem Tuch abgeklopft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen und danach wieder zurück in die Feuchtekkammer gelegt. Als nächstes wurde dann die vorbereitete Antikörperlösung auf die Schnitte pipettiert. Lediglich auf die Negativkontrolle

wurde die Kaninchenserum-Lösung appliziert. Nach Abschluss des Vorgangs wurde die Feuchtekammer verschlossen und die einliegenden Proben über Nacht inkubiert.

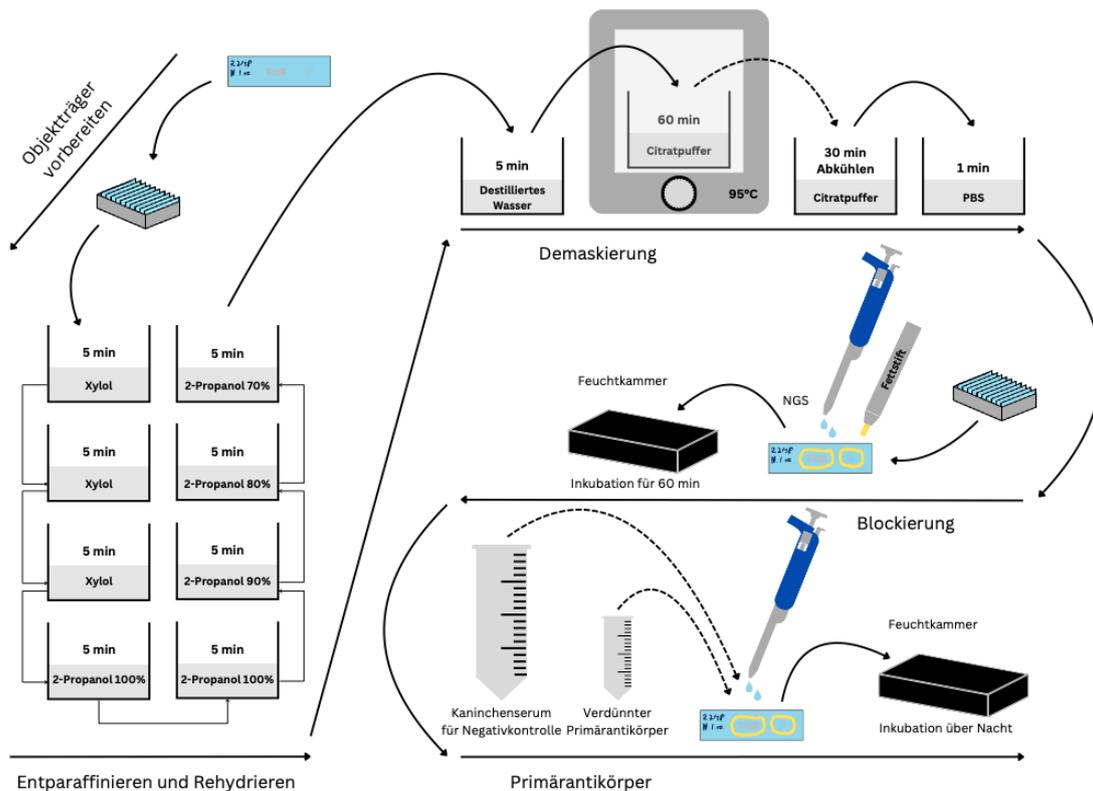


Abbildung 9: Ablauf IHC Tag 1

## Tag 2:

Zu Beginn des zweiten Tages wurden vier Küvetten mit PBS befüllt und bereitgestellt. Außerdem wurde eine 3-prozentige Lösung mit Wasserstoffperoxid angesetzt. Dafür wurden von der 35-prozentigen Ausgangslösung 8,57 ml zusammen mit 91,43 ml PBS in einen Standzylinder gefüllt. Weiterhin wurde ein Mikroreaktionsgefäß mit dem Sekundärantikörper sowie das NGS zum Auftauen aus dem Gefrierschrank geholt.

Sobald die Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurden die Objektträger nacheinander aus der Feuchtekammer genommen, durch Abklopfen auf ein Tuch bestmöglich von Flüssigkeitsresten befreit und in eine Halterung gestellt. Diese wurde dann für jeweils 2 Minuten in zwei der vorbereiteten Küvetten mit PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde in der Feuchtekammer ein neues nasses Tuch ausgelegt. Danach wurden die Objektträger einzeln aus der PBS-Lösung herausgeholt, erneut abgeklopft, zurück in die Feuchtekammer gelegt und anschließend

mit der vorbereiteten Wasserstoffperoxid-Lösung versehen. Hier wurden sie wiederum für 10 Minuten in der verschlossenen Kammer belassen.

Dies bot Zeit, um die Sekundärantikörperlösung vorzubereiten. Diese sollte eine Verdünnung von 1:500 aufweisen. Dafür wurden 20 µl des unverdünnten Sekundärantikörpers zusammen mit 980 µl NGS in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, sodass sich eine Verdünnung von 1:50 ergab. Dieses wurde dann mithilfe des Vortexgerätes vermischt. Von dieser Lösung wurden wiederum 100 µl mit 900 µl NGS zusammengegeben. Somit ergab sich zusammengenommen die gewünschte Verdünnung von 1:500. Insgesamt wurden drei Eppendorf-Gefäße mit jeweils 1 ml dieser Lösung für den weiteren Verlauf bereitgestellt.

Nach Ablauf der 10 Minuten in der Feuchtekammer wurden die Objektträger abermals durch Abklopfen von der überschüssigen Flüssigkeit befreit und in eine Halterung überführt. Die Proben wurden dann zweimal für jeweils 2 Minuten in den verbleibenden zwei vorbereiteten Küvetten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger wieder einzeln aus dem PBS entnommen, abgeklopft und zurück in die Feuchtekammer verbracht. Hier wurde dann die Lösung mit dem Sekundärantikörper auf die Schnitte pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 60 Minuten in der Feuchtekammer inkubiert.

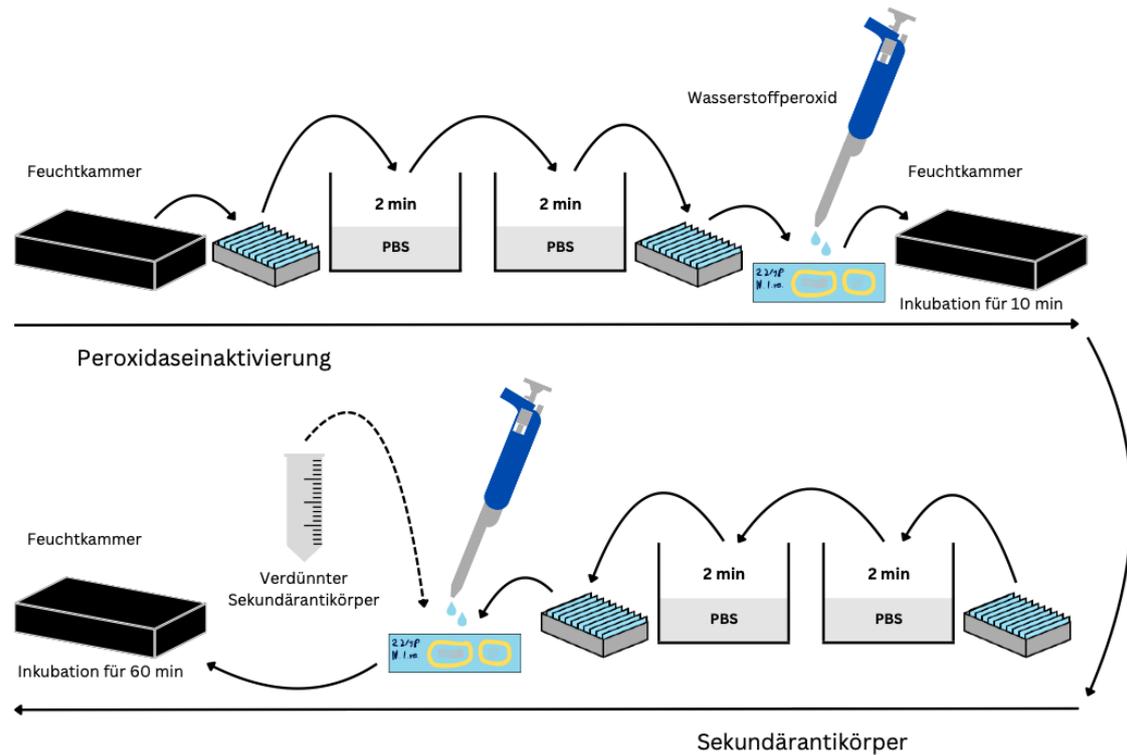


Abbildung 10: Ablauf IHC Tag 2 (1)

Zwischenzeitlich wurden nochmals drei Küvetten mit PBS, eine Küvette mit Leitungswasser sowie zwei Küvetten mit destilliertem Wasser vorbereitet. Kurz vor Ablauf der 60 Minuten wurde zusätzlich die DAB-Lösung angefertigt. Dazu wurden äquivalente Mengen der zwei im Kühlschrank lagernden DAB-Reagenzien in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. In diesem Fall wurden zwei Mikroreaktionsgefäße mit jeweils 1,4 ml der fertigen DAB-Lösung benötigt. Außerdem wurde ein Lichtmikroskop bereitgestellt.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger schrittweise aus der Feuchtkammer genommen, erneut abgeklopft und in eine Halterung gestellt. Diese wurde dann für jeweils 2 Minuten in zwei Küvetten mit PBS gestellt. Danach wurde ein Objektträger, der nicht der Negativkontrolle entsprach, daraus entnommen, abgeklopft und unter das Mikroskop verbracht. Hier wurden die Schnitte schließlich mit der angefertigten DAB-Lösung versehen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte eine kontinuierliche Beurteilung unter dem Mikroskop und es wurde eine Stoppuhr gestartet. Wenn sich eine ausreichend gewünschte Braunfärbung eingestellt hatte, wurde die Reaktion durch Eintauchen des Objektträgers in eine weitere mit PBS gefüllte Küvette unterbrochen und die Zeit gestoppt. Anschließend wurden die verbleibenden Proben für dieselbe Zeit mit der DAB-Lösung versehen und danach auch in PBS überführt.

In der Zwischenzeit wurde bereits eine Küvette mit gefiltertem Hämatoxylin nach Ehrlich bereitgestellt. Vom PBS ausgehend wurden die Objektträger zunächst für 1 Minute in die erste der beiden vorbereiteten Küvetten mit destilliertem Wasser gestellt. Daraufhin wurde die Halterung mit den Proben kurz in das Hämatoxylin gedippt und dann in die zweite Küvette mit destilliertem Wasser überführt, um überschüssige Farbe zu entfernen. Im Anschluss wurden die Objektträger in das Leitungswasser gestellt und zum Bläuen für 5 Minuten unter den fließenden Wasserhahn verbracht.

Zum Schluss folgte analog zur HE-Färbung wieder eine Dehydratation durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Bei der IHC-Färbung startete diese aber bereits mit einer 70-prozentigen 2-Propanol-Lösung, in der die Objektträger 5 Minuten verweilen mussten. Danach kamen sie für 5 Minuten erst in 80-prozentige, dann 90-prozentige und anschließend zweimal in 100-prozentige 2-Propanol-Lösung. Danach wurden die Proben noch dreimal für jeweils 5 Minuten in Xylol gestellt. Diese Arbeitsschritte erfolgten wieder unter dem Abzug.

Der Prozess des Eindeckens wurde wieder nach demselben Prinzip wie bei der HE-Färbung durchgeführt.

Aufgrund des umfangreichen Färbeprotokolls sind die erläuterten Arbeitsschritte in den Grafiken nochmal zusammengefasst.

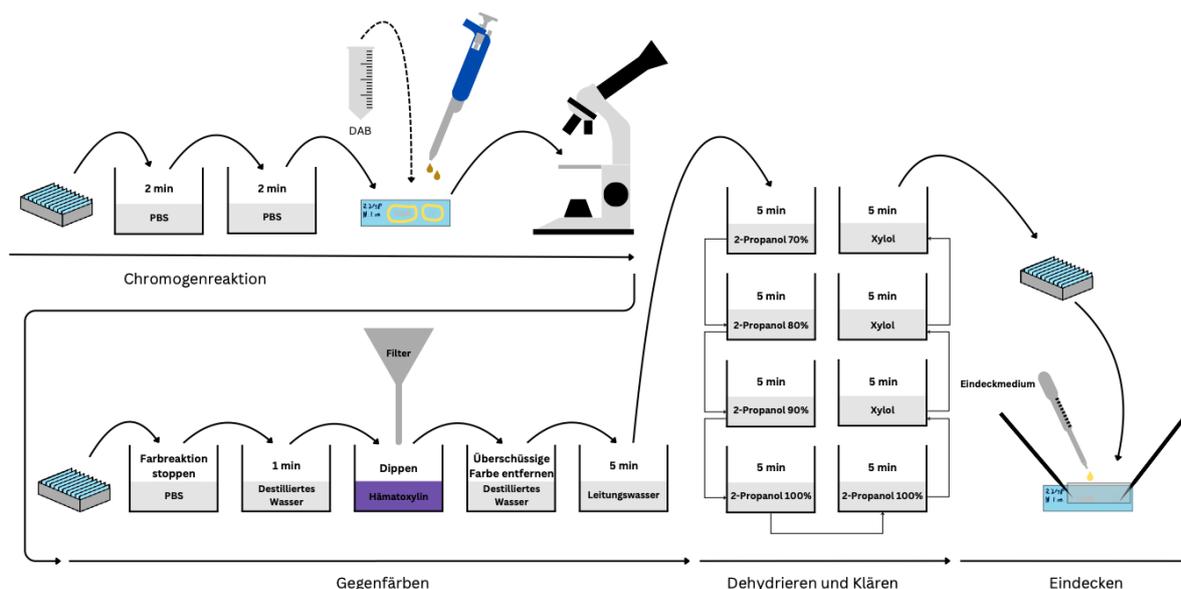


Abbildung 11: Ablauf IHC Tag 2 (2)

### 3.2.7 Auswertung

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde die Expression des TRPC-6 Kanals anhand der Braunfärbung der histologischen Schnittpräparate im Lichtmikroskop beurteilt. Dabei wurde zwischen einem starken, mittleren und schwachen Signal sowie keinem Signal unterschieden. Als Referenz hierfür wurde die Negativkontrolle der jeweiligen Färbeserie herangezogen. Insgesamt handelt es sich daher um eine rein deskriptive semiquantitative Auswertung.



*Abbildung 12: Farblegende für die IHC-Auswertung*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überblick

Wie bereits in der Methodik beschrieben, wurden zwei verschiedene periphere Nerven untersucht. Zum einen der N. ulnaris als Vertreter der oberen Extremität und zum anderen der N. ischiadicus als Vertreter der unteren Extremität. Insgesamt wurden Proben von acht Körperspendern untersucht. Dabei wurden die Nervenproben rechtsseitig bei allen Körperspendern entnommen. Bei den zum Vergleich entnommenen linksseitigen Nervenproben wurde sowohl der N. ulnaris als auch der N. ischiadicus nur viermal exzidiert. Insgesamt wurden somit zwölf Nervenproben des N. ischiadicus und ebenfalls zwölf Nervenproben des N. ulnaris untersucht, sodass sich durch Anfertigung von Längsschnitten und Querschnitten insgesamt 48 histologische Schnitte ergaben. Im Folgenden sollen nun die verschiedenen Proben anhand der erläuterten Methodik miteinander verglichen werden.

*Tabelle 9: Übersicht über entnommene Proben (grün-entnommen und weiß-nicht entnommen)*

	N. ulnaris rechts	N. ischiadicus rechts	N. ulnaris links	N. ischiadicus links
Spender 1				
Spender 2				
Spender 3				
Spender 4				
Spender 5				
Spender 6				
Spender 7				
Spender 8				

## 4.2 Bildmorphologie

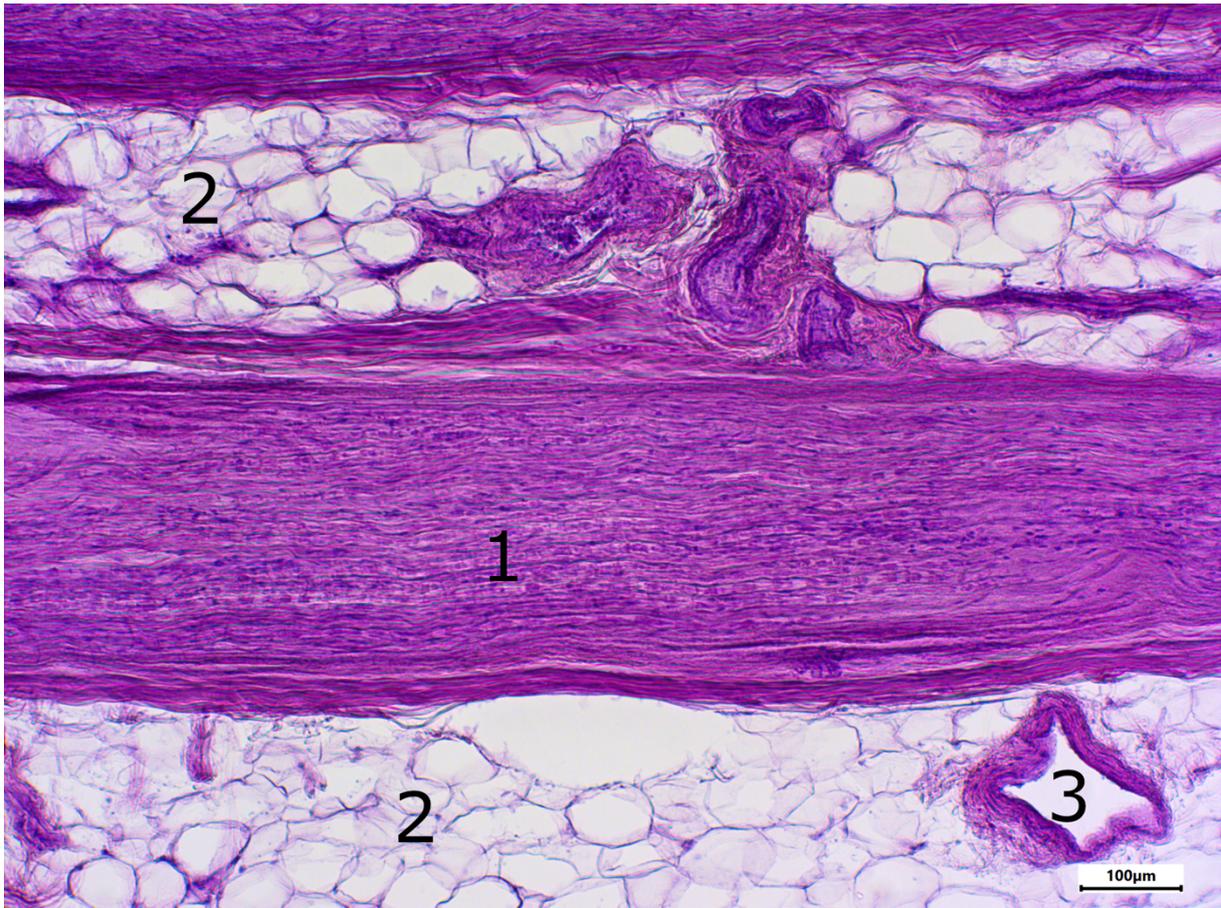
### 4.2.1 HE-Färbung

Bevor die histologischen Schnitte der IHC-Färbung zugeführt wurden, wurden sie zunächst in der HE-Färbung auf größere Gewebeschäden untersucht. Nachfolgend sollen beispielhaft einige Bilder dieser HE-gefärbten Präparate gezeigt werden, an denen die Gewebemorphologie beurteilt wurde.



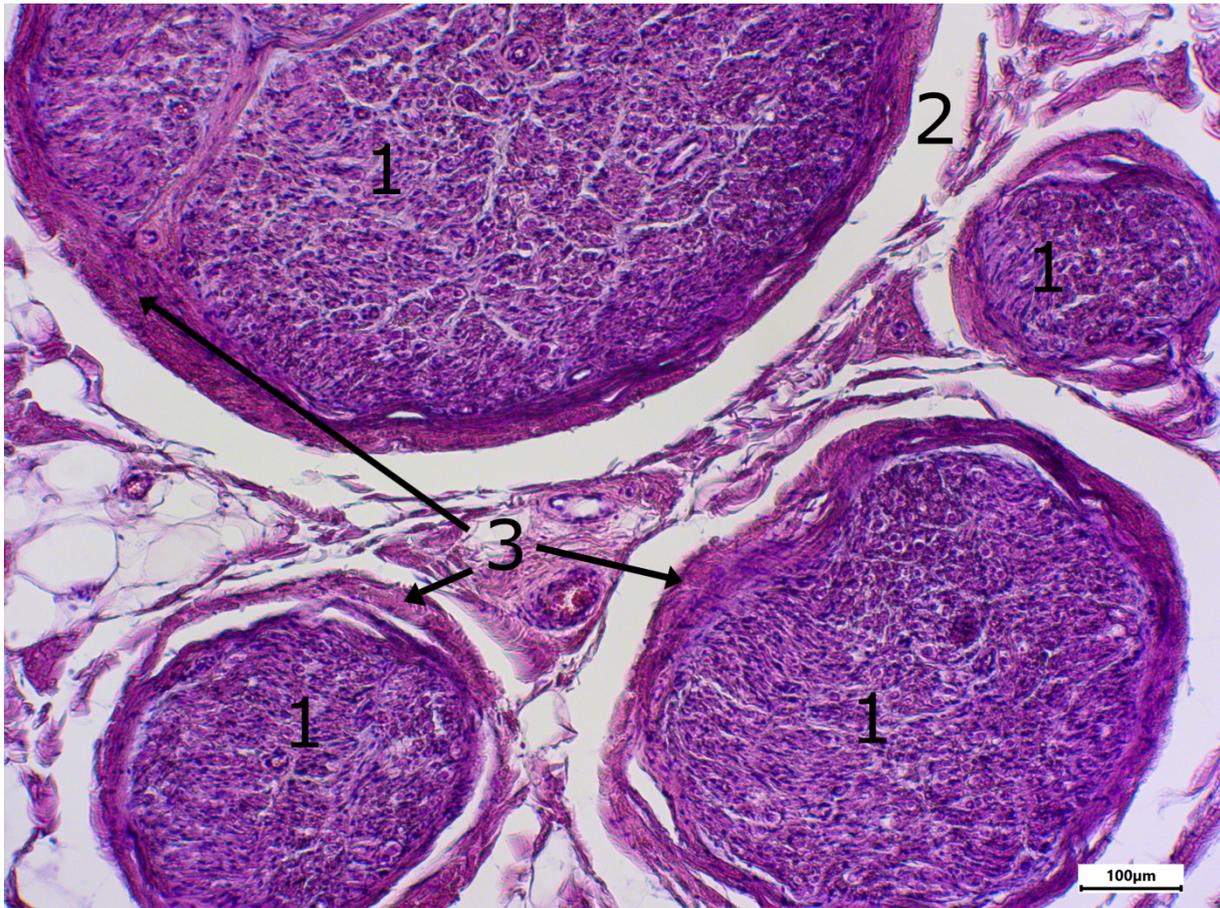
*Abbildung 13: HE-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1*

*Längs angeschnittene Nervenfasern (1) und Adipozyten (2).*



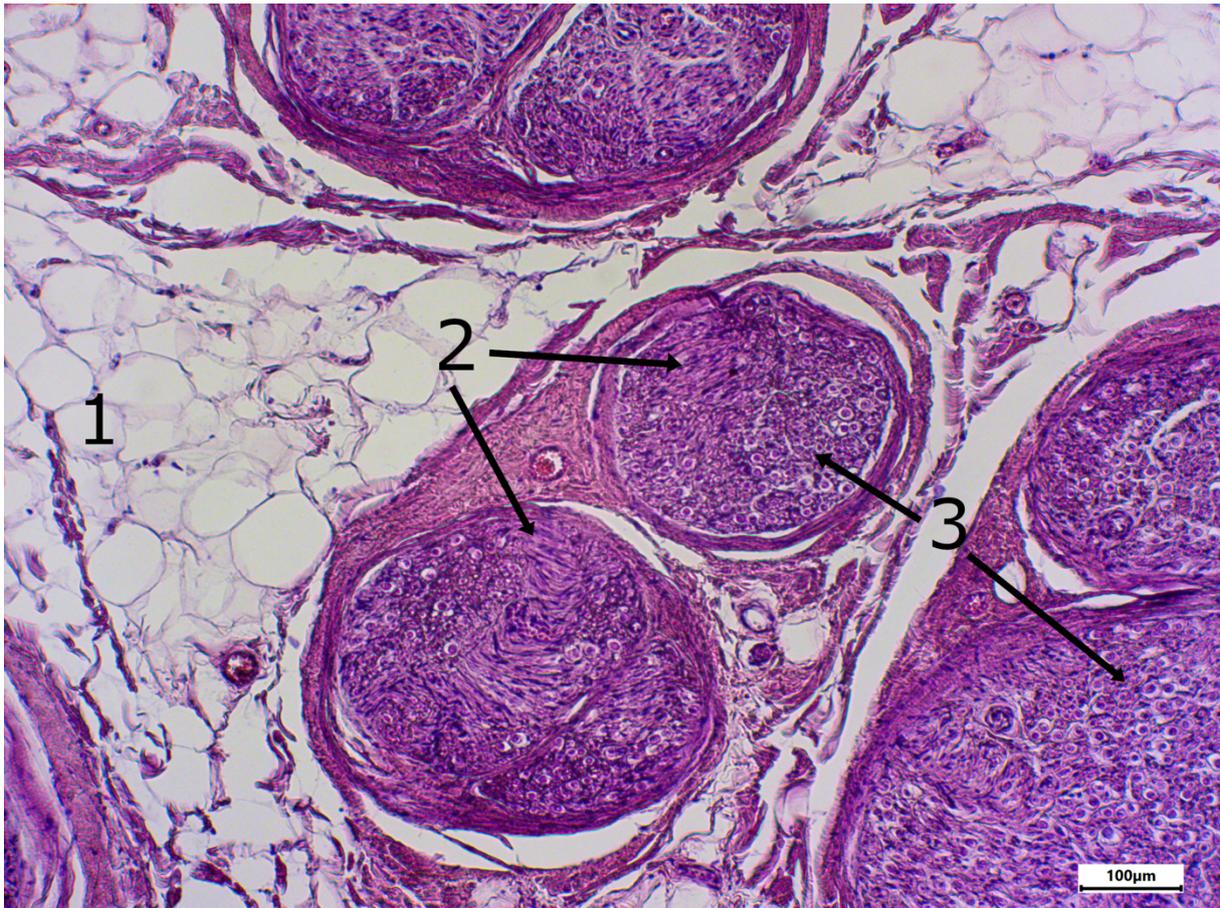
*Abbildung 14: HE-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1*

*Längs angeschnittene Nervenfasern (1), Adipozyten (2) und ein Gefäßanschnitt (3).*



*Abbildung 15: HE-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8*

*Mehrere quer angeschnittene Nervenfaserbündel (1), Schrumpfspalt (2) und Perineurium (3).*

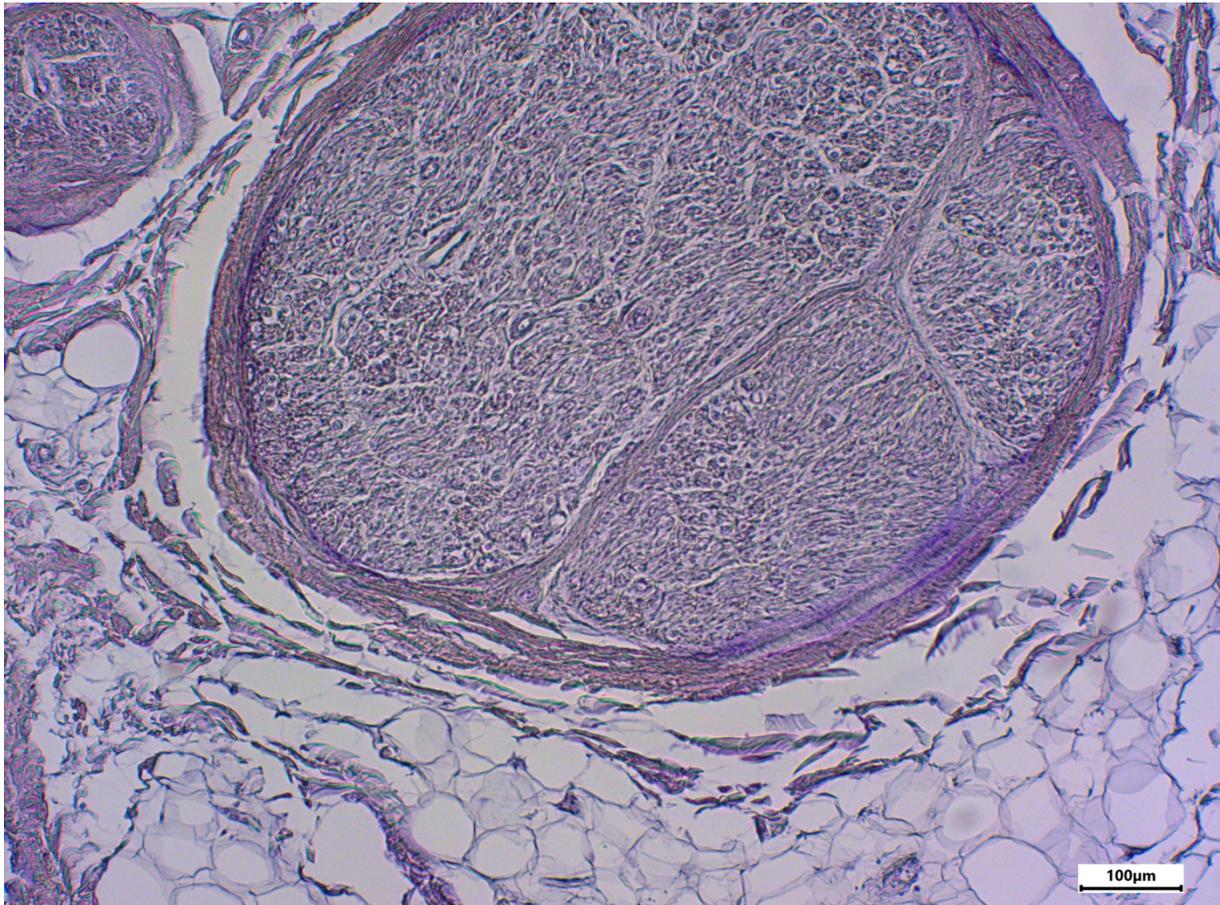


*Abbildung 16: HE-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8*

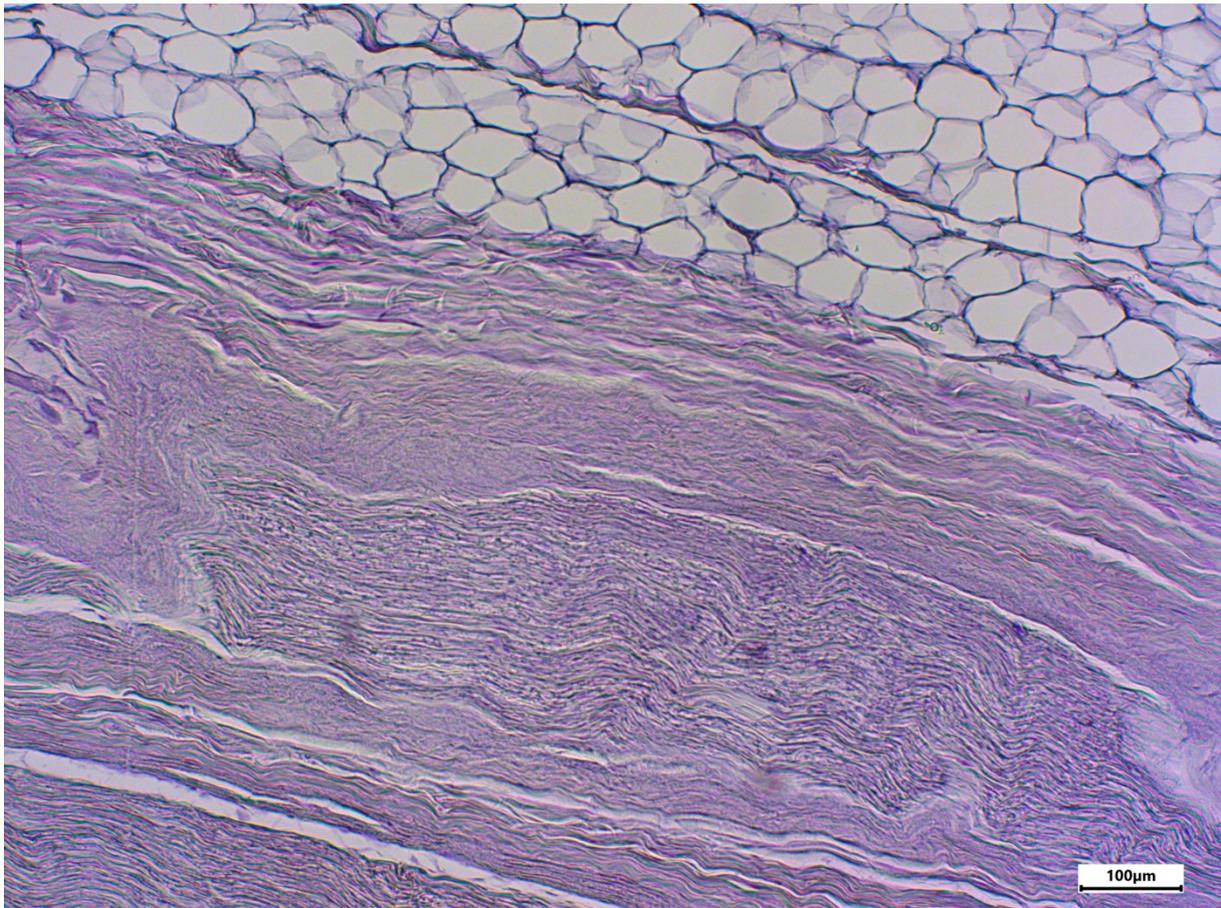
*Adipozyten (1), längs angeschnittene Nervenfasern (2) und quer angeschnittene Nervenfasern (3).*

### 4.2.2 IHC-Färbung

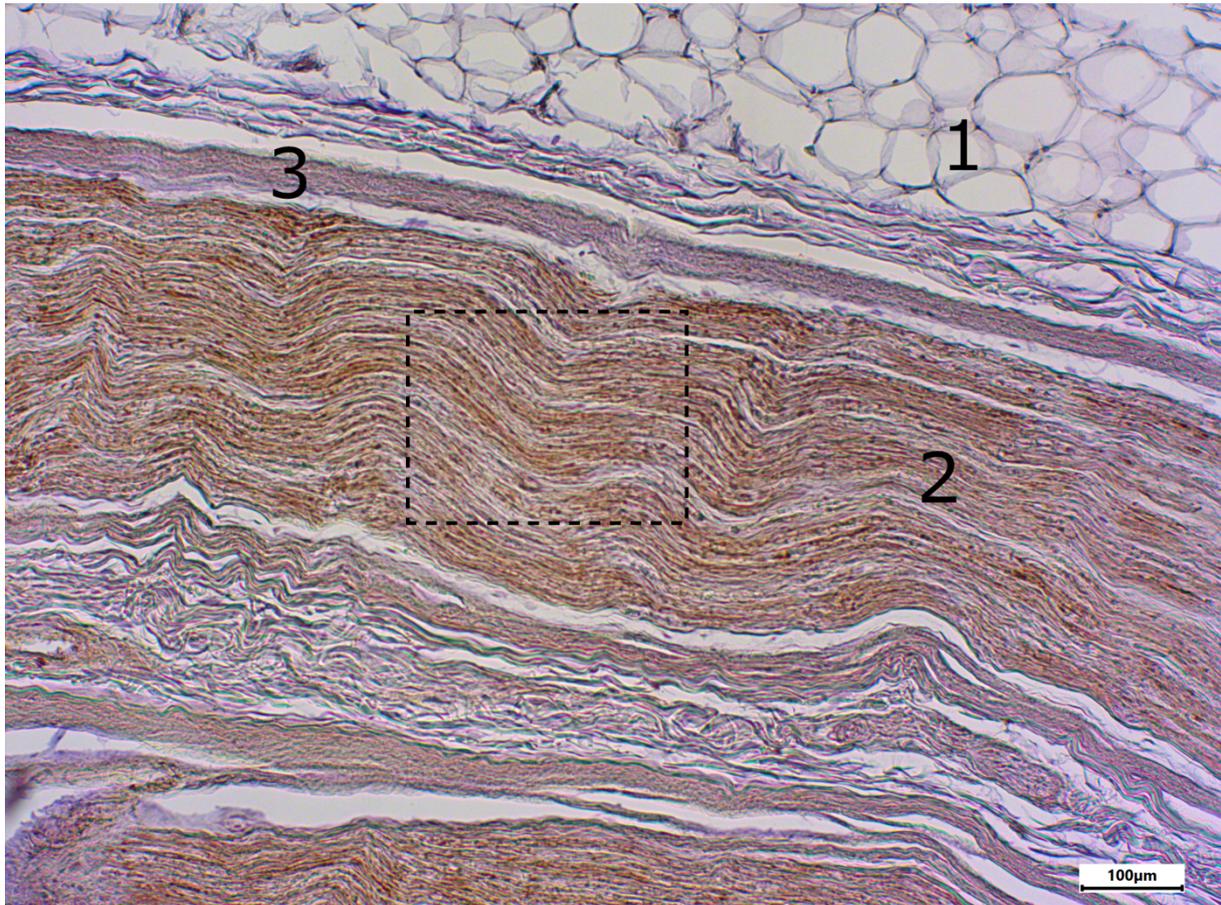
Nachdem die Proben in der HE-Färbung als verwertbar klassifiziert wurden, folgte die IHC-Färbung der Präparate. Dabei wurde bei jeder Färbeserie eine Negativkontrolle angefertigt, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Nachfolgend sind einige ausgewählte Bilder der IHC-Färbung dargestellt. Hierbei soll auch auf die Verteilung des Farbsignals innerhalb der Schnittpräparate eingegangen werden.



*Abbildung 17: Negativkontrolle IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8*

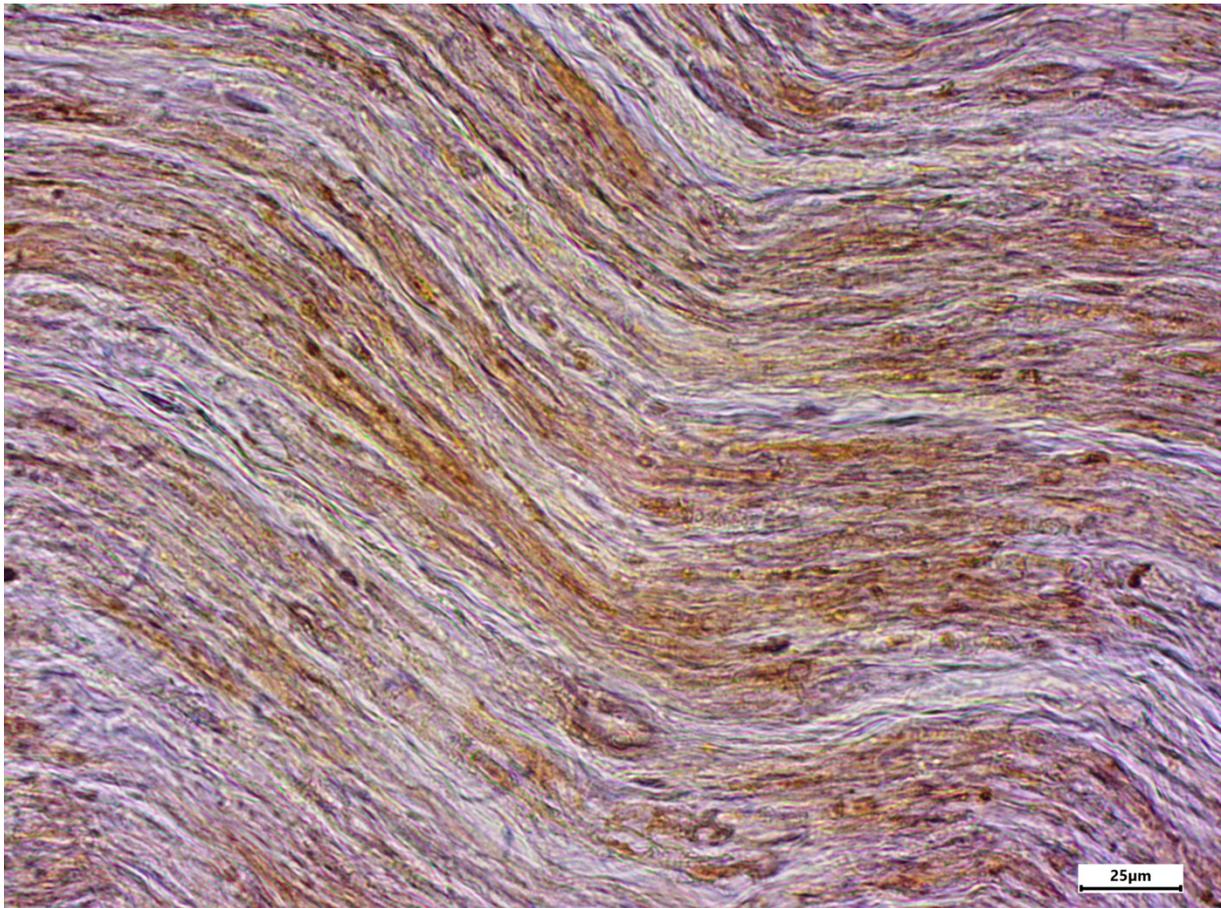


*Abbildung 18: Negativkontrolle IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 5*

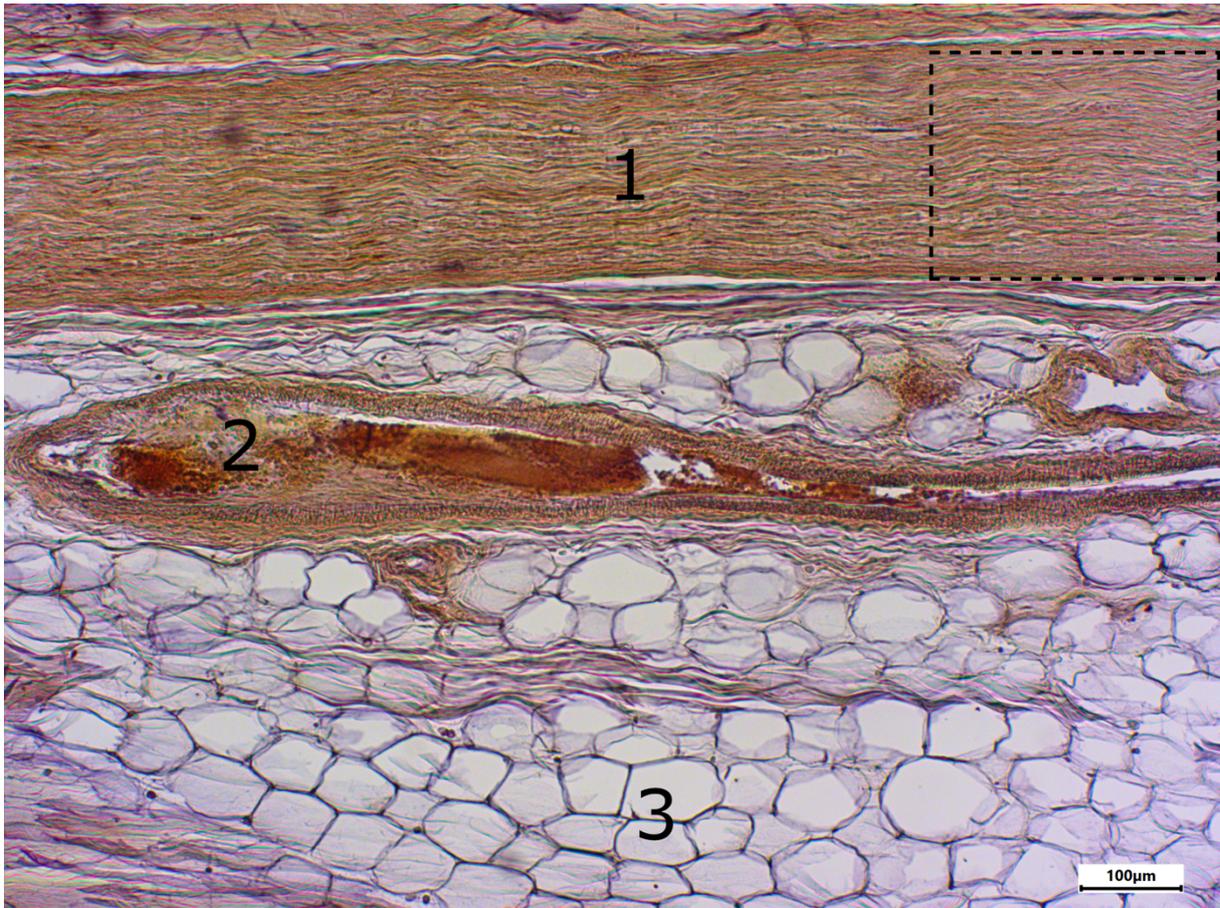


*Abbildung 19: IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 8*

*Adipozyten (1) ohne Farbsignal, längs angeschnittene Nervenfasern (2) mit starkem Farbsignal und Perineurium (3) mit schwächerem Farbsignal.*



*Abbildung 20: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 8*

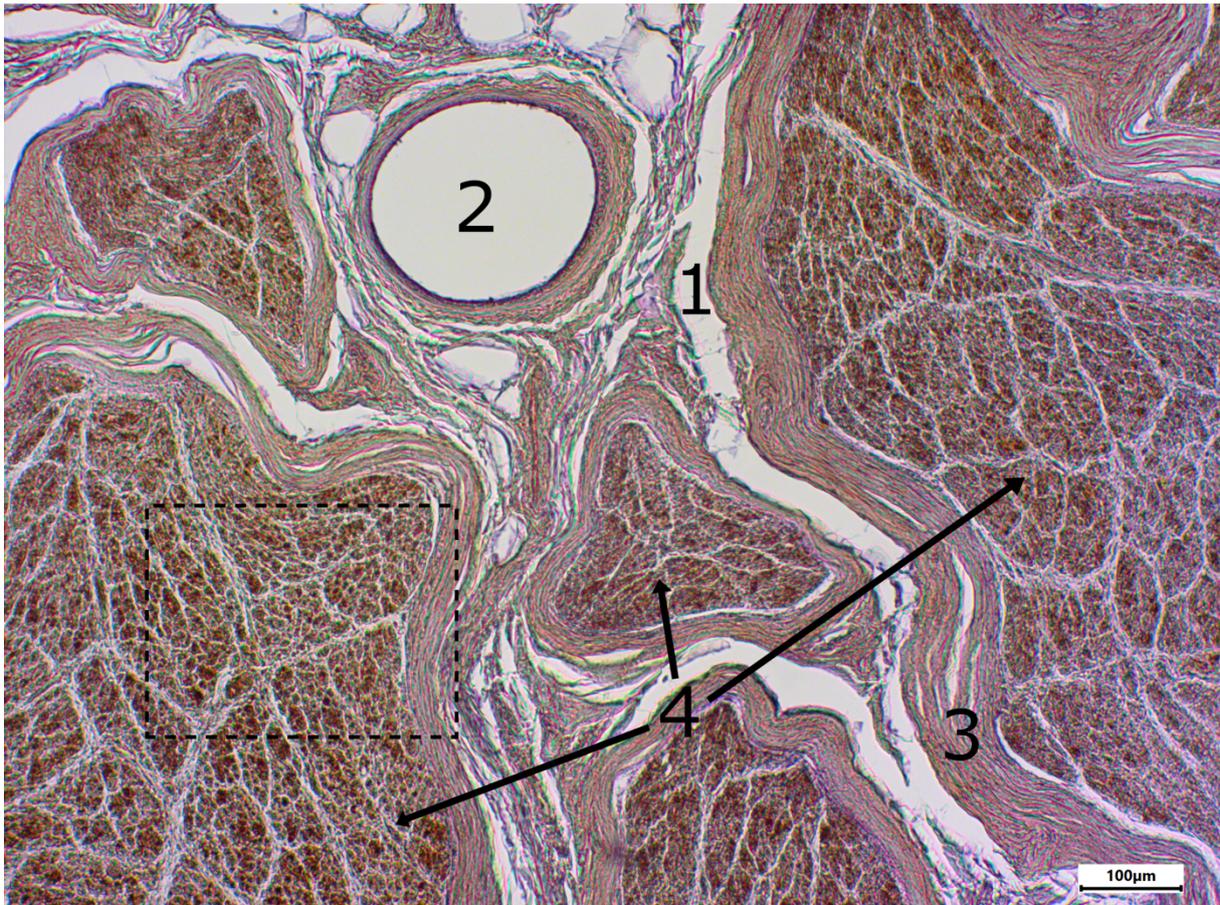


*Abbildung 21: IHC-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1*

*Längs angeschnittene Nervenfasern (1) mit starkem Farbsignal, Längsschnitt eines Blutgefäßes (2) mit starkem Farbsignal und Adipozyten (3) ohne Farbsignal.*

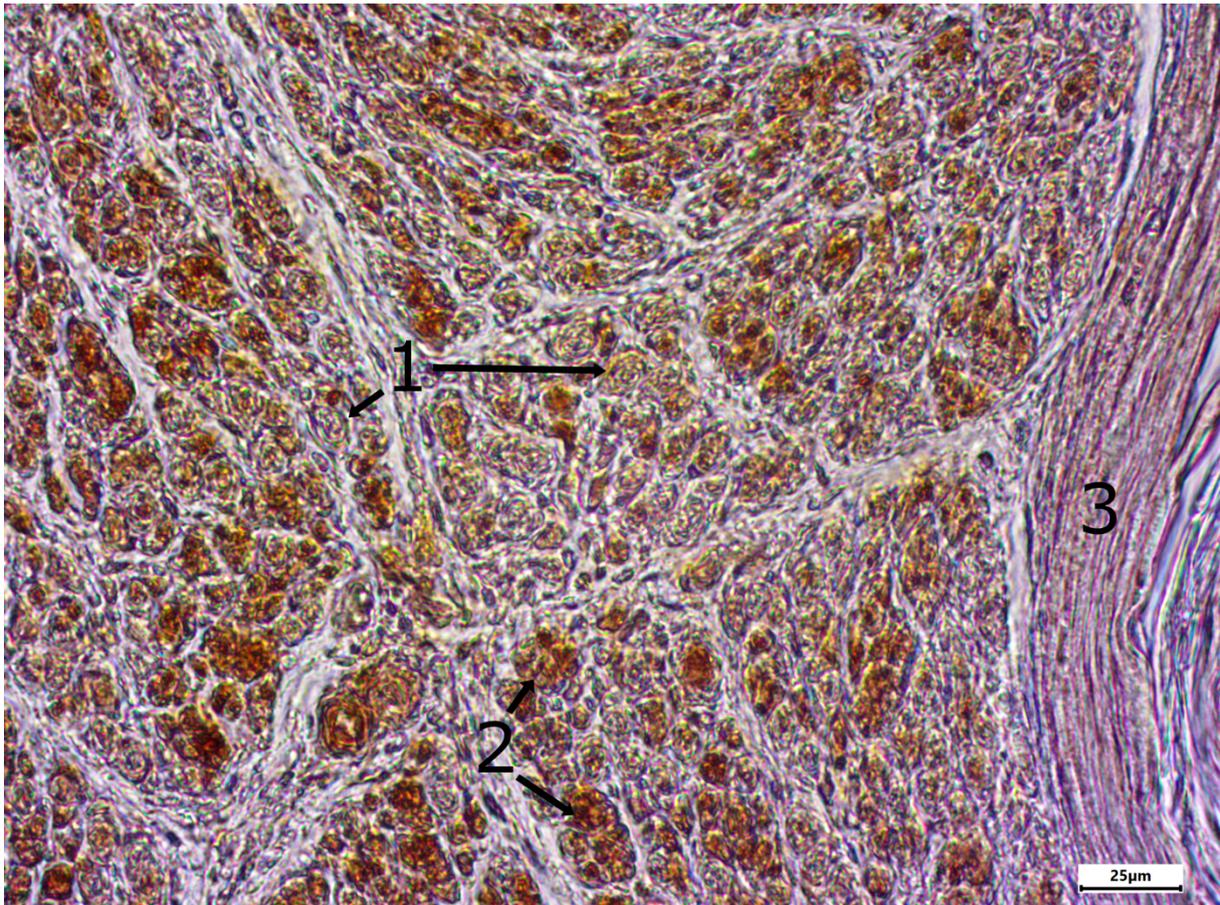


*Abbildung 22: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1*



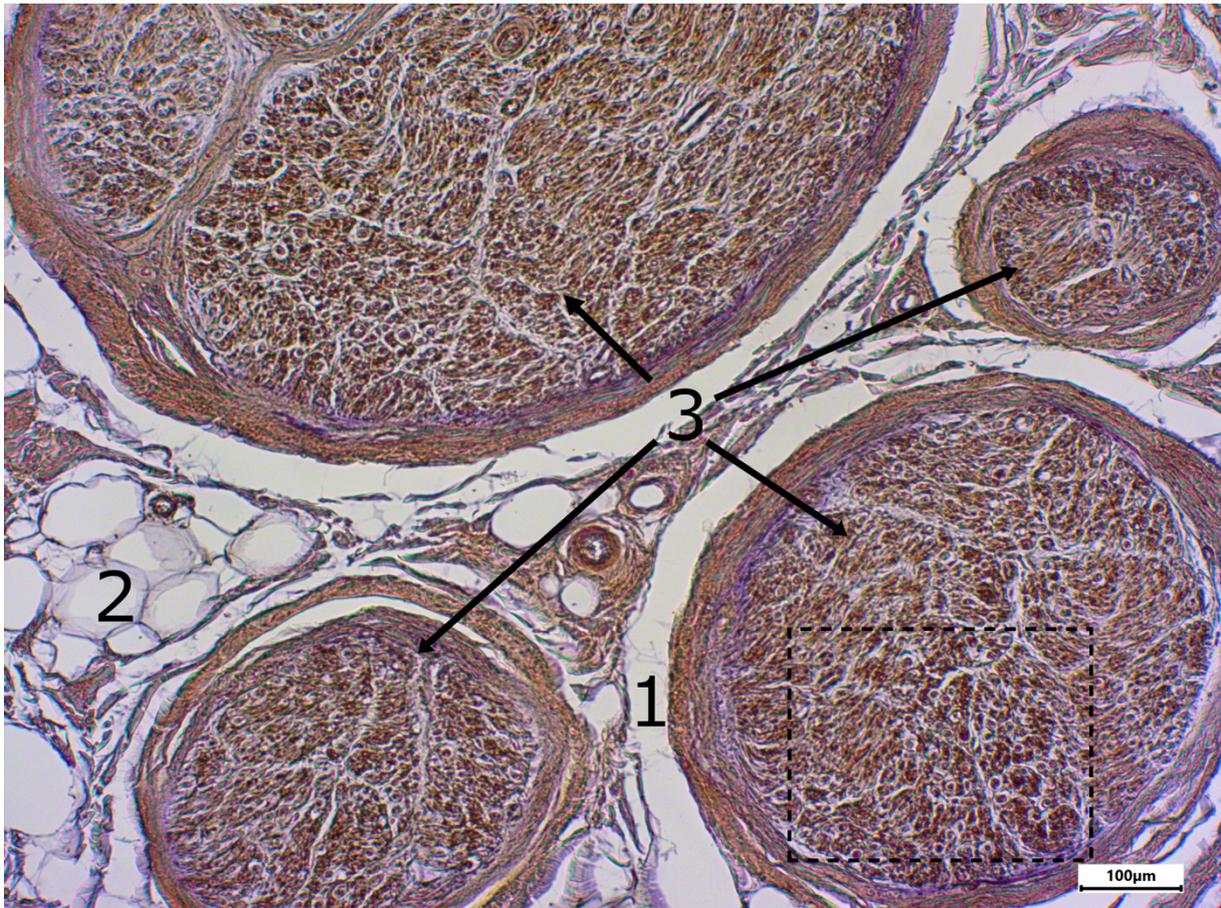
*Abbildung 23: IHC-Färbung N. ulnaris - Querschnitt - Spender 8*

*Schrumpfspalt (1), Querschnitt eines Blutgefäßes (2) und Perineurium (3) mit etwas schwächerem Farbsignal im Vergleich zu den quer angeschnittenen Nervenfaserbündeln (4) mit starkem Farbsignal.*



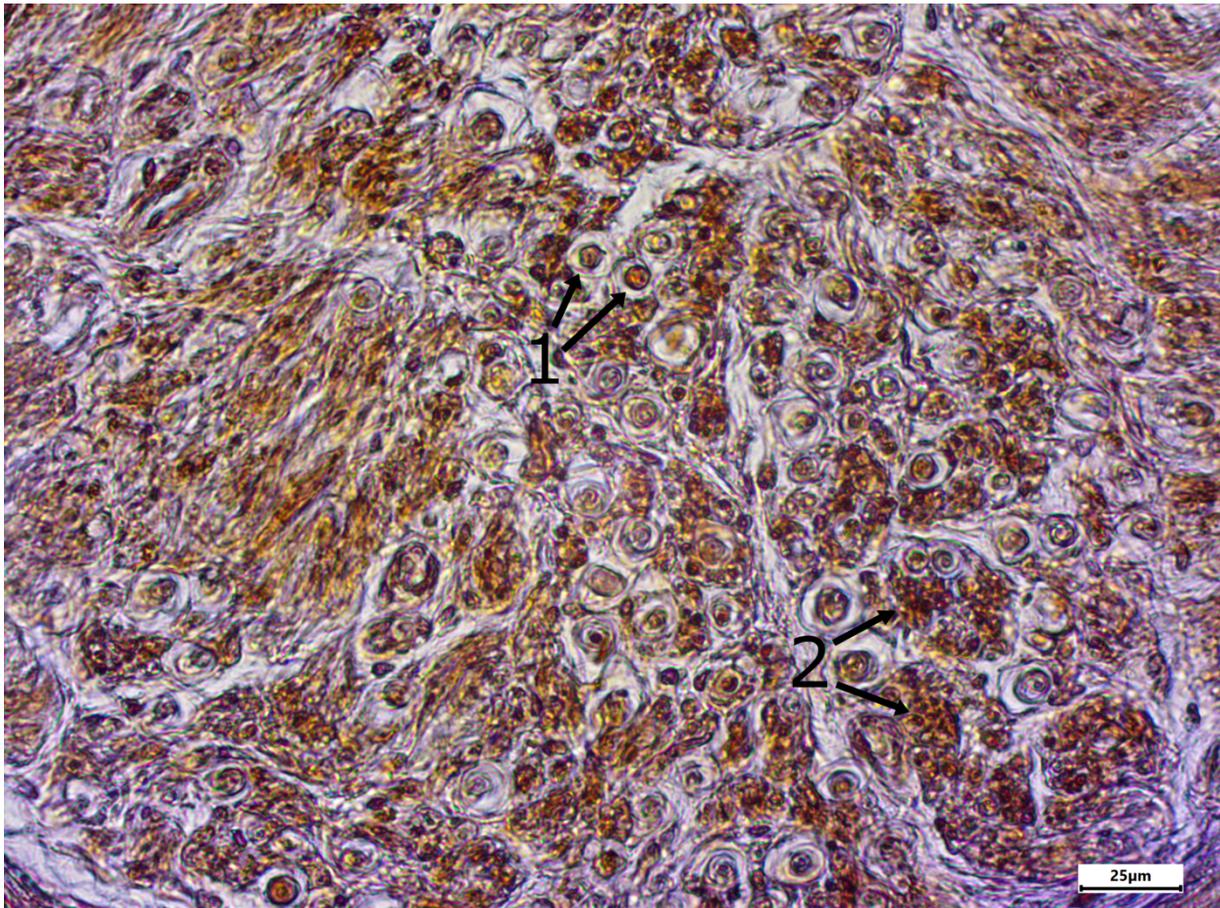
*Abbildung 24: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ulnaris - Querschnitt - Spender 8*

*Quer angeschnittene markhaltige Nervenfasern (1) mit schwächerem Farbsignal, quer angeschnittene marklose Nervenfasern (2) mit starkem Farbsignal und Perineurium (3) mit schwächerem Farbsignal.*



*Abbildung 25: IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8*

*Schrumpfspalt (1), Adipozyten (2) ohne Farbsignal und quer angeschnittene Nervenfaserbündel (3) mit starkem Farbsignal.*



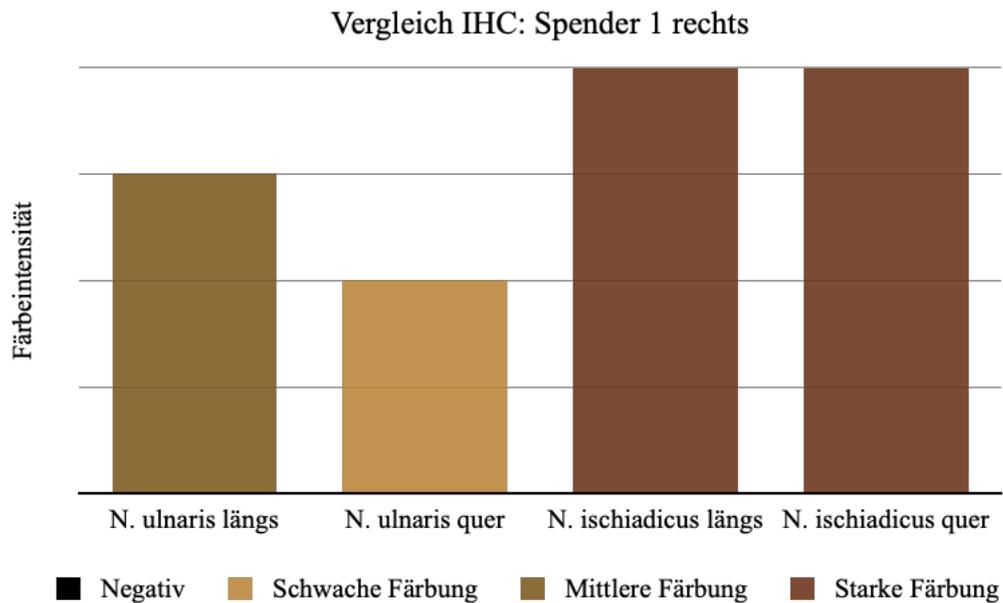
*Abbildung 26: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8*

*Quer angeschnittene markhaltige Nervenfasern (1) mit schwächerem Farbsignal und quer angeschnittene marklose Nervenfasern (2) mit starkem Farbsignal.*

### 4.3 Färbesignal aller Nerven bei allen Spendern

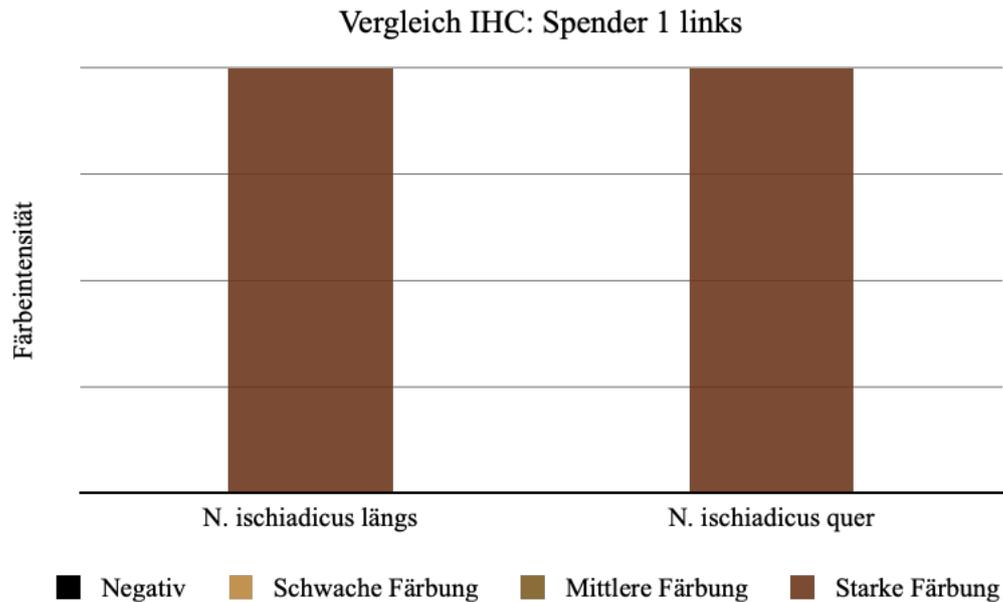
Zunächst sollen die Nervenproben, die bei jeweils einem Körperspender entnommen wurden, untereinander verglichen werden. Dabei wird noch zwischen links- und rechtsseitiger Entnahme unterschieden.

#### 4.3.1 Spender 1



*Diagramm 1: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 1*

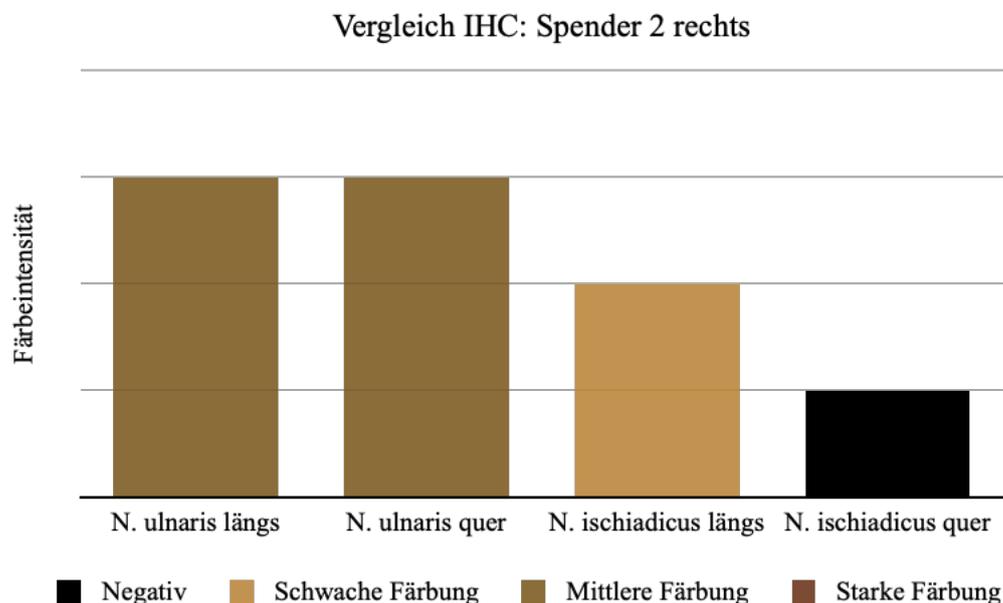
*Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 1 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.*



*Diagramm 2: IHC-Färbesignal bei Nerven der linken Seite von Spender 1*

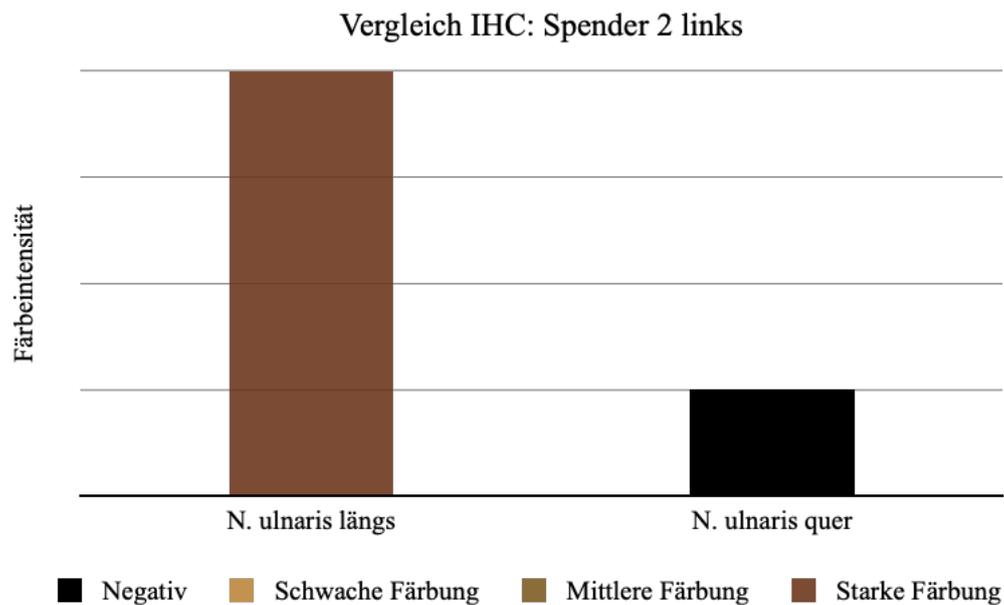
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 1 links. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

### 4.3.2 Spender 2



*Diagramm 3: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 2*

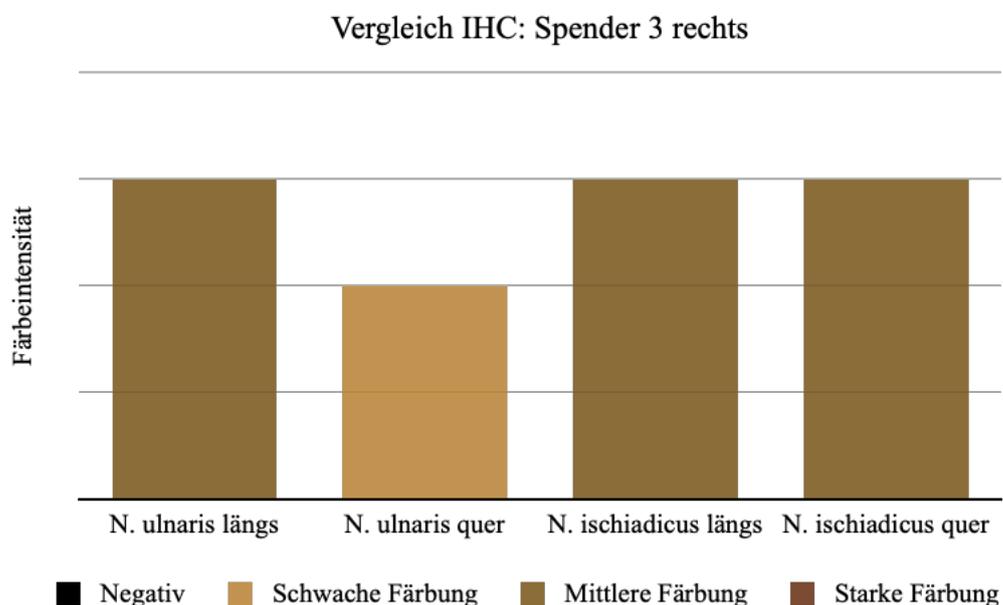
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 2 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.



*Diagramm 4: IHC-Färbesignal bei Nerven der linken Seite von Spender 2*

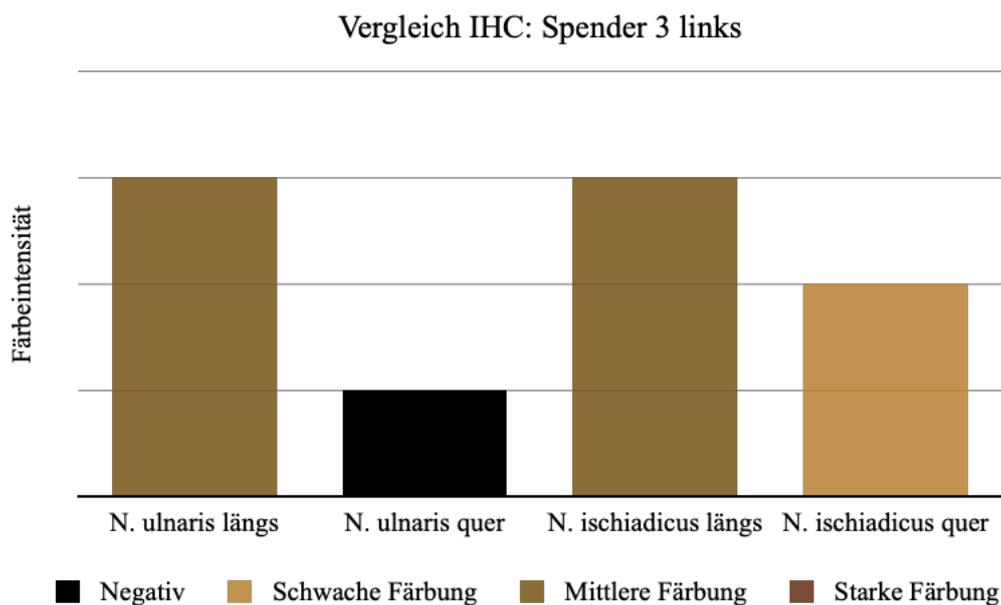
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 2 links. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

### 4.3.3 Spender 3



*Diagramm 5: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 3*

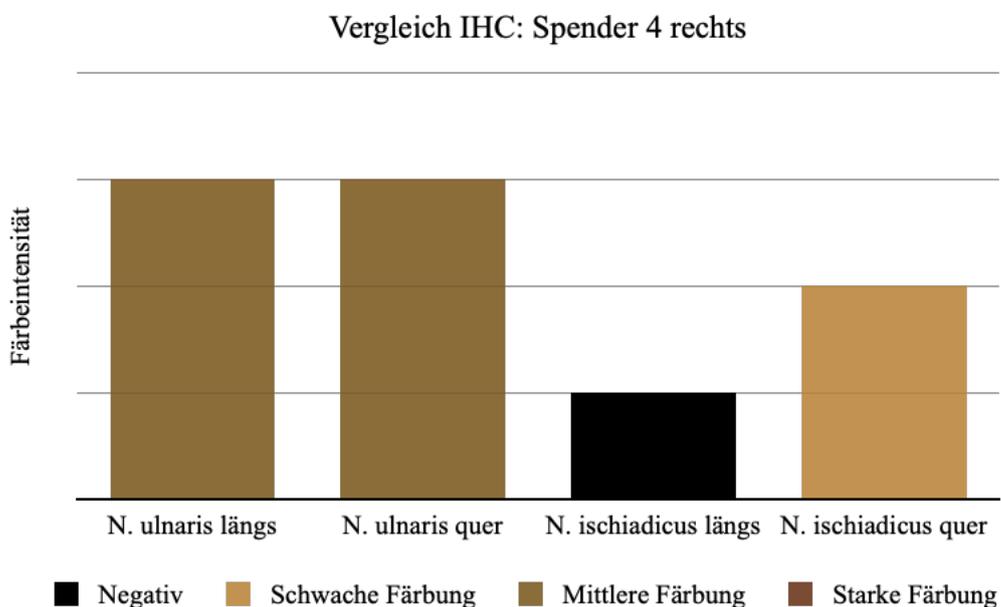
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 3 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.



*Diagramm 6: IHC-Färbesignal bei Nerven der linken Seite von Spender 3*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 3 links. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

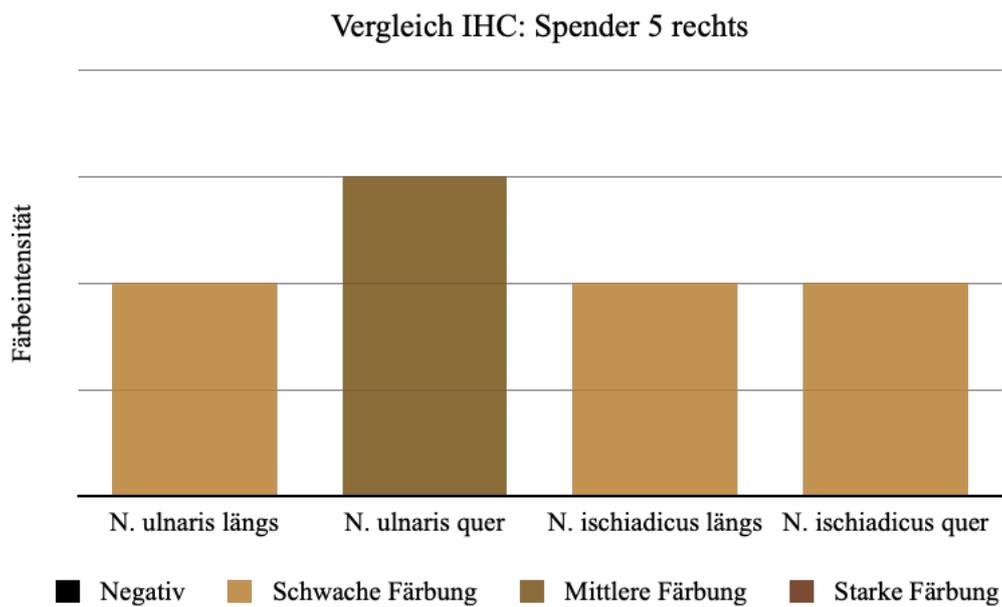
#### 4.3.4 Spender 4



*Diagramm 7: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 4*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 4 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

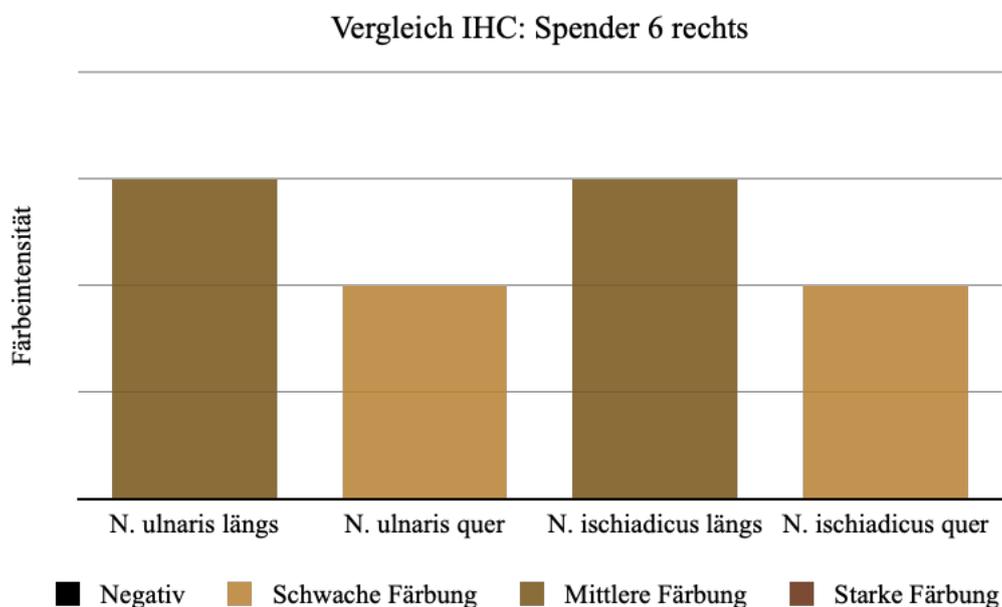
### 4.3.5 Spender 5



*Diagramm 8: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 5*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 5 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

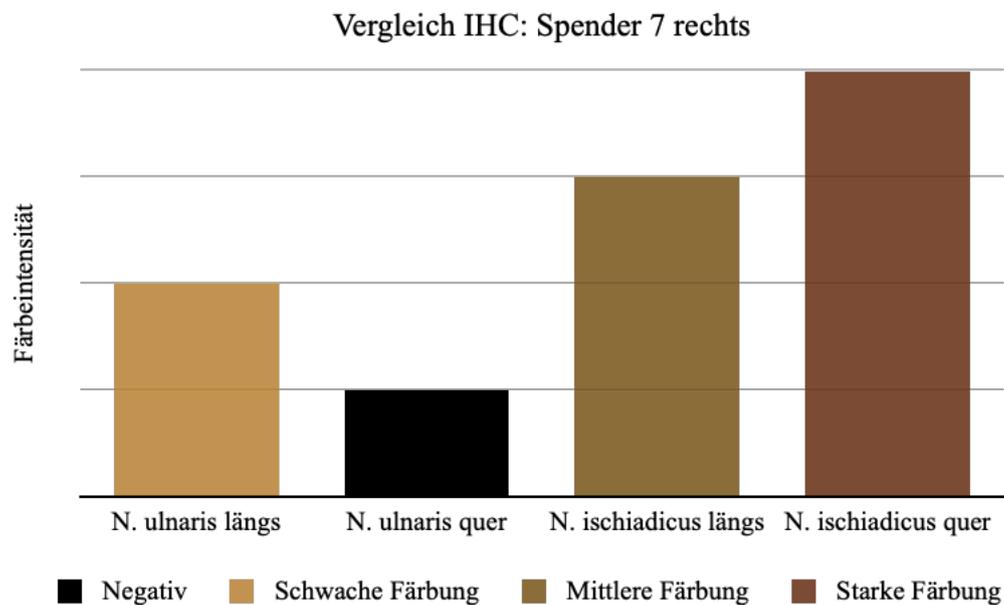
### 4.3.6 Spender 6



*Diagramm 9: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 6*

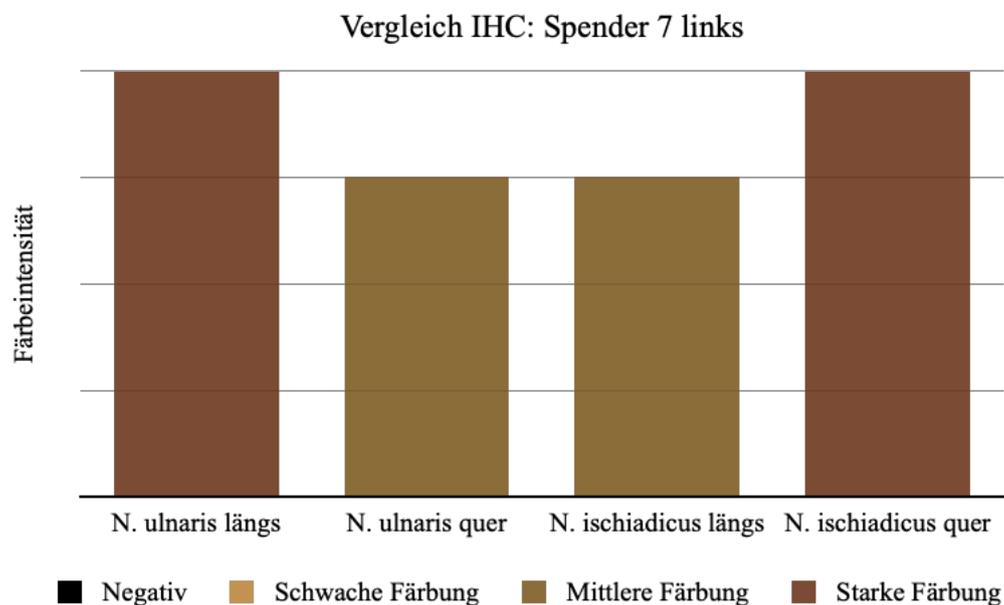
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 6 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

### 4.3.7 Spender 7



*Diagramm 10: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 7*

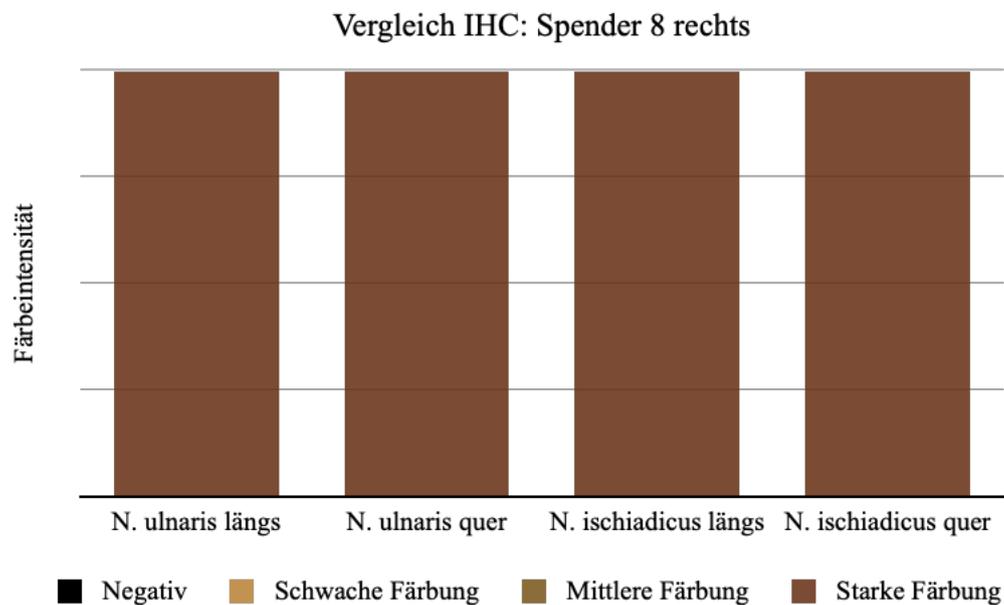
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 7 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.



*Diagramm 11: IHC-Färbesignal bei Nerven der linken Seite von Spender 7*

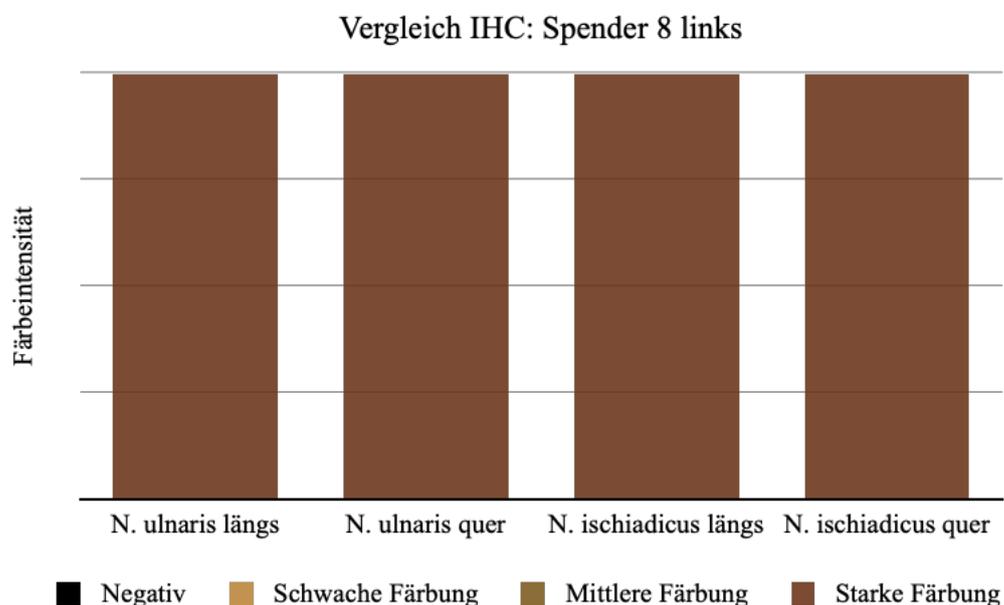
Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 7 links. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

### 4.3.8 Spender 8



*Diagramm 12: IHC-Färbesignal bei Nerven der rechten Seite von Spender 8*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 8 rechts. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.



*Diagramm 13: IHC-Färbesignal bei Nerven der linken Seite von Spender 8*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung von Spender 8 links. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nerven aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Farbintensität in der IHC-Färbung als Ordinalskala aufgetragen. Zusätzlich ist die Färbeintensität farblich kodiert.

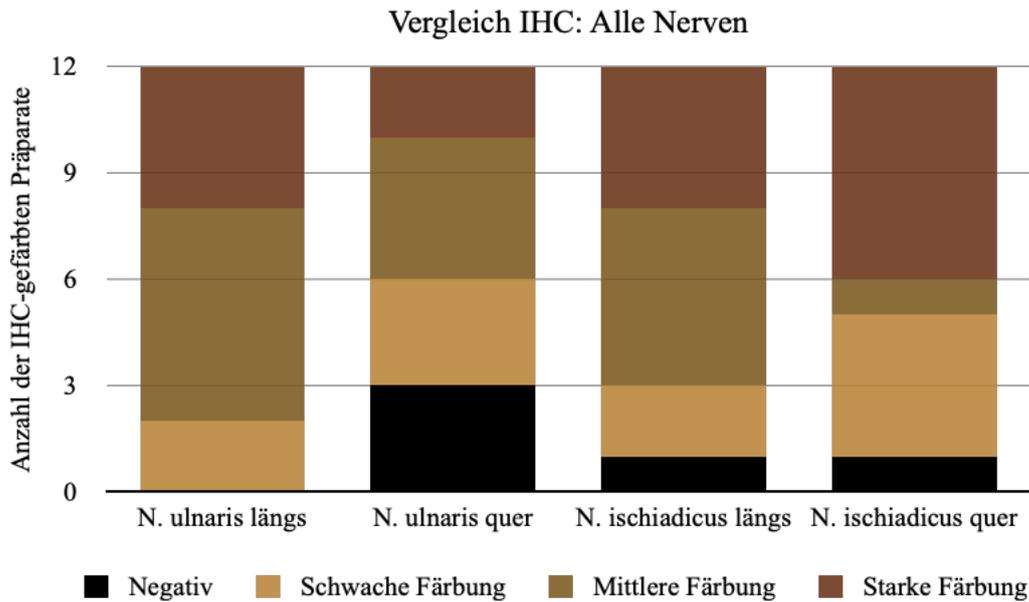
## 4.4 Färbesignal aller Nerven im Vergleich

Im nächsten Schritt sollen die beiden Nerven N. ischiadicus und N. ulnaris in jeweils Längs- und Querschnitt untereinander verglichen werden. Größere Unterschiede zwischen N. ischiadicus und N. ulnaris ließen sich im Hinblick auf die Anfärbung nicht feststellen. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Nervenquerschnitte im Vergleich zu den Längsschnitten generell etwas schwächer angefärbt haben. Bei den Querschnittspräparaten des N. ulnaris gab es insgesamt drei Proben, die sich gar nicht in der IHC-Färbung angefärbt haben, wohingegen sich die Längsschnitte alle angefärbt haben. Beim N. ischiadicus gab es sowohl beim Querschnitt als auch beim Längsschnitt jeweils eine Probe, die kein Signal in der IHC-Färbung zeigte.

*Tabelle 10: IHC-Färbesignal aller Nerven im Vergleich*

Spender	N. ulnaris				N. ischiadicus			
	Längsschnitt		Querschnitt		Längsschnitt		Querschnitt	
	recht	links	recht	links	rechts	links	rechts	links
1	++		+		+++	+++	+++	+++
2	++	+++	++	-	+		-	
3	++	++	+	-	++	++	++	+
4	++		++		-		+	
5	+		++		+		+	
6	++		+		++		+	
7	+	+++	-	++	++	++	+++	+++
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

*Stärke des Farbsignals unterteilt in stark (+++), mittel (++), schwach (+) und negativ.*

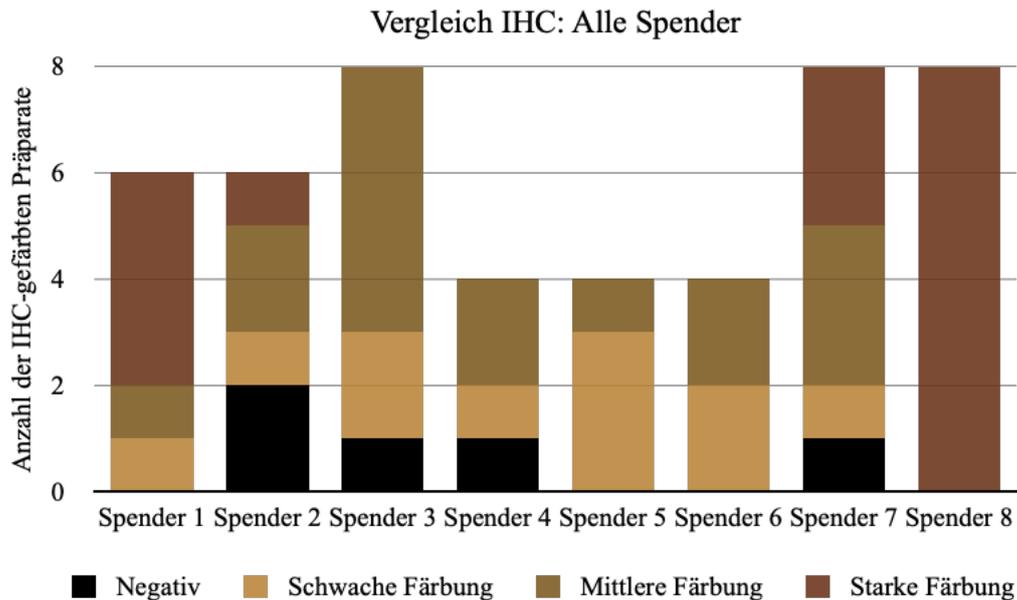


*Diagramm 14: IHC-Färbesignal aller Nerven im Vergleich*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung aller beurteilten Nervenschnitte bei allen Spendern. Auf der x-Achse sind die untersuchten Nervenschnitte aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der untersuchten IHC-Färbungen des jeweiligen Nerven aufgetragen. Dabei wurde kein Unterschied zwischen rechts- und linksseitig entnommenen Nerven gemacht, wodurch sich insgesamt zwölf Proben für einen Nerv ergeben (acht rechtsseitig und vier linksseitig entnommene Nerven). Die farbliche Kodierung innerhalb der einzelnen Säulen stellt die Farbintensität der unterschiedlichen ausgewerteten Nervenpräparate dar.

## 4.5 Färbesignal aller Spender im Vergleich

Zum Schluss sollen noch die verschiedenen Spender in Bezug auf die Farbeintensität ihrer Nerven in der IHC-Färbung verglichen werden. Dabei zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede. Spender 8 beispielsweise zeigte bei allen entnommenen Nerven durchweg eine starke Färbung. Spender 2 hingegen hat bei zwei Proben ein negatives Signal gezeigt. Auch die Proben von Spender 4 haben sich im Gesamtvergleich aller Spender eher schlecht angefärbt. Auch hier gab es eine Probe, die kein Signal gezeigt hat.



*Diagramm 15: IHC-Färbesignal aller Spender im Vergleich*

Dargestellt sind die Ergebnisse der IHC-Auswertung aller beurteilten Nervenschnitte bei allen Spendern. Auf der x-Achse sind die Spender aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der untersuchten IHC-Färbungen des jeweiligen Spenders aufgetragen. Die unterschiedliche Anzahl der IHC-Präparate bei verschiedenen Spendern kommt dadurch zustande, dass die Nerven bei einigen Spendern beidseitig entnommen wurden (s. Tabelle 9). Die farbliche Kodierung innerhalb der einzelnen Säulen stellt die Farbintensität der unterschiedlichen ausgewerteten Nervenpräparate dar.

## 4.6 Gesamtergebnis

Bezugnehmend auf die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass der Nachweis von TRPC-6 im peripheren Nervengewebe mittels Immunhistochemie erbracht worden ist. Insgesamt zeigten 43 von 48 histologischen Schnitten ein positives Farbsignal. 16 Schnitte zeigten dabei ein starkes, 16 Schnitte ein mittleres und 11 Schnitte ein schwaches Farbsignal. Lediglich 5 Schnitte zeigten kein Farbsignal. Verschiedene Bereiche der histologischen Proben wurden dabei unterschiedlich stark angefärbt. So zeigen die Adipozyten kein Farbsignal, wohingegen die marklosen Nervenfasern ein starkes Signal aufweisen. Sowohl Perineurium und myelinisierte Nervenfasern zeigen ein etwas schwächeres Farbsignal. Größere Differenzen zwischen N. ischiadicus und N. ulnaris im Hinblick auf die Anfärbung ließen sich nicht feststellen. Einen geringen Unterschied gab es lediglich in der Anfärbung von Querschnitten und Längsschnitten. Dabei waren die Längsschnitte bei beiden Nerven durchweg etwas besser gefärbt. Größere Abweichungen zeigten sich hingegen zwischen den verschiedenen Spendern. Ein starkes Signal zeigte sich unter anderem bei Spender 1 und 8, während Spender 2 und 4 eine eher schwächere Anfärbung zeigten.

## 5 Diskussion

Insgesamt kann konstatiert werden, dass der Nachweis von TRPC-6 in dem peripheren Nervengewebe von N. ischiadicus und N. ulnaris erbracht worden ist. Trotzdem soll auf potenzielle Schwachstellen in der Methodik und eine differenziertere Betrachtung der Auswertung im Folgenden noch genauer eingegangen werden. Abschließend soll noch eine Einordnung der Ergebnisse anhand des aktuellen Forschungsstandes erfolgen.

### 5.1 Methodendiskussion

Bei der angewandten Methodik handelt es sich um ein in der Arbeitsgruppe etabliertes und durch mehrere Studien validiertes Protokoll [77], [78], [79], [80], [81]. Dennoch sollen mögliche Schwächen im Ablauf dieses Verfahrens an dieser Stelle in chronologischer Reihenfolge besprochen werden.

Als erster Punkt ist die unterschiedlich lange Zeitspanne zwischen Tod und Fixierung der Körperspender zu nennen. In diesem Zeitraum setzen bereits Verfallsprozesse ein, welche zu einem vermehrten Proteinabbau führen können [82]. Wie ausgeprägt diese Proteindegradation stattfindet, hängt von einer Reihe von Faktoren ab [82]. Eine wichtige Rolle spielen dabei unter anderem die Umgebungstemperatur, Alter sowie äußere Faktoren zum Zeitpunkt des Ablebens [82] und nicht zuletzt die Dauer bis zur endgültigen Fixierung [83]. So kann es passieren, dass das Antigen in den verschiedenen Spendern unterschiedlich gut erhalten bleibt und es zu Abweichungen in der IHC-Färbung kommt [83]. In dieser Studie lag die Länge des postmortalen Intervalls bis zur Fixierung bei den meisten Körperspendern im Bereich von ein bis zwei Tagen. Lediglich bei Spender 2 war dieses Intervall mit sechs Tagen deutlich länger. Hier gab es zwar auch zwei negative Schnitte, die restlichen Proben von Spender 2 waren jedoch ebenfalls positiv.

Der nächste Schritt war die Fixierung. Die Körperspender wurden dabei alle mittels NEP-Fixierung nach Weigner fixiert. Eine unterschiedliche Fixierung der Körperspender stellt somit keine Variable in dieser Studie dar.

Die Probenentnahme stellt eine weitere potenzielle Fehlerquelle dar. Hierbei wurde aber wie in der Methodik beschrieben auf ein standardisiertes Vorgehen geachtet. Die Nerven wurden im-

mer an der gleichen Stelle entnommen und die Schnitte erfolgten immer entlang von ausgewählten Landmarken, um eine möglichst hohe Präzision zu gewährleisten.

Nach der Entnahme wurden die Proben zunächst in Formalin gelagert. Das führt zu Querverbindungen zwischen den Proteinen und kann so durch Strukturveränderungen deren Epitope maskieren [84]. Dies kann Auswirkungen auf die IHC-Färbung haben, wobei dies mutmaßlich stark von der Dauer der Formalinfixierung, dem verwendeten Antikörper und entsprechendem Antigen sowie dem Demaskierungsvorgang abhängt [85]. Für den in dieser Studie verwendeten Citratpuffer konnte jedoch eine gute Fähigkeit zur Demaskierung verschiedener Antigene, selbst bei unterschiedlich langen Fixierungszeiten, gezeigt werden [86].

Ein weiterer wichtiger Faktor, auf den noch nicht eingegangen wurde, ist der Antikörper gegen TRPC-6. Wie für jeden Antikörper, wird auch hier ein Spezifitätsnachweis benötigt [87]. Hierfür färbt man zwei Gewebeproben, die das Antigen enthalten, mittels IHC und inkubiert dabei eine Gewebeprobe lediglich mit Primärantikörper und die zweite Probe zusätzlich mit einem Kontrollpeptid, wobei das Peptid der Zielbindungsregion des Antikörpers entspricht [87]. Bei vorliegender Spezifität des Antikörpers sollte beim abschließenden Vergleich beider Schnitte die Probe mit zusätzlich inkubiertem Kontrollpeptid deutlich schwächer angefärbt sein [87]. Wie bereits beschrieben, handelte es sich bei der Methodik dieser Studie um ein in der Arbeitsgruppe bewährtes Protokoll. Im Rahmen bereits stattgefundener Untersuchungen wurden dabei schon Spezifitätsnachweise in Bezug auf den Antikörper an menschlichem Gewebe vorgenommen, sodass im Fall dieser Versuchsreihe darauf verzichtet wurde [77], [79]. Eine noch bessere Möglichkeit, um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen, ist die Anwendung des Antikörpers an einer Knockout-Zelllinie, die das Antigen nicht exprimiert [87]. Für den Antikörper, der in dieser Studie benutzt wurde, wurde eine solche Knockout-Validierung bereits im Rahmen einer Arbeit von Kistler et al. mittels Western-Blot an TRPC-6 negativen Mäusen vorgenommen [88].

Bei dem verwendeten Primärantikörper handelte es sich in diesem Fall um einen polyklonalen Antikörper der Firma Alomone Labs [89]. Trotz mehrfacher Validierung stellt der Antikörper jedoch immer noch eine Schwachstelle in der Studie dar. Gerade polyklonale Antikörper zeigen eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Chargen und können so die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen [90]. Allerdings können selbst die Antikörperchargen von monoklonalen Antikörpern divergieren und so ebenfalls Differenzen in der IHC-Färbung bedingen [87].

Ein Problem bei der Auswertung der Proben stellte außerdem die unspezifische Färbung dar. Potenzieller Grund hierfür kann eine zu starke Konzentration des Primärantikörpers sein [91]. In dieser Studie wurde eine Konzentration des Primärantikörpers von 1:100 gewählt. Auch wenn diese Konzentration bereits in einigen anderen Arbeiten verwendet wurde [77], [78], [79], kann sich die optimale Antikörperkonzentration von Gewebe zu Gewebe unterscheiden [92]. Um die geeignete Antikörperkonzentration herauszufinden, bei der ein möglichst großer Unterschied zwischen unspezifischer und spezifischer Färbung vorliegt, kann man verschiedene Konzentrationen des Primärantikörpers anhand einer Verdünnungsreihe testen [92]. Eine solche Verdünnungsreihe wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt. Aufgrund seiner Polyklonalität ist der verwendete Primärantikörper zusätzlich anfällig für Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen und kann dadurch auch zu einer vermehrten unspezifischen Färbung beitragen [93].

Kritisch zu sehen ist außerdem die rein subjektive Beurteilung in Bezug auf die IHC-Färbung. Bei dem angewandten System zur semiquantitativen Auswertung mit der Unterscheidung von vier Stufen (negativ, schwach, mittel, stark) handelt es sich um eine weit verbreitete Methode [94]. Die lediglich visuell erfolgte Bewertung durch Inspektion der histologischen Schnitte kann durch die Subjektivität des Untersuchenden jedoch variieren und ist somit sehr fehleranfällig [95]. Zusätzlich kompliziert wurde die Auswertung durch das Phänomen der Farbüberlagerung von Chromogen und Gegenfärbung mit Hämatoxylin [96].

Zuletzt kann auch die Schnittdicke der histologischen Präparate eine Auswirkung auf die Anfärbbarkeit der Proben haben, wobei dickere Schnitte sich intensiver anzufärben scheinen [93]. Um diesen Störfaktor zu umgehen, wurde die Schnittdicke am Mikrotom immer auf 7  $\mu\text{m}$  eingestellt.

Alle diese Punkte können Unterschiede in der Ausprägung des Farbsignals und der Bewertung der mittels IHC gefärbten Proben bedingen.

## **5.2 Diskussion individueller Faktoren**

Eine unterschiedlich starke Färbung in der IHC kann ebenfalls auf Differenzen in der Kanalexpression zurückzuführen sein [94]. Da die Nervenproben von acht verschiedenen Spendern stammen, ist davon auszugehen, dass die Nerven aufgrund individueller Faktoren eine unterschiedlich starke Kanalexpression zeigen. Dabei kommt eine Vielzahl von Ursachen infrage.

Einige der möglichen Aspekte gehen aus den Spenderdaten und den Totenscheinen der Spender hervor. Aufgrund des lediglich kleinen Spenderkollektivs, welches hier untersucht wurde, können allerdings keine definitiven Rückschlüsse auf den Einfluss gezogen werden, den diese Faktoren auf die Kanalexpression haben. Trotzdem sollen im Folgenden einige mögliche Punkte diskutiert werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können Erkrankungen der Grund für eine veränderte Expression von TRPC-6 sein [39]. Eine relevante Erkrankung bei der TRPC-6 eine Rolle spielt, ist der Diabetes mellitus [17]. Hierbei kommt es zu erhöhten Blutzuckerspiegeln [45]. Für einige Gewebe wie zum Beispiel dorsale Spinalganglien sowie auch Podozyten und Glomeruli der Niere konnte im Rahmen einer solchen hyperglykämischen Stoffwechsellage bereits ein vermehrtes Vorkommen von TRPC-6 gezeigt werden [45], [97]. Dies steht im Kontrast zu dem insgesamt eher schwachen Farbsignal von Spender 4, bei dem ebenfalls ein Diabetes mellitus Typ 2 als Vorerkrankung angegeben war. Allerdings muss man sagen, dass sowohl die genauen Krankheitsstadien als auch die Krankheitsverläufe und ggf. stattgefundenen Therapien nicht aus den Totenscheinen hervorgehen. Beispielsweise können eingenommene Medikamente wie Metformin zur Behandlung eines Diabetes mellitus Typ 2 den Blutzuckerspiegel reduzieren [98]. Zudem konnte explizit für Metformin gezeigt werden, dass es zu einer Herunterregulation von TRPC-6 in den Podozyten der Niere führt [97]. Ähnliche Mechanismen wären auch für andere Gewebe denkbar. Außerdem gibt es auch Gewebe, in dem bei vorliegendem Diabetes mellitus weniger TRPC-6 exprimiert wird, wie es zum Beispiel bei Blutgefäßen der Fall ist [99].

Eine besonders starke Färbung zeigte sich hingegen bei Spender 8. Bei diesem Körperspender lag laut Totenschein ein chronisches Schmerzsyndrom vor. Chronische Schmerzen können unter anderem eine Hyperalgesie und Allodynie bedingen [100]. Die Induktion einer solchen Hyperalgesie stand in Tierversuchen im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von TRPC-6 in dorsalen Spinalganglien [45]. In einer weiteren Studie war eine induzierte Allodynie ebenso mit einer vermehrten TRPC-6 Expression in dorsalen Spinalganglien vergesellschaftet [62]. Dabei wurde TRPC-6 vor allem in IB4-positiven Neuronen vermehrt exprimiert [62]. Sie gehören zu den sensorischen Neuronen vom Fasertyp C [101]. Diese C-Fasern sind unmyelinisiert und unter anderem für die Schmerzwahrnehmung verantwortlich [102], [103]. Die angeführten Erkenntnisse sind konsistent mit der Beobachtung, dass die unmyelinisierten Nervenfasern im histologischen Querschnitt bei Spender 8 ein besonders starkes Farbsignal bieten.

Auch körperliche Aktivität hat einen Einfluss auf die Expression von Transmembranproteinen, wie die folgenden Beispiele zeigen. Vor allem für Muskelgewebe sind dabei entsprechende Anpassungsprozesse beschrieben. So kommt es durch sportliche Betätigung beispielsweise zu einem vermehrten Einbau bestimmter Calciumkanäle, den Dihydropyridinrezeptoren, in den Skelettmuskel [104]. Des Weiteren hat Training einen Einfluss auf die Expression von Pan-nexinen im Muskelgewebe [105]. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Membrankanäle [105]. Auch die Expression des mitochondrialen Calciumuniporters (MCU), der eine entscheidende Rolle bei der Muskelfunktion spielt, wird durch Kraftübungen der jeweiligen Muskeln hochreguliert [106]. Außerdem werden durch Sport auch vermehrt kardiale Kaliumkanäle expri-miert [107]. Aber auch in Nerven kommt es nach Belastung zu einer modifizierten Expression verschiedener Kanäle [108]. Neben diesen muskulären Veränderungen konnte nämlich gezeigt werden, dass es durch Training ebenfalls zu einer veränderten Transkription von Genen für verschiedene Rezeptoren und Ionenkanäle in alpha-Motoneuronen kommt [108]. Ein Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Expression von TRPC-6 in peripheren Nerven wäre daher durchaus denkbar. Erkrankungen wie zum Beispiel ein Subduralhämatom können eine Muskel-schwäche bedingen und dadurch zu einer eingeschränkten Mobilität führen [109]. Eine solche Immobilität aufgrund eines Subduralhämatoms lag auch bei Spender 2 vor, was in diesem Fall möglicherweise einen Grund für das schwächere Farbsignal des N. ischiadicus darstellen könnte.

Aber auch im Alter nimmt die Mobilität und in der Folge auch die Aktivität der Muskulatur oft stark ab [106]. Außerdem kommt es zu einer Reihe von physiologischen Veränderungen der peripheren Nerven durch den Alterungsprozess [110]. Zudem ist weithingehend bekannt, dass die Expression verschiedener Ionenkanäle altersbedingten Veränderungen unterliegt [111]. Diese Punkte könnten also auch für Unterschiede in der TRPC-6 Expression sorgen. Im Fall dieser Studie waren die Farbsignale mit zunehmendem Alter etwas schwächer ausgeprägt, auch wenn dies lediglich eine Tendenz darstellt. Einzige Ausnahme dabei war Spender 8, der wie bereits beschrieben an einem chronischen Schmerzsyndrom litt.

Ein Faktor, der ebenfalls Einfluss auf die Expression von Kanälen haben kann, ist das Ge-schlecht, wie beispielsweise eine Arbeit zeigt, bei der unter anderem die Häufigkeit von ROMK und NKCC2 in der Niere zwischen Mäusen verglichen wurde [112]. Ein Vergleich der ge-schlechtsabhängigen Expression von TRPC-3 und TRPV-4 in Koronararterien von Schweinen zeigte wiederum keine Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Gewebepro-ben [113]. Ein Einfluss des Geschlechts auf Differenzen in der Kanalexpression von TRPC-6

in peripherem Nervengewebe kann in dieser Arbeit aufgrund der ausschließlich weiblichen Körperspender allerdings nicht beurteilt werden.

### 5.3 Zusammenfassung

Die Relevanz von TRPC-6 für eine Vielzahl pathophysiologischer Zusammenhänge ist mittlerweile bekannt [39]. Auch in Nervengewebe hat der Kanal dabei wichtige Funktionen [114]. Speziell in peripherem Nervengewebe spielt er eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Hyperalgesie [64]. Mehrere aktuelle Studien konnten bereits zeigen, dass eine vermehrte Schmerzwahrnehmung in Form einer Hyperalgesie oder Allodynie im Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von TRPC-6 in dorsalen Spinalganglien steht [45], [62], [64]. Zukünftig könnte der Kanal daher einen wichtigen Angriffspunkt in der Behandlung dieser Schmerzzustände darstellen [64].

Hinsichtlich der Zielsetzung dieser Arbeit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass der immunhistochemische Nachweis von TRPC-6 in Humanpräparaten des N. ulnaris und N. ischiadicus mit dieser Studie erbracht werden konnte. Dabei zeigten die unmyelinisierten Nervenfasern das stärkste Signal. Eine etwas schwächere Anfärbung zeigten myelinisierte Nervenfasern und das Perineurium. Die Adipozyten zeigten kein Signal. Unterschiede im Hinblick auf die Anfärbung von N. ulnaris und N. ischiadicus gab es nicht. Beim Farbsignal von Längsschnitten und Querschnitten ließ sich lediglich eine geringe Differenz im Sinne einer etwas besseren Anfärbung der Längsschnitte feststellen.

Vorherige Studien waren bisher auf peripheres Nervengewebe aus den dorsalen Spinalganglien begrenzt [45], [46], [62], [63], [64]. Außerdem handelte es sich dabei bei den meisten Proben um tierisches Gewebe [45], [46], [62], [63]. Ob TRPC-6 abseits der dorsalen Spinalganglien auch in peripheren Nerven exprimiert wird, war bisher unklar. Soweit bekannt, stellt dies somit den ersten Nachweis von TRPC-6 in peripheren Nerven menschlicher Gewebeproben dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] K. Venkatachalam and C. Montell, “TRP channels,” *Annu Rev Biochem*, vol. 76, pp. 387–417, 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142819.
- [2] L. J. Wu, T. B. Sweet, and D. E. Clapham, “International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the Mammalian TRP ion channel family,” Sep. 2010. doi: 10.1124/pr.110.002725.
- [3] D. J. Cosens and A. Manning, “Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant,” *Nature*, vol. 224, no. 5216, pp. 285–287, Oct. 1969, doi: 10.1038/224285A0.
- [4] B. Minke, C. F. Wu, and W. L. Pak, “Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant,” *Nature*, vol. 258, no. 5530, pp. 84–87, 1975, doi: 10.1038/258084A0.
- [5] R. C. Hardie and B. Minke, “The *trp* gene is essential for a light-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors,” *Neuron*, vol. 8, no. 4, pp. 643–651, 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90086-S.
- [6] M. Gees, G. Owsianik, B. Nilius, and T. Voets, “TRP channels,” Jan. 2012. doi: 10.1002/cphy.c110026.
- [7] B. Nilius and G. Owsianik, “The transient receptor potential family of ion channels,” *Genome Biol*, vol. 12, no. 3, Mar. 2011, doi: 10.1186/GB-2011-12-3-218.
- [8] D. E. Clapham, D. Julius, C. Montell, and G. Schultz, “International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels,” Dec. 2005. doi: 10.1124/pr.57.4.6.
- [9] W. Cheng, C. Sun, and J. Zheng, “Heteromerization of TRP channel subunits: Extending functional diversity,” 2010, *Higher Education Press*. doi: 10.1007/s13238-010-0108-9.
- [10] Y. Zhao, B. M. McVeigh, and V. Y. Moiseenkova-Bell, “Structural Pharmacology of TRP Channels,” Aug. 20, 2021, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.jmb.2021.166914.

- [11] M. Zhang, Y. Ma, X. Ye, N. Zhang, L. Pan, and B. Wang, “TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases,” Dec. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-023-01464-x.
- [12] P. D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, and C. Montell, “TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, no. 21, pp. 9652–9656, Oct. 1995, doi: 10.1073/PNAS.92.21.9652.
- [13] H. Wang *et al.*, “TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes,” *Pharmacol Ther*, vol. 209, May 2020, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107497.
- [14] G. Boulay *et al.*, “Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* Transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G(q) class of g protein,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 47, pp. 29672–29680, Nov. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.47.29672.
- [15] A. Riccio *et al.*, “mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues,” *Molecular Brain Research*, vol. 109, no. 1–2, pp. 95–104, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0169-328X(02)00527-2.
- [16] C. Strübing, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, and D. E. Clapham, “Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 40, pp. 39014–39019, Oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.M306705200.
- [17] X. Chen, G. Sook, I. S. Demaree, F. A. White, and A. G. Obukhov, “Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now,” *Cells*, vol. 9, no. 9, Aug. 2020, doi: 10.3390/CELLS9091983.
- [18] C. M. Azumaya, F. Sierra-Valdez, J. F. Cordero-Morales, and T. Nakagawa, “Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6),” *J Biol Chem*, vol. 293, no. 26, pp. 10381–10391, Jun. 2018, doi: 10.1074/JBC.RA118.003183.

- [19] Q. Tang *et al.*, “Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels,” *Cell Res*, vol. 28, no. 7, pp. 746–755, Jul. 2018, doi: 10.1038/S41422-018-0038-2.
- [20] J. Li, X. Zhang, X. Song, R. Liu, J. Zhang, and Z. Li, “The structure of TRPC ion channels,” Jun. 01, 2019, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.ceca.2019.03.005.
- [21] M. D. Cahalan, “STIMulating store-operated Ca(2+) entry,” *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 6, pp. 669–677, 2009, doi: 10.1038/NCB0609-669.
- [22] T. Hofmann, A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, and G. Schultz, “Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol,” *Nature*, vol. 397, no. 6716, pp. 259–263, Jan. 1999, doi: 10.1038/16711.
- [23] S. M. Bousquet, M. Monet, and G. Boulay, “Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 52, pp. 40534–40543, Dec. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.160051.
- [24] J. Shi *et al.*, “Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells,” *J Physiol*, vol. 561, no. Pt 2, pp. 415–432, Dec. 2004, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2004.075051.
- [25] K. Itsuki, Y. Imai, H. Hase, Y. Okamura, R. Inoue, and M. X. Mori, “PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels,” *J Gen Physiol*, vol. 143, no. 2, pp. 183–201, Feb. 2014, doi: 10.1085/JGP.201311033.
- [26] A. Wenjun Guo, Q. Tang, M. Wei, Y. Kang, J.-X. Wu, and L. Chen Correspondence, “Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites,” 2022, doi: 10.1016/j.neuron.2021.12.023.
- [27] L. Albarrán, N. Dionisio, E. Lopez, G. M. Salido, P. C. Redondo, and J. A. Rosado, “STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location,” *Biochem J*, vol. 463, no. 3, pp. 373–381, Nov. 2014, doi: 10.1042/BJ20140523.

- [28] A. Asanov *et al.*, “Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels,” *Cell Calcium*, vol. 57, no. 1, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1016/j.ceca.2014.10.011.
- [29] S. Bréchar, C. Melchior, S. Plançon, V. Schenten, and E. J. Tschirhart, “Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes,” *Cell Calcium*, vol. 44, no. 5, pp. 492–506, 2008, doi: 10.1016/j.ceca.2008.03.002.
- [30] V. Tedeschi *et al.*, “Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoform 1 (NCX1) and canonical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) are recruited by STIM1 to mediate Store-Operated Calcium Entry in primary cortical neurons,” *Cell Calcium*, vol. 101, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ceca.2021.102525.
- [31] S. Hirota, E. Pertens, and L. J. Janssen, “The reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger provides a source of Ca<sup>2+</sup> for store refilling following agonist-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 292, pp. 438–447, 2007, doi: 10.1152/ajplung.00222.2006.-Agonist-induced.
- [32] A. R. Ko and T. C. Kang, “TRPC6-mediated ERK1/2 phosphorylation prevents dentate granule cell degeneration via inhibiting mitochondrial elongation,” *Neuropharmacology*, vol. 121, pp. 120–129, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.05.004.
- [33] L. Tilokani, S. Nagashima, V. Paupe, and J. Prudent, “Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms,” Jul. 20, 2018, *Portland Press Ltd.* doi: 10.1042/EBC20170104.
- [34] Y. J. Kim and T. C. Kang, “The role of TRPC6 in seizure susceptibility and seizure-related neuronal damage in the rat dentate gyrus,” *Neuroscience*, vol. 307, pp. 215–230, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.054.
- [35] D. S. Kim, H. J. Ryu, J. E. Kim, and T. C. Kang, “The reverse roles of transient receptor potential canonical channel-3 and -6 in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus,” *Cell Mol Neurobiol*, vol. 33, no. 1, pp. 99–109, Jan. 2013, doi: 10.1007/s10571-012-9875-6.

- [36] S. Shekhar *et al.*, “Novel Mechanistic Insights and Potential Therapeutic Impact of TRPC6 in Neurovascular Coupling and Ischemic Stroke,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 4, pp. 1–15, Feb. 2021, doi: 10.3390/IJMS22042074.
- [37] L. Liu *et al.*, “TRPC6 Attenuates Cortical Astrocytic Apoptosis and Inflammation in Cerebral Ischemic/Reperfusion Injury,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, Feb. 2021, doi: 10.3389/fcell.2020.594283.
- [38] X. Chen, M. Lu, X. He, L. Ma, L. Birnbaumer, and Y. Liao, “TRPC3/6/7 Knockdown Protects the Brain from Cerebral Ischemia Injury via Astrocyte Apoptosis Inhibition and Effects on NF- $\kappa$ B Translocation,” *Mol Neurobiol*, vol. 54, no. 10, pp. 7555–7566, Dec. 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0227-2.
- [39] U. Saqib *et al.*, “Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) Channel in the Pathogenesis of Diseases: A Jack of Many Trades,” Aug. 01, 2023, *Springer*. doi: 10.1007/s10753-023-01808-3.
- [40] K. Lee, Y. Y. Jo, G. Chung, J. H. Jung, Y. H. Kim, and C. K. Park, “Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders,” Mar. 04, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fcell.2021.611773.
- [41] K. Griesi-Oliveira, A. M. Suzuki, and A. R. Muotri, “TRPC channels and mental disorders,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 976, Springer New York LLC, 2017, pp. 137–148. doi: 10.1007/978-94-024-1088-4\_12.
- [42] K. Quick *et al.*, “TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells,” *Open Biol*, vol. 2, no. MAY, 2012, doi: 10.1098/rsob.120068.
- [43] J. E. Sexton *et al.*, “The contribution of TRPC1, TRPC3, TRPC5 and TRPC6 to touch and hearing,” *Neurosci Lett*, vol. 610, pp. 36–42, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.052.
- [44] N. Alessandri-Haber, O. A. Dina, X. Chen, and J. D. Levine, “TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensi-

- zation,” *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 19, pp. 6217–6228, May 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0893-09.2009.
- [45] J. E. Roa-Coria *et al.*, “Possible involvement of peripheral TRP channels in the hydrogen sulfide-induced hyperalgesia in diabetic rats,” *BMC Neurosci*, vol. 20, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12868-018-0483-3.
- [46] J. Wang *et al.*, “The analgesic action of larixyl acetate, a potent TRPC6 inhibitor, in rat neuropathic pain model induced by spared nerve injury,” *J Neuroinflammation*, vol. 17, no. 1, Apr. 2020, doi: 10.1186/S12974-020-01767-8.
- [47] J. Zhou *et al.*, “Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses,” *Nat Neurosci*, vol. 11, no. 7, pp. 741–743, Jul. 2008, doi: 10.1038/nn.2127.
- [48] B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, and J. A. Peters, “Transient receptor potential cation channels in disease,” *Physiol Rev*, vol. 87, no. 1, pp. 165–217, Jan. 2007, doi: 10.1152/PHYSREV.00021.2006.
- [49] J. Rowell, N. Koitabashi, and D. A. Kass, “TRP-ing up heart and vessels: canonical transient receptor potential channels and cardiovascular disease,” *J Cardiovasc Transl Res*, vol. 3, no. 5, pp. 516–524, Oct. 2010, doi: 10.1007/S12265-010-9208-4.
- [50] H. Watanabe, M. Murakami, T. Ohba, K. Ono, and H. Ito, “The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease,” *Circ J*, vol. 73, no. 3, pp. 419–427, Mar. 2009, doi: 10.1253/CIRCJ.CJ-08-1153.
- [51] Y. Yamaguchi, G. Iribe, M. Nishida, and K. Naruse, “Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology,” *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 130, no. Pt B, pp. 264–272, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.PBIOMOLBIO.2017.06.010.
- [52] M. Malczyk *et al.*, “The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature,” *Front Immunol*, vol. 8, no. JUN, Jun. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.00707.

- [53] S. Geuna *et al.*, “Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration,” *Int Rev Neurobiol*, vol. 87, no. C, pp. 27–46, 2009, doi: 10.1016/S0074-7742(09)87003-7.
- [54] M. Schünke, E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014.
- [55] K.-J. Moll and M. Moll, *Anatomie*, 18. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2006.
- [56] M. Schünke, E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014.
- [57] K.-J. Moll and M. Moll, *Anatomie*, 18. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2006.
- [58] V. Carriel, I. Garzón, M. Alaminos, and M. Cornelissen, “Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering,” *Neural Regen Res*, vol. 9, no. 18, pp. 1657–1660, Sep. 2014, doi: 10.4103/1673-5374.141798.
- [59] Ó. D. García-García, V. Carriel, and J. Chato-Astrain, “Myelin histology: A key tool in nervous system research,” *Neural Regen Res*, vol. 19, no. 2, pp. 277–281, Feb. 2024, doi: 10.4103/1673-5374.375318.
- [60] J. H. Johnson and Y. Al Khalili, “Histology, Myelin,” *StatPearls*, May 2023, Accessed: Jan. 31, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541009/>
- [61] L. S. Premkumar and M. Abooj, “TRP Channels and Analgesia,” *Life Sci*, vol. 92, no. 8–9, p. 415, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.LFS.2012.08.010.
- [62] B. Miao *et al.*, “The implication of transient receptor potential canonical 6 in BDNF-induced mechanical allodynia in rat model of diabetic neuropathic pain,” *Life Sci*, vol. 273, p. 119308, May 2021, doi: 10.1016/J.LFS.2021.119308.

- [63] M. Kress, J. Karasek, A. V. Ferrer-Montiel, N. Scherbakov, and R. V. Haberberger, "TRPC channels and diacylglycerol dependent calcium signaling in rat sensory neurons," *Histochem Cell Biol*, vol. 130, no. 4, pp. 655–667, Oct. 2008, doi: 10.1007/S00418-008-0477-9.
- [64] Z. C. Sun *et al.*, "TRPC3/6 Channels Mediate Mechanical Pain Hypersensitivity via Enhancement of Nociceptor Excitability and of Spinal Synaptic Transmission," *Adv Sci (Weinh)*, vol. 11, no. 44, Nov. 2024, doi: 10.1002/ADVS.202404342.
- [65] L. D. True, "Quality control in molecular immunohistochemistry," *Histochem Cell Biol*, vol. 130, no. 3, pp. 473–480, Sep. 2008, doi: 10.1007/S00418-008-0481-0.
- [66] N. Ulfig, "Die histologischen Routinefärbungen," in *Kurzlehrbuch Histologie*, 4th ed., Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2015, ch. 14.1.2, p. 244.
- [67] R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*, 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2019.
- [68] G. Lang, "Behandlung der Schnitte vor der Färbung," in *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Aufl., Wien: Springer-Verlag, 2013, ch. 10.4, pp. 190–191.
- [69] G. et al. Aumüller, "Histologische Techniken," in *Duale Reihe Anatomie*, 2. Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010, ch. 2.3, pp. 69–72.
- [70] G. Lang, "Hämatoxylin - Eosin - Färbung," in *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Aufl., Wien: Springer-Verlag, 2013, ch. 10.6, pp. 197–204.
- [71] N. Ulfig, "Die Routinetechniken," in *Kurzlehrbuch Histologie*, 4th ed., Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2015, ch. 14.1.1, p. 244.
- [72] J. A. Ramos-Vara, "Technical aspects of immunohistochemistry," *Vet Pathol*, vol. 42, no. 4, pp. 405–426, Jul. 2005, doi: 10.1354/VP.42-4-405/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1354\_VP.42-4-405-FIG18.JPEG.

- [73] S. R. Shi, S. A. Imam, L. Young, R. J. Cote, and C. R. Taylor, “Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies,” *J Histochem Cytochem*, vol. 43, no. 2, pp. 193–201, 1995, doi: 10.1177/43.2.7822775.
- [74] G. Lang, “Immunhistochemie,” in *Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Aufl., Wien: Springer-Verlag, 2013, ch. 12, pp. 269–304.
- [75] I. Buchwalow, V. Samoiloova, W. Boecker, and M. Tiemann, “Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts,” *Sci Rep*, vol. 1, p. 28, 2011, doi: 10.1038/SREP00028.
- [76] G. Bussolati and R. T. Radulescu, “Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: A mandatory, yet also subtle measure,” *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, vol. 19, no. 5, p. 484, Oct. 2011, doi: 10.1097/PAI.0B013E318219A6E6.
- [77] J. Abdinghoff, D. Servello, T. Jacobs, A. Beckmann, and T. Tschernig, “Evaluation of the presence of TRPC6 channels in human vessels: A pilot study using immunohistochemistry,” *Biomed Rep*, vol. 16, no. 5, May 2022, doi: 10.3892/BR.2022.1525.
- [78] M. Walz, T. Tschernig, P. Schmidt, and J. M. Federspiel, “TRPC6-protein expression in the elderly and in liver disease,” *Ann Anat*, vol. 245, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.AANAT.2022.152016.
- [79] D. Servello, J. Abdinghoff, A. Grissmer, and T. Tschernig, “Transient receptor potential channel 6 in human skeletal muscle fibers: Investigation in fresh and conserved tissue samples,” *Biomed Rep*, vol. 17, no. 1, Jun. 2022, doi: 10.3892/BR.2022.1543.
- [80] J. M. Federspiel, J. Gartner, P. Lipp, P. Schmidt, and T. Tschernig, “Elderly with Varying Extents of Cardiac Disease Show Interindividual Fluctuating Myocardial TRPC6-Immunoreactivity,” *J Cardiovasc Dev Dis*, vol. 10, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/JCDD10010026.

- [81] F. Daum, F. Flockerzi, A. Bozzato, B. Schick, and T. Tschernig, "TRPC6 is ubiquitously present in lymphatic tissues: A study using samples from body donors," *Medicine international*, vol. 4, no. 6, Aug. 2024, doi: 10.3892/MI.2024.186.
- [82] A. Zissler, W. Stoiber, J. Geissenberger, P. Steinbacher, F. C. Monticelli, and S. Pittner, "Influencing factors on postmortem protein degradation for pmi estimation: A systematic review," *Diagnostics*, vol. 11, no. 7, p. 1146, Jul. 2021, doi: 10.3390/DIAGNOSTICS11071146/S1.
- [83] R. J. Pelstring, D. C. Allred, R. J. Esther, S. R. Lampkin, and P. M. Banks, "Differential antigen preservation during tissue autolysis," *Hum Pathol*, vol. 22, no. 3, pp. 237–241, Mar. 1991, doi: 10.1016/0046-8177(91)90156-J.
- [84] M. Werner, A. Chott, A. Fabiano, and H. Battifora, "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry," *Am J Surg Pathol*, vol. 24, no. 7, pp. 1016–1019, Jul. 2000, doi: 10.1097/00000478-200007000-00014.
- [85] J. D. Webster, M. A. Miller, D. Dusold, and J. Ramos-Vara, "Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 57, no. 8, p. 753, Aug. 2009, doi: 10.1369/JHC.2009.953877.
- [86] T. Boenisch, "Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation," *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, vol. 13, no. 3, pp. 283–286, Sep. 2005, doi: 10.1097/01.0000146524.74402.A4.
- [87] J. Bordeaux *et al.*, "Antibody validation," *Biotechniques*, vol. 48, no. 3, pp. 197–209, 2010, doi: 10.2144/000113382/ASSET/F2D13401-1A3F-4DE8-9050-8F84B9493E88/ASSETS/GRAPHIC/IBTN\_A\_12359344\_F0006.GIF.
- [88] A. D. Kistler *et al.*, "Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease," *J Biol Chem*, vol. 288, no. 51, pp. 36598–36609, Dec. 2013, doi: 10.1074/JBC.M113.488122.

- [89] “Anti-TRPC6 Antibody | KO Validated | Alomone Labs.” Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: [https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017?gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQjw-r-vBhC-%20ARIsAGgUO2CFeRTvIqbme9D66w7FrGaYj\\_IVAcPPJb9qXI8jCXOM5ijV\\_aoSw4aAqyWE%20ALw\\_wcB#citation](https://www.alomone.com/p/anti-trpc6/ACC-017?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw-r-vBhC-%20ARIsAGgUO2CFeRTvIqbme9D66w7FrGaYj_IVAcPPJb9qXI8jCXOM5ijV_aoSw4aAqyWE%20ALw_wcB#citation)
- [90] A. Bradbury and A. Plückthun, “Reproducibility: Standardize antibodies used in research,” *Nature* 2015 518:7537, vol. 518, no. 7537, pp. 27–29, Feb. 2015, doi: 10.1038/518027a.
- [91] J. A. Ramos-Vara *et al.*, “Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories,” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 20, no. 4, pp. 393–413, Jul. 2008, doi: 10.1177/104063870802000401/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_104063870802000401-FIG16.JPEG.
- [92] J. A. Ramos-Vara and M. A. Miller, “When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique,” *Vet Pathol*, vol. 51, no. 1, pp. 42–87, Jan. 2014, doi: 10.1177/0300985813505879/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_0300985813505879-FIG6.JPEG.
- [93] S. Libard, D. Cerjan, and I. Alafuzoff, “Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry,” *Histochem Cell Biol*, vol. 151, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2019, doi: 10.1007/S00418-018-1742-1/TABLES/2.
- [94] F. Varghese, A. B. Bukhari, R. Malhotra, and A. De, “IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. 96801, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096801.
- [95] K. R. Choudhury, K. J. Yagle, P. E. Swanson, K. A. Krohn, and J. G. Rajendran, “A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 95–107, Feb. 2010, doi:

- 10.1369/JHC.2009.953554/SUPPL\_FILE/CHOUDHURY\_ETAL\_953554AR1\_SF1\_20.PDF.
- [96] S. P. Zehntner, M. M. Chakravarty, R. J. Bolovan, C. Chan, and B. J. Bedell, “Synergistic tissue counterstaining and image segmentation techniques for accurate, quantitative immunohistochemistry,” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 56, no. 10, pp. 873–880, Oct. 2008, doi: 10.1369/JHC.2008.950345/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1369\_JHC.2008.950345-FIG3.JPEG.
- [97] M. Szejder *et al.*, “Metformin reduces TRPC6 expression through AMPK activation and modulates cytoskeleton dynamics in podocytes under diabetic conditions,” *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1866, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165610.
- [98] G. Rena, D. G. Hardie, and E. R. Pearson, “The mechanisms of action of metformin,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 9, pp. 1577–1585, Sep. 2017, doi: 10.1007/S00125-017-4342-Z/FIGURES/3.
- [99] A. W. Y. Chung, K. Au Yeung, E. Chum, E. B. Okon, and C. van Breemen, “Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein,” *Eur J Pharmacol*, vol. 613, no. 1–3, pp. 114–118, Jun. 2009, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2009.04.029.
- [100] D. Brookoff, “Chronic pain: 1. A new disease?,” *Hosp Pract*, vol. 35, no. 7, pp. 45–59, Jul. 2000, doi: 10.1080/21548331.2000.11444031.
- [101] W.D. Willis and Robert F. Schmidt, Eds., “Encyclopedia of Pain,” in *Encyclopedia of Pain*, vol. 1, Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 952. doi: 10.1007/978-3-540-29805-2.
- [102] E. G. Reed-Geaghan and S. M. Maricich, “Peripheral somatosensation: a touch of genetics,” *Curr Opin Genet Dev*, vol. 21, no. 3, pp. 240–248, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.GDE.2010.12.009.

- [103] W. Sun *et al.*, “Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats,” *Brain*, vol. 135, no. 2, pp. 359–375, Feb. 2012, doi: 10.1093/BRAIN/AWR345.
- [104] A. Saborido, F. Molano, G. Moro, and A. Megías, “Regulation of dihydropyridine receptor levels in skeletal and cardiac muscle by exercise training,” *Pflugers Arch*, vol. 429, no. 3, pp. 364–369, Jan. 1995, doi: 10.1007/BF00374151.
- [105] B. Wakefield and S. Penuela, “Potential Implications of Exercise Training on Pannexin Expression and Function,” *J Vasc Res*, vol. 60, no. 2, pp. 114–124, Sep. 2023, doi: 10.1159/000527240.
- [106] S. Zampieri *et al.*, “Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics,” *Physiol Rep*, vol. 4, no. 24, p. e13005, Dec. 2016, doi: 10.14814/PHY2.13005.
- [107] L. V. Zingman *et al.*, “Exercise-induced expression of cardiac ATP-sensitive potassium channels promotes action potential shortening and energy conservation,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 51, no. 1, p. 72, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.YJMCC.2011.03.010.
- [108] L. Woodrow, P. Sheppard, and P. F. Gardiner, “Transcriptional changes in rat  $\alpha$ -motoneurons resulting from increased physical activity,” *Neuroscience*, vol. 255, pp. 45–54, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.09.038.
- [109] P. L. Nisson *et al.*, “Focal motor weakness and recovery following chronic subdural hematoma evacuation,” *J Neurosurg*, vol. 141, no. 6, pp. 1739–1746, Jun. 2024, doi: 10.3171/2024.4.JNS24121.
- [110] B. Namer *et al.*, “Microneurographic assessment of C-fibre function in aged healthy subjects,” *Journal of Physiology*, vol. 587, no. 2, pp. 419–428, Jan. 2009, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2008.162941.
- [111] S. C. Jung, T. Zhou, and E. A. Ko, “Age-dependent expression of ion channel genes in rat,” *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, vol. 27, no. 1, pp. 85–94, Jan. 2023, doi: 10.4196/KJPP.2023.27.1.85.

- [112] G. Yu, M. Cheng, W. Wang, R. Zhao, and Z. Liu, “Involvement of WNK1-mediated potassium channels in the sexual dimorphism of blood pressure,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 485, no. 2, pp. 255–260, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.BBRC.2017.02.098.
- [113] P. S. Wong, R. E. Roberts, and M. D. Randall, “Sex differences in the role of transient receptor potential (TRP) channels in endothelium-dependent vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries,” *Eur J Pharmacol*, vol. 750, pp. 108–117, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2015.01.022.
- [114] Y. Sun, P. Sukumaran, B. C. Bandyopadhyay, and B. B. Singh, “Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons,” *Cells 2014, Vol. 3, Pages 455-475*, vol. 3, no. 2, pp. 455–475, May 2014, doi: 10.3390/CELLS3020455.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer TRPC-6 Untereinheit in Anlehnung an Tang et al. [19]	11
Abbildung 2: Homotetramerstruktur von TRPC-6 - Ansicht von oben auf die Zellmembran	12
Abbildung 3: Schema der TRPC-6 Regulation - ROCE (links) und SOCE (rechts)	14
Abbildung 4: Querschnitt Nerv	25
Abbildung 5: Präparation N. ulnaris	36
Abbildung 6: Präparation N. ischiadicus	37
Abbildung 7: Ablauf HE-Färbung	43
Abbildung 8: Schema IHC - Primärantikörper (rot) und Sekundärantikörper (grün)	44
Abbildung 9: Ablauf IHC Tag 1	47
Abbildung 10: Ablauf IHC Tag 2 (1)	49
Abbildung 11: Ablauf IHC Tag 2 (2)	50
Abbildung 12: Farblegende für die IHC-Auswertung	51
Abbildung 13: HE-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1	53
Abbildung 14: HE-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1	54
Abbildung 15: HE-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8	55
Abbildung 16: HE-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8	56
Abbildung 18: Negativkontrolle IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8	57
Abbildung 19: Negativkontrolle IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 5	58
Abbildung 21: IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 8	59
Abbildung 22: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ulnaris - Längsschnitt - Spender 8	60
Abbildung 23: IHC-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1	61
Abbildung 24: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ischiadicus - Längsschnitt - Spender 1	62
Abbildung 25: IHC-Färbung N. ulnaris - Querschnitt - Spender 8	63
Abbildung 26: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ulnaris - Querschnitt - Spender 8	64
Abbildung 27: IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8	65
Abbildung 28: Vergrößerung markierter Ausschnitt - IHC-Färbung N. ischiadicus - Querschnitt - Spender 8	66

## 8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Geräte</i>	27
<i>Tabelle 2: Verwendete Chemikalien</i>	28
<i>Tabelle 3: Verwendete Antikörper</i>	29
<i>Tabelle 4: Sonstige verwendete Materialien</i>	30
<i>Tabelle 5: Übersicht über die Körperspender</i>	32
<i>Tabelle 6: Gesundheitsdaten der Körperspender</i>	32
<i>Tabelle 7: NEP-Fixierung nach Weigner</i>	34
<i>Tabelle 8: Übersicht über die Stationen am Gewebeeinbettautomat</i>	38
<i>Tabelle 9: Übersicht über entnommene Proben (grün-entnommen und weiß-nicht entnommen)</i>	52
<i>Tabelle 10: IHC-Färbesignal aller Nerven im Vergleich</i>	74

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
bzw.	beziehungsweise
C	Zervikalsegment
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cm	Zentimeter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CREB	cAMP-response-element-binding protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP1	dynamamin-related-protein 1
ERK1/2	extracellular-signal-regulated-kinase 1/2
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
ggf.	gegebenenfalls
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung

---

IB4	Isolektin B4
IHC-Färbung	Immunhistochemische Färbung
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
l	Liter
L	Lumbalsegment
M.	Musculus
ml	Mililiter
Mm.	Musculi
N.	Nervus
NCX1	Natrium Calcium Exchanger 1
NEP	Nitritpökelsalz-Ethanol-Polyethylenglykol
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NGS	Normal Goat Serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nn.	Nervi
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
R.	Ramus
RNA	Ribonukleinsäure

---

---

Rr.	Rami
S	Sakralsegment
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOAR	Stim Orai activating region
STIM1	stromal interaction molecule 1
Th	Thorakalsegment
TRP	transient receptor potential
TRPA	transient receptor potential ankyrin
TRPC	transient receptor potential canonical
TRPM	transient receptor potential melastatin
TRPML	transient receptor potential mucolipin
TRPN	transient receptor potential NOMPC
TRPP	transient receptor potential polycystin
TRPV	transient receptor potential vanilloid
V.	Vena
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

---

## 10 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur wissenschaftlichen Veröffentlichung bei einem Journal eingereicht. Eine finale Publikation steht zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Dissertation jedoch noch aus.

Eingereicht als:       TRPC6 in human peripheral nerves – An investigation using immunohistochemistry (Raming C, Meier C, Tschernig T)

## 11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank den Menschen, die ihren Körper nach ihrem Ableben der Wissenschaft zu Verfügung stellen. Ihre selbstlose Entscheidung ermöglicht wertvolle Erkenntnisse und trägt maßgeblich zum medizinischen Fortschritt bei. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Tschernig, der mir das Thema dieser Doktorarbeit bereitgestellt hat. Insbesondere danke ich ihm für die stets schnellen Antworten auf meine Fragen sowie für seine konstruktive Unterstützung während der Arbeit. Das ist keinesfalls selbstverständlich.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen der Prosektur Irina Scheck und Katja Schäfer bedanken, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken – für ihre bedingungslose Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg und insbesondere während meines Studiums. Ihr Rückhalt und Vertrauen in mich haben mir immer Kraft gegeben. Ihr sowohl moralischer als auch praktischer Beistand hat somit einen wichtigen Teil zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

## **12 Lebenslauf**

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